

## ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. UTILIZACIÓN DE ANTIMICROBIANOS EN PRODUCCIÓN ANIMAL.....	1
1.1. Consideraciones previas.....	1
1.2. Conceptos generales y clasificación de los antimicrobianos.....	2
1.3. Tratamientos empleados en ganado vacuno lechero.....	4
1.3.1. Principales procesos patológicos del ganado vacuno lechero.....	4
1.3.2. Frecuencia de uso de antimicrobianos empleados en ganado vacuno lechero.....	6
2. PRESENCIA DE RESIDUOS DE ANTIMICROBIANOS EN LA LECHE.....	13
2.1. Origen de la presencia de residuos de antimicrobianos en la leche.....	13
2.2. Frecuencia de la presencia de residuos de antimicrobianos en la leche.....	15
2.3. Efectos de la presencia de residuos de antimicrobianos en la leche.....	17
3. CONTROL DE LA PRESENCIA DE ANTIMICROBIANOS EN LA LECHE.....	19
3.1. Consideraciones previas.....	19
3.2. Límites Máximos de Residuos.....	20
3.3. Planes de control.....	22
3.3.1. Sistema de gestión de la calidad y trazabilidad de la leche en España.....	22
3.3.2. Estrategia de control de los residuos de antibióticos en la leche.....	25
3.3.3. Toma de muestras de leche para controles de calidad.....	27
4. MÉTODOS DE DETECCIÓN DE ANTIMICROBIANOS EN LA LECHE.....	29
4.1. Generalidades.....	29
4.2. Clasificación de los métodos de detección de antimicrobianos.....	29
4.3. Métodos de cribado para la detección de antimicrobianos en la leche.....	31
4.3.1. Métodos microbiológicos.....	31
4.3.2. Métodos específicos (cualitativos de confirmación).....	34
4.4. Criterios para la validación de los métodos analíticos.....	38
4.4.1. Generalidades.....	38
4.4.2. Límite de detección o capacidad de detección CCB.....	40
4.4.2.1. Generalidades.....	40
4.4.2.2. Límites de detección de los métodos microbiológicos.....	43
4.4.2.3. Límites de detección de los métodos específicos.....	51
4.4.3. Sensibilidad.....	53
4.4.3.1. Generalidades.....	53
4.4.3.2. Sensibilidad de los métodos microbiológicos.....	54
4.4.3.3. Sensibilidad de los métodos específicos.....	56
4.4.4. Selectividad.....	57
4.4.4.1. Generalidades.....	57
4.4.4.2. Selectividad de los métodos microbiológicos.....	57
4.4.4.3. Selectividad de los métodos específicos.....	58
4.5. Influencia de factores relacionados con la toma de muestras sobre la respuesta de los métodos de detección de antibióticos en la leche.....	60
4.5.1. Influencia del conservante en las muestras de leche.....	60
4.5.2. Influencia de la refrigeración de las muestras de leche.....	62
II. OBJETIVOS.....	65

III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	67
1. PRIMER ESTUDIO: Evaluación de los métodos de detección de residuos de antimicrobianos en la leche de vaca.....	67
1.1. Diseño experimental.....	67
1.2. Muestras de leche.....	67
1.3. Sustancias antimicrobianas.....	69
1.4. Métodos analíticos.....	70
1.4.1. Métodos microbiológicos.....	70
1.4.1.1. Brilliant Black Reduction Test MRL (BRT MRL).....	70
1.4.1.2. Blue Yellow.....	71
1.4.1.3. Delvotest SP-NT.....	72
1.4.1.4. Delvotest MCS Accelerator.....	72
1.4.1.5. Eclipse 100.....	73
1.4.1.6. Eclipse 50.....	74
1.4.2. Métodos específicos (cualitativos de confirmación).....	75
1.4.2.1. Equinox.....	75
1.4.2.2. Penzym.....	76
1.4.2.3. Beta Star.....	77
1.4.2.4. Delvo-X-Press.....	78
1.4.2.5. Rosa Charm (Beta-Lactam MRL, TET y Enroflox).....	78
1.4.2.6. Snap (BETA-LACTAM, New TETRA Test Kit y Gentamicin).....	79
1.4.2.7. Twinsensor.....	80
1.5. Análisis estadístico.....	81
2. SEGUNDO ESTUDIO: Estrategia analítica para la detección de residuos de antimicrobianos en la leche de vaca.....	82
2.1. Diseño experimental.....	82
2.2. Muestras de leche.....	82
2.3. Sustancias antimicrobianas.....	82
2.4. Métodos analíticos.....	82
2.5. Análisis estadístico.....	83
2.5.1. Análisis estadístico mediante la técnica de Análisis Multivariante de Conglomerados (Cluster).....	83
2.5.2. Análisis estadístico mediante el Análisis por Componentes Principales (PCA)..	84
2.5.3. Cálculo del porcentaje de detección de antibióticos a partir de las frecuencias de uso en España.....	85
3. TERCER ESTUDIO: Influencia de los factores relacionados con la toma de muestras sobre la respuesta de los métodos microbiológicos de detección de antibióticos en la leche de vaca .....	86
3.1. Diseño experimental.....	86
3.2. Muestras de leche.....	87
3.3. Sustancias antimicrobianas.....	88
3.4. Métodos microbiológicos.....	88
3.5. Análisis estadístico.....	90
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	91
1. PRIMER ESTUDIO: Evaluación de los métodos de detección de residuos de antimicrobianos en la leche de vaca.....	91

1.1. Selectividad de los métodos.....	91
1.1.1. Métodos microbiológicos.....	91
1.1.2. Métodos específicos (cualitativos de confirmación).....	93
1.2. Sensibilidad de los métodos.....	96
1.2.1. Antibióticos betalactámicos.....	97
1.2.1.1. Métodos microbiológicos.....	97
1.2.1.2. Métodos específicos (cualitativos de confirmación).....	101
1.2.2. Otros antibióticos no betalactámicos.....	107
1.2.2.1. Métodos microbiológicos.....	108
1.2.2.2. Métodos específicos (cualitativos de confirmación).....	112
1.3. Comparación de la sensibilidad de los métodos con el Límite Máximo de Residuos (LMR) de antibióticos en la leche.....	114
1.3.1. Antibióticos Betalactámicos.....	114
1.3.1.1. Métodos microbiológicos.....	114
1.3.1.2. Métodos específicos (cualitativos de confirmación).....	115
1.3.2. Otros antibióticos no betalactámicos.....	116
2. SEGUNDO ESTUDIO. Estrategia analítica para la detección de residuos de antimicrobianos en la leche de vaca.....	117
2.1. Análisis estadístico mediante la técnica de Análisis Multivariante de Conglomerados (Cluster).....	117
2.1.1. Análisis cluster para las moléculas de antibióticos.....	117
2.1.2. Análisis cluster para los métodos de cribado.....	120
2.2. Análisis estadístico mediante la técnica de Análisis por Componentes Principales (PCA).....	122
2.2.1. Métodos microbiológicos.....	122
2.2.2. Métodos específicos (cualitativos de confirmación).....	124
2.3. Porcentajes de cobertura de los métodos de cribado en la detección de los antibióticos utilizados en España en el ganado vacuno lechero .....	125
3. TERCER ESTUDIO: Influencia de los factores relacionados con la toma de muestras sobre la respuesta de los métodos microbiológicos de detección de antibióticos en la leche de vaca.....	132
3.1. Penicilinas.....	132
3.1.1. Amoxicilina.....	132
3.1.2. Ampicilina.....	142
3.1.3. Penicilina G.....	150
3.2. Oxitetraciclina.....	157
V. CONCLUSIONES.....	165
VI. BIBLIOGRAFÍA.....	169

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación de los diferentes agentes antimicrobianos.....	3
Cuadro 2. Frecuencia de uso de familias de antimicrobianos en tratamientos de otras patologías diferentes a la mamitis del ganado vacuno lechero.....	10
Cuadro 3. Frecuencia de uso de sustancias antimicrobianas en tratamientos de otras patologías diferentes a la mamitis del ganado vacuno lechero.....	11
Cuadro 4. Frecuencia total de uso de antibióticos en el tratamiento de las principales patologías del ganado vacuno lechero.....	12
Cuadro 5. Presencia de residuos de antibióticos en la leche en diferentes países.....	16
Cuadro 6. Límites Máximos de Residuos de antimicrobianos para la leche de vaca.....	21
Cuadro 7. Características de los métodos microbiológicos de cribado más utilizados en la detección de antibióticos en España.....	33
Cuadro 8. Características de los métodos específicos o de confirmación cualitativa más utilizado en la detección de antibióticos en España.....	35
Cuadro 9. Características de funcionamiento que deben determinarse para la validación de métodos analíticos.....	38
Cuadro 10. Límites de detección ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) para sustancias antimicrobianas indicadas por los fabricantes para los métodos microbiológicos .....	44
Cuadro 11. Límites de detección ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) de sustancias antimicrobianas calculadas por diferentes autores para el método Brilliant Reduction Test (BRT).....	47
Cuadro 12. Límites de detección ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) de sustancias antimicrobianas calculadas por diferentes autores para el método Delvotest.....	49
Cuadro 13. Límites de detección ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) para sustancias antimicrobianas indicados por los fabricantes para los métodos específicos .....	52
Cuadro 14. Características de las sustancias antimicrobianas empleadas en el estudio sobre la sensibilidad de los métodos de cribado.....	69
Cuadro 15. Sustancias antimicrobianas y concentraciones empleadas en el estudio de la influencia de los factores relacionados con la toma de muestra sobre la respuesta de los métodos microbiológicos.....	89
Cuadro 16. Resultados del análisis de muestras de leche de vacas procedentes de animales no tratados mediante los métodos microbiológicos.....	91
Cuadro 17. Resultados del análisis de muestras de leche de vacas procedentes de animales no tratados mediante los métodos específicos para betalactámicos.....	93
Cuadro 18. Frecuencia (%) y de test chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) de los resultados de los métodos específicos con muestras de leche procedentes de animales no tratados.....	95
Cuadro 19. Resultados del análisis de muestras de leche de vaca procedentes de animales no tratados mediante los métodos específicos para tetraciclinas.....	96
Cuadro 20. Resultados del análisis de muestras de leche de vaca procedentes de animales no tratados mediante los métodos específicos para quinolonas y gentamicina	96
Cuadro 21. Sensibilidad (%) de los métodos microbiológicos para la detección de antibióticos betalactámicos.....	98
Cuadro 22. Sensibilidad (%) de los métodos específicos para la detección de antibióticos betalactámicos.....	103
Cuadro 23. Sensibilidad (%) de los métodos microbiológicos para la detección de antibióticos no betalactámicos (neomicina y tilosina).....	108

Cuadro 24. Sensibilidad (%) de los métodos microbiológicos para la detección de antibióticos no betalactámicos.....	111
Cuadro 25. Sensibilidad (%) de los métodos específicos para la detección de oxitetraciclina.....	112
Cuadro 26. Sensibilidad (%) de los métodos específicos para la detección de enrofloxacin y gentamicina.....	113
Cuadro 27. Resultados del procedimiento de aglomeración de las sustancias antimicrobianas según los diferentes métodos ensayados.....	118
Cuadro 28. Resultados del procedimiento de aglomeración de los métodos de cribado según los resultados de sensibilidad a los LMRs.....	120
Cuadro 29. Cargas de las variables para los dos primeros componentes principales en los métodos microbiológicos .....	123
Cuadro 30. Cargas de las variables para los dos primeros componentes principales en los métodos específicos.....	124
Cuadro 31. Porcentaje de cobertura de métodos microbiológicos empleados en la detección de antibióticos en leche.....	126
Cuadro 32. Porcentaje de cobertura de métodos específicos empleados en la detección de antibióticos en leche.....	127
Cuadro 33. Porcentaje de cobertura de posibles combinaciones de dos métodos que presentan diferente base analítica.....	129
Cuadro 34. Valores de chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) y probabilidad (p) de los factores de variación de la respuesta de los métodos microbiológicos para la detección de amoxicilina en la leche.....	132
Cuadro 35. Ecuaciones de predicción de la respuesta de los métodos microbiológicos para la detección de amoxicilina en la leche.....	133
Cuadro 36. Efecto del tiempo de refrigeración y la interacción entre tiempo de refrigeración y azidol sobre los métodos microbiológicos en el análisis de muestras de leche con amoxicilina.....	136
Cuadro 37. Efecto del tiempo de refrigeración y del azidol sobre los resultados positivos (%) de los métodos microbiológicos en el análisis de muestras de leche con amoxicilina.....	139
Cuadro 38. Valores de chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) y probabilidad (p) de los factores de variación de la respuesta de los métodos microbiológicos para la detección de ampicilina en la leche.....	143
Cuadro 39. Ecuaciones de predicción de la respuesta de los métodos microbiológicos para la detección de ampicilina en la leche.....	143
Cuadro 40. Efecto del tiempo de refrigeración, azidol y la interacción entre tiempo de refrigeración y azidol sobre los métodos microbiológicos en el análisis de muestras de leche con ampicilina.....	146
Cuadro 41. Efecto del tiempo de refrigeración y del azidol sobre los resultados positivos (%) de los métodos microbiológicos en el análisis de muestras de leche con ampicilina.....	148
Cuadro 42. Valores de chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) y probabilidad (p) de los factores de variación de la respuesta de los métodos microbiológicos para la detección de penicilina G en la leche.....	150
Cuadro 43. Ecuaciones de predicción de la respuesta de los métodos microbiológicos para la detección de penicilina G en la leche.....	151

Cuadro 44. Efecto del tiempo de refrigeración y la interacción entre tiempo de refrigeración y azidiol sobre los métodos microbiológicos en el análisis de muestras de leche con penicilina G.....	153
Cuadro 45. Efecto del tiempo de refrigeración y del azidiol sobre los resultados positivos (%) de los métodos microbiológicos en el análisis de muestras de leche con penicilina G.....	155
Cuadro 46. Valores de chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) y probabilidad (p) de los factores de variación de la respuesta de los métodos microbiológicos para la detección de oxitetraciclina en la leche.....	158
Cuadro 47. Ecuaciones de predicción de la respuesta de los métodos microbiológicos para la detección de oxitetraciclina en la leche.....	158
Cuadro 48. Efecto del tiempo de refrigeración, azidiol y la interacción entre tiempo de refrigeración y azidiol sobre los métodos microbiológicos en el análisis de muestras de leche con oxitetraciclina.....	161
Cuadro 49. Efecto del tiempo de refrigeración y del azidiol sobre los resultados positivos (%) de los métodos microbiológicos en el análisis de muestras de leche con oxitetraciclina.....	162

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Frecuencia de tratamientos con sustancias antimicrobianas de diferentes patologías del ganado vacuno lechero.....	5
Figura 2. Frecuencia de uso de antibióticos empleados en formulaciones farmacéuticas de productos veterinarios para el tratamiento de la mamitis.....	7
Figura 3. Frecuencia de uso de sustancias antimicrobianas en el tratamiento de la mamitis del ganado vacuno lechero.....	8
Figura 4. Causas de la presencia de inhibidores en la leche.....	14
Figura 5. Causas de la presencia de residuos de antibióticos en la leche relacionados con los tratamientos de la mamitis.....	15
Figura 6. Esquema de las diferentes etapas implicadas en el sistema de gestión de la trazabilidad de la leche cruda de vaca.....	23
Figura 7. Etapas de control en la detección de antibióticos en la leche.....	25
Figura 8. Diagrama de la realización de la prueba de detección de residuos de antibióticos en explotaciones ganaderas y centros lácteos.....	27
Figura 9. Principio de los métodos microbiológicos de detección de antibióticos en la leche.....	32
Figura 10. Principio del método enzimático Penzym de detección de antibióticos en la leche.....	36
Figura 11. Principio de los métodos de unión a receptores proteicos de detección de antibióticos en la leche.....	37
Figura 12. Modelo de curva dosis-respuesta para el cálculo del límite de detección de los métodos de cribado .....	41
Figura 13. Perfil de detección de métodos analíticos para diferentes sustancias antimicrobianas.....	42
Figura 14. Diseño experimental del estudio de sensibilidad de los métodos de detección de residuos de antimicrobianos en la leche.....	68
Figura 15. Procedimiento analítico del método microbiológico BRT AiM.....	71
Figura 16. Procedimiento analítico del método microbiológico Blue Yellow.....	71
Figura 17. Procedimiento analítico del método microbiológico Delvotest SP-NT.....	72
Figura 18. Procedimiento analítico del método microbiológico Delvotest MCS Accelerator.....	73
Figura 19. Procedimiento analítico del método microbiológico Eclipse 100.....	74
Figura 20. Procedimiento analítico del método microbiológico Eclipse 50.....	74
Figura 21. Procedimiento analítico del método microbiológico Equinox.....	76
Figura 22. Procedimiento analítico del método enzimático Penzym.....	76
Figura 23. Procedimiento analítico del método de unión a receptores proteicos Beta Star.....	77
Figura 24. Procedimiento analítico del método de unión a receptores proteicos Delvo-X-Press.....	78
Figura 25. Procedimiento analítico del método de unión a receptores proteicos Rosa Charm.....	79
Figura 26. Procedimiento analítico del método de unión a receptores proteicos Snap.....	80
Figura 27. Procedimiento analítico del método de unión a receptores proteicos Twinsensor.....	81

Figura 28. Diseño experimental del estudio sobre la influencia de factores relacionados con la toma de muestras sobre la respuesta de los métodos microbiológicos de cribado.....	87
Figura 29. Sensibilidad de los métodos microbiológicos para las penicilinas al Límite Máximo de Residuos .....	101
Figura 30. Sensibilidad de los métodos microbiológicos para las cefalosporinas al Límite Máximo de Residuos .....	102
Figura 31. Sensibilidad de los métodos específicos para las penicilinas al Límite Máximo de Residuos .....	106
Figura 32. Sensibilidad de los métodos específicos para las cefalosporinas al Límite Máximo de Residuos .....	107
Figura 33. Sensibilidad de los métodos específicos para la neomicina y la tilosina al Límite Máximo de Residuos .....	110
Figura 34. Comparación de la sensibilidad de los métodos microbiológicos en la detección de penicilinas.....	114
Figura 35. Comparación de la sensibilidad de los métodos específicos en la detección de cefalosporinas.....	115
Figura 36. Comparación de la sensibilidad de los métodos microbiológicos en la detección de otros antibióticos no betalactámicos.....	116
Figura 37. Dendograma del análisis cluster basado en la sensibilidad de los antibióticos según los diferentes métodos ensayado.....	119
Figura 38. Dendograma del análisis cluster basado en la sensibilidad de los métodos de cribado.....	121
Figura 39. Análisis de componentes principales de los métodos microbiológicos.....	123
Figura 40. Análisis de componentes principales de los métodos específicos.....	125
Figura 41. Efecto del conservante y del tiempo de refrigeración de las muestras de leche sobre la curva dosis-respuesta de los métodos microbiológicos para la amoxicilina.....	135
Figura 42. Efecto del tiempo de refrigeración sobre las pérdidas relativas de actividad antimicrobiana (PAA) de amoxicilina en la leche.....	140
Figura 43. Efecto del conservante y del tiempo de refrigeración de las muestras de leche sobre la curva dosis-respuesta de los métodos microbiológicos para la ampicilina.....	145
Figura 44. Efecto del tiempo de refrigeración sobre las pérdidas relativas de actividad antimicrobiana (PAA) de ampicilina en la leche.....	149
Figura 45. Efecto del conservante y del tiempo de refrigeración de las muestras de leche sobre la curva dosis-respuesta de los métodos microbiológicos para la penicilina G.....	152
Figura 46. Efecto del tiempo de refrigeración sobre las pérdidas relativas de actividad antimicrobiana (PAA) de penicilina G en la leche.....	156
Figura 47. Efecto del conservante y del tiempo de refrigeración de las muestras de leche sobre la curva dosis-respuesta de los métodos microbiológicos para la oxitetraciclina....	160
Figura 48. Efecto del tiempo de refrigeración sobre las pérdidas relativas de actividad antimicrobiana (PAA) de oxitetraciclina en la leche.....	163