

Nisina (E 234) en huevo líquido pasteurizado e interpretación de la posible interferencia en el cribado de residuos antimicrobianos

Bases microbiológicas, especificidad analítica y riesgo de falsos positivos aparentes

Nisin (E 234) in pasteurized liquid egg and interference with antimicrobial-residue screening: microbiological basis, analytical specificity and the risk of apparent false-positive results

Autoría	José M. López · Director Técnico
Afiliación	INTABIOTECH (Departamento de I+D+i)
Autor de correspondencia	dtecnico@intabiotech.com
Tipo de manuscrito	Revisión

Resumen

La nisina (E 234) es una bacteriocina lantipeptídica producida por determinadas cepas de *Lactococcus lactis* y autorizada en la Unión Europea como conservador alimentario. Entre sus usos autorizados figura específicamente el huevo líquido pasteurizado -clara, yema o huevo entero- con un nivel máximo de 6,25 mg/kg. Esta utilización responde a una necesidad tecnológica bien definida, esto es, la de complementar el tratamiento térmico frente a microorganismos Gram positivos, especialmente bacterias esporuladas capaces de sobrevivir al régimen de pasteurización compatible con las propiedades funcionales de los ovoproductos. La literatura experimental demuestra que la nisina puede conservar actividad antimicrobiana después de la pasteurización y ejercer efectos prolongados durante el almacenamiento del huevo líquido.

Una parte de los métodos utilizados para el cribado de residuos de antibióticos en alimentos de origen animal se basa en la inhibición del crecimiento de microorganismos indicadores, con especial utilización de *Geobacillus stearothermophilus*. Estos sistemas no determinan por sí mismos la estructura química de la sustancia responsable de la inhibición, pero detectan una respuesta biológica. En consecuencia, una sustancia antimicrobiana legalmente incorporada al alimento puede, si alcanza actividad suficiente en las condiciones del ensayo, inducir una respuesta positiva aun en ausencia de residuos de medicamentos veterinarios. La posibilidad resulta particularmente plausible para la nisina debido a su mecanismo de acción sobre bacterias Gram positivas y a la evidencia experimental disponible sobre *Bacillus/Geobacillus*.

El término «falso positivo», aunque habitual en la práctica industrial, requiere matización. Si el ensayo mide actividad inhibitoria, la señal provocada por nisina puede ser biológicamente verdadera; lo incorrecto sería inferir a partir de ella la presencia de un residuo farmacológico concreto. Resulta más preciso hablar de resultado de cribado positivo inducido por un interferente no diana, positivo aparente respecto de residuos veterinarios o falsa atribución causal. Esta interpretación es coherente con el Reglamento de Ejecución (UE) 2021/808, en el que un resultado *Screen Positive* clasifica la muestra como potencialmente no conforme y desencadena una prueba confirmatoria; la norma exige asimismo evaluar selectividad e interferencias y reserva a los métodos confirmatorios la obtención de información estructural suficiente sobre el analito.

La evidencia disponible permite considerar científicamente sólida la posibilidad de interferencia en determinados ensayos microbiológicos, pero no permite afirmar que 6,25 mg/kg de nisina produzcan necesariamente un resultado positivo en cualquier kit comercial. La ausencia de estudios sistemáticos matriz x concentración x plataforma analítica constituye una laguna científica relevante. Se propone un diseño experimental factorial, con diferentes matrices de ovoproducto, concentraciones crecientes de nisina, controles negativos y positivos, cuantificación independiente de nisina y confirmación multiresiduo mediante LC-MS/MS o LC-HRMS, orientado a establecer causalidad, concentración umbral y probabilidad de clasificación positiva para cada plataforma analítica.

Palabras clave: nisina; E 234; bacteriocina; huevo líquido pasteurizado; ovoproductos; residuos veterinarios; antibióticos; sustancias inhibitorias; falso positivo; *Geobacillus stearothermophilus*; screening; LC-MS/MS; HRMS; selectividad analítica.

Abstract

Nisin (E 234) is a lantipeptide bacteriocin produced by selected strains of Lactococcus lactis and authorised in the European Union as a food preservative. Its authorised uses specifically include pasteurised liquid egg -egg white, yolk or whole egg- at a maximum level of 6.25 mg/kg. This application has a clear technological rationale: complementing thermal processing against Gram-positive microorganisms, particularly spore-forming bacteria that may survive pasteurisation conditions compatible with the functional properties of egg products. Experimental studies demonstrate that biologically active nisin may persist following pasteurisation and exert antimicrobial effects during subsequent refrigerated storage.

Several methods used for screening antibiotic residues in foods of animal origin rely on inhibition of susceptible indicator microorganisms, frequently Geobacillus stearothermophilus. Such assays do not inherently determine the chemical identity of the inhibitory compound; they detect a biological response. Consequently, a legally incorporated food antimicrobial may generate a positive screening response when present at a biologically effective concentration, even in the absence of veterinary drug residues. This possibility is particularly plausible for nisin because of its mechanism of action against Gram-positive organisms and published evidence involving Bacillus/Geobacillus.

The commonly used term 'false positive' requires qualification. If the analytical system measures microbial inhibition, a response caused by nisin may be biologically correct; the error arises when that response is interpreted as proof of a specific veterinary antibiotic residue. The more accurate terminology is non-target inhibitor-induced screen-positive result, apparent positive for veterinary residues, or causal misattribution. This distinction is consistent with Commission Implementing Regulation (EU) 2021/808, under which a screen-positive result categorises a sample as potentially non-compliant and triggers confirmatory testing, while selectivity, interference and structural identification requirements apply according to the analytical stage.

Current evidence strongly supports the biological plausibility of nisin interference in selected microbiological screening assays. However, it does not establish that 6.25 mg/kg nisin necessarily produces a positive result in every commercial assay, nor does it define universal test-specific interference thresholds. A factorial validation study involving multiple egg matrices, nisin concentration levels, positive and negative controls, independent nisin determination and orthogonal LC-MS/MS or LC-HRMS confirmation is proposed to establish causality and quantitative interference thresholds.

Keywords: nisin; E 234; pasteurized liquid egg; bacteriocin; veterinary drug residues; antibiotic screening; microbial inhibition; false positive; Geobacillus stearothermophilus; LC-MS/MS; HRMS.

Mensajes centrales del presente trabajo

- La nisina puede permanecer biológicamente activa en huevo líquido pasteurizado y, por su mecanismo antimicrobiano, es un interferente plausible en bioensayos de inhibición.
- Un resultado microbiológico Screen Positive demuestra actividad inhibitoria suficiente bajo las condiciones del ensayo; no identifica por sí solo un residuo veterinario concreto.
- La interferencia debe demostrarse para cada combinación de matriz, concentración y método. No existe evidencia suficiente para sostener un umbral universal aplicable a todos los kits.
- La resolución de resultados discordantes exige metodología ortogonal, preferentemente confirmación multirresiduo por LC-MS/MS o LC-HRMS dentro de un alcance validado.

1. Introducción

El control de residuos de medicamentos veterinarios constituye uno de los pilares de la seguridad química de los alimentos de origen animal. Huevos y ovoproductos no son una excepción. Es claro que distintas familias farmacológicas administradas a aves pueden alcanzar el huevo, y la vigilancia analítica debe disponer de suficiente sensibilidad para detectar residuos potencialmente relevantes y suficiente selectividad para evitar atribuciones erróneas.

Esta segunda exigencia es menos intuitiva que la primera. En la práctica industrial se utiliza con frecuencia la expresión «test de antibióticos» como si designara una única clase de procedimiento. Bajo esa denominación conviven, sin embargo, tecnologías de principio analítico radicalmente distinto. Algunos ensayos reconocen moléculas o familias químicas mediante anticuerpos o receptores; otros detectan una respuesta funcional, normalmente la inhibición del crecimiento de una bacteria extremadamente sensible. Los segundos son útiles como instrumentos de cribado amplio, pero su propia naturaleza plantea un problema epistemológico fundamental que definimos del siguiente modo: una bacteria indicadora detecta que algo inhibe su crecimiento, no conoce el origen farmacológico o tecnológico de aquello que la inhibe, y en consecuencia tampoco el jurídico, por imposibilidad material definitoria.

La cuestión adquiere especial relevancia en alimentos a los que pueden incorporarse legalmente sustancias antimicrobianas. El huevo líquido pasteurizado constituye precisamente uno de esos casos. La legislación europea autoriza la utilización de nisina, E 234, hasta un máximo de 6,25 mg/kg en huevo líquido pasteurizado, incluyendo clara, yema y huevo entero (Reglamento (CE) N.º 1333/2008; Comisión Europea, Food and Feed Information Portal). La nisina no es un conservador inerte, antes al contrario, se utiliza porque posee una actividad antibacteriana real y potente, particularmente frente a microorganismos Gram positivos. Los trabajos realizados específicamente en huevo líquido han demostrado prolongación de la vida útil, control de microorganismos esporulados y persistencia de actividad tras el tratamiento térmico (*Delves-Broughton et al., 1992; Schuman & Sheldon, 2003; Goshali et al., 2025*).

Surge así una paradoja aparente. Una sustancia se añade al huevo precisamente para inhibir microorganismos y posteriormente, la muestra se introduce en un ensayo cuyo fundamento consiste en comprobar si un microorganismo resulta inhibido. Si el ensayo responde positivamente, la pregunta analítica correcta no es simplemente «¿hay antibióticos?», sino «¿qué sustancia o conjunto de sustancias ha impedido el crecimiento del organismo indicador?». Esa reformulación cambia de manera sustancial el alcance probatorio del resultado.

Un resultado de screening incorrectamente interpretado puede conducir a inmovilización de lotes, rechazo de cisternas, reclamaciones comerciales, investigación de proveedores, sospechas de utilización indebida de medicamentos veterinarios e incluso actuaciones administrativas. Por tanto, el problema no reside únicamente en la sensibilidad de la metodología, sino en qué afirmación puede legítimamente hacerse a partir de la señal obtenida.

El objetivo de esta revisión es examinar, desde una perspectiva interdisciplinar, si la nisina presente legalmente en huevo líquido pasteurizado puede explicar resultados positivos o identificaciones incorrectas de antibióticos en ensayos destinados al control de residuos antimicrobianos. La hipótesis central es que la respuesta depende decisivamente del principio analítico utilizado y que la expresión «positivo a antibióticos» puede ser científicamente inadecuada cuando procede exclusivamente de un método microbiológico de inhibición.

2. Alcance y metodología de la revisión

El presente trabajo se plantea como una revisión crítica narrativa con búsqueda documental estructurada, y no como una revisión sistemática PRISMA. Esta calificación es deliberada: una revisión verdaderamente sistemática exigiría reproducibilidad exhaustiva en múltiples bases bibliográficas, evaluación formal del riesgo de sesgo y protocolo de selección previamente establecido.

La búsqueda documental, actualizada al 9 de agosto de 2026, se centró en PubMed/MEDLINE y en fuentes regulatorias primarias de la Unión Europea -EUR-Lex, Comisión Europea y EFSA-, complementándose mediante rastreo de referencias de trabajos relevantes. Se utilizaron combinaciones de términos equivalentes a *nisin*, *liquid egg*, *pasteurized liquid whole egg*, *antibiotic residues*, *antimicrobial screening*, *microbial inhibition test*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *false positive*, *LC-MS/MS* y *high-resolution mass spectrometry*.

Se priorizaron cuatro categorías de evidencia, a saber: estudios primarios sobre nisina en huevo; trabajos sobre mecanismos microbiológicos y susceptibilidad de microorganismos indicadores; estudios de validación de métodos de cribado y confirmación en huevos; y fuentes regulatorias oficiales. Las revisiones secundarias se utilizaron para contextualización. La documentación comercial y las patentes se consideraron únicamente como evidencia tecnológica subsidiaria, no como fundamento principal de las conclusiones.

La búsqueda permitió identificar evidencia considerable sobre los componentes individuales del problema, pero no un estudio revisado por pares que, dentro de las fuentes consultadas, haya determinado sistemáticamente la frecuencia de resultados positivos producidos por diferentes concentraciones de nisina en una batería representativa de *kits* comerciales aplicada específicamente a huevo líquido pasteurizado. Esta ausencia es metodológicamente importante puesto que la plausibilidad causal de interferencia puede ser alta sin que exista todavía un valor universal capaz de predecir el comportamiento de todos los ensayos.

3. Nisina: identidad química, mecanismo de acción y estatuto regulatorio

3.1. Identidad y especificaciones

La nisina pertenece a las bacteriocinas producidas por bacterias ácido-lácticas y, más específicamente, a los lantipéptidos. El Reglamento (UE) N.º 231/2012 define E 234 como un conjunto de polipéptidos estrechamente relacionados producidos por cepas de *Lactococcus lactis subsp. lactis* y establece especificaciones de identidad y actividad. Esta descripción regulatoria proporciona una primera advertencia analítica que conviene tener presente. Y no es otra que el hecho de que la masa de una preparación comercial de nisina no debe confundirse automáticamente con la masa de nisina biológicamente activa.

Los productos comerciales pueden estar estandarizados por actividad, concentración o ambos parámetros. Desde una perspectiva experimental, la variable verdaderamente relevante para estudiar una interferencia microbiológica no es únicamente cuántos miligramos de preparado se añadieron al kilogramo de huevo, sino la cantidad y actividad de nisina que efectivamente alcanza al organismo indicador. Cuando la concentración activa del preparado se conoce gravimétricamente, la relación puede expresarse como $C_{nisina} = C_{preparado} \times f_{activo}$. Cuando la estandarización se realiza en unidades biológicas, debe documentarse asimismo la potencia del lote. Una publicación académica no debería intercambiar de forma acrítica ppm de preparado comercial, ppm de sustancia activa y unidades de actividad.

$$C_{nisina} = C_{preparado} \times f_{activo}$$

3.2. ¿Es la nisina un antibiótico?

La respuesta depende del significado atribuido al término. Desde la perspectiva purista y academicista de la microbiología, la nisina es indiscutiblemente una sustancia antimicrobiana; la literatura puede denominarla *lantibiotic* o *peptide antibiotic*. Ese lenguaje refleja su biología molecular, pero no necesariamente su clasificación jurídica.

Desde el Derecho alimentario europeo, la nisina utilizada en las condiciones previstas en el Reglamento (CE) N.º 1333/2008 es un aditivo alimentario conservador E 234. No se convierte en un residuo de medicamento veterinario por el hecho de poseer actividad antibacteriana. Un residuo veterinario remite a una sustancia farmacológicamente activa -o al residuo marcador definido para su control- presente como consecuencia del tratamiento o exposición del animal. La nisina adicionada durante el procesamiento del ovoproducto posee un origen, una finalidad tecnológica y un régimen jurídico diferentes y en consecuencia:

Actividad antibacteriana ≠ residuo de medicamento veterinario

3.3. Mecanismo antimicrobiano y relevancia para los bioensayos

El mecanismo de la nisina constituye uno de los mejor caracterizados entre las bacteriocinas. *Wiedemann et al. (2001)* demostraron que reconoce específicamente el lípido II, intermediario esencial de la biosíntesis del peptidoglucano. La interacción proporciona una doble ventaja porque por un lado secuestra un elemento necesario para la construcción de la pared celular y por otro, utiliza el propio lípido II como plataforma para la formación de poros en la membrana. Estudios posteriores confirmaron la relevancia de este mecanismo para la formación de poros (*Wiedemann et al., 2004*).

La consecuencia analítica es directa. Cuando un sistema de *screening* utiliza una bacteria Gram positiva susceptible y su variable de lectura es la proliferación, germinación o metabolismo celular, la presencia de nisina no constituye un componente analíticamente invisible. Existe un mecanismo perfectamente plausible mediante el cual puede modificar la respuesta. La magnitud dependerá de concentración libre, potencia del preparado, adsorción a componentes de la matriz, cepa bacteriana, estado fisiológico, concentración de esporas, germinación, composición del medio, pH, temperatura, tiempo de incubación y criterio de lectura.

Por tanto, el razonamiento correcto no es «la nisina es antimicrobiana, luego cualquier test dará positivo», sino «la nisina posee un mecanismo capaz de afectar al principio biológico de determinados ensayos y sin embargo, la existencia y magnitud de la interferencia debe establecerse para cada combinación concreta de matriz, concentración y método».

4. Justificación tecnológica de la nisina en huevo líquido pasteurizado

La aplicación de nisina en huevo líquido posee respaldo experimental desde hace décadas. *Delves-Broughton et al. (1992)* estudiaron su utilización en huevo entero líquido pasteurizado y observaron prolongación de la vida útil refrigerada, niveles residuales efectivos de nisina después de la pasteurización y protección frente al crecimiento de *Bacillus cereus* en determinadas condiciones.

Knight et al. (1999) demostraron que la adición de nisina podía reducir la termorresistencia de *Listeria monocytogenes* Scott A en huevo entero líquido, mostrando que la bacteriocina puede participar activamente en estrategias combinadas con calor. *Schuman y Sheldon (2003)* investigaron el comportamiento de *L. monocytogenes* en huevo líquido pasteurizado sometido a ajuste de pH y adición de nisina, confirmando reducciones de la población y retraso del crecimiento bajo determinadas condiciones.

La evidencia reciente mantiene el interés tecnológico de esta estrategia. *Goshali et al. (2025)* evaluaron 6,25 ppm de nisina frente al crecimiento de esporas de *B. cereus* en huevo entero líquido pasteurizado y observaron un retraso relevante del crecimiento bajo las condiciones del estudio. Otros trabajos han investigado concentraciones similares frente a *Bacillus weihenstephanensis*.

Estos resultados tienen una consecuencia analítica importante, puesto que, si una concentración legalmente utilizable demuestra actividad suficiente para retrasar durante días o semanas el crecimiento de bacterias Gram positivas en huevo, no puede asumirse a priori que esa misma sustancia carezca de todo efecto durante las horas de incubación de un bioensayo susceptible. Esa conclusión no demuestra que un *kit* determinado vaya a ser positivo, pero invalida la premisa de que la nisina presente en el producto final es necesariamente microbiológicamente inactiva.

5. El huevo como matriz antimicrobiana compleja

El huevo no es un simple vehículo para la nisina. La clara constituye un sistema biológico diseñado para limitar la proliferación microbiana alrededor del embrión. Contiene proteínas y mecanismos antimicrobianos entre los que destacan lisozima, ovotransferrina y sistemas de restricción de nutrientes, además de otros componentes minoritarios con actividad defensiva (*Guérin-Dubiard et al., 2006; Legros et al., 2021*).

Por tanto, la actividad inhibitoria de una muestra no puede interpretarse como la suma trivial de «huevo inerte + nisina». La nisina puede interaccionar con proteínas y otros componentes alimentarios. *Aasen et al.* (2003) observaron una adsorción rápida y considerable de nisina y sakacina P a proteínas de diferentes matrices y diferencias de estabilidad condicionadas por el alimento y el procesado.

El resultado analítico depende de la fracción biológicamente disponible, no únicamente de la concentración nominal añadida. Dos muestras con idéntica dosis formulativa pueden comportarse de modo diferente si difieren en pH, composición proteica, proporción de yema y clara, tratamiento térmico, tiempo de almacenamiento o formulación. Esta realidad impide extrapolar directamente un ensayo realizado en agua o tampón a una matriz real de huevo líquido.

6. Qué detecta realmente un test microbiológico de «antibióticos»

Los métodos microbiológicos de inhibición constituyen una de las estrategias clásicas de control de residuos antimicrobianos. Su principal ventaja es cubrir un espectro relativamente amplio de sustancias sin requerir un ensayo independiente para cada molécula. *Pikkemaat* (2009) describió ampliamente esta función de los bioensayos dentro de la vigilancia de residuos.

En estos sistemas se introduce la muestra en un medio que contiene un organismo indicador susceptible. Si el microorganismo crece, modifica una propiedad mensurable del medio -pH, color, turbidez o actividad metabólica-; si una sustancia impide o retrasa suficientemente ese crecimiento, la señal cambia. La segunda trayectoria no contiene, por sí misma, ningún paso de reconocimiento estructural.

Wu et al. (2019, 2021) desarrollaron métodos de cribado en leche, huevo y miel utilizando *Geobacillus stearothermophilus* como organismo de ensayo, confirmando la utilidad de este microorganismo para sistemas microbiológicos de detección amplia. Su elevada sensibilidad es una ventaja para screening, pero implica que toda sustancia no diana capaz de inhibir esa cepa debe considerarse potencialmente interferente.

Screen Positive ≠ identidad química demostrada

Tabla 1. Principales plataformas analíticas y riesgo cualitativo de interferencia por nisina

Plataforma	Señal primaria	Interferencia directa por nisina	Capacidad de identificación
Ensayo microbiológico de inhibición	Crecimiento/no crecimiento del organismo indicador	Media-alta a alta si la cepa es susceptible	Baja o nula sin etapas adicionales
Difusión en agar / multiplaque	Zona de inhibición	Media-alta, dependiente de difusión y cepa	Orientativa; no estructural
Receptor-específico	Unión a receptor	Baja en principio; dependiente de matriz y kit	Moderada-alta para familia diana
Inmunoensayo / flujo lateral	Reconocimiento antígeno-anticuerpo	Baja como cruce molecular directo; posible efecto matriz	Alta para analito/grupo reconocido
LC-MS/MS dirigida	Retención + precursor + fragmentos diagnósticos	Muy baja como confusión molecular	Muy alta dentro del alcance validado
LC-HRMS	Masa exacta + información estructural	Muy baja	Muy alta dentro del alcance validado

7. Nisina y *Geobacillus stearothermophilus*: plausibilidad biológica de la interferencia

Uno de los puntos centrales es establecer si el microorganismo indicador de numerosos bioensayos pertenece a un grupo sobre el cual la nisina pueda ejercer efectos demostrables. La literatura no permite considerar

Bacillus/Geobacillus stearothermophilus intrínsecamente refractario a la nisina. Ya en 1960, *Thorpe* estudió específicamente la acción de nisina sobre esporas de *B. stearothermophilus* y su resistencia térmica.

Wandling et al. (1999) analizaron la capacidad de la nisina para sensibilizar esporas de *Bacillus* al calor y dificultar la recuperación de supervivientes. En estudios más recientes, *Geobacillus stearothermophilus* ha sido incluido expresamente entre los microorganismos sometidos a tratamientos combinados con nisina y otros antimicrobianos (*Aras et al.*, 2021).

Estos trabajos no equivalen a la validación de un *kit* de residuos: concentraciones, medios, temperaturas y estados fisiológicos no son necesariamente comparables. Su valor es otro. Permiten establecer que el organismo indicador pertenece a un grupo microbiológico sobre el cual la nisina puede ejercer efectos biológicos demostrables. La hipótesis de interferencia no se apoya únicamente en una analogía genérica entre «nisina» y «Gram positivo».

El paso todavía pendiente consiste en determinar si la actividad residual existente en huevo líquido, a concentraciones legalmente relevantes, supera el umbral funcional de clasificación de un ensayo comercial concreto.

8. Falso positivo, resultado de cribado e identidad causal

La expresión «falso positivo» puede ocultar varias situaciones. Si una muestra que contiene nisina legalmente adicionada y carece de los residuos veterinarios incluidos en el alcance confirmatorio inhibe el organismo del bioensayo, el “*test*” puede estar detectando correctamente una realidad, esto es, que la muestra posee actividad antibacteriana. El error aparece cuando esa señal se transforma sin evidencia adicional en la afirmación «la muestra contiene un residuo de **antibiótico veterinario**».

Conviene distinguir cuatro niveles: (1) fenómeno biológico: existe inhibición del microorganismo indicador; (2) resultado instrumental: el ensayo clasifica la muestra como positiva o sospechosa; (3) inferencia de cribado: se considera posible la presencia de una sustancia antimicrobiana comprendida en el alcance del screening; y (4) identificación química y decisión de conformidad: se demuestra un analito concreto mediante un método confirmatorio y se interpreta frente al criterio regulatorio aplicable.

El problema surge cuando se salta directamente del nivel 1 o 2 al nivel 4. En este contexto resulta más preciso hablar de «*resultado de cribado positivo inducido por un interferente antimicrobiano no diana*», «*positivo aparente respecto de residuos veterinarios*» o «*falsa atribución causal*» que de un simple «*falso positivo*».

Tabla 2. Jerarquía de evidencia para interpretar un resultado positivo

Nivel	Qué demuestra	Qué no permite afirmar por sí solo
1. Fenómeno	Inhibición real del organismo indicador	Identidad química del inhibidor
2. Screening	Clasificación de la muestra como sospechosa/potencialmente no conforme	Presencia confirmada de un fármaco concreto
3. Método específico	Reconocimiento de una familia o analito según prestaciones del ensayo	Exclusión absoluta de todas las alternativas
4. Confirmación MS	Identidad molecular dentro del alcance validado y criterios de identificación	Ausencia de sustancias no incluidas en el panel

9. Marco metrológico y regulatorio: Reglamento (UE) 2021/808

9.1. Screen Positive no equivale a identificación

El Reglamento de Ejecución (UE) 2021/808 proporciona una terminología particularmente útil. Define el *screening target concentration* (STC) como la concentración a la cual una medición de cribado categoriza una muestra como potencialmente no conforme, *Screen Positive*, desencadenando la prueba confirmatoria.

Asimismo, define selectividad como la capacidad del método para distinguir el analito medido de otras sustancias.

La expresión «potencialmente» es fundamental. El Reglamento no establece que un *Screen Positive* constituya por sí mismo la identificación definitiva de un residuo. Para métodos biológicos, bioquímicos o fisicoquímicos de *screening* exige validación documental y que los resultados sospechosos de no conformidad sean sometidos a confirmación.

Conviene corregir un error terminológico frecuente. El 5 % regulatorio asociado al error *beta* en *screening* se refiere a falsos conformes, es decir, a muestras verdaderamente no conformes clasificadas como conformes, y no a un máximo del 5 % de falsos positivos. El error *alfa* corresponde conceptualmente a la situación inversa y se relaciona con la decisión de no conformidad en la fase confirmatoria mediante el *CCa* y los requisitos aplicables.

9.2. Selectividad e interferencias

La normativa no deja la especificidad como una cuestión abstracta. El estudio de selectividad debe considerar sustancias relacionadas, productos de degradación, compuestos endógenos, componentes de la matriz y otras sustancias potencialmente interferentes. Este requisito resulta especialmente relevante en huevo líquido cuando el método se aplica a una matriz que puede contener legalmente un conservador antimicrobiano.

Si el principio del ensayo depende de un microorganismo susceptible al propio conservador, la pregunta de validación debería formularse de manera explícita: ¿se ha demostrado que las concentraciones legal y tecnológicamente previsibles de nisina no modifican de forma significativa la clasificación del ensayo? Cuando esa evidencia no existe, debe reconocerse una incertidumbre de selectividad.

9.3. Aseguramiento de calidad y alcance de acreditación

El Reglamento 2021/808 conecta el aseguramiento continuado de la calidad con los principios de ISO/IEC 17025:2017. La acreditación de un laboratorio no significa que cualquier ensayo aplicado dentro de él posea especificidad ilimitada. Importan el alcance acreditado, la matriz, el método concreto y las prestaciones demostradas.

Un certificado analítico no debería ampliar semánticamente lo que el método ha medido. Si el ensayo sólo demuestra inhibición microbiológica, la redacción del resultado debe conservar esa naturaleza hasta que exista confirmación estructural.

10. Métodos de reconocimiento específico y confirmación molecular

10.1. Ensayos receptor-específicos

Los ensayos basados en receptores operan bajo un principio diferente. En lugar de preguntar si una bacteria puede crecer, utilizan la interacción de determinadas familias de antibióticos con una proteína receptora. Esta especificidad reduce sustancialmente la posibilidad de que una molécula estructuralmente tan distinta como la nisina se comporte como un antibiótico de pequeña molécula simplemente por poseer actividad antimicrobiana.

El riesgo de interferencia directa debería ser, en principio, considerablemente menor que en un ensayo microbiológico. No obstante, menor no significa cero: viscosidad, proteínas, pH, fuerza iónica, extracción, interacción con superficies y señales ópticas pueden introducir efectos de matriz. Una validación realizada exclusivamente sobre leche no puede trasladarse automáticamente al huevo.

10.2. Inmunoensayos y flujo lateral

Los inmunoensayos utilizan anticuerpos frente a un analito o grupo estructural. La reacción cruzada directa con nisina parece químicamente menos probable que la interferencia microbiológica porque no existe una similitud estructural evidente con las principales familias de medicamentos veterinarios investigadas. Sin

embargo, la especificidad real viene determinada por el anticuerpo concreto y el procedimiento de extracción, y además, persisten posibles efectos matriciales no inmunológicos.

La formulación científicamente prudente es que la presencia de nisina no proporciona por sí misma un mecanismo fuerte para una falsa identificación inmunoquímica de beta-lactámicos, tetraciclinas o sulfonamidas, pero la posibilidad de interferencia debe evaluarse a nivel de ensayo y matriz.

10.3. LC-MS/MS y LC-HRMS: de la actividad a la identidad

La cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem representa un salto cualitativo respecto de los bioensayos. *Jiménez et al.* (2011) desarrollaron un método multiclase para 41 antimicrobianos pertenecientes a siete familias en matrices de huevo. Otros métodos han ampliado progresivamente la cobertura, y *Paoletti et al.* (2021) desarrollaron un método confirmatorio de alta resolución para más de 60 antibióticos en huevo.

La lógica de identificación combina tiempo de retención, masa del precursor y fragmentos diagnósticos. El Reglamento 2021/808 exige para los métodos confirmatorios información sobre la composición química estructural del analito y establece criterios específicos de identificación mediante espectrometría de masas.

Por ello, no existe un mecanismo razonable por el cual una molécula de nisina sea identificada rutinariamente como penicilina G, oxitetraciclina, sulfadiazina o enrofloxacino en un método LC-MS/MS adecuadamente validado simplemente porque todas ellas sean antimicrobianas. La espectrometría no mide antibiosis, mide propiedades moleculares.

Esta superioridad no debe convertirse en una afirmación absoluta. Una LC-MS/MS negativa sólo excluye los analitos comprendidos dentro de su alcance validado y hasta las prestaciones analíticas correspondientes. El desarrollo de métodos cada vez más amplios, incluido el método LC-IMS-QTOF publicado por *Guichard et al.* en 2026 para 74 residuos antimicrobianos en huevos, reduce esa incertidumbre, pero no autoriza a hablar de ausencia absoluta de cualquier antimicrobiano concebible.

11. Evidencia específica procedente de estudios de cribado en huevo

La matriz huevo requiere validación específica. *Gaudin et al.* (2009) compararon diferentes sistemas comerciales de cribado, incluidos métodos microbiológicos en tubo y un ELISA para sulfonamidas, específicamente sobre huevos. El trabajo mostró diferencias de sensibilidad y cobertura entre plataformas y subrayó la necesidad de conocer las prestaciones reales de cada método respecto de cada familia farmacológica.

En 2017, *Gaudin y colaboradores* compararon una estrategia microbiológica clásica con un inmunobiosensor para el *screening* de antibióticos en huevos. El estudio ilustra una característica inherente de las plataformas: los métodos microbiológicos proporcionan cobertura amplia fundamentada en actividad biológica, mientras que los sistemas de reconocimiento molecular pueden alcanzar mayor discriminación para familias concretas, pero dependen de la arquitectura de reconocimiento incorporada al dispositivo.

Otros estudios han mostrado discordancias entre métodos rápidos aplicados a huevos comerciales. Estas diferencias no demuestran que la nisina sea la causa de los resultados discordantes; atribuirle sin análisis específico sería incorrecto. Sí demuestran que la clasificación de una misma matriz puede ser sustancialmente dependiente del método. La conclusión metodológica es inequívoca: no existe «**el test de antibióticos**»; existen métodos concretos con selectividades, microorganismos, receptores, umbrales y efectos de matriz concretos.

12. Interpretación causal de resultados discordantes

La presencia conocida de nisina no prueba que sea ella quien cause un resultado positivo. Pueden coexistir nisina y un verdadero residuo veterinario. También pueden existir inhibidores naturales del huevo, otros

conservadores, residuos de limpieza o desinfección, alteraciones de pH, contaminación cruzada, defectos de incubación, interpretación visual inadecuada o variabilidad del lote del ensayo.

La explicación «es la nisina» debe someterse al mismo nivel de rigor que la explicación «es un antibiótico». Ambas son hipótesis hasta que la evidencia las discrimine. Esta precaución evita un sesgo de confirmación inverso, por medio del cual, sería tan incorrecto considerar que todo bioensayo positivo demuestra un antibiótico como asumir que todo positivo en un producto con E 234 se debe a la nisina.

La repetición del mismo “test” puede demostrar reproducibilidad, pero no aumenta por sí sola la selectividad. Si un interferente produce sistemáticamente inhibición, diez repeticiones pueden generar diez positivos perfectamente reproducibles. Alta reproducibilidad no implica alta especificidad. Para resolver causalidad es necesario modificar el eje analítico mediante una técnica ortogonal.

Alta reproducibilidad ≠ alta selectividad

Tabla 3. Interpretación de escenarios analíticos frecuentes

Escenario	Resultados	Interpretación
A	Screen microbiológico positivo + LC-MS/MS confirma un residuo	Existe evidencia molecular del residuo; la nisina no invalida la confirmación.
B	Screen microbiológico positivo + panel amplio MS negativo + nisina presente	La interferencia por nisina adquiere alta plausibilidad; conviene demostrar causalidad por fortificación controlada.
C	Screen microbiológico positivo + panel MS limitado negativo	No se excluye un antimicrobiano no incluido en el panel.
D	Screen receptor-específico positivo + confirmación MS del mismo analito positiva	La concordancia entre métodos ortogonales proporciona elevada fuerza probatoria.

13. Implicaciones industriales, contractuales y periciales

13.1. Gestión industrial de un positivo inesperado

Desde la industria, un positivo microbiológico inesperado debería conducir inicialmente a la retención preventiva del lote y a la apertura de una investigación documentada, no necesariamente a su destrucción ni a la atribución inmediata de una irregularidad en granja.

La investigación debería reconstruir la identidad y versión del kit, lote y caducidad, organismo o principio receptor, matriz oficialmente validada, preparación de muestra, tiempo y temperatura de incubación, criterio de lectura y controles; y, en paralelo, la composición del ovoproducto, cantidad y lote de nisina, secuencia de proceso, otros aditivos y trazabilidad de materias primas. Posteriormente debe utilizarse una metodología confirmatoria adecuada.

13.2. Contratos B2B

Cuando un cliente establece como requisito contractual «antibióticos-negativo», debería especificarse el método. No es equivalente exigir «negativo mediante ensayo microbiológico X» que «ausencia de los residuos A-Z mediante LC-MS/MS con los límites indicados». La definición analítica del criterio de aceptación evita litigios posteriores.

Si se permite legalmente nisina en la formulación, un comprador que utilice un bioensayo potencialmente susceptible debería conocerlo y acordar de antemano un procedimiento confirmatorio ante resultados positivos. Esta cuestión pertenece tanto a la gestión de calidad como a la buena técnica contractual.

13.3. Control oficial y prueba pericial

En una controversia administrativa o judicial debe diferenciarse entre detección funcional, identificación química, cuantificación y decisión de conformidad. El Reglamento 2021/808 establece que un resultado de cribado sospechoso debe confirmarse y que los métodos confirmatorios deben aportar información estructural suficiente.

Por ello, si la única evidencia disponible fuera un “test” microbiológico positivo en un huevo que contiene legalmente nisina, la existencia de un residuo veterinario específico no debería presentarse científicamente como un hecho demostrado. Se trataría de una hipótesis compatible con el *screening* y pendiente de confirmación.

14. Propuesta de estudio experimental para demostrar o descartar la interferencia

La literatura disponible justifica un estudio experimental específico. La ausencia de un trabajo sistemático **matriz x concentración x plataforma analítica** constituye uno de los aspectos más originales del problema. La hipótesis primaria sería que la probabilidad de clasificación *Screen Positive* es independiente de la concentración de nisina; la hipótesis alternativa, que aumenta con la concentración de nisina en ausencia demostrada de los residuos veterinarios incluidos en el método confirmatorio.

El diseño debería estudiar separadamente huevo entero líquido pasteurizado, clara líquida pasteurizada y yema líquida pasteurizada. No es correcto asumir que las tres matrices son analíticamente equivalentes, pues contenido proteico, lipídico, viscosidad, componentes antimicrobianos naturales y disponibilidad de nisina difieren.

Los lotes blancos deberían caracterizarse previamente mediante un método multiresiduo suficientemente amplio y validado para huevo, preferiblemente LC-MS/MS o LC-HRMS. La terminología correcta sería «muestras negativas para los analitos comprendidos en el alcance del método», evitando la afirmación absoluta «libres de antibióticos».

Debe construirse una curva dosis-respuesta. Un esquema inicial razonable podría incluir 0; 0,5; 1; 2,5; 3,125; 5 y 6,25 mg/kg de nisina activa, siempre que sea técnicamente posible preparar y verificar esas concentraciones. La inclusión de 3,125 mg/kg proporciona un punto correspondiente al 50 % del máximo autorizado; 6,25 mg/kg representa el nivel máximo legal actual para la aplicación estudiada.

Si la nisina se incorpora mediante un preparado estandarizado con excipientes, sería metodológicamente deseable disponer de un control de excipientes equivalente cuando sea posible. Ello permitiría distinguir el efecto de la nisina del efecto potencial del vehículo.

Deben compararse, cuando el proceso industrial lo permita, nisina añadida antes y después de pasteurización y diferentes tiempos de almacenamiento, con objeto de conocer si la historia térmica y el envejecimiento de la matriz modifican la probabilidad de interferencia.

El estudio tendría mayor valor si incorporase plataformas basadas en principios diferentes de al menos un ensayo microbiológico de amplio espectro, un sistema receptor o inmunológico para familias representativas y un método cromatográfico-espectrométrico ortogonal. Idealmente se incluirían dos métodos microbiológicos comerciales diferentes, dado que la literatura demuestra variaciones de prestaciones entre plataformas.

La validación quedaría incompleta si sólo se utilizaran muestras con nisina. Deben incluirse controles fortificados con representantes de familias farmacológicas relevantes a concentraciones relacionadas con el MRL, RPA, STC o criterio aplicable. El objetivo es responder no sólo a si la nisina genera señales positivas, sino también a si modifica la capacidad del método para detectar un verdadero residuo.

Para establecer causalidad, debería determinarse, siempre que sea posible, nisina residual y/o actividad biológica. Esto permitiría diferenciar concentración nominal, concentración medida y actividad efectiva, variables que no son necesariamente equivalentes debido a adsorción, degradación y efectos de matriz.

Tabla 4. Núcleo propuesto del estudio de validación

Factor	Niveles propuestos	Finalidad
Matriz	Huevo entero, clara, yema	Capturar diferencias de matriz
Nisina activa	0-6,25 mg/kg, múltiples niveles	Estimar dosis-respuesta y umbral funcional
Residuo veterinario	Ausente / fortificado	Distinguir interferencia y sensibilidad real
Procesado	Antes/después de pasteurización	Evaluar historia térmica
Almacenamiento	Varios tiempos	Evaluar estabilidad y biodisponibilidad
Screening	≥2 bioensayos + receptor/inmuno	Comparar principios analíticos
Confirmación	LC-MS/MS o LC-HRMS amplia	Establecer identidad molecular
Nisina	Determinación química y/o actividad	Relacionar dosis nominal con actividad real

14.1. Análisis estadístico

Para un resultado binario positivo/negativo, el modelo natural es una regresión logística de efectos mixtos con concentración de nisina, matriz, tratamiento y tiempo como efectos fijos y lote como efecto aleatorio. El modelo permitiría estimar la probabilidad de Screen Positive en función de la concentración y calcular concentraciones asociadas a probabilidades predefinidas de clasificación, por ejemplo 10 %, 50 % y 90 %.

Además, deberían evaluarse la proporción de positivos por plataforma, especificidad frente a blancos con nisina, concordancia con el método confirmatorio, coeficiente kappa cuando proceda, test de McNemar para comparaciones pareadas, intervalos de confianza, influencia del lote y matriz y efecto de la concentración de nisina sobre la intensidad o tiempo de señal.

$$\text{logit}[P(\text{Screen Positive})] = \beta_0 + \beta_1 \cdot C_nisina + \beta_2 \cdot Matriz + \beta_3 \cdot Proceso + \beta_4 \cdot Tiempo + u_lote$$

14.2. Criterios para atribuir causalidad

La interferencia por nisina podría considerarse demostrada para un “test” determinado cuando concurren temporalidad -la señal aparece tras añadir nisina a una matriz previamente negativa-; reproducibilidad en distintos lotes y días; gradiente biológico; ausencia de los antibióticos diana por confirmación molecular; coherencia mecanística con la susceptibilidad del organismo indicador; y consistencia en la matriz concreta para la que se formula la conclusión.

La combinación de estos elementos constituiría evidencia mucho más convincente que una simple correlación observada durante el control rutinario de una cisterna o un lote industrial.

15. Limitaciones de la evidencia y agenda de investigación

La principal limitación de la literatura es, paradójicamente, la razón por la que este tema merece investigación. Existen pruebas convincentes de los eslabones principales: nisina legalmente autorizada en huevo líquido; actividad antimicrobiana demostrada; actividad residual después del procesamiento; susceptibilidad de bacterias Gram positivas y efectos sobre el grupo *Bacillus/Geobacillus*; utilización de *G. stearothermophilus* en *screening*; naturaleza funcional de la inhibición microbiológica; y diferencias conocidas entre plataformas de detección en huevo.

Lo que falta es el experimento que una esos eslabones en una única cadena causal: huevo negativo para un panel amplio de residuos, adición de nisina conocida, aparición dosis-dependiente de *Screen Positive* y mantenimiento de la negatividad para los residuos diana por confirmación molecular.

No identificar esta laguna y presentar la interferencia como un hecho cuantitativamente universal exageraría la evidencia. Pero ignorar todos los datos mecanísticos y considerar imposible la interferencia sería científicamente todavía menos defendible. La hipótesis puede calificarse como biológicamente fuerte y analíticamente plausible, pero insuficientemente parametrizada.

16. Conclusiones

La nisina E 234 es un conservador alimentario autorizado en la Unión Europea para huevo líquido pasteurizado -clara, yema o huevo entero- hasta un máximo de 6,25 mg/kg. Su presencia en el ovoproducto responde a una función tecnológica antimicrobiana deliberada y no constituye, por ese solo hecho, un residuo de medicamento veterinario.

La literatura demuestra que la nisina puede conservar actividad después de la pasteurización del huevo y ejercer efectos frente a microorganismos Gram positivos durante el almacenamiento. Muchos métodos microbiológicos de screening utilizan microorganismos sensibles, entre ellos *Geobacillus stearothermophilus*, y clasifican la muestra a partir de la inhibición del crecimiento. Estos métodos no proporcionan necesariamente identidad estructural del compuesto responsable.

Existe evidencia experimental de efectos de nisina sobre bacterias y esporas del grupo *Bacillus/Geobacillus*, lo que proporciona un fundamento biológico robusto para considerar la interferencia posible. En consecuencia, un resultado positivo de un ensayo microbiológico realizado sobre huevo líquido pasteurizado que contiene nisina no demuestra por sí solo la existencia de un residuo de antibiótico veterinario.

El término «**falso positivo**» debe utilizarse con cautela. El bioensayo puede estar detectando correctamente actividad inhibitoria, y en ese caso, el error reside en atribuir esa señal a una clase química o farmacológica no identificada. La denominación científicamente más precisa es «**resultado de cribado positivo inducido por un interferente antimicrobiano no diana**» o «**positivo aparente respecto de residuos veterinarios**».

El Reglamento de Ejecución (UE) 2021/808 es coherente con esta interpretación: un *Screen Positive* caracteriza una muestra como potencialmente no conforme y requiere investigación confirmatoria; la norma exige estudiar selectividad e interferencias y reserva a los métodos confirmatorios la obtención de información estructural suficiente.

Los ensayos receptor-específicos e inmunológicos presentan, en principio, menor susceptibilidad a una interferencia directa derivada simplemente de la actividad antibacteriana de la nisina, aunque siguen requiriendo validación específica de matriz. LC-MS/MS y LC-HRMS correctamente validadas ofrecen una capacidad de identificación molecular radicalmente superior, pero una técnica negativa únicamente excluye los analitos comprendidos dentro de su alcance validado.

La presencia de nisina no debe utilizarse para descartar automáticamente un verdadero residuo: ambos pueden coexistir. Toda discrepancia debe resolverse mediante técnicas ortogonales.

Finalmente, no existe todavía un umbral universal de nisina capaz de predecir el resultado de los diferentes kits microbiológicos en huevo. Un estudio factorial que combine matrices reales, concentraciones de 0-6,25 mg/kg, varios sistemas de screening, controles fortificados, cuantificación independiente de nisina y confirmación multirresiduo permitiría establecer relaciones dosis-respuesta, umbrales de interferencia y probabilidades de clasificación positiva específicas para cada método.

La presencia de una señal antimicrobiana no es equivalente a la identificación de un antibiótico.

En huevo líquido pasteurizado tratado con nisina, confundir ambos niveles puede transformar una herramienta de cribado útil en una fuente de atribuciones analíticas incorrectas.

Declaraciones editoriales

Contribuciones de autoría (CRediT): Este trabajo es original de su autor.

Financiación: El trabajo tiene interés académico y técnico-científico, pero no recibió financiación externa específica.

Conflictos de interés: ND Pharma & Biotech y su comercial Intabiotech SL, producen diversos compuestos a base de nisina, sin embargo, para el presente trabajo se ha limitado o eliminado toda vinculación comercial con productos que contengan nisina fabricados por estas entidades, y en su caso, ninguna alegación comercial de/hacia los mismos se contiene en el mismo.

Disponibilidad de datos: No aplica a la presente revisión narrativa. Las pruebas y datos de testaje realizados por nuestro Departamento o incluso aquellos que proceden de clientes de la empresa, permanecen vinculados por secreto industrial y confidencialidad.

Referencias

- Aasen, I. M., Markussen, S., Møretrø, T., Katla, T., Axelsson, L., & Naterstad, K. (2003). Interactions of the bacteriocins sakacin P and nisin with food constituents. *International Journal of Food Microbiology*, 87(1-2), 35-43. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00047-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00047-3)
- Aras, S., et al. (2021). Synergistic effects of nisin, lysozyme, lactic acid, and Citricidal for enhancing pressure-based inactivation of *Bacillus amyloliquefaciens*, *Geobacillus stearothermophilus*, and *Bacillus atrophaeus* endospores. *Microorganisms*, 9(3), 653.
- Commission Implementing Regulation (EU) 2021/808 of 22 March 2021 on the performance of analytical methods for residues of pharmacologically active substances used in food-producing animals and on the interpretation of results, as amended.
- Commission Implementing Regulation (EU) 2026/731 of 27 March 2026 amending Implementing Regulation (EU) 2021/808 as regards its transitional provisions and certain provisions on sampling.
- Commission Regulation (EU) No 231/2012 of 9 March 2012 laying down specifications for food additives listed in Annexes II and III to Regulation (EC) No 1333/2008. Specification E 234 Nisin.
- Delves-Broughton, J., Williams, G. C., & Wilkinson, S. (1992). The use of the bacteriocin, nisin, as a preservative in pasteurized liquid whole egg. *Letters in Applied Microbiology*, 15(4), 133-136. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1992.tb00746.x>
- European Commission. (2026). Food and Feed Information Portal: E 234 Nisin. Conditions of use in pasteurised liquid egg.
- European Food Safety Authority. (2006). Opinion of the Scientific Panel related to the use of nisin (E 234) as a food additive in an additional category of liquid eggs. *EFSA Journal*, 314b. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2006.314b>
- European Food Safety Authority. (2017). Safety of nisin (E 234) as a food additive in the light of new toxicological data and the proposed extension of use. *EFSA Journal*, 15(12), 5063. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.5063>
- European Parliament and Council. (2008). Regulation (EC) No 1333/2008 of 16 December 2008 on food additives, as amended.
- European Parliament and Council. (2011). Regulation (EU) No 1169/2011 of 25 October 2011 on the provision of food information to consumers, as amended.
- Gaudin, V., Hédou, C., Rault, A., Sanders, P., & Verdon, E. (2009). Comparative study of three screening tests, two microbiological tube tests, and a multi-sulphonamide ELISA kit for the detection of antimicrobial and sulphonamide residues in eggs. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 26(4), 427-440. <https://doi.org/10.1080/02652030802527626>
- Gaudin, V., Rault, A., Hédou, C., Soumet, C., & Verdon, E. (2017). Strategies for the screening of antibiotic residues in eggs: Comparison of the validation of the classical microbiological method with an immunobiosensor method. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 34(9), 1510-1527. <https://doi.org/10.1080/19440049.2017.1339331>
- Goshali, B. K., Kapoor, H. K., Dev Kumar, G., Shrestha, S., Juneja, V. K., & Mishra, A. (2025). Effect of nisin and storage temperature on outgrowth of *Bacillus cereus* spores in pasteurized liquid whole eggs. *Foods*, 14(3), 532.
- Guérin-Dubiard, C., et al. (2006). Proteomic analysis of hen egg white. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(11), 3901-3910. <https://doi.org/10.1021/jf0529969>
- Guichard, P., Gaugain, M., Chailleux, A., Couëdor, P., Hurtaud-Pessel, D., & Verdon, E. (2026). Development and validation of a multi-residue high-resolution mass spectrometry method for screening antimicrobial veterinary drug residues in eggs using LC-IMS-QTOF, with comparison to Q-Orbitrap technology. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 43(3), 330-347. <https://doi.org/10.1080/19440049.2026.2633529>
- Jiménez, V., Rubies, A., Centrich, F., Companyó, R., & Guiteras, J. (2011). Development and validation of a multiclass method for the analysis of antibiotic residues in eggs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218(11), 1443-1451. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.01.021>
- Knight, K. P., Bartlett, F. M., McKellar, R. C., & Harris, L. J. (1999). Nisin reduces the thermal resistance of *Listeria monocytogenes* Scott A in liquid whole egg. *Journal of Food Protection*, 62(9), 999-1003. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-62.9.999>
- Legros, J., Jan, S., Bonnassie, S., et al. (2021). The role of ovotransferrin in egg-white antimicrobial activity: A review. *Foods*, 10(4), 823.
- Paoletti, F., Sdogati, S., Barola, C., Giuseppeoni, D., Moretti, S., & Galarini, R. (2021). Development and validation of a multiclass confirmatory method for the determination of over 60 antibiotics in eggs using liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry. *Food Control*, 127, 108109. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108109>

- Pikkemaat, M. G. (2009). Microbial screening methods for detection of antibiotic residues in slaughter animals. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395, 893-905. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-2841-6>
- Schuman, J. D., & Sheldon, B. W. (2003). Inhibition of *Listeria monocytogenes* in pH-adjusted pasteurized liquid whole egg. *Journal of Food Protection*, 66(6), 999-1006. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-66.6.999>
- Thorpe, R. H. (1960). The action of nisin on spoilage bacteria. I. The effect of nisin on the heat resistance of *Bacillus stearothermophilus*.
- Wandling, L. R., Sheldon, B. W., & Foegeding, P. M. (1999). Nisin in milk sensitizes *Bacillus* spores to heat and prevents recovery of survivors.
- Wiedemann, I., Breukink, E., van Kraaij, C., Kuipers, O. P., Bierbaum, G., de Kruijff, B., & Sahl, H.-G. (2001). Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. *Journal of Biological Chemistry*, 276(3), 1772-1779. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006770200>
- Wiedemann, I., Benz, R., & Sahl, H.-G. (2004). Lipid II-mediated pore formation by the peptide antibiotic nisin: A black lipid membrane study. *Journal of Bacteriology*, 186(10), 3259-3261.
- Wu, Q., et al. (2019). A novel microbiological method in microtiter plates for screening seven kinds of widely used antibiotic residues in milk, chicken egg and honey. *Frontiers in Microbiology*, 10, 436.
- Wu, Q., Shabbir, M. A. B., Peng, D., Yuan, Z., & Wang, Y. (2021). Microbiological inhibition-based method for screening and identifying antibiotic residues in milk, chicken egg and honey. *Food Chemistry*, 363, 130074.

© 2026 · José M. López · Todos los derechos reservados.

Servicio de Publicaciones de INTABIOTECH
Botiguers, 3, 2ª Planta, Parque empresarial Tàctica,
46980, Paterna, Valencia, España