

## SISTEMA MICROBIOLÓGICO PARA UN CONTROL EFICIENTE DE ANTIBIÓTICOS EN LECHE

Racca, Joaquin; Martino, Tomás

<sup>1</sup>Centro de Investigación en Métodos Computacionales CIMEC-UNL-CONICET

Facultad de Ciencias Veterinarias, UNL  
Director/a: Nagel, Orlando  
Codirector/a: Gasparotti, Maria Laura

Área: Ciencias de la Salud

### INTRODUCCIÓN

Para el control de estos residuos de antibióticos, se han desarrollado diferentes métodos microbiológicos (Toldra & Reig, 2006) que se basan en la inhibición de *Geobacillus stearothermophilus* subsp. *calidolactis* y se utilizan ampliamente en los programas de vigilancia de residuos de medicamentos veterinarios, porque permiten analizar un elevado número de muestras a un bajo costo y de forma simple. La bacteria-test *G. stearothermophilus* posee una elevada velocidad de crecimiento a elevadas temperaturas y buena sensibilidad para detectar betalactámicos y sulfamidas, aunque no permite detectar tetraciclinas, macrólidos y quinolonas en leche (ISO/IDF, 2010). Para mejorar la sensibilidad de *G. stearothermophilus*, se han utilizado técnicas de quimiometría a fin de diseñar y optimizar bioensayos que sean capaces de mejorar los límites de detección de antibióticos betalactámicos, tetraciclinas y sulfonamidas en leche a niveles cercanos a sus LMRs (Nagel et al., 2009, 2011). Estos bioensayos tienen la ventaja de proporcionar respuestas dicotómicas fáciles de interpretar (positivas o negativas) en un tiempo cercano a las 3 horas sin la necesidad de especialistas técnicos en microbiología, sin embargo, los residuos de macrólidos y quinolonas continúan sin poder ser detectados en la leche. Debido a la ausencia de un método ideal que detecte la totalidad de los antibióticos empleados en la terapéutica del ganado lechero, Nagel et al. (2013) sugieren el uso de bioensayos microbiológicos que empleen bacterias test con sensibilidad complementaria a diferentes familias de antibióticos, de este modo es posible cubrir una amplia detección de antibióticos mediante el empleo simultáneo de dos bioensayos.

### OBJETIVOS

Evaluar un Sistema Microbiológico compuesto por dos bacterias test con sensibilidad complementaria, que permita detectar residuos de antibióticos en leche perteneciente a betalactámicos, tetraciclinas, sulfamidas, quinolonas y macrólidos.

**Preparación de los bioensayos:**



**Bioensayo BAT** (*G. stearothermophilus*): se preparó medio de cultivo PCA compuesto por peptona de caseína (6.25 g/l), extracto de levadura (2.25 g/l), Agar (15 g/l) fortificado con glucosa (10 g/l). El medio se esterilizó a 121°C-15 min y se ajustó el pH a 7.2 cuando la temperatura descendió a los 50±1°C. Posteriormente, se inoculó con una suspensión de *G. stearothermophilus* C-953 (2 10<sup>7</sup> esporas/ml), púrpura de bromocresol (0.05 mg/l) y cloranfenicol (400 µg/l).

**Bioensayo QMS** (*B. subtilis*): se utilizó medio Müeller Hinton (38 g/l) fortificado con glucosa (10 g/l), trimetoprima (400 µg/l) y trifeniltetrazolium (150 mg/l)/azul de toluina (15 mg/l). Una vez preparado, el medio de cultivo fue inoculado con *B. subtilis* BGA.

Cada pocillo de la microplaca fue llenada con 100 µl de medio de cultivo. Posteriormente, los bioensayos fueron sellados con bandas aluminizadas y refrigerados a 4°C.

**Curvas dosis respuesta:** se analizaron 8 betalactámicos, 3 tetraciclinas, 4 macrólidos, 3 quinolonas, 5 sulfamidas y 3 aminoglucósidos en leche. Para ello, 16 réplicas de 12 concentraciones fueron ensayadas de modo tal de obtener resultados negativos en los dos primeros niveles y resultados positivos en las dos últimas concentraciones testeadas. Para ello, 50 µl de muestras de leche fortificadas con antibióticos se añadió a cada pocillo de los bioensayos, se sellaron las placas con bandas adhesivas y se incubaron a 64±1°C- 2,5 h (BAT) y 40±1°C - 5,5 h (QMS) según el cambio de color de las muestras negativas (BAT: amarillo y QMS: rosa).

**Cálculo de los Límites de detección:** Los resultados obtenidos fueron analizados según el siguiente modelo de regresión logística:

$$L_{ij} = \text{Logit}[P_{ij}] = \beta_0 + \beta_1[ATB]_i + \varepsilon_{ij} \quad (\text{Eq. 1})$$

Donde:  $L_{ij}$  = Modelo lineal Logístico;  $[P_{ij}]$  = logit  $[Pp/(1 - Pp)]$ : (probabilidad de una respuesta "positiva"/probabilidad de una respuesta "negativa"),  $\beta_0, \beta_1$  = parámetros calculados por el modelo logístico;  $[ATB]_i$  = concentración de antibiótico ( $i = 1, 2, \dots, 12$  niveles); y  $\varepsilon_{ij}$  = error residual. Los límites de detección (LD) fueron calculados como aquella concentración que produce el 95% de frecuencias positivas.

## RESULTADOS/CONCLUSIONES

Los Límites de Detección (LDs) de los Bioensayos BAT y QMS, calculados como concentraciones que producen el 95% de los resultados positivos en las curvas dosis-respuesta se resumen en la Tabla 1. Con respecto a los antibióticos betalactámicos, Bioensayo BAT presenta LDs similares a sus respectivos LMRs, mientras que Bioensayo QMS presenta un nivel de penicilina similar a su LMR. Los LDs del Bioensayo BAT son similares a los reportados para Eclipse<sup>®</sup>100ov (LD<sub>Amoxicilina</sub>=7µg/l, LD<sub>Cloxacilina</sub> = 68µg/l, LD<sub>Penicilina</sub>= 5µg/l, LD<sub>Cefalexina</sub>=115µg/l y LD<sub>Cefoperazone</sub>=110µg/l) por Montero et al. (2005) y Charm<sup>®</sup> (LD<sub>Ampicilina</sub>=5-6µg/l, LD<sub>Cloxacilina</sub>=33-42µg/l, LD<sub>Penicilina</sub>=3-4 µg/l, LD<sub>Cefalexina</sub>=160-202 µg/l, LD<sub>Cefoperazone</sub>=73-82µg/l y LD<sub>Ceftiofur</sub>=96-107µg/l) por Linage et al. (2007), los cuales también utilizan como bacteria-test el microorganismo *G. stearothermophilus*. Por su parte, Nagel et al. (2013) obtiene LDs de betalactámicos similares (LD<sub>penicilina</sub>=4 µg/l, LD<sub>amoxicilina</sub>= 14µg/l, LD<sub>ampicilina</sub>=8µg/l, LD<sub>cloxacilina</sub>=49µg/l, LD<sub>oxacilina</sub>=25µg/l, LD<sub>ceftiofur</sub>=190 µg/l, LD<sub>cefalexina</sub>= 190 µg/l y LD<sub>cefoperazona</sub>=140 µg/l) a los reportados en este trabajo, cuando utilizan un bioensayo con *G. stearothermophilus*.

En relación a los aminoglucósidos analizados, neomicina fue detectada por Bioensayo BAT a niveles de su LMR (1500 µg/l). Del mismo modo, el método Charm<sup>®</sup> (444-542 µg/l de neomicina, 355-382 µg/l de gentamicina y 3063-3593 µg/l de estreptomina) presenta LDs adecuados para detectar neomicina (Linage et al., 2007).

<i>Antibióticos</i>	Bioensayo BAT	Bioensayo QMS	LMRs <sup>a</sup>
<i>Betalactámicos</i>			
Amoxicilina	9	53	4
Ampicilina	7	34	4
Cloxacilina	42	210	30
Oxacilina	17	200	30
Penicilina "G"	3	7	4
Cefalexina	99	610	100
Cefoperazone	62	530	50
Ceftiofur <sup>®</sup>	105	350	100
<i>Aminoglucósidos</i>			
Gentamicina	320	660	100
Neomicina	600	3700	1500
Estreptomina	2300	4900	200
<i>Macrólidos</i>			
Eritromicina	210	31	40
Lincomicina	150	730	150
Espiramicina	3400	340	200
Tilosina	74	120	50
<i>Quinolonas</i>			
Ciprofloxacina	1750	160	100
Enrofloxacina	2000	151	100
Marbofloxacina	2700	160	75
<i>Sulfamidas</i>			
Sulfadiazina	49000	150	100
Sulfadimetoxina	12000	130	100
Sulfametazina	30000	150	100
Sulfametoxazol	14000	120	100
Sulfatiazol	13000	120	100
<i>Tetraciclinas</i>			
Clortetraciclina	271	420	100
Oxitetraciclina	145	260	100
Tetraciclina	150	430	100

**Tabla 1** Límites de detección ( $\mu\text{g/l}$ ) del Sistema Microbiológico y Límites Máximos de Residuos (LMRs,  $\mu\text{g/l}$ ).

Para los macrólidos, el Bioensayo QMS (Tabla 1) muestra LDs de eritromicina (31  $\mu\text{g/l}$ ) y espiramicina (340  $\mu\text{g/l}$ ) cercanos a sus respectivos LMRs. Bioensayo BAT presenta mejor nivel de detección de tilosina en leche (74  $\mu\text{g/l}$ ) si se lo compara con Bioensayo QMS (120  $\mu\text{g/l}$ ). La baja sensibilidad de *G. stearothermophilus* para detectar eritromicina (830  $\mu\text{g/l}$  para Eclipse<sup>®</sup> y 444-522  $\mu\text{g/l}$  para Charm<sup>®</sup>) y espiramicina (18100  $\mu\text{g/l}$  para Eclipse<sup>®</sup> y 1106-1346  $\mu\text{g/l}$  para Charm) fue señalada por Montero et al. (2005) y Linage et al. (2007).

El Bioensayo QMS presenta LDs de quinolonas cercanos a sus LMRs ( $\text{LD}_{\text{ciprofloxacina}}=60$   $\mu\text{g/l}$ ,  $\text{LD}_{\text{enrofloxacina}}=151$   $\mu\text{g/l}$ ,  $\text{LD}_{\text{marbofloxacina}}=160$   $\mu\text{g/l}$ ). En forma similar, Nagel et al. (2013) informaron valores levemente superiores (160  $\mu\text{g/l}$  de ciprofloxacina, 160  $\mu\text{g/l}$  de enrofloxacina y 230  $\mu\text{g/l}$  de marbofloxacina) a este trabajo, cuando utilizan un método con *B. subtilis* para analizar residuos de quinolonas en leche. Por el contrario, Linage et al.

(2007) señalan altos valores de detección (41000-46000 µg/l) cuando analizan residuos de enrofloxacin con método Charm® Blue-Yellow.

Los LDs del bioensayo QMS para sulfamidas (Tabla 1), resultaron similares a 100 µg/l (LMR). Estos niveles son cercanos a los reportados por Linage et al. (2007) para Charm® (LD<sub>Sulfadimethoxine</sub>=101-119 µg/l, LD<sub>Sulfamethazine</sub> = 309-328 µg/l, LD<sub>Sulfathiazole</sub>=122-151 µg/l), pero más bajos que los obtenidos por Montero et al. (2005) cuando utiliza Eclipse®100ov (LD<sub>Sulfadimethoxine</sub>=170µg/l; LD<sub>Sulfamethazine</sub>=750µg/l y LD<sub>Sulfathiazole</sub>=250 µg/l).

Por último, las tetraciclinas son detectadas a niveles cercanos a sus LMRs (100 µg/l) únicamente por el Bioensayo BAT. Al respecto, Nagel et al. (2013) calculan LDs de tetraciclinas (clortetraciclina: 330 µg/l, oxitetraciclina: 110 µg/l, tetraciclina: 110 µg/l) levemente inferiores a los de Tabal 1, cuando utilizan *B. cereus* en un tiempo de 5 horas.

De esta forma, un Sistema Microbiológico que utiliza una combinación de bioensayos con bacterias test que presentan sensibilidad complementaria permite una mayor detección de antibióticos en leche a niveles de sus LMRs, que los actuales métodos comerciales que utilizan *G. stearothermophilus* como bacteria-test.

A modo de síntesis se puede establecer que este Sistema Microbiológico compuesto por Bioensayo BAT (*G. stearothermophilus*) y Bioensayo QMS (*B. subtilis*) permite detectar residuos de betalactámicos, aminoglucósidos, tetraciclinas, macrólidos, quinolonas y sulfamidas en leche a niveles cercanos a sus LMRs. La respuesta de los bioensayos es de tipo dicotómica (positiva-negativa) de sencilla interpretación visual que permite analizar un gran número de muestras en un breve período de incubación (3-5.5 h). La implementación de este sistema con dos bacterias-test permite un control más riguroso de los residuos de antibióticos en la leche y, en consecuencia, incrementa la seguridad alimentaria a fin de proteger la salud de los consumidores.

## BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

**ISO/IDF**, 2010. Current situation & compilation of commercially available screening methods for the detection of inhibitors/antibiotic residues in milk. IDF bulletin N42. Brussels, Belgium: IDF.

**Linage B., Gonzalo C., Carriedo J., Asensio J., Blanco M., De la Fuente L., San Primitivo, F.**, 2007. Performance of Blue-Yellow Screening test for antimicrobial detection in ovine Milk. Journal of Dairy Science, 90, 5374-5379.

**Montero A., Althaus R., Molina A., Berruga I., Molina, M.**, 2005. Detection of antimicrobial agents by specific microbiological method (Eclipse 100) for ewe milk. Small Ruminant Research, 57, 229-237.

**Nagel O., Molina M., Basílico J., Zapata M., Althaus, R.L.**, 2009. Robust experimental design for optimizing the microbial inhibitor test for penicillin detection in milk. Letters in Applied Microbiology, 48, 744-749.

**Nagel O., Molina M. P., Althaus, R. L.**, 2011. Microbial system for identification of antibiotic residues in milk. Journal of Food and Drug Analysis, 19(3), 369-375.

**Nagel O., Molina M., Althaus R.**, 2013. Microbiological system in microtitre plates for detection and classification of antibiotic residues in milk. International Dairy Journal, 32, 150-155

**Toldra F., Reig M.**, 2006. Methods for rapid detection of chemical and veterinary drug residues in animal foods. Trends in Food Science & Technology, 17, 482-489.