

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. Los antimicrobianos	3
1.1 Sulfonamidas	5
1.1.1 Mecanismo de acción	7
1.2 Tetraciclinas	8
1.2.1 Mecanismo de acción	10
1.3 Uso de antimicrobianos en veterinaria	12
1.4 Consumo de antimicrobianos	17
1.5 Antimicrobianos y medio ambiente	22
2. Determinación de antimicrobianos	25
2.1 Técnicas microbiológicas	26
2.2 Técnicas cromatográficas	30
2.3 Técnicas inmunoquímicas	34
2.3.1. Obtención y características de anticuerpos.....	37
2.3.1.1 <i>Desarrollo de haptenos</i>	40
2.3.2. Tipos de inmunoensayos	44
3. Microinmunoanálisis sobre discos compactos (CDs)	55
3.1 Microarrays	55
3.2 Tipos de soporte	58
3.2.1 Discos Compactos	63
3.3 Tecnología de CDs	65
3.3.1 Estructura de los CDs	65
3.3.2 Funcionamiento de un lector de CDs	67
3.4 Antecedentes de los <i>microarrays</i> sobre CD	71
3.5 Desarrollo de microinmunoensayos sobre CDs	75
3.5.1 Elección de la plataforma analítica.....	75
3.5.2 Amplificación de la señal	76
OBJETIVOS	78
MATERIALES Y MÉTODOS	81
4. Productos y reactivos	83
4.1 Sulfonamidas y tetraciclinas	83
4.2 Reactivos	83
4.3 Tampones	84
4.4 Haptenos	85
4.5 Otros materiales	86
5. Equipos instrumentales	87

6. Técnicas generales	88
6.1 Conjugación de haptenos a proteínas	88
6.2 Purificación de conjugados	91
6.3 Obtención de anticuerpos policlonales	92
6.4 Enzimoimmunoanálisis en fase sólida (ELISA) sobre placas de poliestireno	93
6.4.1 Ensayos de titulación y competición.....	93
6.4.2 Optimización de los ensayos ELISA.....	96
6.4.3 Estudios de selectividad.....	97
6.4.4 Efecto de los disolventes orgánicos.....	98
6.5 Micro-enzimoimmunoanálisis en fase sólida (microinmunoensayo) sobre disco compacto	98
6.5.1 Ensayos de titulación y competición.....	100
6.5.2 Sistema de detección.....	102
RESULTADOS	107
7. Diseño de haptenos	109
7.1 Haptenos para sulfonamidas	110
7.2 Haptenos para tetraciclinas	114
8. Desarrollo y puesta a punto de inmunoensayos en placa ELISA	116
8.1 Sulfonamidas	117
8.1.1 ELISAs competitivos para sulfonamidas.....	117
8.1.2 Optimización y características de los ELISA para sulfonamidas.....	122
8.1.2.1 <i>Efecto de la fuerza iónica</i>	122
8.1.2.2 <i>Efecto del pH</i>	123
8.1.2.3 <i>Efecto de la concentración de tensoactivo</i>	126
8.1.2.4 <i>Efecto del tiempo de incubación en la etapa competitiva</i>	128
8.1.2.5 <i>Prestaciones analíticas de los ELISAs optimizados</i>	130
8.1.2.6 <i>Ensayos de selectividad</i>	132
8.1.3 Determinación de residuos de sulfonamidas en miel.....	140
8.1.3.1 <i>Tolerancia a disolventes orgánicos</i>	141
8.1.3.2 <i>Estudio del procedimiento de extracción de muestras de miel</i>	147
8.1.3.3 <i>Análisis de muestras de miel</i>	151
8.1.4 Determinación de residuos de SSZ en plasma humano.....	155
8.1.4.2 <i>Determinación de SSZ en muestras de suero fisiológico</i>	157
8.1.4.3 <i>Determinación de SSZ en muestras de plasma humano</i> ..	159
8.1.5 Determinación de residuos de SMX en agua de depuradora...	163

8.2 Tetraciclinas	166
8.2.1 ELISAs competitivos para tetraciclinas	166
8.2.2 Optimización y características de los ELISAs para tetraciclinas	168
8.2.2.1 <i>Efecto de la fuerza iónica</i>	169
8.2.2.2 <i>Efecto del pH</i>	170
8.2.2.3 <i>Efecto de la concentración de tensoactivo</i>	171
8.2.2.4 <i>Efecto del tiempo de incubación en la etapa competitiva</i>	172
9. Desarrollo y puesta a punto de inmunoensayos en CD	177
9.1 Sulfonamidas	183
9.1.1 Optimización y características de los microinmunoensayos ...	186
9.1.1.1 <i>Efecto de la fuerza iónica</i>	187
9.1.1.2 <i>Efecto del pH</i>	189
9.1.1.3 <i>Efecto de la concentración de tensoactivo</i>	190
9.1.1.4 <i>Efecto del tiempo de incubación en la etapa competitiva</i>	192
9.1.1.5 <i>Efecto de las condiciones de incubación con</i> <i>el anticuerpo secundario</i>	194
9.1.1.6 <i>Prestaciones analíticas de los</i> <i>microinmunoensayos optimizados</i>	196
9.1.1.7 <i>Ensayos de selectividad</i>	202
9.1.2 Aplicación de los ensayos desarrollados en CD para sulfonamidas	206
9.1.2.1 <i>Determinación de residuos de sulfatiazol en agua</i>	206
9.1.2.2 <i>Determinación de residuos de sulfametoxazol en agua</i> ...	207
9.2 Tetraciclinas	210
9.2.1.1 <i>Efecto de la fuerza iónica</i>	213
9.2.1.2 <i>Efecto del pH</i>	214
9.2.1.3 <i>Efecto de la concentración de tensoactivo</i>	215
9.2.1.4 <i>Efecto del tiempo de incubación en la etapa competitiva</i>	216
9.2.1.5 <i>Efecto de las condiciones de incubación con</i> <i>el anticuerpo secundario.</i>	217
9.2.1.6 <i>Prestaciones analíticas del</i> <i>microinmunoensayo optimizado</i>	219
9.2.1.7 <i>Ensayos de selectividad</i>	223
9.2.2 Aplicación de los ensayos desarrollados en CD para clortetraciclina	224
9.2.2.1 <i>Determinación de residuos de clortetraciclina</i> <i>en dorada (Sparus aurata)</i>	224

9.3 Inmunoensayos en CD: conclusiones	226
CONCLUSIONES GENERALES	229
PUBLICACIONES ASOCIADAS	235
ANEXOS	239

