

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. RESIDUOS DE SUSTANCIAS ANTIMICROBIANAS EN LA LECHE	1
1.1. Consideraciones previas.....	1
1.2. Origen y excreción de los residuos de medicamentos	2
1.3. Factores de variación de la presencia de residuos en la leche	5
1.4. Efectos de la presencia de residuos de medicamentos	7
1.5. Medidas de control de la presencia de residuos.....	9
1.5.1. Medidas preventivas.....	9
1.5.2. Límites Máximos de Residuos	10
2. SUSTANCIAS ANTIMICROBIANAS EN MEDICINA VETERINARIA	13
2.1. Características generales de los antimicrobianos	13
2.2. Clasificación de las sustancias antimicrobianas	14
2.3. Propiedades generales de los antibióticos	16
2.3.1. Betalactámicos	16
2.3.1.1. Penicilinas	17
2.3.1.2. Cefalosporinas.....	19
2.3.2. Aminoglucósidos	21
2.3.3. Macrólidos	22
2.3.4. Quinolonas	24
2.3.5. Tetraciclinas	25
2.3.6. Sulfonamidas	26
2.3.7. Otros agentes antimicrobianos	28
3. MÉTODOS DE DETECCIÓN DE RESIDUOS DE ANTIMICROBIANOS EN LA LECHE	29
3.1. Generalidades	29
3.2. Clasificación de los métodos de detección de residuos	32
3.2.1. Métodos de cribado o “screening”	32
3.2.2. Métodos de postcribado o identificación preliminar.....	37
3.2.3. Métodos de cuantificación físico-químicos	39
3.3. Problemática de la utilización de los métodos de detección en leche de pequeños rumiantes	40
4. MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS MÚLTIPLES O BIOENSAYOS	43

4.1. Aspectos generales	43
4.2. Tipos de bioensayos.....	45
4.3. Sistema microbiológico multiplaca (SMMP).....	49
4.4. Criterios de validación de métodos microbiológicos	52
II. OBJETIVOS	55
III. MATERIAL Y MÉTODOS	57
1. PRIMER ESTUDIO: EVALUACIÓN DEL MÉTODO MICROBIOLÓGICO DE CRIBADO ECLIPSE® “100ov” EN LECHE DE OVEJA	57
1.1. Diseño experimental.....	57
1.1.1. Selectividad del método microbiológico Eclipse® “100ov”	57
1.1.2. Límites de detección del método microbiológico Eclipse® “100ov”	57
1.2. Material	58
1.2.1. Muestras de leche	58
1.2.1.1. Obtención y preparación de las muestras	58
1.2.1.2. Preparación del conservante	58
1.2.2. Disoluciones de fármacos y muestras fortificadas	59
1.3. Métodos analíticos	61
1.3.1. Composición y calidad higiénica de la leche	61
1.3.1.1. Composición química	62
1.3.1.2. Recuento de células somáticas.....	62
1.3.1.3. Recuento de bacterias	62
1.3.2. Método de detección de Inhibidores.....	63
1.3.2.1. Características del método Eclipse®	63
1.3.2.2. Procedimiento del método.....	64
1.4. Análisis estadístico	65
1.4.1. Selectividad del método microbiológico Eclipse® “100ov”	66
1.4.2. Límites de detección del método microbiológico Eclipse® “100ov”	66
2. SEGUNDO ESTUDIO: APLICACIÓN DEL SISTEMA MICROBIOLÓGICO MULTIPLACA (SMMP) EN LECHE DE OVEJA.....	67
2.1. Diseño experimental.....	67
2.1.1. Efecto de la naturaleza de la leche en el SMMP	67
2.1.2. Adecuación del Sistema Microbiológico Multiplaca.....	68
2.1.2.1. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)	68
2.1.2.2. Obtención de los Límites de Detección (LD).....	69
2.1.3. Especificidad del SMMP aplicado a leche de oveja	70

2.1.3.1. Selectividad del SMMP	70
2.1.3.2. Especificidad cruzada	71
2.2. Muestras de leche	72
2.2.1. Obtención y preparación de las muestras.....	72
2.2.2. Métodos analíticos.....	73
2.3. Sistema Microbiológico Multiplaca (SMMP).....	73
2.3.1. Características del Sistema Microbiológico Multiplaca.....	73
2.3.2. Equipos, reactivos y materiales del SMMP	73
2.3.3. Preparación de las suspensiones bacterianas.....	74
2.3.3.1. Consideraciones previas	74
2.3.3.2. Preparación de la suspensión bacteriana a partir de cepas liofilizadas de formas esporuladas.....	75
2.3.3.3. Preparación de la suspensión bacteriana a partir de cepas liofilizadas de formas vegetativas	76
2.3.4. Preparación de las placas	77
2.3.4.1. Placa de <i>Bacillus stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i>	77
2.3.4.2. Placa de <i>Bacillus subtilis</i> BGA.....	77
2.3.4.3. Placa de <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	78
2.3.4.4. Placa de <i>Escherichia coli</i> ATCC 11303	78
2.3.4.5. Placa de <i>Bacillus cereus</i> var. <i>mycoides</i> ATCC 11778	79
2.3.4.6. Placa de <i>Bacillus subtilis</i> BGA.....	80
2.3.5. Interpretación de los resultados.....	80
2.4. Métodos estadísticos.....	82
2.4.1. Efecto de la naturaleza de la leche	82
2.4.2. Linealidad y límites de detección.....	82
2.4.3. Especificidad del SMMP	83
 IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	 85
 1. PRIMER ESTUDIO: APLICACIÓN DEL MÉTODO MICROBIOLÓGICO DE CRIBADO ECLIPSE® “100OV” EN LECHE DE OVEJA	 85
1.1. Selectividad del método Eclipse® “100ov”	85
1.2. Límites de detección del método Eclipse® “100ov.....	88
1.2.1. Detección de betalactámicos en leche de oveja	89
1.2.1.1. Efecto de la concentración de betalactámicos sobre las lecturas visuales y fotométricas	89
1.2.1.2. Límites de detección de betalactámicos	92
1.2.2. Detección de aminoglucósidos en leche de oveja.....	94

1.2.2.1. Efecto de la concentración de aminoglucósidos sobre las lecturas visuales y fotométricas	94
1.2.2.2. Límites de detección de aminoglucósidos	96
1.2.3. Detección de macrólidos en leche de oveja	98
1.2.3.1. Efecto de la concentración de macrólidos sobre las lecturas visuales y fotométricas	98
1.2.3.2. Límites de detección de macrólidos.....	99
1.2.4. Detección de quinolonas en leche de oveja	101
1.2.4.1. Efecto de la concentración de quinolonas sobre las lecturas visuales y fotométricas	101
1.2.4.2. Límites de detección de quinolonas.....	103
1.2.5. Detección de tetraciclinas en leche de oveja	104
1.2.5.1. Efecto de la concentración de tetraciclinas sobre las lecturas visuales y fotométricas	104
1.2.5.2. Límites de detección de tetraciclinas.....	106
1.2.6. Detección de sulfonamidas en leche de oveja	107
1.2.6.1. Efecto de la concentración de sulfonamidas sobre las lecturas visuales y fotométricas	107
1.2.6.2. Límites de detección de sulfonamidas	109
2. SEGUNDO ESTUDIO: APLICACIÓN DEL SISTEMA MICROBIOLÓGICO MULTIPLACA (SMMP) EN LECHE DE OVEJA.....	111
2.1. Detección de antimicrobianos mediante el Sistema Microbiológico Multiplaca en leche de oveja	111
2.1.1. Efecto de la naturaleza de la leche	111
2.1.2. Validación del Sistema Microbiológico Multiplaca en leche de oveja.....	113
2.1.2.1. Concentración Mínima Inhibitoria.....	113
2.1.2.2. Factores de variación de las determinaciones.....	114
2.1.2.3. Detección de betalactámicos mediante <i>Bacillus stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i> C953 en la leche de oveja	114
2.1.2.3.1. Detección de penicilinas	114
2.1.2.3.2. Detección de cefalosporinas	120
2.1.2.4. Detección de aminoglucósidos mediante <i>Bacillus subtilis</i> BGA en la leche de oveja	125
2.1.2.5. Detección de macrólidos mediante <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341 en la leche de oveja	130
2.1.2.6. Detección de quinolonas mediante <i>Escherichia coli</i> ATCC 11303 en la leche de oveja	134

2.1.2.7. Detección de tetraciclinas mediante <i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778 en la leche de oveja	137
2.1.2.8. Detección de sulfonamidas mediante <i>Bacillus subtilis</i> BGA en la leche de oveja.....	143
2.2. Especificidad del SMMP en leche de oveja	148
2.2.1. Selectividad del SMMP	148
2.2.2. Especificidad cruzada	149
V. CONCLUSIONES	163
VI. BIBLIOGRAFÍA	167

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Límites Máximos de Residuos (LMRs) establecidos por la UE.....	12
Cuadro 2. Clasificación de los diferentes agentes antimicrobianos.....	15
Cuadro 3. Radicales más comunes de algunos antibióticos betalactámicos.....	17
Cuadro 4. Clasificación de las penicilinas según su espectro de acción.....	19
Cuadro 5. Clasificación y espectro de las cefalosporinas.....	21
Cuadro 6. Radicales más comunes de las principales quinolonas.....	24
Cuadro 7. Clasificación y espectro de acción de las quinolonas.....	25
Cuadro 8. Radicales de las tetraciclinas más importantes.....	25
Cuadro 9. Radicales de las sulfonamidas.....	27
Cuadro 10. Clasificación sulfonamidas.....	27
Cuadro 11. Métodos microbiológicos de cribado.....	34
Cuadro 12. Métodos de confirmación e identificación de inhibidores.....	38
Cuadro 13. Método de bioensayo modificado.....	47
Cuadro 14. Características de un bioensayo aplicado a leche de vaca.....	48
Cuadro 15. Características del Sistema Microbiológico Multiplaca.....	50
Cuadro 16. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del SMMP en leche de vaca y Límites Máximos de Residuos.....	51
Cuadro 17. Clasificación de los métodos analíticos en función de las características de funcionamiento.....	52
Cuadro 18. Antimicrobianos y disolventes empleados.....	60
Cuadro 19. Concentraciones de sustancias antimicrobianas.....	61
Cuadro 20. Concentraciones ensayadas para determinar la CMI.....	69
Cuadro 21. Concentraciones ensayadas para establecer la linealidad del SMMP y los límites de detección.....	71
Cuadro 22. Resultados de la aplicación de la regresión logística a las calificaciones visuales del método Eclipse® “100ov”.....	85
Cuadro 23. Frecuencias absolutas y relativas (%) de los resultados del método Eclipse® “100ov” en la leche de oveja a lo largo de la lactación.....	86
Cuadro 24. Selectividad del método Eclipse® “100ov” comparada con los métodos BRT AiM® y Delvotest®.....	87
Cuadro 25. Resultados del modelo de regresión logística aplicado a la detección de betalactámicos en leche de oveja con el método Eclipse® “100ov”.....	89
Cuadro 26. Límites de detección de betalactámicos en leche de oveja para el método Eclipse® “100ov”.....	93

Cuadro 27. Resultados del modelo de regresión logística aplicado a la detección de aminoglucósidos en leche de oveja con el método Eclipse® “100ov”	95
Cuadro 28. Límites de detección de aminoglucósidos en leche de oveja para el método Eclipse® “100ov”	96
Cuadro 29. Resultados del modelo de regresión logística aplicado a la detección de macrólidos en leche de oveja con el método Eclipse® “100ov”	98
Cuadro 30. Límites de detección de macrólidos en leche de oveja para el método Eclipse® “100ov”	100
Cuadro 31. Resultados del modelo de regresión logística aplicado a la detección de quinolonas en leche de oveja con método Eclipse® “100ov”	102
Cuadro 32. Límites de detección de quinolonas en leche de oveja para el método Eclipse® “100ov”	103
Cuadro 33. Resultados del modelo de regresión logística aplicado a la detección de tetraciclinas en leche de oveja con el método Eclipse® “100ov”	104
Cuadro 34. Límites de detección de tetraciclinas en leche de oveja para el método Eclipse® “100ov”	106
Cuadro 35. Resultados del modelo de regresión logística aplicado a la detección de sulfonamidas en leche de oveja con el método Eclipse® “100ov”	108
Cuadro 36. Límites de detección de sulfonamidas en leche de oveja para el método Eclipse® “100ov”	106
Cuadro 37. Resultados del ANOVA en el estudio de la adecuación del Sistema Microbiológico Multiplaca a la leche de oveja	111
Cuadro 38. Diámetros medios de las zonas de inhibición y desviación estándar (mm) de las diferentes placas para la leche de vaca y oveja.....	112
Cuadro 39. Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) determinadas en leche de oveja para el Sistema Microbiológico Multiplaca.....	113
Cuadro 40. Resultados del ANOVA para el estudio de los efectos “concentración”, “preparación del medio” y su interacción sobre el diámetro de la zona de inhibición en leche de oveja	115
Cuadro 41. Efecto de la concentración de penicilinas en la leche de oveja sobre el diámetro de la zona de inhibición de <i>Bacillus stearothermophilus</i>	117
Cuadro 42. Concentraciones de penicilinas correspondientes a diferentes diámetros (18, 20 y 22 mm) de la zona de inhibición en leche de oveja	119
Cuadro 43. Efecto de la concentración de cefalosporinas en la leche de oveja sobre el diámetro de la zona de inhibición de <i>Bacillus stearothermophilus</i>	121
Cuadro 44. Concentraciones de cefalosporinas correspondientes a diferentes diámetros (18, 20 y 22 mm) de la zona de inhibición en leche de oveja.....	122

Cuadro 45. Efecto de la concentración de aminoglucósidos en la leche de oveja sobre el diámetro de la zona de inhibición de <i>Bacillus subtilis</i> BGA	126
Cuadro 46. Concentraciones de aminoglucósidos correspondientes a diferentes diámetros (18, 20 y 22 mm) de la zona de inhibición en leche de oveja.....	127
Cuadro 47. Efecto de la concentración de macrólidos en la leche de oveja sobre el diámetro de la zona de inhibición del <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	130
Cuadro 48. Concentraciones de macrólidos correspondientes a diferentes diámetros (18, 20 y 22 mm) de la zona de inhibición en leche de oveja	132
Cuadro 49. Efecto de la concentración de quinolonas en la leche de oveja sobre el diámetro de la zona de inhibición del <i>Escherichia coli</i> ATCC 11303	135
Cuadro 50. Concentraciones de quinolonas correspondientes a diferentes diámetros (18, 20 y 22 mm) de la zona de inhibición en leche de oveja.....	137
Cuadro 51. Efecto de la concentración de tetraciclinas en la leche de oveja sobre el diámetro de la zona de inhibición del <i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	139
Cuadro 52. Concentraciones de tetraciclinas correspondientes a diferentes diámetros (18, 20 y 22 mm) de la zona de inhibición en leche de oveja	140
Cuadro 53. Efecto de la concentración de sulfonamidas en la leche de oveja sobre el diámetro de la zona de inhibición del <i>Bacillus subtilis</i> BGA.....	144
Cuadro 54. Concentraciones de sulfonamidas correspondientes a diferentes diámetros (18, 20 y 22 mm) de la zona de inhibición en leche de oveja.....	146
Cuadro 55. Selectividad del SMMP en leche de oveja.....	148
Cuadro 56. Diámetros de inhibición correspondientes a diferentes agentes antimicrobianos ensayados en la placa de <i>Bacillus stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i> (betalactámicos: nivel de decisión 20 mm).....	150
Cuadro 57. Diámetros de inhibición correspondientes a diferentes de agentes antimicrobianos ensayados en la placa de <i>Bacillus subtilis</i> BGA (aminoglucósidos: nivel de decisión 20 mm)	153
Cuadro 58. Diámetros de inhibición correspondientes a diferentes agentes antimicrobianos ensayados en la placa de <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341 (macrólidos: nivel de decisión 20 mm)	154
Cuadro 59. Diámetros de inhibición correspondientes a diferentes agentes antimicrobianos ensayados en la placa de <i>Escherichia coli</i> ATCC 11303 (quinolonas: nivel de decisión 22 mm)	156
Cuadro 60 Diámetros de inhibición correspondientes a diferentes agentes antimicrobianos ensayados en la placa de <i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778 (tetraciclinas: nivel de decisión 20 mm)	157

Cuadro 61. Diámetros de inhibición correspondientes a diferentes agentes antimicrobianos ensayados en la placa de <i>Bacillus subtilis</i> BGA pH 7,0 (sulfonamidas: nivel de decisión 20 mm)	158
Cuadro 62. Concentraciones ($\mu\text{g}/\text{kg}$) de agentes antimicrobianos en leche de oveja que producen interferencias en el Sistema Microbiológico Multiplaca)	160

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Frecuencias relativas (%) de causas más frecuentes de la presencia de residuos en la leche (n = 516).....	3
Figura 2. Efecto de la biotransformación corporal de los fármacos en relación con su actividad farmacológica	5
Figura 3. Objetivos y áreas de los Códigos de Buenas Prácticas.....	10
Figura 4. Formula estructural de los antibióticos betalactámicos.....	17
Figura 5. Núcleo de la penicilina y radicales que originan penicilinas sintéticas	18
Figura 6. Estructura química del núcleo de las cefalosporinas y algunos radicales de las más importantes.....	20
Figura 7. Estructura química de antibióticos aminoglucósidos	22
Figura 8. Formula estructural de la eritromicina	23
Figura 9. Estructura básica de las quinolonas	24
Figura 10. Estructura química del núcleo de las tetraciclinas	25
Figura 11. Fórmula estructural básica de las sulfonamidas	26
Figura 12. Sistema integrado de control de la presencia de residuos.....	31
Figura 13. Placa de Eclipse® después de su utilización.....	64
Figura 14. Esquema del procedimiento utilizado en el método Eclipse®	65
Figura 15. Diseño experimental empleado en el estudio del tipo de leche.....	68
Figura 16. Diseño experimental empleado para estudiar los límites de detección del SMMP en leche de oveja	70
Figura 17. Secuencia de preparación de las placas y medida de las zonas de inhibición.....	81
Figura 18. Efecto del conservante sobre las respuestas visuales del método Eclipse® “100ov” en muestras de leche de oveja	86
Figura 19. Efecto de la concentración de penicilinas sobre la frecuencia de casos positivos del método Eclipse® “100ov”	90
Figura 20. Efecto de la concentración de penicilinas sobre la absorbancia relativa del método Eclipse® “100ov”	91
Figura 21. Efecto de la concentración de cefalosporinas sobre la frecuencia de casos positivos del método Eclipse® “100ov”	91
Figura 22. Efecto de la concentración de cefalosporinas sobre la absorbancia relativa del método Eclipse® “100ov”	92
Figura 23. Efecto de la concentración de aminoglucósidos sobre la frecuencia de casos positivos del método Eclipse® “100ov”	95
Figura 24. Efecto de la concentración de aminoglucósidos sobre la absorbancia relativa del método Eclipse® “100ov”	96

Figura 25. Efecto de la concentración de macrólidos sobre la frecuencia de casos positivos del método Eclipse® “100ov”	99
Figura 26. Efecto de la concentración de macrólidos sobre la absorbancia relativa del método Eclipse® “100ov”	99
Figura 27. Efecto de la concentración de quinolonas sobre la frecuencia de casos positivos del método Eclipse® “100ov”	102
Figura 28. Efecto de la concentración de quinolonas sobre la absorbancia relativa del método Eclipse® “100ov”	103
Figura 29. Efecto de la concentración de tetraciclinas sobre la frecuencia de casos positivos del método Eclipse® “100ov”	105
Figura 30. Efecto de la concentración de tetraciclinas sobre la absorbancia relativa del método Eclipse® “100ov”	105
Figura 31. Efecto de la concentración de sulfonamidas sobre la frecuencia de casos positivos del método Eclipse® “100ov”	108
Figura 32. Efecto de la concentración de sulfonamidas sobre la absorbancia relativa del método Eclipse® “100ov”	109
Figura 33. Relación entre la concentración de penicilinas (µg/kg) en leche de oveja y el diámetro de la zona de inhibición (mm) de <i>Bacillus stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i>	118
Figura 34. Relación entre la concentración de cefalosporinas (µg/kg) en leche de oveja y el diámetros de la zona de inhibición (mm) de <i>Bacillus stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i>	123
Figura 35. Comparación de las concentraciones que producen diferentes diámetros de inhibición con los LMR de antibióticos betalactámicos en leche de oveja.....	125
Figura 36. Relación entre la concentración de aminoglucósidos (µg/kg) en leche de oveja y el diámetro de la zona de inhibición (mm) de <i>Bacillus subtilis</i> BGA.....	128
Figura 37. Comparación de las concentraciones que producen diferentes diámetros de inhibición con los LMR de aminoglucósidos en leche de oveja.....	129
Figura 38. Relación entre la concentración de macrólidos (µg/kg) en leche de oveja y el diámetro de la zona de inhibición (mm) de <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	131
Figura 39. Comparación de las concentraciones que producen diferentes diámetros de inhibición con los LMR de macrolidos en leche de oveja	134
Figura 40. Relación entre la concentración de quinolonas (µg/kg) en leche de oveja y el diámetro de la zona de inhibición (mm) de <i>Escherichia coli</i> ATCC 11303.....	136

Figura 41. Relación entre la concentración de quinolonas ($\mu\text{g}/\text{kg}$) en leche de oveja y el diámetro de la zona de inhibición (mm) de <i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778.....	141
Figura 42. Comparación de las concentraciones que producen diferentes diámetros de inhibición con los LMR de tetraciclinas en leche de oveja.....	143
Figura 43. Relación entre la concentración de sulfonamidas ($\mu\text{g}/\text{kg}$) en leche de oveja y el diámetro de la zona de inhibición (mm) de <i>Bacillus subtilis</i> BGA	145
Figura 44. Comparación de las concentraciones que producen diferentes diámetros de inhibición con los LMR de sulfonamidas en leche de oveja	147