



ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL

**Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la
Producción**

**“Validación de método de screening para la cuantificación de
residuos de antibióticos tetraciclinas en leche cruda.”**

PROYECTO DE TITULACIÓN

Previo a la obtención del Título de:

**MAGISTER EN GESTION DE PROCESOS Y SEGURIDAD DE
LOS ALIMENTOS**

Presentado por:

Andrea Galarza Carrión

GUAYAQUIL –ECUADOR

Año: 2021

AGRADECIMIENTO

A Dios, a mi familia, por ser el apoyo incondicional en cada momento de mi vida, por ser el motivo de inspiración para cumplir con este objetivo propuesto, a la Ph.D. Ximena Yépez, mi tutora del proyecto de titulación por ser mi guía durante este tiempo, Ph.D. Arturo Sócrates por su valiosa ayuda en mi proyecto. Al Laboratorio de Análisis Químico y Microbiológico de Alimentos de la Subsecretaría de Calidad e Inocuidad y a todo su personal predispuesto; a la MSc. Fernanda Hurtado Ángulo por la predisposición, por compartir sus conocimientos y ayuda en todo momento, al Laboratorio de lácteos.

DEDICATORIA

Dedicado principalmente a Dios por darme la fortaleza para cumplir con mi objetivo, por poner personas correctas en mi vida, a Rosa Maribel Carrión, mi madre por ser quién estuvo impulsándome a superarme día a día y poder cumplir uno de sus sueños tan anhelados, a mi esposo, mi hija, mi papá, mis hermanos y mis suegros, por ser el pilar principal de apoyo constante en los momentos difíciles, tristes y alegres de la vida, a mis amigos que la vida me ha regalado.

Andrea

TRIBUNAL DE TITULACIÓN

Ximena Yépez P., Ph. D
DIRECTOR DE PROYECTO

A. Sócrates Palacios P., Ph.D.
VOCAL

DECLARACIÓN EXPRESA

“La responsabilidad del contenido de este trabajo de titulación, me corresponden exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL”

Andrea Carolina Galarza Carrión

RESUMEN

Hoy en día el uso indiscriminado de antibióticos en las haciendas ganaderas es una preocupación a nivel mundial tanto para las industrias como la salud pública. Los antibióticos se utilizan para el tratamiento de infecciones y enfermedades del ganado especialmente la mastitis. Existen entes regulatorios nacionales como es el INEN, ARCSA y Agrocalidad, que realizan constantes inspecciones y controles en las haciendas ganaderas, centros de acopio e industrias, para dar cumplimiento a las normativas establecidas y los límites máximos de residuos de antibióticos en leche, con el fin de precautelar la salud del consumidor. Internacionalmente el Codex ha establecido que el límite máximo de antibióticos para tetraciclinas en leche es 100 ppb, este análisis se realiza con métodos de detección rápidos en la industria láctea. Es importante para las industrias aplicar técnicas y métodos valederos que permitan discernir la adulteración de una materia prima obteniendo resultados en menor tiempo, cumpliendo estándares y normativas vigentes para el sector lácteo. El método analítico rápido utilizado en este trabajo se basa en la tecnología de inmunocromatografía en la cual se obtiene el resultado de detección y discriminación de los antibióticos específicos en un tiempo máximo de 9 minutos.

El objetivo general de este trabajo es validar el método de screening para verificar el desempeño en la cuantificación de residuales de antibióticos tetraciclinas, para el aseguramiento de la calidad en la recepción de leche cruda en las industrias lácteas. Esta validación permite dar la confianza en la detección de antibióticos como tetraciclina, oxitetraciclina y clortetraciclina y el cumplimiento de los rangos máximos permitidos de residuos de antibióticos según el Codex. Se utilizó la técnica de cromatografía líquida de alta resolución para identificar y cuantificar los antibióticos en leche, como método confirmatorio. Para este análisis fue necesario realizar la fortificación de muestras de leche con los antibióticos de estudio en varias concentraciones y se comparó con la detección del método analítico rápido. Además, se determinó las características de desempeño como son: el límite de detección, selectividad, especificidad, falsos positivos y negativos.

Los resultados obtenidos en la validación del método analítico rápido satisfacen las características de desempeño establecidas por la "Guía de validación de métodos de laboratorios" de la organización europea Eurachem. El método analítico rápido presentó un límite de detección de 25 ppb por debajo del nivel máximo permitido de residuos que es 100 ppb según el Codex, lo cual garantiza la seguridad del uso y aplicación en la recepción de leche cruda en las industrias. Además, este método presenta selectividad y especificidad para los analitos establecidos, ya que en la aplicación de las pruebas con y sin el analito de interés respondió satisfactoriamente. Así mismo, se realizó la aplicación y seguimiento de los resultados del método analítico rápido en la recepción de leche cruda. En este caso no se presentaron resultados positivos en antibióticos tetraciclinas, para los litros recibidos durante 8 meses de seguimiento en una industria láctea. Estos resultados dan cumplimiento a los niveles por debajo de los límites máximos de residuos permitidos según las normativas nacionales e internacionales.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN.....	II
ÍNDICE GENERAL	III
ABREVIATURA	V
SIMBOLOGÍA	VI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VII
ÍNDICE DE TABLAS.....	VIII
CAPÍTULO 1	
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Presencia De Antibióticos En Leche	1
1.2. Regulaciones.....	2
1.3. Antibióticos En Leche	2
1.4. Resistencia Microbiana.....	5
1.5. Métodos de análisis de antibióticos	6
1.5.1. Método Elisa.....	7
1.5.2. Kit de método analítico rápido de residuos de antibióticos beta-lactámicos, sulfonamidas, tetraciclinas.....	8
1.6. Características de desempeño de la Validación de un método.....	9
1.7.1. Definiciones.....	9
1.7. Estado de la Situación Actual	11
1.8. Planteamiento del problema	12
1.9. Objetivo general y específicos	12
CAPÍTULO 2	
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
2.1. Equipos	13
2.2. Estándares y reactivos	13
2.3. Preparación de soluciones.....	14
2.3.1. Solución de trabajo o intermedia 5000 ppb.....	14
2.3.2. Solución Buffer McIlvaine EDTA 0.01 M	14
2.3.3. Solución fase móvil.....	14
2.3.4. Diseño Experimental.....	14
2.4. Cromatografía líquida alta resolución (HPLC-DAD)	15
2.4.1. Proceso de Extracción de muestras	15
2.4.2. Análisis HPLC.....	15
2.5. Control de Calidad de Muestras.....	15
2.6. Análisis rápido	16
2.7. Método de Validación	17
CAPÍTULO 3	
3. RESULTADOS Y DISCUSION	19
3.1. Cuantificación de antibióticos	19
3.2. Límite de Detección	22

3.3. Selectividad	24
3.4. Especificidad	25
3.5. Determinación Falsos Positivos y Falsos Negativos	27
3.6. Resultados de Aplicación del método analítico rápido en muestras de leche cruda.....	28
CAPÍTULO 4	
4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	30
4.1. Conclusiones.....	30
4.2. Recomendaciones	30
BIBLIOGRAFÍA	
ANEXOS	

ABREVIATURA

ARCSA	Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria
CAC	Comisión del Codex Alimentarius
ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos
JECFA	Expertos en Aditivos Alimentarios y Contaminantes
LMR	Límite máximo de residuos
INEN	Instituto Ecuatoriano de Normalización
OMS	Organización Mundial de la Salud
RAM	Resistencia Antimicrobiana
UE	Unión Europea
OT	Oxitetraciclina
TC	Tetraciclina
CT	Clortetraciclina

SIMBOLOGÍA

β	Beta
°C	Grados centígrados
HR	Horas
Kg	Kilogramos
min	minutos
mg	miligramos
ng	nanogramos
ml	mililitros
l	litros
ppb	partes por billón
ppm	partes por millón
ul	microlitros
ug	microgramos

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1.1 Estructura Química de las tetraciclinas	4
Figura 1.2 Estructura Química de los antibióticos	4
Figura 1.3 Mecanismo de resistencia bacteriana	5
Figura 1.4 Diagrama de interpretación de resultados de tirillas	9
Figura 1.5 Determinación de linealidad de un analito	10
Figura 2.1 Método analítico rápido para detección de antibióticos Beta-lactámicos, sulfonamidas, tetraciclinas utilizado kit 3IN1BST (Shenzhen Bioeasy Biotechnology Co., Ltd, Shenzhen, R. P. China	16
Figura 3.1 Cromatograma de curva de calibración estándar para antibiótico oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina en HPLC	19
Figura 3.2 Curvas de calibración estándar para antibióticos utilizando HPLC-DAD. a) oxitetraciclina, b) tetraciclina, c) clortetraciclina, con rango de cuantificación entre 25 y 350 ppb	20
Figura 3.3 Gráfico determinación límite de detección del método analítico rápido ..	23
Figura 3.4 Capacidad de detección del método analítico rápido	23
Figura 3.5 Gráfico de la cantidad de litros mensuales recibidos por proveedor y las pruebas de antibiótico aplicadas por proveedor	28
Figura 3.6 Gráfico del número de pruebas de antibiótico aplicadas por proveedor ..	29

ÍNDICE DE TABLAS

		Pág.
Tabla 1	Ejemplos de kits de elisa disponibles comercialmente	7
Tabla 2	Interpretación de resultados de la tirilla del método analítico rápido.....	8
Tabla 3	Porcentaje de recuperación del análisis de oxitetraciclina, tetraciclina y clortetraciclina utilizando hplc-dad	21
Tabla 4	Resultados determinación antibióticos oxitetraciclina, tetraciclina y clortetraciclina en hplc vs kit rápido de detección 3in1bst	22
Tabla 5	Resultados de muestras fortificadas con antibióticos oxitetraciclina, tetraciclina y clortetraciclina mediante el método analítico rápido 3in1bst bioeasy	23
Tabla 6	Resultados de análisis de leche cruda enriquecida con antibióticos (cloranfenicol, tetraciclina) para determinar la selectividad del método screening (kit 3in1bst bioeasy).....	24
Tabla 7	Resultados determinación de selectividad.....	25
Tabla 8	Resultados de análisis con antibiótico cloranfenicol para la determinación de especificidad del método mediante kit 3in1bst bioeasy	26
Tabla 9	Resultados determinación de especificidad.....	26
Tabla 10	Resultados de análisis de muestras fortificadas en 100 ppb de antibióticos oxitetraciclina, tetraciclina y clortetraciclina mediante método analítico rápido con el kit 3in1bst	27
Tabla 11	Resultados determinación falsos positivos y falsos negativos.	27

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

Hoy en día una de las preocupaciones en la salud a nivel mundial es la resistencia antimicrobiana por el uso desmedido e inadecuado de antibióticos. Esto ha hecho perder la efectividad ante diversos microorganismos para combatir enfermedades, e infecciones bacterianas en las granjas. El uso constante de antibióticos en el ganado lechero ha provocado esta resistencia microbiana en las especies de ganadería, desde su crianza hasta finalmente la obtención de la leche y sus derivados del ganado. Al existir un uso desmedido de antibióticos se crean residuos que pueden ser transmitidos posteriormente al ser humano mediante la cadena alimentaria, si no son detectados en su debido tiempo.

1.1. Presencia de antibióticos en leche

El consumo de leche en un plan alimentario representa un lugar muy importante en la nutrición de los seres vivos en cada una de sus etapas de desarrollo, aporta proteínas, carbohidratos, lípidos, vitaminas, minerales además es rica fuente de calcio. Su consumo directo y derivados como queso, yogurt, mantequilla, está incluido en la dieta diaria de la población. Por lo tanto, la exigencia de estándares de calidad e inocuidad de los productos en las industrias es alta.

A nivel mundial la mayor producción de leche proviene de la vaca. Es una preocupación para las autoridades el establecimiento y cumplimiento de normas por parte de personas involucradas directamente con la extracción, venta y producción de la leche del ganado bovino ya que se ve comprometida la salud de los consumidores (Santillan-urquiza, 2016).

El uso de antibióticos es frecuentemente aplicado en la práctica veterinaria como medicina para prevenir, tratar enfermedades e infecciones en el ganado incluso como promotor de crecimiento, también usados como aditivos alimentarios para el aumento de eficiencia de piensos. Una de las enfermedades más comunes que afectan al ganado es la mastitis bovina, neumonía, diarrea bacteriana, y artritis bacteriana.

El uso reiterado de antibióticos puede dar lugar a la presencia de residuos en los productos animales, como la carne bovina, leche, entre otros alimentos. Debido al incumplimiento de los productores en los protocolos del tratamiento, manejo animal y lo que con lleva al tiempo de espera o cuarentena, después de la aplicación, pueden estos llegar mediante la cadena alimentaria al consumo de los seres vivos si no es detectado. Provocando problemas de salud, alergias, hipersensibilidad en la flora bacteriana, aparición de microorganismos resistentes, efectos inmunopatológicos entre otras patologías dependiendo del nivel de exposición y consumo (Kantiani et al., 2009).

En la industria láctea se presentan problemas en la producción de lácteos y sus derivados. En la elaboración de mantequilla y el yogurt se ven alteradas las características organolépticas como el aroma, además de la reducción de la acidez. En la elaboración de quesos se dificulta la maduración ya que disminuye la retención de agua, donde se origina una textura blanda y sabor no característico amargo. Otros de los efectos no deseable durante el proceso de elaboración de yogurt es la no

fermentación. Las bacterias que son adicionadas como cultivos son muy sensibles a los antibióticos, por lo tanto se presentan cambios morfológicos, donde se pueden dar situaciones en que los cultivos iniciadores sean reemplazados por microorganismos no deseados, pudiendo convertirse en un peligro para el consumo de la población llegando muchas veces a la eliminación del producto y esto generando pérdidas económicas a los pequeños y grandes productores en la industria (Guerrero & G, 2009).

1.2. Regulaciones

En la actualidad es una prioridad garantizar la seguridad e inocuidad de los alimentos para los consumidores e industrias productoras. Por lo tanto, se han creado organismos como el Codex Alimentarius (CODEX), Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), la Unión Europea (UE), la Organización Mundial de la Salud (OMS) principales entes responsables y encargados de realizar evaluaciones y seguimiento de riesgos, cuyos resultados de análisis y datos científicos permiten establecer las normas internacionales, límites máximos de residuos (LMR) en los alimentos. Bajo todo el estudio científico se establecen directrices y códigos de prácticas internacionales con el objetivo de dar confianza a los consumidores en que los productos alimentarios son saludables y de calidad.

Dentro de nuestro país existe el Servicio Ecuatoriano de Normalización (INEN) responsable de establecer las normas, parámetros fisicoquímicos y requisitos para el cumplimiento de alimentos aptos para el consumo humano, la Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria (Arcsa) como ente regulador para aplicar mecanismos de prevención y protección de los alimentos, además de la Agencia de control y regulación para la protección y el mejoramiento de la sanidad animal, sanidad vegetal e inocuidad alimentaria (Agrocalidad) . Responsables de dar el seguimiento desde el campo agrícola hasta la industria verificando el cumplimiento de las normativas y que se cumpla estos LMR permitidos para cumplir con la calidad e inocuidad de productos como los lácteos en la industria.

Según el Servicio Ecuatoriano de Normalización (INEN) dentro de la Norma técnica ecuatoriana establece que los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios serán los que determine el Codex Alimentario. En efecto, debido a la preocupación mundial que existe sobre la resistencia microbiana, y lo que implica la presencia de residuos de medicamentos veterinarios en los animales y como consecuencia se vea afectada la salud de la población por su consumo. Se realizan estudios y por ende actualizaciones constantes de LMR, la comisión del Codex Alimentarius (CAC), la Unión Europea (UE) y otras agencias reguladoras de todo el mundo han aplicado LMR de antibióticos en los alimentos de origen animal para garantizar su presencia limitada y de esta manera restringir el uso sin control de medicamentos veterinarios prohibidos en las prácticas agrícolas y ganaderas. Las cantidades de residuos en los alimentos deben ser inocuos para los consumidores y lo más bajas posibles (COMISION DEL CODEX ALIMENTARIUS, 2018). Por tal motivo el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios y Contaminantes (JECFA), en su 41° periodo de sesiones de la CAC realizaron la actualización de los LMR para residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos (COMISION DEL CODEX ALIMENTARIUS, 2018).

1.3. Antibióticos en leche

La leche cruda es definida como el producto de la secreción mamaria normal de animales bovinos lecheros, obtenida a partir del ordeño higiénico de vacas sanas, sin adición ni sustracción alguna, exento de calostros y libre de materias extrañas a su

naturaleza, destinada a un tratamiento posterior previo a su consumo (Ecuatoriana & Requisitos, 2012).

La presencia de residuos de antibióticos en la leche representa un riesgo potencial para la salud de los consumidores, puesto que son usados frecuentemente en las prácticas agrícolas para precautelar la salud y bienestar de los animales. Los antibióticos más comúnmente usados son los β -lactámicos y tetraciclinas, ya que son agentes antibacterianos sintéticos aplicados para el tratamiento y prevención de infecciones. Los antibióticos realizan su acción bactericida de diferentes formas y mecanismos, como por ejemplo la alteración o inhibición de la síntesis a la pared celular del microorganismo (Mónica Cartelle Gestal, 2014). En este caso se hace más vulnerable a las diferencias de presión osmótica con el exterior provocando un nivel de estrés a la célula o una lisis celular lo cual la lleva a la muerte. Además, se produce una interferencia en los diversos componentes de la membrana celular, como la síntesis de ácidos nucleicos y ácido fólico, incluso la síntesis de las proteínas microbianas (Mónica Cartelle Gestal, 2014).

La función de los β -lactámicos es la inhibición de la síntesis de la pared bacteriana constituida por peptidoglucanos, el sitio de acción es la muramoylpentapeptido carboxipeptidasa, enzima indispensable para el entrecruzamiento de la pared celular bacteriana. Presenta efectos adversos a la salud si es consumido como: erupciones maculopapulares, urticaria, fiebre, broncoespasmo, vasculitis, enfermedad del suero, dermatitis exfoliativa, síndrome de Stevens-Johnson y anafilaxia (Guerrero & G, 2009). Los β -lactámicos más usados como medicamentos veterinarios son la amoxicilina, penicilina, ampicilina pues tienen alta actividad antimicrobiana los límites máximos de residuos según el Codex Alimentarius para los antibióticos antes mencionados es 4 ug/kg y para ceftiofur 100 ug/L.

Las Tetraciclinas son antibióticos anfóteros que forman sales cristalinas con ácidos y bases. Utilizadas ampliamente para el tratamiento de la mastitis bovina los cuales se añaden en cantidades o niveles subterapéuticos a los piensos del ganado para la profilaxis (De et al., 1998). Responsables de actuar sobre los ribosomas de las bacterias, tienen efecto sobre gran cantidad de bacterias gram positivas y negativas, aerobias y anaerobias, micoplasmas, rickettsias, clamidias y espiroquetas. Las reacciones adversas por su consumo consisten en irritaciones digestivas por administración oral: molestia por dolor epigástrico y abdominal, náuseas, vómitos y diarreas, además se puede producir en el ser humano fotosensibilidad por exposición al sol, toxicidad hepática o renal (Guerrero & G, 2009). Según el Codex Alimentarius los niveles máximos de residuos en leche para el grupo de las tetraciclinas son 100 ug/L (ppb) para Clortetraciclina, oxitetraciclina y tetraciclinas.

Cloranfenicol es un agente antimicrobiano de amplio espectro adecuado para el tratamiento de una variedad de organismos infecciosos, de alta eficiencia y de bajo costo usado especialmente para el tratamiento de la mastitis en el ganado vacuno, responsable de producir anemia aplásica en un pequeño porcentaje de seres humanos expuestos al fármaco (De et al., 1998). Según el Codex Alimentario en las conclusiones de la JECFA basadas en la información científica, no existe un nivel seguro de residuos o sus metabolitos en los alimentos, que represente un riesgo aceptable para los consumidores. Esto puede lograrse a través de la prohibición del uso de este medicamento en animales productores de alimentos (COMISION DEL CODEX ALIMENTARIUS, 2018). Por esta razón, las autoridades competentes deberían prevenir la presencia de residuos del cloranfenicol en los alimentos, debería prohibirse su venta y comercialización.

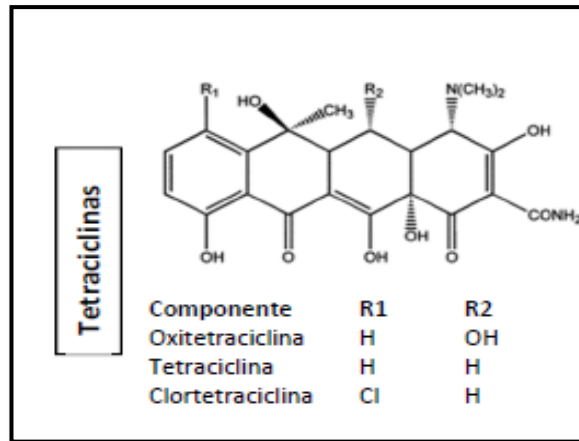


Figura 1.1 Estructura Química de las tetraciclinas

Fuente: (La Rosa Zambrano, 2016)

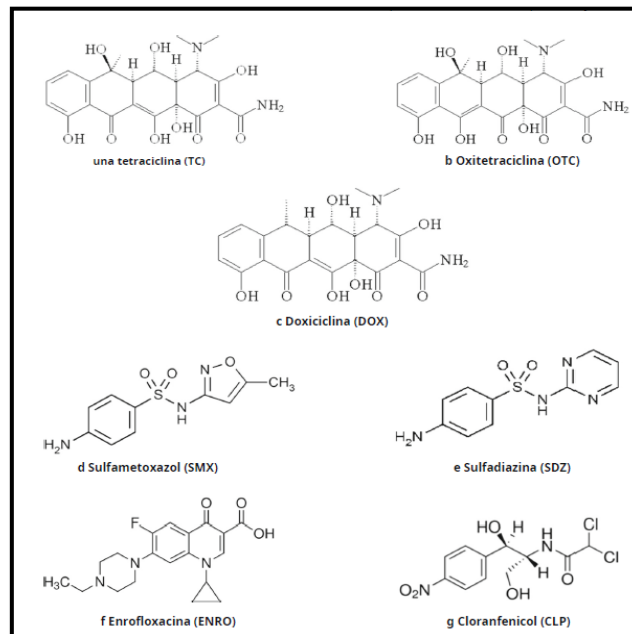


Figura 1.2 Estructura Química de los antibióticos

Fuente: (Moudgil, 2019).

1.4. Resistencia microbiana

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la resistencia a los antimicrobianos (RAM) surge cuando las bacterias, los virus, los hongos y los parásitos cambian a lo largo del tiempo y dejan de responder a los medicamentos, lo que hace más difícil el tratamiento de las infecciones e incrementa el riesgo de propagación de enfermedades graves incluso la muerte, pues los antibióticos y otros medicamentos antimicrobianos se vuelven ineficaces, por lo que las infecciones son cada vez más difíciles o imposibles de tratar.

La resistencia bacteriana se produce cuando el germen modifica la proteína diana, y cambia su función o produce enzimas distintas. Existen varios mecanismos que las bacterias han desarrollado para resistir la acción de los antibióticos. Uno de ellos es la posición de un sistema de expulsión activa del antimicrobiano, una especie de bomba expulsora que utilizan las bacterias para la excreción de productos residuales o tóxicos, mediante el cual se pueden eliminar los agentes antimicrobianos. El segundo mecanismo es la disminución de la permeabilidad de la pared bacteriana, con la pérdida o modificación de los canales de entradas (porinas), el tercer mecanismo es la producción de enzimas inactivantes de los antibióticos, de tal modo son inhibidos los aminoglucósidos y cloranfenicol por la acetil transferasa y las beta lactamasas a los β - lactamicos (Cor et al., 2003).

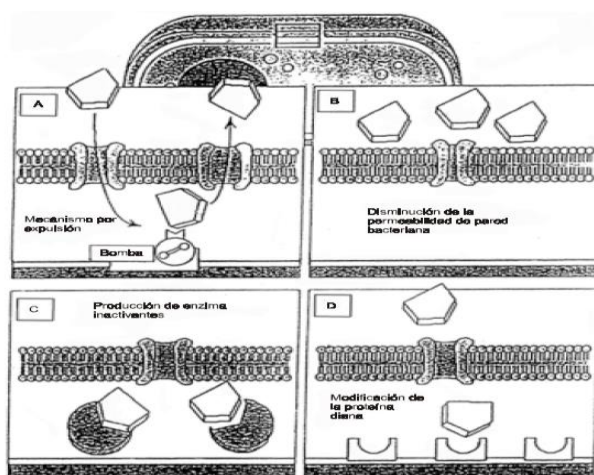


Figura 1.3 Mecanismo de resistencia bacteriana

Fuente: (Cor et al., 2003).

Los principales factores que mantienen en auge a nivel mundial la resistencia a los antimicrobianos se encuentran, el uso indebido y excesivo de antimicrobianos; el uso de agua limpia, saneamiento e higiene, tanto para las personas como para los animales; medidas deficientes de prevención y control de las enfermedades y las infecciones en los centros de atención de salud y las explotaciones agrícolas; el acceso deficiente a medicamentos, vacunas y medios de diagnóstico asequibles y de calidad; la falta de sensibilización y conocimientos; y el incumplimiento de las normativas y leyes que se deben respetar y aplicar conscientemente.

El compromiso y la participación de los gobiernos es clave para el desarrollo y cumplimiento de este plan que incluye cinco acciones principales: concienciar y sensibilizar a la población sobre el uso y manejo adecuado de los antibióticos para de esta forma evitar la resistencia a los antimicrobianos; mejorar la vigilancia y la investigación; reducir la propagación de las infecciones mediante medidas eficaces de

saneamiento, higiene y prevención de las infecciones; optimizar el uso de antibióticos en la atención de la salud humana y animal, aumentar la innovación y la inversión (Perez, 2017). Además, la OMS solicita incrementar los esfuerzos para intensificar la vigilancia e implementar protocolos para la detección oportuna de mecanismos emergentes de resistencia, así como intensificar medidas de prevención y control de infecciones.

1.5. Métodos de análisis de antibióticos

Poder identificar y cuantificar antibióticos presentes en leche es una de las tareas importantes dentro de la industria de alimentos, permite asegurar la calidad e inocuidad de los productos. Es una necesidad para las industrias la implementación de métodos rápidos para antibióticos que permitan detectar los analitos y residuos presentes en la recepción de leche cruda para aceptar o rechazar inmediatamente esta materia prima.

Existen distintos métodos de detección y cuantificación de antibióticos presentes en la leche. Muchos de ellos dependen del costo, la rapidez de respuesta o detección, la especificidad o identificación del analito objetivo, por lo tanto, esto determina su selección para el fin propuesto. Los métodos identificativos o de confirmación, denominados métodos de screening o de criba cuya función principal es detectar de una manera rápida la presencia o ausencia del analito de interés en una determinada muestra, además que están realizados o diseñados para evitar falsos negativos, positivos (Riera, 2010). Son semicuantitativos ya que detectan niveles de acuerdo con el LMR y sustancias específicas o familias de antimicrobianos. Se clasifican en inmunoenzimático como ELISA, Radioinmunoensayo-RIA-, Penzym y los métodos de unión de receptores como Charm, Beta-Star y Snap, (En et al., 2009) , y los de unión de antígeno anticuerpo como el 3IN1 BST Bioasy.

También existen los métodos de confirmación que determinan la presencia en cantidades exactas y precisas de sustancias antimicrobianas mediante métodos fisicoquímicos cuantificando las concentraciones determinadas en ppb, entre estos están la cromatografía de gases (CG), la cromatografía en capa fina (TLC), espectrofotometría de masa, cromatografía líquida (HPLC). Son las metodologías más recomendadas por su elevada capacidad de cuantificación, especificidad y sensibilidad siendo la más usada. Una de las principales desventajas es el elevado costo de aplicación, tiempo y los tipos de reactivos químicos que deben ser usados.

La cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) en la química analítica es una herramienta de alto desempeño ya que tiene la capacidad de separar, identificar y cuantificar los analitos presentes en los productos alimenticios. Es un proceso automatizado con alta especificidad, sensibilidad, precisión y la obtención de resultados se logra en 13 minutos aproximadamente por muestra. Tiene variedad de fases móviles, la disponibilidad de una amplia gama de empaquetaduras de columnas y la variación de modos de operación son las que representan alta demanda en su uso (Moudgil, 2019). Tiene gran aplicabilidad en la determinación de sustancias de gran interés en la industria y distintos campos de la ciencia, como ácidos nucleicos, aminoácidos, hidrocarburos, carbohidratos, drogas, terpenoides, plaguicidas, antibióticos, esteroides.

1.5.1. Método Elisa

Es un método inmunológico específico para el tipo de analito de estudio, presenta ventajas como la rapidez para determinar un resultado además de la cantidad de muestras que pueden ser analizadas de forma simultánea, altamente sensible y específico el sistema de detección es mediante lectura espectrofotométrica. La técnica consiste en ensayos con inmunosorbentes ligados a una enzima el cual consiste en la reacción de antígeno- anticuerpo la interacción que existe entre ambas es muy específica y útil en la detección de residuos químicos y medicamentos veterinarios que se pueden encontrar en los alimentos de origen animal. Los límites de detección dependerán de la extracción y limpieza que se realice a la muestra la misma que dependerá del tipo de muestra analizar, puede la preparación de la muestra iniciar desde una dilución con una solución tampón hasta una hidrólisis enzimática y una extracción en fase sólida (Riera, 2010). El método consiste en la unión entre el metabolito de la muestra y el conjugado medicamento-enzima en la cual se da la unión al anticuerpo específico. Posteriormente se da un proceso de incubación en el que los reactivos no unidos son eliminados en el lavado. Se agrega el conjugado enzimático y el sustrato cromógeno lo que da la coloración. Finalmente, la intensidad del color se da por lectura espectrofotométrica.

En la tabla 1 se detalla los tipos de kits de Elisa que pueden ser usados dependiendo del tipo de residuo en estudio.

Tabla 1
Ejemplos de kits de Elisa disponibles comercialmente.

TIPO DE RESIDUO	GRUPO	PRINCIPAL SUSTANCIA A DETECTAR	LÍMITE DE DETECCIÓN (ng/ml)
Estrógenos	A1	Dietilestibestrol	0.2
Esteroides	A3	Trembolona	0.5
Lactonas del ácido resorcilico	A4	Zaranol	0.25
β -agonistas	A5	Clembuterol	0.3
Antibióticos	A6	Cloranfenicol	0.5
Antibióticos	B1	Sulfonamidas	0.5
Antibióticos	B1	Tilosina	5.0
Antibióticos	B1	Gentamicina	1.5
Corticoides	B2f	Dexametasona	2.5

Fuente: (Riera, 2010)

1.5.2. Kit de método analítico rápido de residuos de antibióticos beta-lactámicos, sulfonamidas, tetraciclinas

Es un método analítico rápido de detección y discriminación de Beta-lactámicos, sulfonamidas y tetraciclinas en leche. El método de detección consiste en el principio de la inmunocromatografía de oro coloidal y la utilización de dos anticuerpos. El primer anticuerpo de recubrimiento que puede unirse y actuar con un antígeno, y el segundo anticuerpo de captura que se encuentra adherido en la tirilla que contiene una membrana indicadora de nitrocelulosa (Yu et al., 2018). El proceso se efectúa por medio del fenómeno denominado capilaridad donde los fluidos suben por medio de la tirilla donde se representa la coloración por la interacción que se forma entre los anticuerpos y el antígeno en una determinada muestra con el analito de estudio.

Tiene un tiempo aproximado de duración de 9 minutos hasta la obtención del resultado. La interpretación de los resultados se basa en tres aspectos que se detalla a continuación:

- Si se realiza la verificación visual, se debe observar si la línea de control superior (línea C) está presente.
- Si hay una línea C normal, se debe comparar la intensidad del color de la línea Test (línea T) y la línea C.
- Si no existe una línea C visible, la prueba se considera inválida, se muestra en la figura 1.4 a

Los resultados de la prueba pueden ser interpretados de acuerdo con la tabla 2 y la figura 1. 4.a. Al realizar la lectura de la tirilla mediante el lector como se muestra en la figura 1.4.b, se debe establecer los resultados de negativo (coloración verde), débil positivo (coloración amarilla) y fuerte positivo (coloración roja), de acuerdo con el valor R (resultado) como se muestra en la tabla 2. El valor R es un número que equivale al nivel de detección en un rango de 0 a > 1.1 proporcionado por el equipo. Siendo los números > 1.1 correspondiente a un resultado negativo y los valores < 0,9 positivos (coloración roja), que indican la presencia de antibióticos en la muestra analizada.

Tabla 2
Interpretación de resultados de la tirilla del método analítico rápido

LÍNEA TEST (T) VS LÍNEA CONTROL ©	RESULTADO	RESULTADO DE ANÁLISIS	INTERPRETACIÓN EN LECTOR VALOR R- PROPORCIÓN
Negativo	T > C	La muestra de leche no contiene antibióticos o contiene antibióticos en el nivel inferior que los límites de detección.	R > 1,1
Débil Positivo	T = C	La muestra de leche contiene antibióticos cerca del límite de detección.	0,9 ≤ R ≤ 1,1
Positivo	T < C O no T	La muestra de leche contiene antibióticos cerca del límite de detección	R < 0,9

*R= resultado

Fuente: (instructivo de método 3IN1 BST)

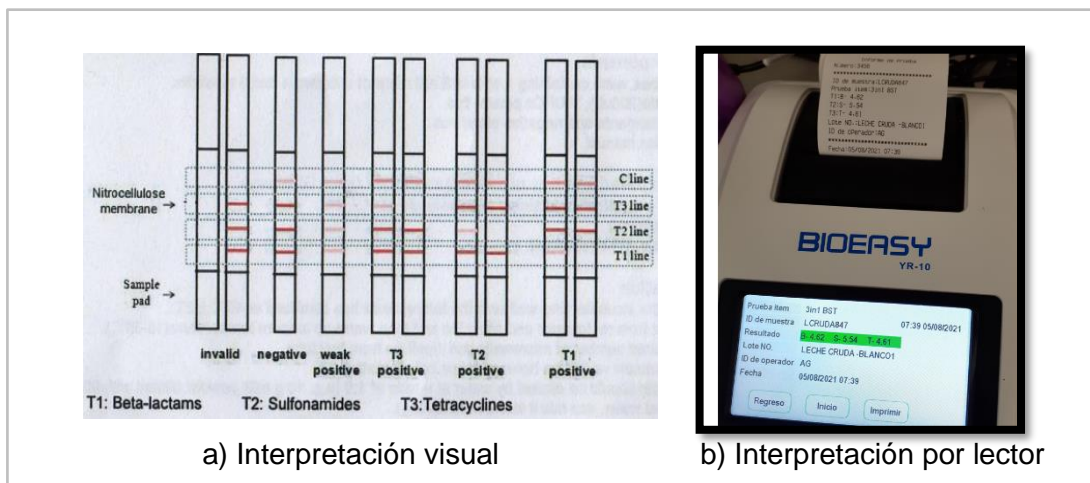


Figura 1.4 Diagrama de interpretación de resultados de tirillas

Fuente: (instructivo de método 3IN1 BST).

1.6. Características de desempeño de la Validación de un método.

La validación consiste en demostrar mediante estudios de laboratorio que un método analítico es capaz o apto para el uso indicado y que sus características de desempeño cumplen con los requisitos analíticos establecidos.

1.6.1. Definiciones

Límite de Detección (LOD) es la cantidad más baja del analito en estudio en una muestra que puede detectarse de forma fiable, pero no necesariamente cuantificarse como un valor exacto (Ravisankar et al., 2019).

Límite de Cuantificación (LOQ) es la cantidad más baja del analito en una muestra que se puede determinar cuantitativamente con precisión y exactitud bajo la condición operativa declarada del método en estudio (Ravisankar et al., 2019).

Capacidad de detección es el contenido o concentración más baja del analito de una muestra que puede ser detectado, identificado o cuantificarse con una probabilidad de error β . El error β es la probabilidad de que la muestra analizada realmente no cumpla con los requisitos, aunque se haya obtenido una medición que cumpla con los requisitos falso negativo. Para las pruebas de detección, la β error debe ser $< 5\%$. Para los casos de analitos que no se encuentra establecido un límite reglamentario, la capacidad de detección es la más baja concentración a la que un método es capaz de detectar muestras verdaderamente contaminadas con una estadística certeza de $1 - \beta$. Para este caso la capacidad de detección debe ser lo más baja posible o inferir a las concentraciones recomendadas en normativas. En el caso de analitos con Limite Regulatorio establecido, la capacidad de detección es la concentración a la que el método puede detectar concentraciones limite permitidas con una certeza estadística de $1 - \beta$. Es la concentración a la que solo quedan $\leq 5\%$ de resultados falsos conformes. En este caso la capacidad de detección debe ser menor o igual al límite reglamentario (Límites Máximos de Residuos (Lmr) y Recomendaciones Sobre La Gestión de Riesgos

(Rgr) Para Residuos de Medicamentos Veterinarios En Los Alimentos Cx/Mrl 2-2018, 2018).

Especificidad/Selectividad. Es la capacidad de un método analítico para diferenciar y cuantificar exactamente un analito específico en estudio en presencia de interferencias u otros compuestos que probablemente estén presentes o que contengan componentes de comportamiento similar (Örnemark & Magnusson, 2014).

La especificidad es la capacidad de un método para distinguir entre el analito que se está midiendo y otras sustancias (Riera, 2010).

Linealidad. Es una medida de que tan bien se muestra un gráfico de calibración de respuesta frente a una concentración donde se aproxima una línea recta. La linealidad se puede evaluar realizando mediciones únicas a varias concentraciones del analito. Posteriormente los datos se procesan mediante una regresión lineal de mínimos cuadrados. La pendiente del gráfico resultante, el intercepto y el coeficiente de correlación proporcionan la información deseada sobre linealidad (Ravisankar et al., 2019).

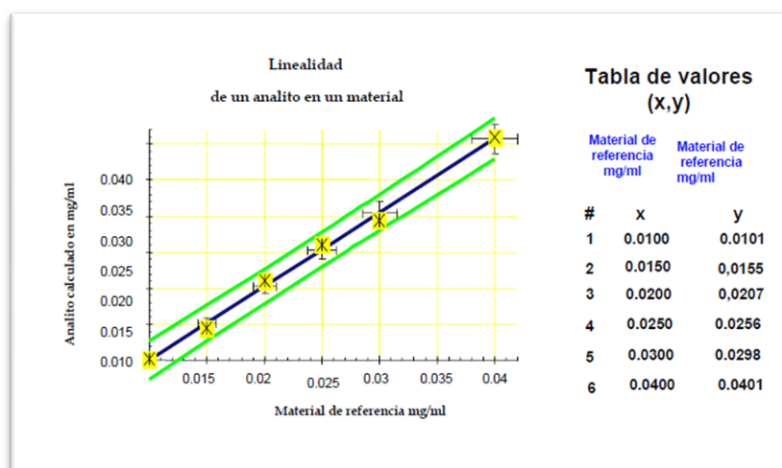


Figura 1.5 Determinación de linealidad de un analito

Fuente: (Pr et al., 2002).

Precisión. Representa la proximidad entre los resultados de una serie de mediciones obtenidas de muestreos múltiples de una misma muestra homogénea en condiciones analíticas similares y se divide en 3 categorías (Ravisankar et al., 2019).

Repetibilidad: Precisión obtenida aplicando un mismo procedimiento en las mismas condiciones de operación, sobre una misma muestra, con el mismo analista, en intervalos cortos de tiempo, utilizando el mismo equipamiento, dentro de un mismo laboratorio (Guía Para Validación de Métodos de Ensayo, 2019).

Precisión intermedia: Precisión obtenida aplicando un mismo procedimiento, sobre una misma muestra, en el mismo laboratorio, bajo condiciones diferentes de operación. Estas condiciones pueden estar relacionadas a las siguientes variables: tiempo, analista, equipamiento o calibración (Guía Para Validación de Métodos de Ensayo, 2019).

Reproducibilidad: precisión obtenida aplicando un mismo procedimiento, sobre una misma muestra, en diferentes laboratorios, distintos analistas, y diferentes equipos (Guía Para Validación de Métodos de Ensayo, 2019).

Robustez: medida de la capacidad de un método analítico para mantenerse inalterado ante pequeños cambios, pero deliberadas variaciones del método, que provee una indicación de su confiabilidad durante el uso normal (Ravisankar et al., 2019).

Recuperación: es el porcentaje de la concentración real de una sustancia recuperada durante el proceso de análisis. En la cual se puede emplear una muestra llamada blanco enriquecido con el analito de interés. Este factor siempre se determina en la validación si no se dispone de material certificado de referencia.

Sensibilidad diagnóstica: es la capacidad que tiene un método cualitativo para detectar pequeñas cantidades de un analito en una determinada muestra (Örnemark & Magnusson, 2014).

Sensibilidad analítica: Es la respuesta que presenta el instrumento a una determinada concentración de analito (Örnemark & Magnusson, 2014).

Capacidad de detección para análisis cualitativo. Para métodos cualitativos, la precisión no puede ser expresada mediante la desviación estándar, pero si puede ser expresada como tasa de verdaderos y falsos positivos y negativos. (Örnemark & Magnusson, 2014)

1.7. Estado de la Situación Actual

Una de las prácticas comunes que existen en la actualidad en las haciendas ganaderas es la administración de antibióticos, en el manejo, o cuidado de enfermedades más frecuentes que se presentan en las ubres de las vacas, también usados como promotores de crecimiento para aumentar y mejorar la eficiencia de la producción. La mastitis es una de las principales enfermedades tratada con antibióticos. Existen malas prácticas en el manejo de animales que han tenido esta enfermedad y han sido administrados antibióticos. Por lo tanto, el riesgo de presencia de residuales de antibióticos en la leche cruda es alto, más aún si en la gran mayoría de ocasiones, se utilizan sin tener la guía de un profesional calificado. Es imprescindible que haya personal calificado para la dosificación y administración de los antibióticos en el ganado lechero, de manera que se pueda evitar que los antibióticos sean utilizados inadecuadamente, empleando dosificaciones mayores o por debajo de lo indicado, número de aplicaciones, duración del tratamiento y vías de administración incorrectas, en las que finalmente se pueden presentar residuales en la leche cruda si no existe la asesoría técnica a los ganaderos y no se cumple el tiempo establecido de cuarentena. La mejora de procesos dentro de la industria alimentaria en los últimos años se ha enfocado en optimizar sistemas de gestión de la calidad, seguridad e inocuidad de los productos, por lo tanto, ha sido una necesidad la implementación de diferentes metodologías que ayuden a estar alineados a estándares de normativas nacionales e internacionales. El uso de métodos rápidos de detección ha sido indispensable en las industrias que ayuden a la determinación de antibióticos de una manera rápida y confiable buscando incrementar la confianza en los consumidores respondiendo de esta manera a las exigencias de los organismos o entidades de gobierno.

La validación del método analítico rápido (screening) de antibióticos 3IN1BST en este proyecto busca establecer la validez y fiabilidad de sus resultados cumpliendo con los criterios de calidad que permitan dar mayor aceptación y seguridad a los productos, adquiriendo ventajas competitivas dentro del mercado, además de satisfacer las necesidades de los clientes.

1.8. Planteamiento del problema

En la actualidad uno de los problemas con el que tienen que enfrentar y buscar una solución los productores o ganaderos es la presencia de mastitis en el ganado lechero, y su manejo o tratamiento mediante el uso de antibióticos betalactámicos y tetraciclinas para la inhibición de microorganismos responsables de producir inflamación en la ubre de las vacas por el mal manejo en el ordeño, siendo las tetraciclinas los antibióticos más usados en el tratamiento de mastitis e infecciones, debido a su fácil manejo y aplicación, además de su bajo costo, convirtiéndose en una de las principales causa de la aparición de residuos de antibióticos en la leche, ya que muchas veces no se respeta el tiempo de cuarentena y el ganado es ordeñado y su leche rápidamente comercializada, esto conlleva que para el productor ganadero eliminar esta leche represente pérdidas económicas, por lo tanto, se realiza mala práctica a nivel agrícola, realizando mezclas entre producto bueno y leche con residuos de antibióticos tratando de esta forma enmascarar para evitar que sean detectados (Guerrero & G, 2009). Es por ello la importancia en la industria mantener controles bajo métodos de detección confiables que permita determinar estos residuales en la recepción de esta materia prima y actuar de manera inmediata al rechazo de producto no conforme.

1.9. Objetivo general y específicos

El objetivo general de este trabajo es validar el método de screening para verificar el desempeño en la cuantificación de residuales de antibióticos tetraciclinas (TC).

Para lograr lo antes indicado se ha identificado los siguientes objetivos específicos:

- a) Identificar los métodos analíticos utilizados para cuantificar antibióticos en leche.
- b) Validar el método de screening para antibióticos tetraciclinas.
- c) Aplicar el método de screening y evaluar los resultados en muestras de leche cruda.

CAPÍTULO 2

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Equipos

Se realizará la validación del método analítico rápido de detección y discriminación de antibióticos oxitetraciclinas (OT), tetraciclinas (TC) y Clortetraciclina (CT) en la leche cruda basado en la tecnología de inmunocromatografía de oro coloidal vs método de cromatografía líquida HPLC-DAD.

Se realizará curvas de calibración a diferentes concentraciones en el método confirmatorio para determinar la linealidad y sensibilidad del método en estudio para cada uno de los antibióticos antes mencionados. Se comparará los resultados con el método analítico rápido (screening) 3IN1BST. Se determinará los criterios de desempeño como, sensibilidad, especificidad, selectividad, límite de detección, falsos positivos, negativos, basado en la guía *Eurachem* (Örnemark & Magnusson, 2014).

El equipo utilizado para determinar y cuantificar antibióticos fue un cromatógrafo líquido de alta resolución con un detector de diodos (UHPLC-DAD) modelo 1290 infinity (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Otros de los equipos necesarios para el análisis fueron, balanza gramera, balanza analítica, vortex, cronometro, refrigeradora, congelador, micropipeta, centrifuga, cámara de concentración en fase solida (milford Massachusetts USA-Waters), bomba de succión de vacío, baño ultrasónico, cabina extractora de gases, pH metro. Además, también se usó una columna cromatográfica y cartuchos de extracción en fase sólida de 30 μm (Oasis HBL – Waters) (Moudgil, 2019).

La separación y cuantificación de los antibióticos se dio mediante UHPLC con columna marca Merck C8 (Thomas Scientific Special Order Sigma 1500320001 Purrospher Star RP 8 Endcapped (5 μm) LiChrocart 250-4.6. El proceso de extracción en fase sólida se realizó con el uso de cartuchos poliméricos con características (60 mg, 3 ml, OASIS HBL, Waters, EE. UU.). Fue necesario la utilización de la cámara de concentración de fase solida de 20 puertos (Waters Corporation, EE. UU.). Para realizar la limpieza y extracción de las muestras se requirió la conexión de la bomba de vacío para lograr la succión de las muestras por medio de presión negativa a una velocidad de 1 ml/min (Moudgil, 2019).

2.2. Estándares y reactivos

En el método cromatografía líquida de alta resolución UHPLC-DAD, fue necesario la utilización de Clorhidrato de Oxitetraciclina con 89.62% de pureza, con número de lote del material de referencia G1125763, Clorhidrato de Clortetraciclina con 92.5% de pureza, número de lote 737779, Clorhidrato de Tetraciclina con 97.15 % de pureza con lote G992250 todas adquiridas del instituto nacional de medición de LGC Standards (Alemania), Cloranfenicol con 98% de pureza adquirida de Cambridge Isotope Laboratories, Inc.

Otros reactivos utilizados fueron: ácido cítrico, sal disódica etilendiaminotetraacetato de sodio (EDTA), hidrogenofosfato disódico, metanol grado HPLC, acetonitrilo grado HPLC, ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, hidróxido de sodio, ácido tricloroacético, adquiridos de la marca MERCK (Alemania). Además, se trabajó con agua de grado HPLC con sistema Milli-Q de Millipore (EE. UU.).

2.3. Preparación de soluciones

Para la preparación de soluciones se pesó 0.05 gramos de oxitetraciclina, tetraciclina y 0.05 gramos de Clortetraciclina se afora cada una de las muestras hasta 50 ml con metanol, para la obtención de la solución madre posteriormente se toma 250 ul de cada una de las soluciones antes mencionadas y se lleva a un matraz color ámbar de 50 ml y afora con metanol de grado HPLC. Mediante este método se obtuvo una concentración de 1000000 ppb (AOAC 995.09, 2019).

2.3.1. Solución de trabajo o intermedia 5000 ppb

Se toma 250 ul de la solución madre y se afora con metanol grado HPLC a 50 ml en un matraz color ámbar y se almacena en refrigeración hasta su posterior uso.

2.3.2. Solución Buffer McIlvaine EDTA 0.01 M

Se pesan las siguientes cantidades de reactivos en un vaso precipitado, ácido cítrico 4.08 gramos, 1.92 gramos de hidrogenofosfato disódico, 1.11 gramos de sal disódica etilendiaminotetraacetato de sodio (EDTA) se afora con 300 ml de agua destilada y se llevó a pH 3,5 con hidróxido de sodio.

2.3.3. Solución fase móvil

Se midió un volumen 1000 ml de agua destilada grado (HPLC) con sistema Milli-Q de Millipore (EE. UU.), en un vaso de precipitación se agregó 8 gotas de ácido sulfúrico 95-97%, se agitó y se llevó a pH 2,1 con solución de ácido sulfúrico al 10 %.

2.3.4. Diseño Experimental

La preparación de muestras de trabajo para la determinación de antibióticos Tetraciclinas, Oxitetraciclina, Clortetraciclina se realizaron para el método analítico rápido 3IN1 BST y HPLC. Las muestras se prepararon a partir de una muestra madre de 1000000 ppb de los antibióticos OT, TC y CT, a partir de la cual se preparó una solución intermedia con una concentración final de 5000 ppb, donde posteriormente se realizaron las fortificaciones con el objetivo de obtener las concentraciones de estudio, 6.25, 12.5, 25, 50, 75, 100, 200 ppb para determinar si el método en estudio es capaz de detectar el antibiótico, además de encontrar el límite de detección, (ver anexo D).

Para realizar las fortificaciones de cada una de las concentraciones se tomó 12.5, 25, 50, 100, 150, 200, 400 ul de la solución intermedia de 5000 ppb que contiene los antibióticos OT, TC, CT y se colocaron en 10 ml con muestra de leche cruda blanca en un tubo plástico de centrifuga, se homogenizó para la obtención de una concentración de 6.25, 12.5, 25, 50, 75, 100, 200 ppb de los antibióticos de interés Tetraciclinas, Clortetraciclina y Oxitetraciclina, se pesó 5 gramos de muestra para la determinación en el método confirmatorio (HPLC), se consideraran como valor x la concentración a partir de los fortificados y la variable y como la lectura obtenida en el equipo del método analítico rápido. El anexo c detalla información adicional acerca de las fortificaciones.

Se realizó un estudio comparativo entre los resultados obtenidos con el método analítico rápido 3IN1BST y el método confirmatorio por HPLC/DAD. Se realizó un análisis comparativo entre los resultados de los diferentes niveles de concentración para determinar el rango mínimo de detección de los analitos de interés en el método analítico rápido.

2.4. Cromatografía líquida alta resolución (HPLC-DAD)

2.4.1. Proceso de Extracción de muestras

Cada una de las muestras de trabajo fueron agitadas en vortex durante 5 minutos para ser homogenizada. Se peso 5 gramos de muestra en cada tubo y se agregó 4 mL de la solución buffer EDTA Mcllvaine sódico (0.01M con ph 3,5). Se procedió agitar nuevamente durante 5 min en Vortex, posteriormente se centrifugo durante 15 min a 4000 rpm. Transcurrido el tiempo se retiró el sobrenadante y se colocó en otro tubo, todos los tubos debidamente rotulados con sus respectivas concentraciones. Se agregaron 6 mL de la solución buffer EDTA Mcllvaine 0.01M nuevamente al tubo inicial, se agito durante 5 min en vortex y se procedió a centrifugar durante 15 min a 4000 rpm con la finalidad de promover la precipitación de las proteínas. Se retiro el sobrenadante y se agregó en los tubos de recolección, 200 ul de ácido tricloroacético y se almaceno en refrigeración hasta el siguiente día (AOAC 995.09, 2019).

Se retiro la muestra de refrigeración, hasta alcanzar temperatura ambiente, luego se centrifugo durante 15 min a 4000 rpm.

Para extraer la muestra se utilizó, los cartuchos poliméricos SPE (OASIS HBL, Waters, EE. UU.), que fueron activados previamente con 5 ml de metanol y 3 ml de agua destilada grado (HPLC) con sistema Milli-Q de Millipore (EE. UU.). Los cartuchos o columnas fueron conectadas a un extractor de fase solida de 20 puertos marca Waters. Además, fue necesario utilizar una bomba de vacío para la succión de las muestras a presión negativa. Una vez activada la columna se procedió a colocar el sobrenadante de cada una de las concentraciones de estudio, el mismo que fue desechado. Posteriormente los analitos retenidos en la fase solida de cada uno de los cartuchos fueron eluidos con 1 ml de metanol y 1,5 ml de buffer EDTA ph 3,5. Finalmente el filtrado fue transferido con ayuda de filtros de jeringa en viales de muestreo automático con tapa septum color ámbar y almacenado hasta el análisis respectivo. (AOAC 995.09, 2019)

2.4.2. Análisis HPLC

Las condiciones cromatográficas que se trabajaron para la determinación de antibióticos fueron, temperatura del horno para la columna 25 °C, flujo de la bomba de 1 ml/min, como fase móvil se utilizó el agua acidificada con ácido sulfúrico con ph 2,1, previamente se mantuvo en un baño ultrasónico por 15 min, volumen de inyección fue de 40 ul.

El gradiente utilizado fue agua acidificada de ácido sulfúrico y acetonitrilo en relación 85:15. Los antibióticos fueron separados por una columna LiChroCart 250-4.6 Purospher Star RP-8e marca Merck de (5 um de diámetro interno). La longitud de onda de detección utilizada para la cuantificación fue de 355 nm. Se realizó una curva de calibración en base a las concentraciones en estudio (25, 50, 100, 250, 350 ppb) con metanol grado HPLC, solución intermedia y buffer mcllvaine EDTA con ph 3,5.

2.5. Control de Calidad de Muestras

Se toma muestra de leche cruda de medios de transporte que contienen tanques de acero inoxidable tipo cisterna. El personal responsable de realizar el muestreo se coloca arnés para la toma de muestra por seguridad, se realiza agitación de cada compartimento para la correcta homogenización de la leche, se utiliza un agitador manual y jarras metálicas.

La muestra es llevada al laboratorio de aseguramiento de calidad donde la muestra es tratada en las condiciones establecidas para análisis. La muestra debe llevarse a una temperatura de 20 °C +/- 5 °C, con el objetivo de homogenizar o disminuir los glóbulos de grasa presentes y evitar sedimentos, además asegurar fluidez de la muestra que en su análisis se evite la interferencia o dificultad en la detección del analito de interés de tal forma que no se vean comprometidos los resultados.

2.6. Análisis rápido

El método analítico rápido para detección de antibióticos Beta-lactámicos, sulfonamidas, tetraciclinas utilizado fue el kit 3IN1BST (Shenzhen Bioeasy Biotechnology Co., Ltd, Shenzhen, R. P. China) se muestra en la figura 2.1. Para llevar a cabo esta medición se requiere de equipos, materiales y reactivos que son de la misma marca del proveedor del método analítico rápido Shenzhen Bioeasy Biotechnology. Con lo relacionado a equipos se necesitan una mini Incubadora con temperatura de $40 \pm 2^\circ\text{C}$ de tolerancia, lector de tirillas y temporizador, respecto de los materiales el kit provee micropocillos de pruebas y tiras reactivas. Los micropocillos contienen el reactivo de detección de antibióticos que viene dosificado por el fabricante. El kit cuenta con estándares de antibióticos para realizar pruebas de verificación en las siguientes concentraciones: tetraciclinas 60 ppb, sulfametazina 50 ppb, penicilina G 4.5 ppb (control positivo), leche liofilizada libre de antibióticos (control negativo).

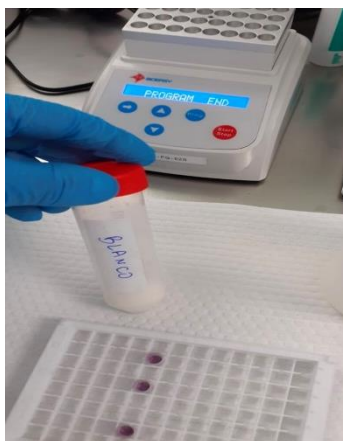


Figura 2.1 Método analítico rápido para detección de antibióticos Beta-lactámicos, sulfonamidas, tetraciclinas utilizado kit 3IN1BST (Shenzhen Bioeasy Biotechnology Co., Ltd, Shenzhen, R. P. China)

Fuente: Fotografía del autor, 2021

Previo a la medición, se encendió previamente la incubadora hasta que llegue a la temperatura de trabajo estable de $40 \pm 2^\circ\text{C}$. El kit de medición que es mantenido en refrigeración es llevado a temperatura ambiente para su uso. Se toma una muestra de leche homogenizada de 200 μL , se coloca en el micropocillo que contiene el reactivo, y se mezcla con la micropipeta automática de 5 a 10 veces, para permitir una correcta homogenización de la muestra con el reactivo. A continuación, se coloca los micropocillos en la incubadora por 3 minutos a una temperatura de 40°C . Una vez transcurrido el tiempo se sumerge la tirilla de prueba en el micropocillo por 6 minutos. Se retira la tirilla del micropocillo y se procede a la lectura de los resultados en el lector de tirillas con el software SAFF Reader LF (Shenzhen Bioeasy Biotechnology Co., Ltd, Shenzhen, R. P. China).

2.7. Método de Validación

El proceso de validación del método screening en el presente trabajo consistió en la determinación y confirmación del cumplimiento de los requisitos de calidad y confiabilidad que presentan los resultados del kit 3IN1BST para garantizar la seguridad de su uso y dar cumplimiento a las normativas nacionales e internacionales. Por lo que, las características de desempeño aplicadas fueron límite de detección, sensibilidad, especificidad, selectividad y exactitud, falsos positivos y negativos, debido a que es un método semicualitativo además del uso de la guía de laboratorio de validación de métodos (Örnemark & Magnusson, 2014).

Fue necesario obtener resultados de un método confirmatorio como es HPLC, mediante el cual se compararon las concentraciones en estudio versus la respuesta en el método del kit rápido 3IN1BST.

Se realizó la fortificación de muestras de trabajo con antibióticos Oxitetraciclina, Tetraciclina y Clortetraciclina en 7 niveles (6.25, 12.5, 25, 50, 75, 100, 200 ppb) a partir de una muestra intermedia de 5000 ppb con los analitos antes mencionados.

Las curvas de calibración en HPLC se realizaron a partir de la solución intermedia de los estándares en las concentraciones 25, 50, 100, 250, 350 ppb más el buffer McIlvaine EDTA ph 3,5.

La **sensibilidad** del método fue determinada mediante los resultados de la pendiente de la curva de calibración de los analitos. El límite de detección fue establecido bajo las concentraciones conocidas de los analitos en el estudio en el método confirmatorio y las réplicas realizadas a las mismas muestras con el kit rápido 3IN1BST permitieron determinar el nivel mínimo de respuesta que el kit pudo detectar de los analitos de una forma fiable. La exactitud se realizó comparando las concentraciones analizadas en el equipo HPLC y la respuesta obtenida en el kit rápido 3IN1BST (Örnemark & Magnusson, 2014).

La **especificidad** se realizó mediante la réplica de cada una de las concentraciones que fueron realizadas a partir de una muestra blanco leche y la fortificación con el antibiótico cloranfenicol en diferentes concentraciones (6.25, 12.5, 25, 50, 75, 100 ppb), en la cual se determinó si el kit era capaz de dar señal positiva al antibiótico mencionado a pesar de no ser el analito de interés para el cual está diseñado el kit, al tener las mismas características de las tetraciclinas (Örnemark & Magnusson, 2014).

Fórmula para usar será: Fracción del número total de muestras negativas que son correctamente asignados con el método utilizado.

$$E = (a+d) / n$$

Selectividad fue realizada con una muestra de leche cruda fortificada en 100 ppb de cloranfenicol y tetraciclina, se trabajaron réplicas de niveles (6.25, 12.5, 25, 50, 75, 100 ppb), con la finalidad de ver el nivel de respuesta del kit ante el analito tetraciclina objeto de estudio y cloranfenicol que tiene las mismas característica y comportamiento que las tetraciclinas, de esta manera se evaluó si se presentaban interferencias y el nivel de desempeño del kit (Örnemark & Magnusson, 2014).

Fórmula para usar será: Fracción del número total de muestras positivas que son correctamente asignados con el método utilizado.

$$S = (a+d) / n$$

La determinación de **falsos positivos y falsos negativos** se realizó utilizando dos muestras de leche blanco fortificadas en 100 ppb de Clortetraciclina y Oxitetraciclina y tetraciclina (Örnemark & Magnusson, 2014).

Falsos positivos: Es la probabilidad que el ensayo presente un resultado positivo cuando la muestra no contiene antibióticos o tiene otro tipo de antibióticos no objeto de estudio, interpretación de fórmula se detalla en el anexo f.

Se usará la fórmula $b/(a+b)$, es decir la fracción de muestras positivas asignadas por el método: a= serán el número de muestras que den como resultado negativo, b= serán el número de muestras que den como resultado positivo.

Falsos negativos: Es la probabilidad que el ensayo presente un resultado negativo cuando la muestra contiene el analito (positivo). La fórmula para usar es $c/(c+d)$ cuando el kit haya dado como resultado negativo erróneamente, c= número de muestras con resultado negativo, d= número de muestras con resultado positivo.

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los parámetros evaluados en este trabajo fueron la cuantificación de antibióticos por método confirmatorio (HPLC-DAD) y límite de detección, selectividad, especificidad, falsos positivos, falsos negativos, por método analítico rápido, los cuales se describen a continuación.

Durante las pruebas del método analítico rápido se realizó muestras blanco (leche), todas presentaron un resultado negativo. Además, antes de las mediciones se realizó un control negativo (leche liofilizada libre de antibióticos) y positivo (60 ppb Tetraciclina - 50 ppb-Sulfametazina - 4,5 ppb Penicilina G) que contiene el método 3IN1BST, los resultados dieron correctamente negativo y positivo respectivamente, mismos que se detallan en tabla 5.

3.1. Cuantificación de antibióticos

Para validar el uso del método analítico rápido o denominado también screening, se utilizó el método confirmatorio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-DAD). La fase móvil utilizada en el método fue solución de ácido sulfúrico con un pH de 2,1, y agua acidificada con acetonitrilo, en proporción 85:15 respectivamente. El acetonitrilo es un disolvente que presenta buen comportamiento en la extracción de una amplia gama de antibióticos de diferentes propiedades químicas (Dubreil et al., 2017).

La figura 3.1 muestra el cromatograma de la mezcla de antibióticos OT, TC, y CT en una concentración de 100ppb, respectivamente. Se puede observar los tiempos de retención entre 6 y 9 minutos bajo las condiciones de análisis en HPLC-DAD.

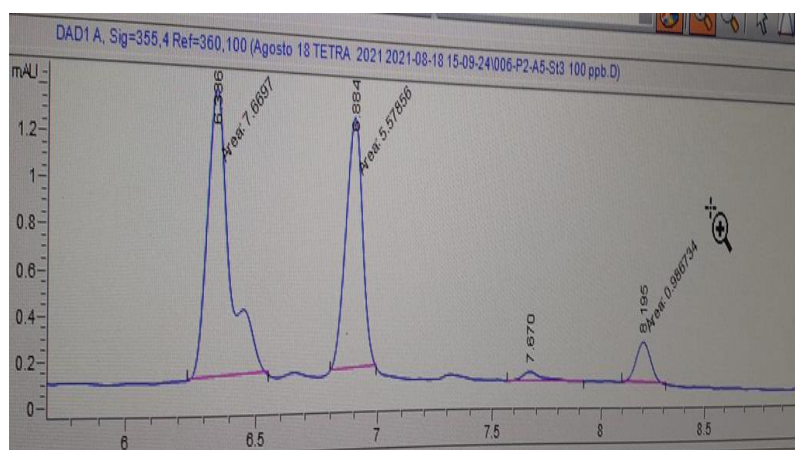
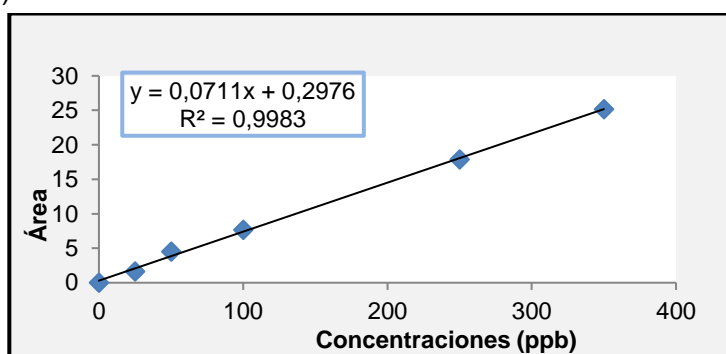


Figura 3.1 Cromatograma de curva de calibración estándar para antibiótico oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina en HPLC

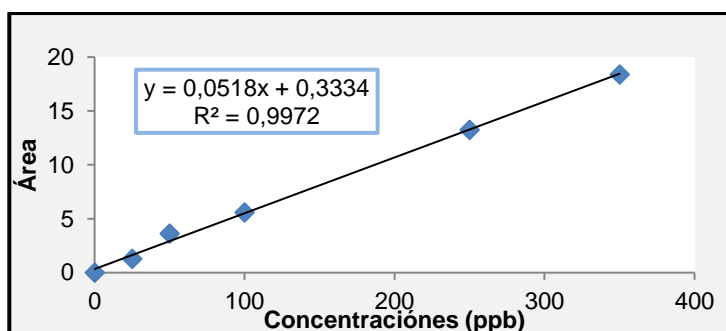
*Cromatograma de estándares con detección de 355 nm para oxitetraciclina, tetraciclina y clortetraciclina, con niveles de fortificación 100 ppb.

Los resultados de las curvas de calibración estándar de cada uno de los antibióticos se muestran en la figura 3.2. Las curvas de calibración muestran la correlación existente de los valores obtenidos del área de cada uno de los picos de los analitos estándares, frente a las concentraciones de forma ascendente utilizadas (25, 50, 100, 250 y 350 ppb). Según los datos de regresión lineal la curva tiene un comportamiento lineal adecuado para los analitos de estudio, con coeficiente de correlación (R^2) en rango de 0.997 para tetraciclina, 0.998 para oxitetraciclina y clortetraciclina.

a) Oxitetraciclina



b) Tetraciclina



c) Clortetraciclina

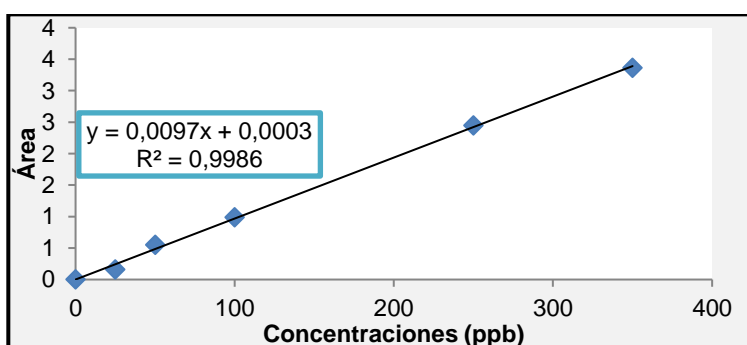


Figura 3.2 Curvas de calibración estándar para antibióticos utilizando HPLC-DAD. a) oxitetraciclina, b) tetraciclina, c) clortetraciclina, con rango de cuantificación entre 25 y 350 ppb

Fuente: Laboratorio de Análisis Químico y Microbiológico de alimentos de la Subsecretaría de Calidad e Inocuidad

Los resultados de análisis de las muestras de leche fortificadas con antibióticos se muestran en la tabla 3. Los valores de porcentaje de recuperación para el antibiótico Oxitetraciclina, Tetraciclina y Clortetraciclina fue de $87,21\% \pm 6,95\%$, $104,59\% \pm 7,06\%$ y $46,95\% \pm 19,80\%$, respectivamente. Los valores demuestran una adecuada capacidad de recuperación del analito durante el procesamiento de las muestras de OT y TC, ya que se encuentran dentro del rango de recuperación del método establecido que es de 60% a 120% para Oxitetraciclina y Tetraciclina (European Commission, 2010). Para el antibiótico Clortetraciclina, los resultados no fueron los esperados ya que no se alcanzó el porcentaje de recuperación establecido bajo las condiciones ensayadas. Haroenraks y colaboradores reportaron resultados similares de recuperación de antibióticos mediante el análisis de HPLC en camarón, en donde CT tuvo el menor porcentaje de recuperación (Haroenraks et al., 2005).

Para los residuos de Clortetraciclina se pudo realizar la lectura e interpretarla, pero los porcentajes de recuperación no fueron los esperados, por lo tanto, se sugiere que el método requiere de una adaptación para incrementar el porcentaje de recuperación de este antibiótico. Según E. Dubreil y colaboradores existe la posibilidad de haberse presentado interacciones entre los antibióticos o volatilidad de la muestra. En especial, la clortetraciclina en presencia de otros antibióticos provoca la degradación de la clortetraciclina (Dubreil et al., 2017).

Tabla 3
Porcentaje de recuperación del análisis de oxitetraciclina, tetraciclina y clortetraciclina utilizando HPLC-DAD

ANTIBIÓTICOS	OXITETRACICLINA		TETRACICLINA		CLORTETRACICLINA	
	Concentración(ppb)	Resultado (ppb)	Recuperación (%)	Resultado (ppb)	Recuperación (%)	Resultado (ppb)
6.25	ND	ND	ND	ND	ND	ND
12.5	ND	ND	ND	ND	ND	ND
25.00	22,22	88,87	26,34	105,35	ND	ND
50.00	46,73	93,47	58,74	117,48	22,75	45,5
75.00	67,3	89,74	74,06	98,75	28,87	38,5
100.00	90,29	90,29	103,71	103,71	52,81	52,81
200.00	147,33	73,66	195,34	97,67	101,97	50,98
Promedio	74,77	87,21	91,64	104,59	51,60	46,95
Desviación estándar	42,68	6,95	57,54	7,06	34,95	19,80

*ND: No detectado

Fuente: Laboratorio de Análisis Químico y Microbiológico de alimentos de la Subsecretaría de Calidad e Inocuidad

En la tabla 4 se muestra la comparación entre los dos métodos de análisis aplicados a la misma muestra de leche fortificada con antibióticos en concentraciones de 6.25 a 200 ppb. A una concentración mayor a 25ppb de los antibióticos OT/TC/CT hay un resultado fuerte positivo en el método de análisis rápido, esto indica que el método permite tener una confiabilidad de los resultados en el análisis de muestra de leche cruda. Se pudo determinar que el método de análisis rápido presento alta sensibilidad a las concentraciones 25, 50, 75, 100, 200 ppb, mientras que en valores menores a 25 ppb no hubo detección. Los resultados de detección de las concentraciones antes mencionadas fueron positivos (fuerte positivo = $R < 0,9$).

Tabla 4
Resultados determinación Antibióticos Oxitetraciclina, Tetraciclina y
Clortetraciclina en HPLC vs Kit rápido de detección 3IN1BST

CONCENTRACIONES (ppb)	HPLC (ppb)			KIT RÁPIDO 3IN1BST	
	OXITETRACICLINA	TETRACICLINA	CLORTETRACICLINA	TETRACICLINA	INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS
6,25	ND	ND	ND	3,49	Negativo
12,5	ND	ND	ND	1,31	Negativo
25	22,22	26,34	ND	0,29	Fuerte Positivo
50	46,73	58,74	22,75	0,18	Fuerte Positivo
75	67,3	74,06	28,87	0,03	Fuerte Positivo
100	90,29	103,71	52,81	0,01	Fuerte Positivo
200	147,33	195,34	101,97	0	Fuerte Positivo

*ND: No detectado

Fuente: Elaborado por el autor, 2021

3.2. Límite de Detección

El límite de detección fue determinado haciendo uso de las mismas muestras reportadas del análisis de HPLC en la tabla 4 para ser analizadas con el método de análisis rápido, con el objetivo de corroborar el desempeño del método en la detección de los antibióticos en estudio. El límite de detección del método es definido como la cantidad más baja de analito de una determinada muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada.

La tabla 5 detalla los promedios de los resultados del ensayo completo del método analítico rápido, se puede observar el límite de detección es de 25 ppb, en la gráfica 3.3 se puede observar la respuesta relacionada con la concentración de los antibióticos OT, TC, CT, los resultados completos se detallan en el anexo h del presente trabajo.

En la figura 3.4 a, se puede observar la tasa de respuesta positiva de las réplicas realizadas de cada una de las concentraciones y el nivel de respuesta del método analítico rápido. Es importante resaltar que los niveles máximos de residuos permitidos en leche, según las normativas y regulaciones internacionales como el Codex, son 100 ppb para tetraciclina. Por lo tanto, el método de análisis rápido presentó buen nivel de detección dentro del rango permitido para TC. Esta medición permite tener seguridad respecto de los resultados al momento de determinar la aceptación o rechazo de muestras en la recepción de leche cruda. Según la Decisión de la Comisión Europea 2002/657 / EC (Comisión Europea 2002), la precisión del ensayo debe ser menor del 15%, en este caso sería 85 ppb, y los valores observados están de acuerdo con las directrices de la UE (European Commission, 2010).

El análisis estadístico de los resultados en las diferentes concentraciones de detección de TC mostró que existe diferencias significativas entre los niveles de detección con un valor $p < 0,05$, es decir que en el método analítico rápido los valores de detección del analito de interés a concentraciones menores a 12,5 ppb son diferentes a las concentraciones mayores a 25 ppb, valores que se observan en la figura 3.4 b.

Tabla 5
Resultados de muestras fortificadas con antibióticos Oxitetraciclina, Tetraciclina y Clortetraciclina mediante el método analítico rápido 3IN1BST Bioeasy

CONCENTRACION	RESULTADOS MÉTODO ANALÍTICO RÁPIDO MUESTRAS FORTIFICADAS OXITETRACICLINA, TETRACICLINA, CLORTETRACICLINA												FRECUENCIA MARGINAL		
	3,45	3,34	3,62	3,55	3,61	3,5	3,48	3,45	3,47	3,45	3,49	NO DETECTADO	0	10	10
Lc + 6.25 ppb	3,45	3,34	3,62	3,55	3,61	3,5	3,48	3,45	3,47	3,45	3,49	NO DETECTADO	0	10	10
Lc + 12.5 ppb	1,27	1,31	1,37	1,26	1,3	1,35	1,34	1,3	1,29	1,27	1,31	NO DETECTADO	0	10	10
Lc + 25 ppb	0,26	0,3	0,32	0,25	0,3	0,31	0,26	0,3	0,3	0,3	0,29	DETECTADO	10	0	10
Lc + 50 ppb	0,1	0,23	0,2	0,24	0,2	0,2	0,11	0,22	0,23	0,1	0,18	DETECTADO	10	0	10
Lc + 75 ppb	0	0,07	0	0,06	0	0	0,06	0	0,07	0	0,03	DETECTADO	10	0	10
Lc + 100 ppb	0	0,02	0	0	0	0	0	0,01	0,02	0,02	0,01	DETECTADO	10	0	10
Lc + 200 ppb	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00	DETECTADO	10	0	10
FRECUENCIA MARGINAL												50	20	70	

*N: negativo, P: positivo

*Lc: Leche cruda

* Estos datos representan el promedio de los resultados del ensayo analítico rápido que incluye los antibióticos tetraciclinas. Los resultados de controles negativo y positivo del método y tabla completa ver en anexo h.

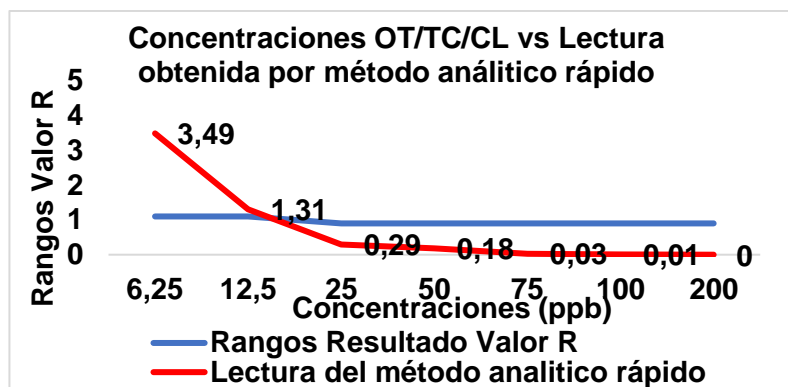


Figura 3.3 Gráfico determinación límite de detección del método analítico rápido

Fuente: Elaborado por el autor, 2021

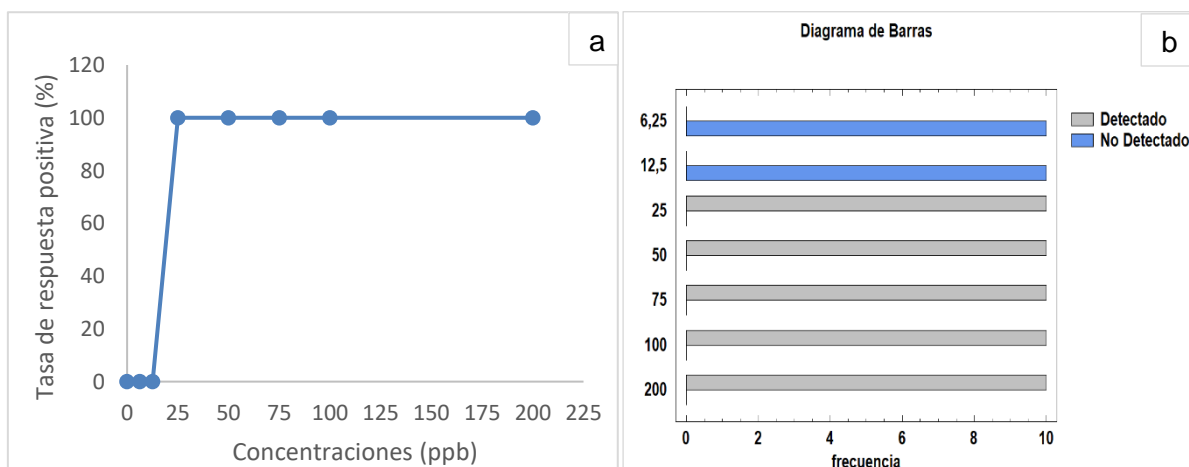


Figura 3.4 Capacidad de detección del método analítico rápido

Fuente: Elaborado por el autor, 2021

3.3. Selectividad

La selectividad (resultados sin interferencias) es una de las características importantes dentro del desarrollo y desempeño del método analítico rápido. En la tabla 6 se muestran los resultados del análisis de una muestra de leche cruda fortificada en diferentes concentraciones con 0, 6.25, 12.5, 25, 50, 75, y 100 ppb de cloranfenicol y tetraciclina. En la evaluación realizada se determinó que, en presencia de otro componente o analito de similar comportamiento, el método mantiene la habilidad de medir el analito de interés. Las réplicas de las diferentes concentraciones se presentaron un valor positivo en presencia de cloranfenicol + tetraciclina cuando la concentración fue mayor a 25 ppb, y negativo para menores a 12.5 ppb (ver en anexo i). Por lo tanto, se pudo determinar que el método analítico rápido en estudio presenta una selectividad adecuada para la determinación de antibióticos dirigidos, ya que pudo identificar y diferenciar la identidad del analito en estudio al no presentar interferencias en presencia de otros compuestos.

Tabla 6
Resultados de análisis de leche cruda enriquecida con antibióticos
(Cloranfenicol, Tetraciclina) para determinar la Selectividad del método
screening (KIT 3IN1BST BIOEASY)

CONCENTRACIONES	BETALACTAMICOS	SULFAMIDAS	TETRACICLINAS
Blanco Leche Cruda	4,11N	4,86N	4,10N
	3,86N	4,43N	3,76N
	4,00N	4,21N	3,88N
Leche cruda + 25 ppb (Cloranfenicol, Tetraciclina)	4,56N	4,36N	0,44P
	4,01N	4,03N	0,59P
	4,24N	4,10N	0,51P
Leche cruda + 50 ppb (Cloranfenicol, Tetraciclina)	3,37N	3,35N	0,21P
	4,11N	3,71N	0,21P
	3,79N	3,25N	0,21P
Leche cruda + 75 ppb (Cloranfenicol, Tetraciclina)	3,85N	3,85N	0,14P
	3,76N	4,04N	0,01P
	3,29N	2,98N	0,13P
Leche cruda + 100 ppb (Cloranfenicol, Tetraciclina)	3,37N	3,54N	0,00P
	3,93N	4,14N	0,09P
	3,89N	3,96N	0,11P

*N: negativo, P: positivo

*Lc: Leche cruda

*Estos datos representan el resultado del ensayo completo del método analítico rápido que incluye los antibióticos betalactámicos, sulfanamidas y tetraciclina.

Para expresar la precisión en el método analítico rápido fue necesario aplicar la tasa de verdaderos positivos, falsos positivos, verdaderos negativos y falsos negativos (Örnemark & Magnusson, 2014). En la tabla 7 se puede observar los resultados que fueron aplicados para confirmar la selectividad de 100% del método. Donde el total de muestras con antibiótico fueron 12 positivas y muestras negativas cero. Reemplazando la fórmula fue tasa de verdaderos positivos 12 muestras y tasa de falsos negativos cero.

Tabla 7
Resultados determinación de Selectividad

MUESTRA FORTIFICADA CON CLORANFENICOL + TETRACICLINA			
Fórmula:	$S = (a+d) / n = (12+0) / 12$		
a =	Positivos		
d =	Negativos		
n =	Número total de análisis		
Fórmula Selectividad:	$TP/TP+FN=$	12/12+0	
TN	Tasa de verdaderos negativos	Resultado	
TP	Tasa de verdaderos positivos	TP	12
FP	Falsos positivos	FN	0
FN	Falsos negativos	Resultado	100%

Fuente: Elaborado por el autor, 2021

3.4. Especificidad

Para conocer la especificidad del método analítico rápido fue necesario realizar una muestra de leche fortificada con un antibiótico de similares características a las tetraciclinas, para verificar el comportamiento del método analítico rápido o de screening en estudio. De esta manera, se mide la capacidad del método analítico rápido de detectar la presencia de un analito no específico a su diseño. El antibiótico utilizado fue cloranfenicol en diferentes concentraciones (0, 6.25, 12.5, 25, 50, 75, y 100 ppb).

En la evaluación de las muestras fortificadas con cloranfenicol en las diferentes concentraciones, ninguna de las 3 réplicas dio como resultado positivo en presencia de cloranfenicol (tabla 8). Estos resultados son adecuados a pesar de contener un analito con comportamiento similar, pero no específico como son las tetraciclinas (Örnmärk & Magnusson, 2014). En la tabla 9 se puede observar los resultados donde la tasa de verdaderos negativos de las muestras fortificadas fue 18 ya que la muestra no contenía antibiótico para el diseño del método, la tasa de falsos positivos fue cero, reemplazando los valores en la fórmula se obtiene el 100 % en especificidad.

Tabla 8
Resultados de análisis con antibiótico Cloranfenicol para la determinación de especificidad del método mediante kit 3IN1BST BIOEASY

CONCENTRACIONES	BETALACTÁMICOS	SULFAMIDAS	TETRACICLINAS
Blanco Leche Cruda	4,11N	4,86N	4,10N
	3,86N	4,43N	3,76N
	4,00N	4,21N	3,88N
Lc+ 6.25 ppb (Cloranfenicol)	4,44N	5,19N	4,00N
	5,01N	5,50N	4,68N
	4,88N	5,36N	4,61N
Lc + 12.5 ppb (Cloranfenicol)	4,76N	4,68N	4,46N
	4,39N	4,54N	3,95N
	4,31N	4,54N	4,33N
Lc + 25 ppb (Cloranfenicol)	4,37N	4,20N	4,05N
	4,78N	4,15N	4,41N
	4,83N	4,06N	4,51N
Lc + 50 ppb (Cloranfenicol)	4,40N	3,55N	4,06N
	4,40N	4,08N	4,18N
	4,34N	3,79N	4,22N
Lc + 75 ppb (Cloranfenicol)	3,87N	3,26N	3,69N
	4,74N	4,22N	4,46N
	4,01N	3,77N	3,78N
Lc + 100 ppb (Cloranfenicol)	4,52N	3,82N	4,04N
	4,00N	3,66N	3,91N
	4,55N	4,04N	4,20N

*N: negativo, P: positivo

*Lc: Leche cruda

*Estos datos representan el resultado del ensayo completo del método analítico rápido que incluye los antibióticos betalactámicos, sulfanamidas y tetraciclina.

Tabla 9
Resultados determinación de Especificidad

MUESTRA FORTIFICADA CON CLORANFENICOL			
Formula:	$E = (a+d) / n = 0+18/18$		
a =	Positivos		
d =	Negativos		
n =	Número total de análisis		
Formula Especificidad:	$TN/TN+FP=$	18/18+0	
TN	Tasa de verdaderos negativos	Resultado	
TP	Tasa de verdaderos positivos	TN	18
FP	Falsos positivos	FP	0
FN	Falsos negativos	Resultado	100%

Fuente: Elaborado por el autor, 2021

3.5. Determinación Falsos Positivos y Falsos Negativos

Para la determinación de falsos positivos, fue necesario la utilización de muestras fortificadas con cloranfenicol (0, 6.25, 12.5, 25, 50, 75, y 100 ppb), para determinar si el kit presenta un resultado positivo en presencia de otro antibiótico no objeto de estudio con similares características a la tetraciclina. Para la determinación de falsos negativos se utilizan 2 muestras fortificadas en 100 ppb de antibióticos Clortetraciclina y otra de Oxitetraciclina y Tetraciclina para determinar si el kit presentaba resultados negativos en presencia de analitos objeto de estudio para el kit.

El método presenta buen desempeño en los resultados para cada una de las concentraciones en estudio con y sin el analito de interés.

El kit y método en estudio no presento positivos en presencia de cloranfenicol dentro de la tasa de falsos positivos se obtuvo 0, pues todas las muestras resultaron negativas. Además presento correctamente los resultados positivos en presencia de los analitos en estudio de 100 ppb de oxitetraciclina, tetraciclina y Clortetraciclina, presentándose 0 en la tasa de falsos negativos (Örnemark & Magnusson, 2014), se presenta en tablas 10 mientras que en la tabla 11 se detalla el reemplazo de los resultados en las fórmulas de falsos positivos y falsos negativos.

Tabla 10
Resultados de análisis de muestras fortificadas en 100 ppb de antibióticos Oxitetraciclina, tetraciclina y Clortetraciclina mediante método analítico rápido con el kit 3IN1BST

CONCENTRACIONES	BETALACTÁMICOS	SULFAMIDAS	TETRACICLINAS
Blanco Leche Cruda	3,69 N	4,29 N	2,60N
	3,33N	3,68N	3,45N
	3,11N	3,66N	3,39N
Clortetraciclina 100 (ppb)	3,84N	2,92N	0,06P
	3,87N	3,27N	0,10P
	3,83N	3,11N	0,03P
Oxitetraciclina- Tetraciclina 100 (ppb)	3,42N	2,58N	0,18P
	4,26N	3,38N	0,05P
	4,00N	2,99N	0,06P

*N: negativo, P: positivo

*Estos datos representan el resultado del ensayo completo del método analítico rápido que incluye los antibióticos betalactámicos, sulfanamidas y tetraciclina.

Tabla 11
Resultados determinación Falsos Positivos y Falsos Negativos.

FALSOS POSITIVOS		
Muestra fortificada con antibiótico Cloranfenicol		
Fórmula=	FP= b/a+b	Resultados
a= número de muestras negativas		0/ (18+0) =0
b= número de muestras positivas		
Resultados falsos positivos		0
FALSOS NEGATIVOS		
Muestras Fortificadas con Oxitetraciclina, Tetraciclina y Clortetraciclina		
Fórmula=	FN= c/c+d	Resultados
c= número de muestras negativas		0/ (0+6) =0
d= número de muestras positivas		
Resultados falsos negativos		0

Fuente: Elaborado por el autor, 2021

3.6. Resultados de Aplicación del método analítico rápido en muestras de leche cruda.

Una industria láctea en el país recibe aproximadamente 2 millones de litros de leche cruda mensuales para la producción y elaboración de los diferentes productos lácteos. La cantidad de litros de leche proveniente de los diferentes proveedores calificados se muestra en la figura 3.5. En donde se puede observar el código de proveedor numerado del 1 al 10, para leche cruda (LC), y la cantidad de litros recibidos mensualmente. El promedio de entrega por proveedor va desde los 52500 a 916700 litros mensuales los cuales dependen de la capacidad de entrega del proveedor y la época del año, aunque el proveedor con mayor entrega es el LC-P-2 y LC-P-4. Los análisis se hacen por tanquero recibido de cada uno de los proveedores, la capacidad va desde los 16890 a 23000 litros diarios.

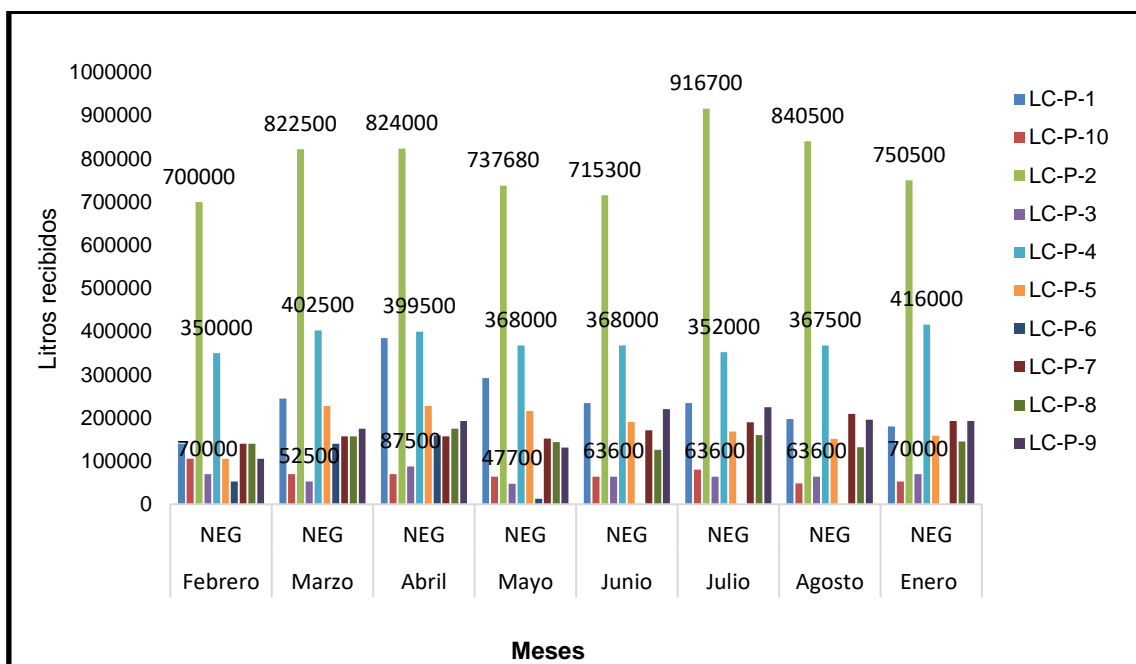


Figura 3.5 Gráfico de la cantidad de litros mensuales recibidos por proveedor y las pruebas de antibiótico aplicadas por proveedor

*Estos datos representan el resultado del ensayo completo del método analítico rápido que incluye los antibióticos.

Se aplico el método analítico rápido para la determinación de antibióticos en la recepción de la materia prima leche cruda durante 8 meses, donde se recibieron aproximadamente 18 millones de litros de leche cruda. Durante el seguimiento de los resultados obtenidos en los meses transcurridos del presente año no se han presentado resultados positivos en la detección de antibióticos, demostrando que se encuentran por debajo de los límites máximos permitidos según las normativas nacionales e internacionales como son el Inen y el Codex Alimentarius. La figura 3.6 muestra el número de pruebas aplicadas por proveedores según los litros entregados por mes que son 47 pruebas aplicadas para el proveedor con mayor número de entregas mensuales de leche cruda. Esto es Indicador de que se da cumplimiento a los controles y normativas vigentes por parte de los ganaderos y los entes regulatorios, además de ser proveedores calificados esto permite tener alianzas estratégicas que dan mayor compromiso del producto que es entregado a la industria. Además, del control de calidad y el personal calificado que presenta la industria ha permitido alinear a los proveedores existentes. Caso contrario producto con presencia de antibióticos es rechazado, la industria se encarga de comunicar al ente de control como es Agrocalidad, quienes realizan la verificación y decomiso del producto que no cumple con los parámetros establecidos según la norma Inen 009 de leche cruda.

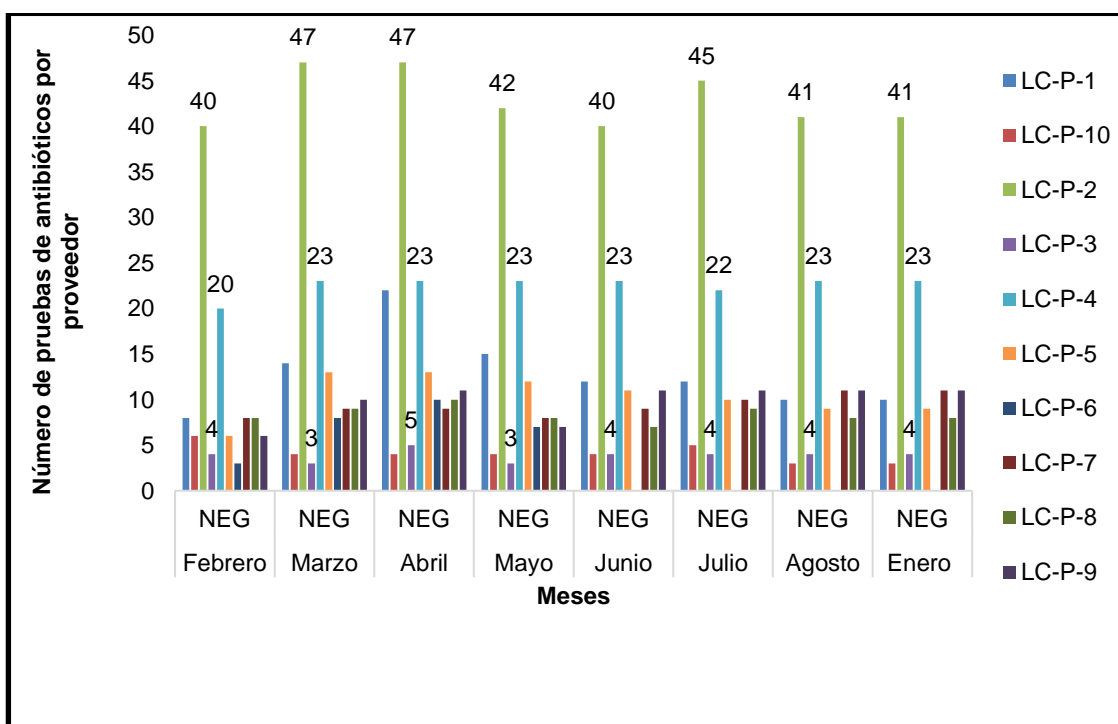


Figura 3.6 Gráfico del número de pruebas de antibiótico aplicadas por proveedor

*Estos datos representan el resultado del ensayo completo del método analítico rápido que incluye los antibióticos.

CAPÍTULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

1. Los métodos de cromatografía son los métodos confirmatorios comúnmente usados para determinación de antibióticos, en el presente trabajo se usó el método HPLC/DAD para la cuantificación de OT, TC, CT.
2. El método analítico rápido (kit 3IN1BST) satisface los criterios de desempeño establecidos, sensibilidad, selectividad, especificidad, falsos positivos, falsos negativos, para la detección de antibióticos en leche incluidos en la guía Eurachem. Se logró determinar un límite de detección de 25 ppb para tetraciclinas mismo que está por debajo del límite máximo de residuos establecido según el Codex Alimentarius (100 ppb).
3. Los resultados de la validación del kit rápido para residuos de antibióticos 3IN1 BST para Tetraciclinas, Oxitetraciclina y Clortetraciclina, muestran que es una prueba confiable para el screening de leche cruda, pues cumple con los criterios de aceptación según las norma nacionales e internacionales según los límites máximos de residuos permitidos para el consumo humano.
4. El método analítico rápido (kit 3IN1BST) satisfacen los criterios de selectividad, ya que es capaz de medir los analitos de interés sin presentar interferencias. A pesar de haber agregado intencionalmente otro antibiótico (cloranfenicol) que tiene componentes y comportamiento similar a las tetraciclinas.
5. Todas las réplicas de muestras fortificadas en 100 ppb con Clortetraciclina, Oxitetraciclina y Tetraciclina fueron detectadas al 100%, no se presentaron falsos negativos.
6. Es específico para tetraciclina, oxitetraciclina y clortetraciclina analitos diseñados para el método analítico rápido, ya que no presento falsos positivos ni falsos negativos a las pruebas aplicadas, con y sin el analito de interés.
7. Durante el seguimiento y aplicación del método analítico rápido a las muestras de leche cruda. no se presentaron resultados positivos en las pruebas de antibiótico realizadas a los litros entregados de los diferentes proveedores durante los meses del presente año, que suman un aproximado de 18 millones de litros en 8 meses de seguimiento.

4.2. Recomendaciones

1. Los análisis de HPLC se hicieron sin replicas por la falta de acceso al equipo y las restricciones de personal en los laboratorios durante la pandemia de coronavirus. Sería importante tener esas mediciones para hacer un análisis estadístico que permita comparar entre muestras el comportamiento en el porcentaje de recuperación.

BIBLIOGRAFÍA

- AOAC 995.09 (21st ed.). (2019).
- COMISION DEL CODEX ALIMENTARIUS. (2018). <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/maximum-residue-limits/es/>
- Cor, T., Fernández, F., Jorge, M., Hernández, L., Laida, D., & Ponce, M. (2003). *Resistencia bacteriana*. 32(1), 44–48.
- De, D., Schenck, F. J., & B, P. S. C. (1998). *Métodos cromatográficos de análisis de antibióticos en la leche*. 812, 99–109.
- Dubreil, E., Gautier, S., Fourmond, M. P., Bessiral, M., Gaugain, M., Verdon, E., & Pessel, D. (2017). Validation approach for a fast and simple targeted screening method for 75 antibiotics in meat and aquaculture products using LC-MS/MS. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 34(4), 453–468. <https://doi.org/10.1080/19440049.2016.1230278>
- Ecuatoriana, N. T., & Requisitos, L. C. (2012). *Instituto ecuatoriano de normalización*.
- En, Q., En, L., Noa-lima, E., Noa, M., González, D. G., & Landeros, P. (2009). *EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS Y EVALUATION OF THE PRESENCE OF ANTIMICROBIAL RESIDUES IN MILK IN THE STATE OF JALISCO , MEXICO*. 31(1), 29–33.
- European Commission. (2010). *Commission Regulation of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin*. 37/ 2010/E. https://ec.europa.eu/food/system/files/2016-10/cs_vet-med-residues_guideline_validation_screening_en.pdf
- Guerrero, D. M., & G, rodrigo motta. (2009). *DETECCIÓN DE RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS Y TETRACICLINAS EN LECHE CRUDA COMERCIALIZADA EN EL CALLAO*. https://200.62.146.19/BVRevistas/ciencia/v12_n2/pdf/a05v12n2.pdf
- Guía para validación de métodos de ensayo*. (2019). 1–10. https://www.google.com/search?q=guia+para+validacion+de+metdos+de+ensayos&rlz=1C1CHBD_esEC904EC904&oq=guia&aqs=chrome.0.69i59j69i57j35i39j0i20i263i433i2j0j0i131i433j0i131i433i457j0i402j0.2075j0j15&sourceid=chrome&ie=UTF-8
- Haroenraks, T. C., Huanuwatanakul, S. C., Onda, K. H., Amaguchi, Y. Y., & Hailapakul, O. C. (2005). *Análisis de antibióticos de tetraciclina mediante HPLC con detección amperométrica pulsada*. 21, 241–245.
- Kantiani, L., Farré, M., & Barceló, D. (2009). *Metodologías analíticas para la detección de B-antibióticos lactámicos en muestras de leche y piensos*. 28. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.04.005>
- La Rosa Zambrano, P. E. (2016). *Uso de técnicas cromatográficas en la identificación de residuos de antibióticos veterinarios*. 87.
- Límites máximos de residuos (Imr) y recomendaciones sobre la gestión de riesgos (rgr) para residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos cx/mrl 2-2018*. (2018).
- Monica Cartelle Gestal, J. E. V. (2014). *De la granja a la mesa. Implicaciones del uso de Antibióticos en la crianza de animales para la resistencia microbiana y la salud*. 130. <http://www.revalnutricion.sld.cu/index.php/rcan/article/view/159>
- Moudgil, P. (2019). *de fluoroquinolonas , tetraciclina , sulfonamidas y residuos de cloranfenicol en la leche bovina*. 338–346.
- Örnemark, U., & Magnusson, B. (2014). *Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*. https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_ES.pdf

- Perez, D. Q. (2017). *Resistencia antimicrobiana: evolución y perspectivas actuales ante el enfoque "Una salud."* 10–13. http://scielo.sld.cu/pdf/mtr/v69n3/a09_263.pdf
- Pr, B., Nacionales, L., & Farmac, C. (2002). *Validación.* 1–83. https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2008/13_Modulo_VALIDACION_de_Metodos_Fisicoqcos.pdf
- Ravisankar, P., Navya, C. N., Pravallika, D., & Sri, D. N. (2019). *Una revisión sobre la validación del método analítico paso a paso.* <file:///C:/Users/HP/Downloads/AReviwonStep-by-StepAnalyticalMethodValidation.en.es.pdf>
- Riera, maria milagro reig. (2010). *Desarrollo de métodos rápidos de detección de residuos medicamentosos en animales de granja* [Politecnica de Valencia]. <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/8644/tesisUPV3390.pdf>
- Santillan-urquiza, E. (2016). *Productos lácteos funcionales , fortificados y sus beneficios en la salud humana.* November.
- Yu, X., Wei, L., Chen, H., Niu, X., Dou, Y., & Yang, J. (2018). *Desarrollo de un ensayo inmunocromatográfico a base de oro coloidal para la detección rápida del parvovirus del ganso.* 3–5. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.00953/full>

ANEXOS

ANEXO A

LISTA DE MATERIALES UTILIZADOS EN EL ANÁLISIS POR HPLC Y EL MÉTODO ANALÍTICO RÁPIDO

a. Cromatografía de alta resolución HPLC-DAD.

- Gradillas
- Jeringas
- Picetas
- Agitadores
- Espátulas metálicas
- Micropipeta en rango 0.5 a 5 ml
- Micropipeta en rango 20 a 200 ul
- Micropipeta de 5 a 50 ul
- Micropipeta de 100 a 1000 ul
- Tubos de centrifuga de 50 ml
- Viales de 2 ml con tapa septum
- Tubos plásticos de 20 ml
- Vaso de precipitación 1000 ml
- Matraces volumétricos ámbar de 50 ml
- Filtros de membrana de 0.45 um de poro y 13mm de diámetro

b. Método rápido kit 3IN1BST Bioeasy.

- Porta placas
- Micropipeta de 200 ul
- Puntas descartables

ANEXO B

RESULTADOS DE ANÁLISIS ANTIBIÓTICOS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES UTILIZANDO LA TÉCNICA DE HPLC

a. Oxitetraciclina

CONCENTRACIÓN (ppb)	ÁREA	FÓRMULA	PESO MUESTRA (g)	RESULTADO (ppb)	RECUPERACIÓN (%)
6.25	No detectado	No detectado	5,0018	No detectado	No detectado
12.5	No detectado	No detectado	5,0047	No detectado	No detectado
25.00	3,46	44,49	5,0056	22,22	88,87
50.00	6,95	93,55	5,0047	46,73	93,47
75.00	9,88	134,83	5,0084	67,30	89,74
100.00	13,14	180,68	5,0030	90,29	90,29
200.00	21,28	295,11	5,0077	147,33	73,66

b. Tetraciclina

CONCENTRACIONES (ppb)	ÁREA	FÓRMULA	PESO MUESTRA (g)	RESULTADO (ppb)	RECUPERACIÓN (%)
6.25	No detectado	No detectado	5,0018	No detectado	No detectado
12.5	No detectado	No detectado	5,0047	No detectado	No detectado
25.00	3,07	52,73	5,0056	26,34	105,35
50.00	6,42	117,59	5,0047	58,74	117,48
75.00	8,02	148,37	5,0084	74,06	98,75
100.00	11,08	207,54	5,0030	103,71	103,71
200.00	20,60	391,29	5,0077	195,34	97,67

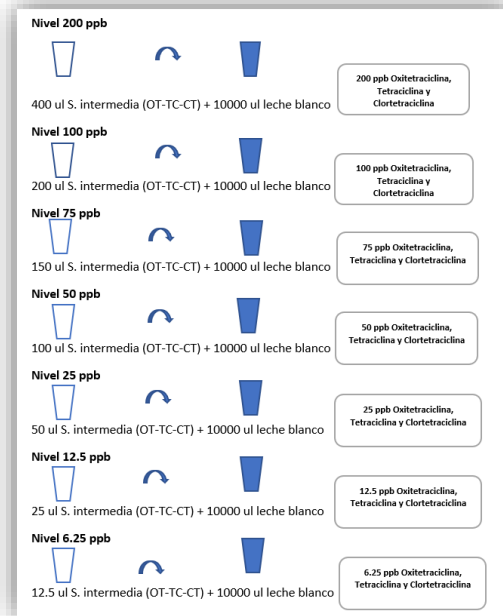
c. Clortetraciclina

CONCENTRACIONES (ppb)	ÁREA	FÓRMULA	PESO MUESTRA (g)	RESULTADO (ppb)	RECUPERACIÓN (%)
6.25	No detectado	No detectado	5,0018	No detectado	No detectado
12.5	No detectado	No detectado	5,0047	No detectado	No detectado
25.00	No detectado	No detectado	5,0056	No detectado	No detectado
50.00	0,44	45,54	5,0047	22,75	45,50
75.00	0,56	57,85	5,0084	28,87	38,50
100.00	1,03	105,68	5,0030	52,81	52,81
200.00	1,98	204,25	5,0077	101,97	50,98

Fuente: Laboratorio de Análisis Químico y Microbiológico de alimentos de la Subsecretaría de Calidad e Inocuidad

ANEXO C

MÉTODO DE FORTIFICACIÓN DE MUESTRAS



Fuente: Elaborado por el autor, 2021

Para obtener las fortificaciones de cada una de las concentraciones objetivo se realizó desde la siguiente formula:

$$C1V1=C2V2$$

Concentración 1 (200 ug/kg)

$$(5000 \text{ ug/l}) (v1) = (100 \text{ ug/kg}) (10\text{ml})$$

V1= 0.4 ml de solución intermedia en 10 ml de muestra blanco

Concentración 2 (100 ug/kg)

$$(5000 \text{ ug/kg}) (v1) = (100 \text{ ug/kg}) (10\text{ml})$$

V1= 0.2 ml de solución intermedia en 10 ml de muestra blanco

Concentración 3 (75 ug/kg)

$$(5000 \text{ ug/kg}) (v1) = (75 \text{ ug/kg}) (10\text{ml})$$

V1= 0.15 ml de solución intermedia en 10 ml de muestra blanco

Concentración 4 (50 ug/kg)

$$(5000 \text{ ug/kg}) (v1) = (50 \text{ ug/kg}) (10\text{ml})$$

V1= 0.1 ml de solución intermedia en 10 ml de muestra blanco

Concentración 5 (25 ug/kg)

$$(5000 \text{ ug/kg}) (v1) = (25 \text{ ug/kg}) (10\text{ml})$$

V1= 0.05 ml de solución intermedia en 10 ml de muestra blanco

Concentración 6 (12.5 ug/kg)

$$(5000 \text{ ug/kg}) (v1) = (12.5 \text{ ug/kg}) (10\text{ml})$$

V1= 0.025 ml de solución intermedia en 10 ml de muestra blanco

Concentración 7 (6.25 ug/kg)

$$(5000 \text{ ug/kg}) (v1) = (6.25 \text{ ug/kg}) (10\text{ml})$$

V1= 0.0125 ml de solución intermedia en 10 ml de muestra blanco

ANEXO D

PLAN DE VALIDACIÓN DE ANTIBIÓTICOS OXITETRACICLINAS, TETRACICLINAS, CLORTETRACICLINAS

PLAN DE VALIDACIÓN DE ANTIBIÓTICOS TETRACICLINAS EN LECHE LIQUIDA CRUDA
<p>La validación se realizará a partir de una solución stock de 1000000ppb de los antibióticos Clortetraciclina, tetraciclina y oxitetraciclina. Se realizará una muestra intermedia desde la muestra stock obteniendo como concentración final 5000 ppb a partir de la cual se realizará las diluciones para obtener las concentraciones de estudio, 200, 100, 75, 50, 25, 12.5, 6.25 ppb. Se usará leche líquida cruda como muestra blanca. Se determinará en el kit rápido 3IN1BST 10 réplicas por x 7 niveles = 70 muestras y se comparará los resultados con el método en HPLC.</p>

DETERMINACIÓN DEL LIMITE DE DETECCIÓN		
Descripción	Actividades	Criterio de aceptación
<p>Para encontrar el límite de detección se usará muestras fortificadas en diferentes niveles desde 200 ppb hasta 6,25 ppb como límite de detección.</p>	<p>Se realizará 10 réplicas de cada una de las concentraciones establecidas 200-100-75-50-25-12,5 y 6,25 ppb, se realizará una curva de respuesta de porcentajes de resultados positivos y negativos frente a la concentración, en la que se determinará en que concentración se vuelve poco confiable el método, además se realizará comparación con el método HPLC.</p>	<p>6,25 ppb</p>

SENSIBILIDAD		
Descripción	Actividades	Criterio de aceptación
<p>Diagnóstica: Se usará diferentes niveles en el que se determinará el nivel más bajo que puede ser detectado correctamente el analito. Analítica: Respuesta que presente a cada una de las concentraciones del analito.</p>	<p>Se determinará mediante los resultados obtenidos del nivel más bajo de detección del método analítico rápido 3IN1BST. Nivel de respuesta a cada una de las concentraciones.</p>	<p>Mayor a 90%</p>

SELECTIVIDAD		
Descripción	Actividades	Criterio de aceptación
<p>Para determinar si existe interferencias en el método analítico rápido de estudio y ver la capacidad para diferenciar exactamente el analito en presencia de otros compuestos que están presentes o que tenga componentes de comportamiento similar como es el caso de cloranfenicol.</p> <p>Para la determinación de selectividad del método se usará una muestra fortificada en 100 ppb con el antibiótico cloranfenicol + tetraciclina en las concentraciones (100-75-50-25-12,5 y 6,25 ppb).</p>	<p>Se realizará 3 réplicas de cada una de las concentraciones establecidas.</p>	Mayor a 90%
<p>Falsos-positivos: Es la probabilidad que el ensayo presente un resultado positivo cuando la muestra no contiene antibióticos o tiene otro tipo de antibióticos no objeto de estudio. Será $b/(a+b)$, es decir la fracción de muestras positivas asignada por el método erróneamente. a = serán el número de muestras que den como resultado negativo. b= serán el número de muestras que den como resultado positivo.</p> <p>Falsos-negativos: Es la probabilidad que el ensayo presente un resultado negativo cuando la muestra contiene el analito (positivo). Fórmula: $c/(c+d)$ C= número de muestras con resultado negativo. D= número de muestras con resultado positivo.</p>	<p>Se realizará 3 repeticiones de la muestra de leche cruda blanco, además de los resultados que se obtengan de las muestras con el antibiótico cloranfenicol en las diferentes concentraciones.</p>	
	<p>Se realizará 3 réplicas con muestras fortificadas de Clortetraciclina en concentración 100 ppb y otra muestra de Oxitetraciclina, y Tetraciclina en 100 ppb.</p>	

ESPECIFICIDAD		
Descripción	Actividades	Criterio de aceptación
<p>Será el resultado del número total de muestras negativas que son correctamente asignadas por el método en presencia de un antibiótico no diseñado para el método como es cloranfenicol. Fórmula: $E = (a+d) / n$ Se usará unas muestras fortificadas con cloranfenicol.</p>	<p>Se realizará 3 réplicas de las muestras con el antibiótico cloranfenicol en las diferentes concentraciones (100-75-50-25-12,5 y 6,25 ppb).</p>	No detectados

Fuente: Elaborador por el autor, 2021
Tomado en base de datos de la guía Eurachem (Örnemark & Magnusson, 2014)

ANEXO E

PLAN DE VALIDACIÓN DE ANTIBIÓTICOS OXITETRACICLINA, TETRACICLINA, CLORTETRACICLINA

PLAN DE VALIDACIÓN		
ANTIBIÓTICOS A USAR EN VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANÁLITICO RÁPIDO	OXITETRACICLINA, CLORTETRACICLINA Y TETRACICLINA	
MÉTODO	SEMICUALITATIVO	
	NO NORMALIZADO	
CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO	LIMITES ESTABLECIDOS	
LIMITE DE DETECCIÓN	6,25 ppb	
SELECTIVIDAD	100%	
ESPECIFICIDAD	100%	
FALSOS POSITIVOS, NEGATIVOS	0%	
EQUIPOS		
MÉTODO CONFIRMATORIO (HPLC)	MÉTODO DE ANÁLISIS RÁPIDO 3IN1BST	
Detector DAD	Lector de tirillas	
Cromatógrafo líquido de alta eficacia	Incubadora con rango de trabajo 40 +/- 2 °C	
Micropipeta automática 200 ul	Micropipeta automática 200 ul	
Vortex	Kit Código 3INBST	
refrigerador		
Baño ultrasónico		
ph metro		
Cartuchos SPE Oasis		
Cámara de filtración en fase solida		
Balanza analítica y gramera		
CONCENTRACIONES DE NIVELES	MATRIZ	RESULTADO ESPERADO
6,25 ppb (OT/TC/CT)	Leche líquida	Detectado
12,5 ppb (OT/TC/CT)		Detectado
25 ppb (OT/TC/CT)		Detectado
50 ppb (OT/TC/CT)		Detectado
75 ppb (OT/TC/CT)		Detectado
100 ppb (OT/TC/CT)		Detectado
200 ppb (OT/TC/CT)		Detectado
100 ppb de Clortetraciclina		Detectado
100 ppb (OT, TC)		Detectado
6,25 a 100 ppb Cloranfenicol + tetraciclinas		Detectado
6,25 a 100 ppb Cloranfenicol		No Detectado

ANEXO F

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS DE LAS TASAS DE FALSO POSITIVO Y DE FALSO NEGATIVO.

INTERPRETACION DE LAS FORMULAS				
		Muestras positivas y negativas		Resultado
		+	-	
Resultados Confirmados por el Método	Prueba Positiva (+)	Pruebas positivas verdaderas (a)	Pruebas positivas falsas (b)	Número total de pruebas positivas (a+b)
	Prueba Negativa (-)	Pruebas negativas falsas (c)	Pruebas negativas verdaderas (d)	Número total de pruebas negativas (c+d)
		a+c	b+d	N

Fuente: Elaborador por el autor, 2021

Tomado en base de datos de la guía Eurachem (Örnemark & Magnusson, 2014)

ANEXO G

DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN DE CORTE- LIMITE DE DETECCIÓN DEL MÉTODO ANÁLITICO RÁPIDO

Concentración (ppb)	Número de resultados positivos y negativos	tasa de respuesta positiva (%)
0	0/10	0
6,25	0/10	0
12,5	0/10	0
25	10/0	100
50	10/0	100
75	10/0	100
100	10/0	100
200	10/0	100

Fuente: Elaborado por el autor, 2021

ANEXO H

RESULTADOS DE MUESTRAS FORTIFICADAS CON ANTIBIÓTICOS OXITETRACICLINA, TETRACICLINA, CLORTETRACICLINA MEDINATE EL METODO ANÁLITICO RÁPIDO 3IN1BST BIOEASY

CONCENTRACION	BETALACTAMICOS	SULFAMIDAS	TETRACICLINA	Número de resultados positivos / negativos
Control negativo (3IN1BST) + blanco leche	3,17 N	4,57 N	4,35 N	-
Control positivo (3IN1BST) (60 ppb Tetraciclina-50 ppb Sulfametazina- 4,5 PPB Penicilina G) + blanco leche	0,00 P	0,00 P	0,04 P	-
Blanco Leche Cruda	3,7	4,31	3,59	0/10
	3,56	4,19	3,53	
	3,59	4,17	3,51	
	3,69	4,29	3,54	
	3,57	4,2	3,56	
	3,7	4,21	3,57	
	3,56	4,19	3,53	
	3,57	4,18	3,52	
Leche cruda + 6. 25 ppb	3,89	4,48	3,45	0/10
	3,69	4,26	3,34	
	4,12	4,78	3,62	
	3,9	4,76	3,55	
	3,87	4,78	3,61	
	3,69	4,77	3,5	
	3,67	4,75	3,48	
	3,85	4,78	3,45	
Leche cruda + 12.5 ppb	3,7	4,76	3,47	0/10
	3,88	4,75	3,45	
	3,45	3,87	1,27	
	3,23	3,68	1,31	
	3,31	3,64	1,37	
	3,3	3,72	1,26	
	3,3	3,67	1,3	
	3,31	3,86	1,35	
	3,29	3,69	1,34	
	3,25	3,68	1,3	
Leche cruda + 25 ppb	3,23	3,78	1,29	10/0
	3,24	3,65	1,27	
	2,94	3,27	0,26	
	3,28	3,56	0,3	
	3,07	3,3	0,32	
	3,29	3,29	0,25	
	3,26	3,57	0,3	
3,1	3,58	0,31		
3,26	3,58	0,26		

	3,28	3,28	0,3	
	3,16	3,3	0,3	
	2,98	3,3	0,3	
Leche cruda + 50 ppb	3,18	3,47	0,1	10/0
	2,6	2,83	0,23	
	3,12	3,31	0,2	
	3,2	3,32	0,24	
	3,16	2,98	0,2	
	3,18	3,48	0,2	
	3,21	3,5	0,11	
	3,17	3,47	0,22	
	3,18	3,3	0,23	
	3,2	3,31	0,1	
Leche cruda + 75 ppb	3,54	3,95	0	10/0
	3,14	3,64	0,07	
	3,25	3,76	0	
	3,55	3,95	0,06	
	3,54	3,67	0	
	3,16	3,77	0	
	3,28	3,76	0,06	
	3,55	3,89	0	
	3,57	3,94	0,07	
3,27	3,95	0		
Leche cruda + 100 ppb	3,13	3,77	0	10/0
	3,35	3,8	0,02	
	3,12	3,54	0	
	3,12	3,8	0	
	3,35	3,54	0	
	3,35	3,76	0	
	3,32	3,79	0	
	3,34	3,8	0,01	
3,14	3,79	0,02		
3,13	3,77	0,02		
Leche cruda + 200 ppb	3,38	3,96	0	10/0
	2,81	3,23	0	
	3,17	3,6	0	
	3,36	3,95	0	
	3,38	3,25	0	
	2,95	3,59	0	
	3,34	3,94	0	
	3,35	3,96	0	
	3,35	3,24	0	
3,37	3,55	0		

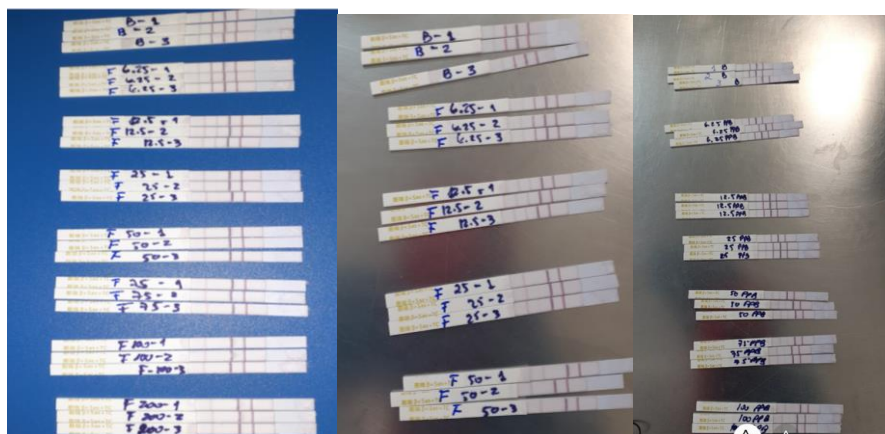
ANEXO I

RESULTADOS DE ANALISIS COMPLETO DE LECHE CRUDA ENRIQUECIDA CON ANTIBIÓTICO (CLORANFENICOL, TETRACICLINA)

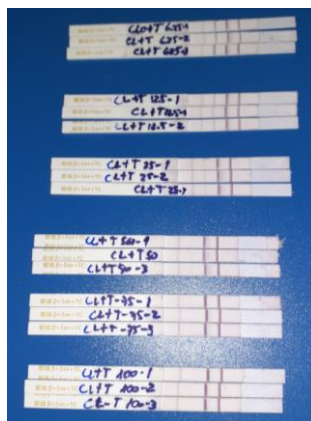
CONCENTRACION	BETALACTAMICOS	SULFAMIDAS	TETRACICLINAS
Blanco Leche Cruda	4,11N	4,86N	4,10N
	3,86N	4,43N	3,76N
	4,00N	4,21N	3,88N
Leche cruda + 6,25 ppb	4,55N	5,09N	3,36N
	4,47N	4,96N	3,36N
	4,95N	5,30N	3,97N
Leche cruda + 12,5 ppb	3,77N	3,94N	1,45N
	4,06N	4,17N	1,22N
	4,12N	4,16N	1,41N
Leche cruda + 25 ppb	4,56N	4,36N	0,44P
	4,01N	4,03N	0,59P
	4,24N	4,10N	0,51P
Leche cruda + 50 ppb	3,37N	3,35N	0,21P
	4,11N	3,71N	0,21P
	3,79N	3,25N	0,21P
Leche cruda + 75 ppb	3,85N	3,85N	0,14P
	3,76N	4,04N	0,01P
	3,29N	2,98N	0,13P
Leche cruda + 100 ppb	3,37N	3,54N	0,00P
	3,93N	4,14N	0,09P
	3,89N	3,96N	0,11P

ANEXO J

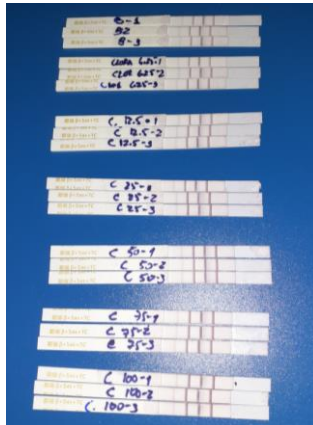
IMÁGENES DE LAS TIRILLAS UTILIZADAS EN EL MÉTODO ANÁLITICO RÁPIDO



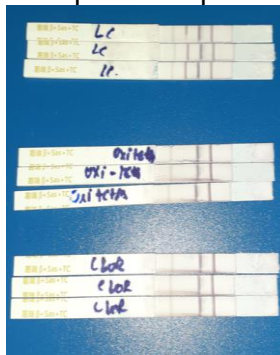
- a. Resultado de muestras de leche fortificadas con antibióticos Oxitetraciclina, Clortetraciclina, Tetraciclina en diferentes concentraciones mediante prueba rápida de kit 3IN1BST Bioeasy



- b. Resultado de muestras de leche fortificadas en diferentes concentraciones con antibiótico Cloranfenicol y Tetraciclina mediante prueba rápida de kit 3IN1BST Bioeasy



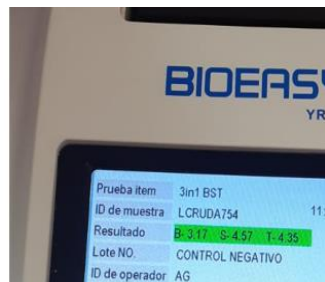
c. Resultado de muestras de leche fortificadas con antibiótico Cloranfenicol en diferentes concentraciones mediante prueba rápida de kit 3IN1BST Bioeasy



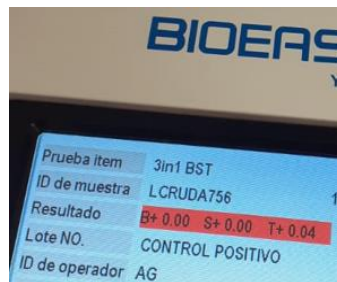
c. Resultado de muestras de leche fortificadas en 100 PPB con Oxitetraciclina más tetraciclina y Clortetraciclina mediante prueba rápida de kit 3IN1BST Bioeasy

ANEXO K

RESULTADOS CONTROLES DEL MÉTODO ANÁLITICO RÁPIDO 3IN1BST BIOEASY



a) control negativo



b) control positivo

Fuente: Fotografía del autor, 2021