

Resumen

La leche de cabra se destina fundamentalmente a la fabricación de productos fermentados, en especial diferentes tipos de queso. Por lo tanto, el control de residuos de antibióticos en la leche es de gran importancia, ya que su presencia podría tener repercusiones negativas sobre las propiedades tecnológicas de la leche, así como en la salud de los consumidores.

En los programas de control de la calidad de la leche los métodos microbiológicos son ampliamente utilizados para la detección de antibióticos en la etapa de cribado. Sin embargo, debido a que son métodos inespecíficos, otras sustancias distintas a los antibióticos pueden ser capaces de inhibir el crecimiento del microorganismo del método ocasionando resultados falsos positivos.

El objetivo de esta tesis ha sido evaluar las interferencias relacionadas con la presencia de diferentes sustancias contaminantes de la leche de cabra, sobre la respuesta de los métodos microbiológicos más empleados para la detección antibióticos en España (BRT MRL, Delvotest SP-NT MCS y Eclipse 100). También, se ha estudiado la influencia de las características físico-químicas de la leche de cabra sobre los resultados falsos positivos de estos métodos.

La idoneidad de los métodos microbiológicos para la detección de antibióticos en las secreciones calostrales se estudió mediante el análisis de muestras de calostro y de leche procedentes de cuarenta y tres cabras de raza Murciano-Granadina obtenidas cada 12 horas durante la primera semana post-parto. Los resultados indicaron que los métodos microbiológicos no son adecuados para el análisis del calostro caprino, ya que se encontraron elevados porcentajes de resultados dudosos y positivos (hasta un 37,2% a las 36 horas después del parto).

Para evaluar el efecto de la mezcla de calostro en la leche de cabra sobre la respuesta de los métodos de cribado, se analizaron muestras de leche de cabra sin antibióticos con diferentes concentraciones de calostro. Las mayores interferencias se obtuvieron con la adición del calostro obtenido a las 12 y 24 horas después del parto, siendo el método BRT LMR el más afectado. También se calcularon las concentraciones inhibitorias de calostro que producen el 5% de resultados positivos en los métodos microbiológicos, estando comprendidas entre 5,1 y 34,6%.

En otro estudio, se investigó la interferencia que producen en los métodos microbiológicos los detergentes y desinfectantes empleados en las explotaciones ganaderas para la limpieza del material de ordeño y tanques de almacenamiento de la

leche. Para ello, se adicionaron ocho concentraciones de diferentes productos de limpieza (5 ácidos, 5 alcalinos, 5 lavavajillas de uso doméstico y 1 desinfectante) a leche de cabra sin antibióticos, y se analizaron mediante los métodos microbiológicos de detección de antibióticos. La presencia de detergentes ácidos y de desinfectante, cuya composición se basa en hipoclorito sódico, en la leche de cabra no afectó a la respuesta de los métodos. Por el contrario, los detergentes alcalinos en concentraciones ≥ 1 ml/l dieron lugar a resultados falsos positivos en las pruebas microbianas (hasta un 16,7%) y a concentraciones de 4 ml/l el 100% de las respuestas obtenidas fueron positivas. En cuanto a los productos de limpieza de uso doméstico, que se suelen emplear en pequeñas granjas y queserías, el lavavajillas que contiene lauril sulfato sódico y etanol, presentó un mayor efecto que el resto de productos ensayados sobre los métodos microbiológicos, incluso a concentraciones relativamente bajas (1 ml/l). Además, la presencia en la leche de cabra de detergentes a bajas concentraciones (0,5 ml/l) modificó ligeramente la sensibilidad de los métodos microbiológicos para la amoxicilina, ampicilina, bencilpenicilina y cloxacilina, aunque no compromete la detección de estos antibióticos a los límites de seguridad (LMR).

Los residuos de antiparasitarios en la leche de cabra podrían ser otra de las posibles causas de resultados falsos positivos en las pruebas de detección de inhibidores. Para su estudio se realizó un experimento *in vitro* para evaluar el efecto de siete antiparasitarios de uso frecuente en ganado caprino lechero, así como, dos experimentos en los cuales diferentes grupos de cabras en lactación se trataron con albendazol e ivermectina. Hay que señalar que, aunque la ivermectina está prohibida en el tratamiento de animales productores de leche para consumo humano, aunque se consideró interesante su inclusión en este estudio para analizar el potencial efecto de sus residuos en la leche en caso de una aplicación ilegal.

En el estudio *in vitro*, se añadieron ocho concentraciones diferentes de albendazol, closantel, diclazurilo, febendazol, levamisol, diazinón e ivermectina a leche cruda de cabra sin antibióticos. Los resultados mostraron una gran variabilidad según el método y antiparasitario empleado. El método BRT MRL fue el más sensible frente a los agentes antiparasitarios, ya que presentó concentraciones inhibitoras más bajas que produjeron un 5, 10 y 50% de resultados positivos en comparación con los otros métodos. En general, los antiparasitarios closantel y diazinón fueron los que produjeron mayores interferencias en todos los métodos de cribado a concentraciones relativamente bajas. Por el contrario, se necesitaron concentraciones más elevadas de levamisol e ivermectina para ocasionar resultados falsos positivos en las pruebas microbianas de control.

Para evaluar el efecto de los residuos de albendazol sobre la respuesta de los métodos microbiológicos, se emplearon dieciocho cabras Murciano-Granadinas en mitad de lactación tratadas con una única dosis oral de albendazol (7,5 mg/kg de principio activo por peso vivo) comercialmente registrado para ovejas lecheras que presenta un período de eliminación de 4 días. Tanto el albendazol como sus metabolitos no se detectaron por encima del límite máximo de residuos a partir del tercer día del tratamiento. Sin embargo, el método BRT MRL mostró una alta frecuencia de resultados falsos positivos durante los seis días después de la administración, lo que sugiere que otros factores relacionados con la aplicación del antiparasitario diferentes a la concentración de albendazol son capaces en algunos casos de influir sobre la respuesta de los métodos de detección de inhibidores.

En cuanto al estudio de la ivermectina, veintiocho cabras Murciano-Granadinas infestadas por *Sarcoptes scabiei* var. *caprae* fueron tratadas con una dosis de ivermectina por vía subcutánea (200 mg/kg de peso vivo), que se repitió a los siete días después de la primera administración. Los residuos de este antiparasitario en leche de cabra se detectaron durante los quince días del experimento a concentraciones comprendidas entre 8,13 y 24,25 ng/ml. Además, todos los métodos de cribado presentaron resultados positivos durante el experimento, siendo el BRT MRL el método que presentó un mayor porcentaje (20%) en comparación con el Delvotest SP-NT MCS (6,6%) y el Eclipse 100 (5,7%). Estos resultados positivos no se pueden asociar exclusivamente con la concentración de ivermectina en la leche de cabra, ya que las concentraciones inhibitorias calculadas en un estudio *in vitro* previo fueron muy superiores a las cuantificadas en la leche de cabras tratadas con ivermectina. Por lo que, las interferencias encontradas podrían estar relacionados con cambios o alteraciones causados por la aplicación del antiparasitario o por la propia enfermedad, que podrían afectar la respuesta inmune de los animales favoreciendo la presencia de sustancias inhibitoras en la leche.

También, se planteó realizar el estudio del efecto de la composición de la leche de cabra sobre la selectividad (resultados falsos positivos) de los métodos microbiológicos. Para ello, se analizaron 200 muestras de leche de cabra individuales mediante los métodos microbiológicos clasificando los resultados de modo visual e instrumental. La selectividad más elevada se obtuvo con la interpretación instrumental respecto a la visual (94-99% vs 90-96%), ya que las muestras con coloraciones intermedias (verde-amarillo, amarillo-azul) dificultan la clasificación visual de los resultados. La obtención de resultados positivos en los métodos BRT MRL y Eclipse 100 estuvo relacionada con el elevado contenido de la grasa de la leche de cabra.

También, el contenido en ácido butírico se asoció con las respuestas positivas en el método Eclipse 100. Mientras que, los resultados del Delvotest SP-NT MCS se vieron afectados por elevados valores de pH y altas concentraciones de ácido miristoleico y lactoferrina. Estos porcentajes de resultados positivos se podrían minimizar llevando a cabo algunos pre-tratamientos de las muestras de leche antes de su análisis como la eliminación de grasa por centrifugación (3100 g a 4 °C durante 10 minutos) y/o el calentamiento (80 °C durante 10 minutos).

La mejora en la selectividad de los métodos microbiológicos para la detección de antibióticos en la leche de cabra es sin duda totalmente necesaria para evitar pérdidas económicas en las ganaderías, industrias lácteas así como en los laboratorios de control. Sin embargo, se debe señalar que la presencia de contaminantes en la leche de cabra se puede evitar en gran medida mediante la aplicación de buenas prácticas ganaderas destinadas a asegurar que la leche procede de animales sanos, y que ha sido obtenida bajo condiciones adecuadas de higiene, lo que garantiza la seguridad de la leche de cabra y sus productos derivados.