

Resum

La llet de cabra es destina fonamentalment a la fabricació de productes fermentats, en especial diferents tipus de formatge. Per tant, el control de residus d'antibiòtics en la llet és de gran importància, ja que la seua presència podria tindre repercussions negatives sobre les propietats tecnològiques de la llet, així com en la salut dels consumidors.

En els programes de control de la qualitat de la llet els mètodes microbiològics són àmpliament utilitzats en l'etapa de garbellament per a la detecció d'antibiòtics. No obstant això, pel fet que són mètodes inespecífics, altres substàncies diferents dels antibiòtics poden ser capaços d'inhibir el creixement del microorganisme del mètode i, per tant, ocasionar resultats falsos positius.

L'objectiu d'esta tesi ha sigut avaluar les interferències de la presència de diferents substàncies contaminants de la llet de cabra, sobre la resposta dels mètodes microbiològics més empleats per a la detecció antibiòtics a Espanya (BRT MRL, Delvotest SP-NT MCS i Eclipse 100). També, s'ha estudiat la influència de les característiques fisicoquímiques de la llet de cabra sobre els resultats falsos positius d'estos mètodes. La idoneïtat dels mètodes microbiològics per a la detecció d'antibiòtics en els calostres es va estudiar per mitjà de l'anàlisi de mostres de calostre i de llet procedents de quaranta-tres cabres de raça Murciano-Granadina obtingudes cada 12 hores durant la primera setmana post-part. Els resultats van indicar que els mètodes microbiològics no són adequats per a l'anàlisi del calostre caprí, ja que es van trobar elevats percentatges de resultats dubtosos i positius (fins a un 37,2% a les 36 hores després del part).

Per a avaluar l'efecte de la mescla de calostre en la llet de cabra sobre la resposta dels mètodes de garbellament, es van analitzar mostres de llet de cabra sense antibiòtics amb diferents concentracions de calostre. Les majors interferències es van obtenir amb l'addició del calostre obtingut a les 12 i 24 hores després del part, sent el mètode BRT MRL el més afectat. També es van calcular les concentracions inhibidores de calostre que produïxen el 5% de resultats positius en els mètodes microbiològics, estant compreses entre 5,1 i 34,6%.

En un altre estudi, es va investigar la interferència que produïxen en els mètodes microbiològics els detergents i desinfectants empleats en les explotacions ramaderes per a la neteja del material de munyiment i tancs d'emmagatzemament de la llet. Per això, es van addicionar huit concentracions de diferents productes de neteja (5 àcids, 5 alcalins, 5 detergents d'ús domèstic i 1 desinfectant) a llet de cabra sense antibiòtics, i

es van analitzar pels mètodes microbiològics de detecció d'antibiòtics. La presència de detergents àcids i de desinfectant, a base de hipoclorit sòdic, en la llet de cabra no va afectar la resposta dels mètodes. Al contrari, els detergents alcalins en concentracions ≥ 1 ml/l van donar lloc a resultats falsos positius en les proves microbianes (fins a un 16,7%) i a concentracions de 4 ml/l el 100% de les respostes van ser positives. Respecte als productes de neteja d'ús domèstic, que se solen emprar en xicotetes granges i formatgeries, el detergent d'ús domèstic que conté lauril sulfat sòdic i etanol, va presentar un major efecte que la resta de productes assajats sobre els mètodes microbiològics, inclús a concentracions relativament baixes (1 ml/l). A més, la presència en la llet de cabra de detergents a baixes concentracions (0,5 ml/l) va modificar lleugerament la sensibilitat dels mètodes microbiològics per a l'amoxicilina, ampicilina, bencilpenicilina i cloxacilina, encara que no compromet la detecció d'estos antibiòtics als límits de seguretat (LMR).

Els residus d'antiparasitaris en la llet de cabra podrien ser una altra de les possibles causes de resultats falsos positius en les proves de detecció d'inhibidors. Per al seu estudi es va realitzar un experiment *in vitro* per a avaluar l'efecte de set antiparasitaris d'ús freqüent en el ramat caprí lleter, així com dos experiments en els quals diferents grups de cabres en lactació es van tractar amb albendazol i ivermectina. Cal assenyalar que la ivermectina està prohibida en el tractament d'animals productors de llet per a consum humà, encara que es va considerar interessant la seua inclusió en este estudi per a analitzar el potencial efecte dels seus residus en la llet.

En l'estudi *in vitro*, es van afegir huit concentracions diferents d'albendazol, closantel, diclazurilo, febendazol, levamisol, diazinón i ivermectina a llet crua de cabra sense antibiòtics. Els resultats van mostrar una gran variabilitat segons el mètode i antiparasitari empleat. El mètode BRT MRL va ser el més sensible front els agents antiparasitaris, ja que va presentar concentracions inhibidores més baixes en comparació amb els altres mètodes per a produir un 5, 10 i 50% de resultats positius. L'antihelmíntic closantel i l'ectoparasitari diazinón van ser els antiparasitaris que a concentracions relativament baixes van produir majors interferències en tots els mètodes de garbellament. Al contrari, es van necessitar concentracions més elevades de levamisol i ivermectina per a ocasionar resultats falsos positius en les proves microbianes.

Per a avaluar l'efecte dels residus d'albendazol sobre la resposta dels mètodes microbiològics, es van emprar díhuit cabres Murciano-Granadines en mitat de lactació tractades amb una única dosi oral d'albendazol (7,5 mg/kg de principi actiu per pes viu) comercialment registrat per a ovelles lleteres que presenta un període d'eliminació de

4 dies. Tant l'albendazol com els seus metabòlits no es van detectar per damunt del límit màxim de residus a partir del tercer dia del tractament. No obstant això, el mètode BRT MRL va mostrar una alta freqüència de resultats falsos positius durant els sis dies després de l'administració, que suggerix que altres factors relacionats amb l'aplicació de l'antiparasitari diferents de la concentració d'albendazol residual en la llet són capaços en alguns casos d'influir sobre la resposta dels mètodes de detecció d'inhibidors.

Quant a l'estudi de la ivermectina, vint-i-huit cabres Murciano-Granadines infestades per *Sarcoptes scabiei* var. *caprae* van ser tractades amb una dosi d'ivermectina per via subcutània (200 mg/kg de pes viu), que es va repetir als set dies després de la primera administració. Els residus d'este antiparasitari en llet de cabra es van detectar durant els quinze dies de l'experiment amb concentracions compreses entre 8,13 i 24,25 ng/ml. A més, tots els mètodes de garbellament van presentar resultats positius durant l'experiment, sent el BRT MRL el mètode que va presentar un major percentatge (20%) en comparació amb el Delvotest SP-NT MCS (6,6%) i Eclipse 100 (5,7%). Estos resultats positius no es poden associar exclusivament amb la concentració de ivermectina en la llet de cabra, ja que les concentracions inhibidores calculades en l'estudi *in vitro* previ van ser molt superiors a les quantificades en la llet de cabres tractades amb ivermectina. Per tant, les interferències trobades podrien estar relacionats amb canvis o alteracions causats per l'aplicació de l'antiparasitari o per la pròpia malaltia, que podrien afectar la resposta immune dels animals afavorint la presència de substàncies inhibidores en la llet.

També es va plantejar realitzar l'estudi de l'efecte de la composició de la llet de cabra sobre la selectivitat (resultats falsos positius) dels mètodes microbiològics. Per això, es van analitzar 200 mostres de llet de cabra individuals per mitjà dels mètodes microbiològics classificant els resultats de manera visual i instrumental. La selectivitat més elevada es va obtenir amb la interpretació instrumental respecte a la visual (94-99% vs 90-96%), ja que les mostres amb coloracions intermèdies (verd-groc, groc-blau) dificulten la classificació visual dels resultats. L'obtenció de resultats positius en els mètodes BRT MRL i Eclipse 100 va ser relacionada amb l'elevat contingut de greix de la llet de cabra. També, la concentració d'àcid butíric es va associar amb les respostes positives en el mètode Eclipse 100. Mentre que, els resultats del Delvotest SP-NT MCS es van veure afectats per elevats valors de pH i altes concentracions d'àcid miristoleic i lactoferrina. Estos percentatges de resultats positius es podrien minimitzar duent a terme alguns pre-tractaments abans de la seua anàlisi com

l'eliminació de greix per centrifugació (3100 g a 4 °C durant 10 minuts) i/o el calfament (80 °C durant 10 minuts) de les mostres de llet.

La millora en la selectivitat dels mètodes microbiològics per a la detecció d'antibiòtics en la llet de cabra és sens dubte totalment necessària per a evitar pèrdues econòmiques en les ramaderies, indústries làcties així com en els laboratoris de control. No obstant això, s'ha d'assenyalar que la presència de contaminants en la llet de cabra es pot evitar en gran manera per mitjà de l'aplicació de bones pràctiques ramaderes destinades a assegurar que la llet procedisca d'animals sans, que ha sigut obtinguda baix condicions adequades d'higiene, el que garantix la seguretat de la llet de cabra i els seus productes derivats.