



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

Cátedra de Biofísica
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad Nacional del Litoral

**OPTIMIZACIÓN DE UN SISTEMA MICROBIOLÓGICO PARA LA DETECCIÓN E
IDENTIFICACIÓN DE RESIDUOS DE ANTIMICROBIANOS EN LA LECHE**

AUTOR: Medica Veterinaria Melisa TUMINI

DIRECTOR: Dr. Orlando NAGEL

CODIRECTOR: Dr. Rafael L. ALTHAUS

TESIS PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS

Esperanza, 2016.



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

Cátedra de Biofísica
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad Nacional del Litoral

**OPTIMIZACIÓN DE UN SISTEMA MICROBIOLÓGICO PARA LA DETECCIÓN E
IDENTIFICACIÓN DE RESIDUOS DE ANTIMICROBIANOS EN LA LECHE**

AUTOR: Medica Veterinaria Melisa TUMINI

DIRECTOR: Dr. Orlando NAGEL

CODIRECTOR: Dr. Rafael L. ALTHAUS

MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE TESIS:

Dr. José Luis Otero (FCV-UNL)
Dra. Nora Mestorino (FCV-UNLP)
Dr. Gabriel Osvaldo Gutkind (FFyB, UBA)

A mis familiares y amigos.....

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, deseo agradecer a mis directores de tesis Rafael Althaus y Orlando Nagel, por la dedicación y el esfuerzo que me brindaron durante el desarrollo de la investigación, por guiarme, enseñarme en esta etapa importante de mi vida.

A la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral. Especialmente al Dr. Humberto Occhi, por otorgarme su confianza y la posibilidad de formar parte de esta institución.

A la Universidad Nacional del Litoral, por la beca doctoral otorgada y por los proyectos de Investigación CAI+D'11 (PI 501 201101 00575 LI, H.C.D.Resol 205/13 Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina) y PICT 2011-368 (Res. N°140/12, Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica) que hicieron posible la realización de la presente tesis.

Finalmente, a mis amigas y amigos, por el apoyo, la sinceridad y compañía en todo momento.

Y, sobre todo, a mis padres María del Lujan y Mario, a mis hermanos Bruno, Romina y Georgina, mis sobrinos del alma y a mi amor Ariel, por permanecer siempre junto a mí.

Publicaciones

Tumini M, Nagel O, Althaus R. (2015) Microbiological bioassay using *Bacillus pumilus* to detect tetracycline in milk. *Journal of Dairy Research*. 82, 248-255.

Tumini M, Nagel O, Molina M, Althaus R. (2016). Microbiological method using *Bacillus megaterium* with fusidic acid for detection of macrolides in milk. *Czech J. Food Sci.* 34, 9-15

Tumini M, Nagel O, Molina M, Althaus R. (2016). Novel bioassay using *Bacillus megaterium* to detect tetracycline in milk. *Revista Argentina de Microbiología*.

Tumini M, Nagel O, Molina M, Althaus R. (2016). Microbiological assay with *Bacillus licheniformis* for the easy detection of quinolones in milk. *International Dairy Journal*. 64, 9-3

Tumini M, Nagel O, Molina M. Althaus R. (2016). Detección de betalactámicos en leche mediante *Geobacillus kaustophilus* y *Geobacillus stearothermophilus*. Actas del VI Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. (CICYTAC, Cordoba, Arcentina). En prensa.

RESUMEN

La utilización de antimicrobianos es una práctica frecuente para el tratamiento de diversas patologías que afectan al ganado productor de leche. El incumplimiento de los tiempos de retiro o una aplicación inadecuada podría generar residuos en leche. Estos residuos constituyen una amenaza para los consumidores debido que pueden ocasionar problemas tales como alergias, trastornos digestivos, resistencias a medicamentos, shock anafiláctico etc. Por otro lado, la industria láctea puede tener interferencias en los procesos de fermentación y alteración de las características organolépticas de los productos derivados de la leche como el queso y yogur. Es por ello que resulta necesario establecer medidas de control que aseguren una leche libre de sustancias antimicrobianas y que cumplan la legislación europea.

Los métodos comerciales utilizados con frecuencia para detectar la presencia de antibióticos en leche son de tipo microbiológico. Estos métodos permiten analizar un gran número de muestras y resultan fáciles de implementar, ya que producen una respuesta dicotómica en un tiempo breve (2 a 4 horas), pero presentan el inconveniente de no detectar todos los antimicrobianos frecuentemente utilizados para el tratamiento del ganado vacuno.

Por otro lado, los “Sistemas Microbiológicos Multiplacas” o Multirresiduos (SMMP) hacen uso de diferentes placas de Petri que clasifican los residuos en familias de antibióticos mediante la medición de los diámetros de los halos inhibitorios como una variable continua. Estos sistemas demoran mucho tiempo en brindar una respuesta (18 a 24 horas), además resultan dificultosos de implementar

rutinariamente en los laboratorios de control de calidad, debido a que requieren de personal capacitado para la elaboración de los bioensayos, ya que tienen corto periodo de caducidad por estar elaborados con células vegetativas.

Es por ello que, posteriormente, se desarrolló un “Sistema Microbiológico en microplacas” (SMmp) que permite, al igual que los anteriores, la clasificación de residuos en familias de antibióticos y brinda una respuesta de tipo dicotómica de sencilla interpretación en un tiempo inferior a las 6 horas. Además, resulta práctico de implementar en los laboratorios de control debido a que están elaborados con esporas de microorganismos que presentan periodos de caducidad prolongados, facilitando su futura comercialización. No obstante, este sistema permite identificar antibióticos pertenecientes a cuatro familias (betalactámicos, tetraciclinas, sulfamidas y quinolonas), además de presentar problemas de especificidad cruzada.

Por ello, haciendo uso de las técnicas del diseño experimental y del modelo de regresión logística, se planificó diseñar y optimizar un Sistema Microbiológico en microplaca (SMmp) que permita detectar y clasificar residuos de antibióticos de cinco familias (betalactámicos, tetraciclinas, sulfamidas macrolidos y quinolonas) a niveles cercanos a sus Límites Máximos de Residuos (LMRs) en un tiempo comprendido entre 4 y 5 horas.

El SMmp emplea cinco bioensayos que contienen esporas de *G. stearothermophilus* sensible a los betalactámicos (Bioensayo “B”), *B. megaterium* con cloranfenicol sensible a las tetraciclinas (Bioensayo “T”), *B. megaterium* con ácido fusídico sensible a los macrólidos (Bioensayo “M”), *B. licheniformis* sensible a las quinolonas (Bioensayo “Q”) y *B. licheniformis* con trimetoprim sensible a las

quinolonas y sulfamidas (Bioensayo QS”). Estos métodos emplean medios de cultivos, indicadores y sustancias antimicrobianas adecuadas que mejoran la detección de estos residuos y permiten la identificación de 24 antimicrobianos a niveles cercanos a los LMRs establecidos por la legislación.

Cada uno de estos bioensayos son exclusivos para la detección de una familia particular de antimicrobianos a excepción del bioensayo “QS” que detecta quinolonas y sulfamidas, por lo tanto la identificación de residuos de quinolonas y sulfamidas se lleva a cabo mediante la interpretación simultánea de dos bioensayos (“Q” y “QS”). Las quinolonas presentan resultados positivos a los dos bioensayos, mientras que las sulfamidas brindan resultados positivos a bioensayo “QS” y negativos a “Q”. Con respecto a los demás bioensayos, la microplaca “B” presenta especificidad cruzada con tilosina y neomicina, mientras que bioensayos “T” y “M” con neomicina. En este sentido, betalactámicos, neomicina, y tilosina son detectados por bioensayo “B”, tetraciclinas y neomicina por bioensayo “T”, macrólidos y neomicina por bioensayo “M”, quinolonas por bioensayo “Q” y quinolonas y sulfamidas por bioensayo “QS”.

A modo de síntesis, una adecuada estrategia analítica para detectar una amplia cantidad de antimicrobianos en leche, se logra cuando se emplean simultáneamente los cinco Bioensayos (“B”, “T”, “M”, “Q” y “QS”). Este sistema permite clasificar residuos de betalactámicos, tetraciclinas, macrólidos, quinolonas y sulfamidas en leche en niveles cercanos a sus LMRs establecidos por la legislación y presenta escasos problemas de especificidad cruzada. Sin embargo, en un futuro, sería conveniente diseñar y optimizar un bioensayo que utilice otro

microorganismos y ampliar el número de familias de antibióticos a identificar (aminoglucósidos).

Summary

The use of antimicrobials is common practice for the treatment of various pathologies affecting dairy cattle. Failure withdrawal times or improper application could generate residues in milk. These residues are a threat to consumers because they can cause problems such as allergies, digestive disorders, drug resistance, anaphylactic shock etc. Moreover in the dairy industry can cause interference in fermentation processes or alter the organoleptic characteristics of milk products such as cheese and yogurt. Therefore it is necessary to establish control measures to ensure free milk antimicrobial substances and comply with European legislation.

Commercial methods frequently used to detect antibiotics in milk are the microbiological. These methods allow analyzing a large number of samples and are easy to implement because they generate a dichotomous response, in a relatively short time (2 to 4 hours), but these methods do not detect all antimicrobials commonly used for the treatment of cattle.

Furthermore, the "Microbiological Systems multiplate" or Multiresidue (SMMP) use Petri dishes, and classify residues families of antibiotics by measuring the diameters of the inhibitory halos as a continuous variable. These systems take a long time to provide a response (18 to 24 hours), it is also difficult to implement as routine methods in quality control laboratories because it requires trained personnel

for the development of bioassays since they have short expiry period by being prepared with vegetative cells.

For this reason subsequently the "Microbiological Systems microplate" (SMPP) were developed. For this reason subsequently the "Microbiological Systems microplate" (SMPP) were developed, which also allow a classification in families of antibiotics residues and generate a dichotomous response of simple interpretation (6 hours). Moreover, they are practical for implementation in control laboratories due to its elaboration with microorganisms' spores extending expiration periods allowing its commercialization. However antibiotics can identify only four families, as well as presenting problems of cross specificity.

Therefore, making use of the techniques of experimental design and logistic regression model, we planned to design and optimize a Microbiological Systems in microplates (SMmp) to detect and identify residues of five antibiotics families to levels close to their Maximum residues limits (MRLs) in a time of between 4 and 5 hours.

The SMmp uses five bioassays containing spores of *G. stearothermophilus* sensitive to beta-lactams (Bioassay "B"), spores of *B. megaterium* and chloramphenicol sensitive to tetracyclines (Bioassay "T"), spores of *B. megaterium* and fusidic acid sensitive to macrolide (Bioassay "M"), spores of *B. licheniformis* sensitive to quinolones (Bioassay "Q") and spores of *B. licheniformis* and trimethoprim sensitive to quinolones and sulfonamides (Bioassay QS "). These methods use culture media, indicators and appropriate antimicrobial substances that improve the detection of these residues and allow the identification of 24 antimicrobials in levels near their MRLs established by legislation.

Each bioassay detected exclusively one antibiotics family except bioassay "QS" detecting antibiotics quinolones and sulfonamides, therefore identifying residues quinolones and sulfonamides is carried out through simultaneous interpretation of both Bioassays "Q" and "QS". Quinolones present positive results for the two bioassays, while sulfonamides produce positive results in the response of Bioassay "QS" and negative in Bioassay "Q". For other bioassays the "B" present cross specificity with tylosin and neomycin and bioassay "T" and "M" with neomycin. In this sense, beta-lactams, neomycin, and tylosin are detected by bioassay "B", tetracycline and neomycin by Bioassay "T", macrolides and neomycin by Bioassay "M", quinolones by Bioassay "Q" and quinolones and sulfonamides by bioassay "QS". For other bioassays the "B" present crosses specificity with tylosin and neomycin and Bioassays "T" and "M" with neomycin. Thus, beta-lactams, neomycin, and tylosin are detected by Bioassay "B", tetracycline and neomycin by Bioassay "T", macrolides and neomycin by Bioassay "M", quinolones by Bioassay "Q" and quinolones and sulfonamides by bioassay "QS".

To summarize, adequate analytical strategy to detect a large number of antimicrobials in milk, is achieved by using simultaneously five bioassays ("B", "T", "M", "Q" and "QS"). This system allows identifying residues beta-lactams, tetracyclines, macrolides, quinolones and sulfonamides in milk close to their MRLs established legislation and has reduced levels of cross specificity problems. However, in the future, it would desirable to design and optimize another bioassay using other microorganisms and and increase the number of antibiotic families to identify (aminoglycosides).

Índice general

Capitulo I. Introducción.....	2
I.1. Uso de antibióticos en el ganado vacuno productor de leche.....	2
I.1.1. Generalidades.....	2
I.1.2. Frecuencia de uso de antimicrobianos empleados en ganado vacuno lechero.....	3
I.2. Problemas que ocasionan los residuos de antibióticos.....	5
I.3. Aspectos legales – Límites máximos de residuos.....	8
I.4. Detección de residuos de antibióticos en leche.....	11
I.4.1 .Clasificación de los métodos de detección.....	11
I.4.2. Principales métodos microbiológicos comerciales.....	13
I.4.3. Validación de métodos de screening para la detección de antibióticos.....	17
I.4.3.1. Límites de detección.....	18
I.4.3.2. Capacidad de detección.....	19
I.4.3.3. Especificidad.....	21
I.4.3.4. Robustez.....	21
I.5. Sistemas microbiológicos multiplacas para la detección y clasificación de antibióticos en la leche.....	22
I.5.1. Sistemas microbiológico multiresiduo en placas de Petri.....	23
I.5.2. Sistemas Microbiológico en placas de microtitulación.....	26
I.6. Hipótesis de trabajo.....	31
Capitulo II. Objetivos.....	32
II.1. Objetivo general.....	33
II.2. Objetivos específicos.....	33
Capítulo III. Bioensayo microbiológico que utiliza <i>Bacillus pumilus</i> para detectar tetraciclina en la leche.....	36
III.1. Introducción.....	40
III.2. Material y métodos.....	42
III.2.1. Elaboración de los bioensayos.....	42
III.2.2. Análisis de las curvas dosis-respuesta.....	42
III.2.3. Efecto de la concentración de esporas en el tiempo de respuesta del bioensayo.....	44
III.2.4. Efecto de la concentración de cloranfenicol en los límites de detección de tetraciclinas.....	45
III.2.5. Especificidad del bioensayo.....	46
III.2.6. Especificidad cruzada, límites de detección para otros antibióticos.....	46
III.3. Resultados y discusión.....	48
III.3.1. Efecto de la concentración de esporas en el tiempo de respuesta del bioensayo.....	38
III.3.2. Efecto de la concentración de Cloranfenicol sobre los límites de detección de las tetraciclinas.....	49
III.3.3. Especificidad del bioensayo.....	55

III.3.4. Especificidad cruzada: límites de detección para otros antibióticos.....	55
III.4. Conclusiones.....	58
Capítulo IV. Método microbiológico que utiliza <i>Bacillus megaterium</i> con ácido fusídico para la detección de macrólidos en leche.	59
IV.1. Introducción.....	62
IV.2. Materiales y métodos.....	64
IV.2.1. Elaboración del bioensayo.....	64
IV.2.2. Análisis de las curvas de dosis-respuesta.	64
IV.2.3. Efecto de la concentración de esporas en el tiempo de respuesta y límites de detección del bioensayo.....	66
IV.2.4. Efecto de la concentración de ácido fusídico sobre los límites de detección del bioensayo.....	66
IV.2.5. Especificidad del bioensayo.....	67
IV.2.6. Especificidad cruzada del bioensayo.....	67
IV.3. Resultados y discusión.....	68
IV.3.1. Efecto de la concentración de esporas sobre el tiempo de respuesta del bioensayo.....	68
IV.3.2. Efecto del ácido fusídico sobre los límites de detección del bioensayo.....	69
IV.3.3. Especificidad del bioensayo.....	73
IV.3.4. Especificidad cruzada.	73
IV.4. Conclusión.....	75
IV.5. Agradecimientos.....	76
Capítulo V. Novedoso bioensayo con <i>Bacillus megaterium</i> para detectar tetraciclina en leche.	77
V.1. Introducción.....	80
V.2. Materiales y métodos.....	81
V.2.1. Elaboración de los bioensayos.....	81
V.2.2. Análisis de las curvas dosis-respuestas.....	82
V.2.3. Análisis estadístico.....	83
V.3. Resultados.....	84
V.4. Conclusión.....	88
V.5. Agradecimientos.....	88
Capítulo VI. Métodos microbiológico con <i>Bacillus licheniformis</i> para la fácil detección de quinolonas en leche.	90
VI.1. Introducción.....	93
VI.2. Materiales y métodos.....	95
VI.2.1. Elaboración del Bioensayo.	95
VI.2.2. Análisis de las curvas dosis-respuesta.....	96
VI.2.3. Efecto de la concentración de esporas sobre la respuesta del bioensayo.....	97
VI.2.4. Especificidad del bioensayo.....	98
VI.2.5. Límites de detección de quinolonas.....	100
VI.2.6. Especificidad cruzada con otros antibióticos.....	100
VI.3. Resultados y discusión.....	101
VI.3.1. Efecto de la concentración de esporas sobre la respuesta del	101

bioensayo.....	101
VI.3.2. Especificidad del bioensayo.	101
VI.3.3. Límites de detección de las quinolonas.....	102
VI.3.4. Especificidad cruzada de otros antibióticos.....	104
VI.4. Conclusión.....	106
VI.5. Agradecimientos.....	107
Capítulo VII. Detección de betalactámicos en leche mediante <i>Geobacillus kaustophilus</i> y <i>Geobacillus stearothermophilus</i>	108
VII.1. Introducción.....	111
VII.2. Materiales y métodos.....	112
VII.2.1. Elaboración de los bioensayos.....	112
VII.2.2. Disoluciones de fármacos y muestras adicionadas de antibióticos.....	113
VII.3. Resultados y Discusión.....	115
VII.4. Conclusión.....	119
VII.5. Agradecimientos.....	119
Capítulo VIII. Sistema de cinco bioensayos microbiológicos para la detección rutinaria de residuos de antibióticos y evaluación de la calidad de la leche.....	121
VIII.1. Introducción.....	124
VIII.2. Materiales y métodos.	126
VIII.2.1. Preparación de los bioensayos.....	126
VIII.2.2. Disoluciones de antibióticos y muestras fortificadas.....	127
VIII.2.3. Curvas dosis-respuesta.....	129
VIII.2.4. Interpretación de resultados de los bioensayos.....	129
VIII.2.5. Cálculo de los Límites de detección.....	130
VIII.2.6. Especificidad de los bioensayos.	131
VIII.3. Resultados y discusión.....	132
VIII.3.1. Límites de detección de los bioensayos.....	132
VIII.3.2. Especificidad de los bioensayos.....	138
VIII.3.3. Especificidad cruzada del sistema de cinco bioensayos.....	139
VIII.3.4. Clasificación de antibióticos mediante el sistema de cinco bioensayos.....	141
VIII.4. Conclusión.....	142
VIII.5. Agradecimiento.....	143
Bibliografía.....	145
Anexo.....	175

Índice de Tablas

Tabla I.1	Consumo de antimicrobianos en medicina veterinaria a nivel mundial.....	4
Tabla I.2	Límites máximos de residuos establecidos por el Codex Alimentarius, Unión Europea y tolerancia en USA de antimicrobianos en leche.....	10
Tabla I.3	Principales bioensayos microbiológicos para la detección de residuos de antibióticos en la leche.....	15
Tabla I.4	. Límites de detección ($\mu\text{g}/\text{kg}$) de los métodos microbiológicos comerciales para diferentes antibióticos en leche.....	16
Tabla I.5	Propiedades a evaluar para la validación de diferentes métodos analíticos.....	17
Tabla I.6	Capacidad de detección de métodos microbiológicos de screening para la detección de antimicrobianos en leche de cabra y oveja.....	20
Tabla I.7	Tabla I.7 Composición de los bioensayos que componen el sistema microbiológico en placas de microtitulación.....	29
Tabla III.1.	Concentraciones antimicrobianos utilizados para determinar los límites de detección del ensayo biológico usando <i>Bacillus pumilus</i>	47
Tabla III.2.	Valores de " χ^2 y probabilidad estimada para los factores que afectan la respuesta del bioensayo con adición de Cloranfenicol para la detección de Tetraciclinas.....	50
Tabla III.3.	Modelos de regresión logística representando los efectos de la concentración de cada uno de las Tetraciclinas y los diferentes niveles de Cloranfenicol en la respuesta del bioensayo.....	51
Tabla III.4.	Efecto de la concentración de CAP en los límites de detección de las TC en muestras de leche.....	52
Tabla III.5.	Coeficientes del modelo de regresión logística para las curvas dosis-respuesta del bioensayo.....	56
Tabla IV.1.	Ecuaciones de regresión logística que representan el efecto de la concentración de macrólidos y los niveles de ácido fusídico en las absorbancia relativa del bioensayo.....	70
Tabla IV.2.	Efecto de ácido fusídico en los límites de detección de macrólido en leche.....	72
Tabla IV.3.	Coeficientes del modelo de regresión logística para las curvas dosis-respuesta del bioensayo.....	74
Tabla V.1.	Modelos de regresión logística que representan los efectos de tetraciclinas y cloranfenicol sobre la respuesta bioensayo.....	85
Tabla V.2.	Efecto de cloranfenicol sobre los límites de detección ($\mu\text{g}/\text{l}$) de tetraciclinas en leche.....	87
Tabla VI.1.	Composición química y parámetros higienicos de la leche de vaca Holstein-Friesian.....	99
Tabla VI.2.	Modelos de regresión logística que representan los efectos de las concentraciones de quinolonas en un bioensayo con <i>Bacillus licheniformis</i>	102

Tabla VI.3.	Límites de detección para el bioensayo con <i>Bacillus licheniformis</i>	104
Tabla VII.1.	Ecuaciones de regresión logística que modelan las curvas dosis-respuesta de betalactámicos para bioensayos que utilizan <i>G. stearothermophilus</i> y <i>G. kaustophilus</i>	116
Tabla VII.2.	Límites de detección de betalactámicos para bioensayos con <i>G. stearothermophilus</i> y <i>G. kaustophilus</i>	118
Tabla VIII.1.	Composición de los cinco bioensayos que integran el Sistema Microbiológico.....	128
Tabla VIII.2.	Coeficientes calculados por el Modelo de regresión logística para la curva dosis respuesta de los cinco bioensayos.....	133
Tabla VIII.3.	Límites de detección de los cinco sistemas microbiológicos en microplacas.....	135
Tabla VIII.4.	Especificidad del sistema microbiológico de cinco microplacas..	139
Tabla VIII.5.	Interpretación de los resultados del Sistema microbiológico en microplacas.....	142

Índice de Figuras

Figura I.1.	Frecuencia de tratamientos de patologías del ganado vacuno que emplean sustancias antimicrobianas.....	3
Figura I.2.	Frecuencia de uso de antibióticos empleados en formulaciones farmacéuticas de productos veterinarios para el tratamiento de la mastitis.....	5
Figura I.3.	Sistema integrado de control de residuos de antibióticos y sulfamidas en leche.....	12
Figura. III.1.	Efecto de la concentración de esporas sobre el tiempo de incubación y Límites de detección del bioensayo con <i>B. pumilus</i>	49
Figura. III.2.	Curvas dosis-respuesta para diferentes tetraciclonas y concentraciones de cloranfenicol (<i>B. pumilus</i>).....	53
Figura. III.3.	Patrón de detección (LD/LMR) del bioensayo con <i>B. pumilus</i>	57
Figura IV.1.	Efecto del ácido fusídico en las curvas de dosis-respuesta de los macrólidos en leche (<i>B. megaterium</i>).....	71
Figura V.1.	Curvas dosis-respuestas de las tetraciclinas para las diferentes concentraciones de cloranfenicol (<i>B. megateium</i>).....	86
Figura. VI.1.	Curvas dosis-respuesta de quinolonas para el bioensayo con <i>B. licheniformis</i>	103
Figura. VI.2.	Patrón de detección de los antibióticos para el bioensayo con <i>B. licheniformis</i>	105
Figura. VII.1.	Curvas dosis-respuesta de betalactámicos de un bioensayo con <i>G. stearothermophilus</i> y <i>G. kaustophilus</i>	117
Figura. VIII.1.	Patrón de detección para el sistema de cinco bioensayos microbiológicos.....	140

Introducción

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Uso de antibióticos en el ganado vacuno productor de leche

I.1.1. Generalidades

En los establecimientos de producción lechera, los antibióticos se utilizan frecuentemente para el tratamiento de múltiples patologías, como por ejemplo mastitis, metritis, neumonías, enteritis y cojeras (Zwald et al., 2004; Sawant et al., 2005; Mathew et al., 2007). Además se los utiliza con fines metafilácticos y/o profiláctico (Viola y DeVincent, 2006; Mathew et al., 2007).

Estas patologías constituyen en general, el 80% de los problemas en los tambos intensivos (Sarmah et al., 2006), siendo la mastitis la enfermedad más frecuente que produce mayores pérdidas económicas y gastos veterinarios (Gruet et al., 2001; Sawant et al., 2005). Además constituye una de las principales causas de la presencia de residuos de antibióticos en la leche (hasta un 90%), ya sea por los tratamientos clínicos, o por las terapias preventivas que se emplean en el período de secado (Erskine et al., 2003).

Estos residuos pueden ocasionar problemas toxicológicos a los consumidores y tecnológicos a las industrias lácteas. Por ello, y a fin de evitar la presencia de estos residuos, resulta necesario establecer una estrategia adecuada para el control de estos fármacos en la leche. Un estudio llevado a cabo por Diserens et al. (2005) revela que el 74,6% de los tratamientos realizados en el ganado productor de leche son para el control de la mastitis, de los cuales un 44,2

% se aplicaron en la fase de secado (mastitis subclínica) y el 30,4% durante la manifestación clínica.

El resto de los tratamientos se destinaron a las enfermedades infecciosas postparto (10,0%) y del tracto digestivo (5,5%). Por el contrario los destinados a pezones (1,5%) y pulmones (1,3%) fueron menos frecuentes, como se muestra en la Figura I.1. A continuación, se analizan los antibióticos más empleados para el tratamiento de estas patologías.

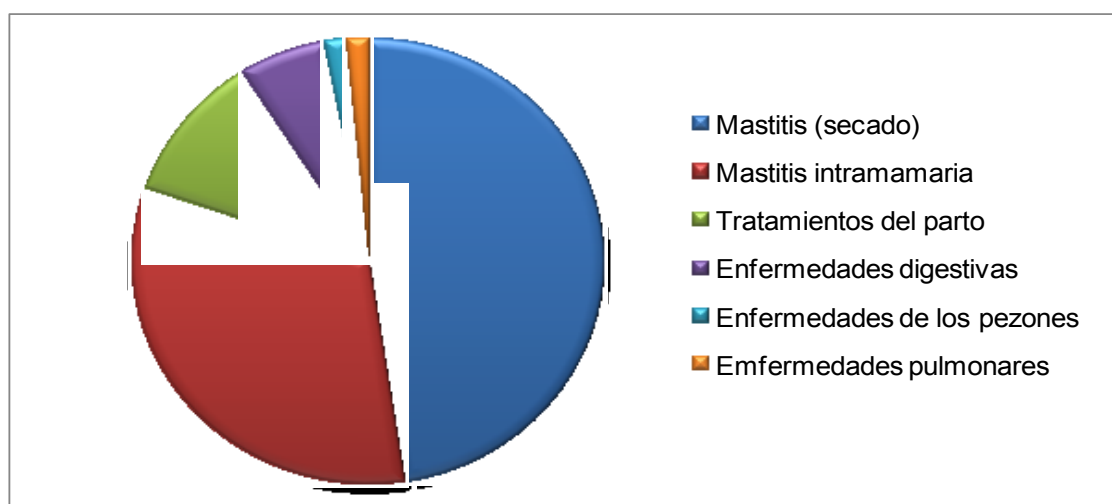


Figura I.1. Frecuencia de tratamientos de patologías del ganado vacuno que emplean sustancias antimicrobianas (Diserens et al., 2005).

I.1.2. Frecuencia de uso de antimicrobianos empleados en ganado vacuno lechero

Los trabajos de investigación concerniente a la frecuencia del consumo de los distintos grupos de antimicrobianos (betalactámicos, tetraciclinas, sulfamidas,

aminoglucósidos, macrólidos, quinolonas, etc.) para su uso terapéutico en animales, son muy reducidos.

Estudios realizados en la Unión Europea (IFAH-Europa, 2006) en base a diferentes formulaciones farmacológicas, señalan que los antibióticos más utilizados en ganadería son las tetraciclinas (66%), seguidos de macrólidos (12%) y betalactámicos (9%), según se resumen en Tabla I.1.

Tabla I.1. Consumo de antimicrobianos en medicina veterinaria a nivel mundial

Antibióticos	Distribución (%)
Betalactámicos	9
Tetraciclinas	66
Macrólidos	12
Aminoglucósidos	4
Quinolonas	1
Sulfamidas/trimetoprim	2
Otros	6

IFAH-Europa (2006).

En el caso del ganado vacuno productor de leche, la mastitis es una de las patologías más habituales (Gruet et al., 2001; Sawant et al., 2005). Sobre ello, Diserens et al. (2005) destacan que en 23 países de Europa, los antibióticos más utilizados en vacas lecheras en lactación para el tratamiento de esta patología son cloxacilina (32,7%), penicilina (23,4%), ampicilina (15,6%) y neomicina (14,9%), seguidas en menor importancia por DH-estreptomicina (9,5%), cefalexina (5,1%),

lincomicina (4,3%) y en menores porcentajes la amoxicilina, cefapirina y cefoperazona (Figura I.2).

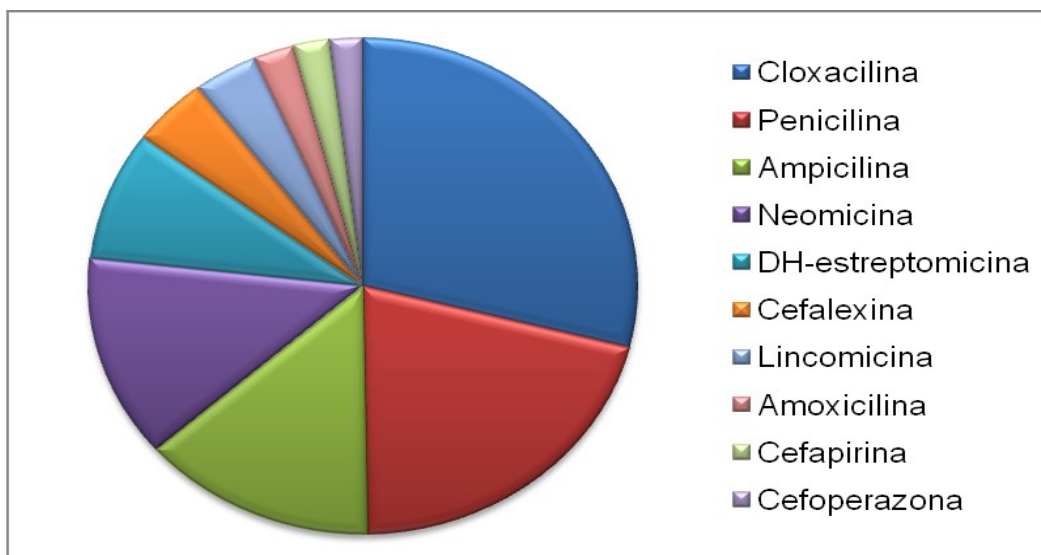


Figura I.2. Frecuencia de uso de antibióticos empleados en formulaciones farmacéuticas de productos veterinarios para el tratamiento de la mastitis. Diserens et al., (2005).

Para otras enfermedades del ganado vacuno se destacan el uso de la penicilina para el tratamiento de metritis (23,0%) y heridas postquirúrgicas (65%); oxitetraciclina para la metritis (37,0%) y neumonías (28.4%); ceftiofur en caso de metritis (27,0%) e infecciones podales (22,0%); cefalexina (29,3%) y tilosina (20,7%) para el tratamiento de las infecciones podales y enrofloxacina (23,3%) para otras infecciones (Zorraquino, 2008).

I.2. Problemas que ocasionan los residuos de antibióticos

Los residuos de antibióticos pueden ocasionar problemas en cuatro escenarios claramente definidos:

1. Salud de los consumidores: Se conoce que los antibióticos pueden tener efectos adversos para la salud de los consumidores (Cerniglia y Kotarski, 1999; Demoly y Romano, 2005). Entre los principales problemas se destaca la sensibilización producida por ingestiones reiteradas de bajas dosis de un medicamento, que ocasiona modificaciones en la composición de la flora bacteriana intestinal (Lyn, 1992). Además, los ATBs pueden ocasionar reacciones alérgicas que en casos extremos pueden producir anafilaxia (Demoly y Romano, 2005, Wang y Leung, 2007, Khaskheli; 2008). Finalmente, la resistencia antimicrobiana adquirida por determinadas bacterias se pueden transmitir, dificultando el posterior tratamiento con antibióticos específicos (Tollefson y Karp, 2004, Abriouel, 2008).
2. Problemas tecnológicos: Los residuos de antibióticos en la leche también pueden tener efectos adversos a nivel de las industrias. La elaboración de productos fermentados como el queso y el yogur puede alterarse ya que la flora láctica podría modificarse o inhibirse dando lugar a productos de mala calidad (Packham et al., 2001). Además se puede observar cierto retraso en la acidificación, dificultad en el cuajado y maduración de los quesos (Packham et al., 2001; Berruga et al., 2007, 2008, 2011). Por otra parte, es importante destacar que numerosos antibióticos presentes en la leche resisten las altas temperaturas de los tratamientos industriales empleados en la pasteurización y esterilización de la leche. Por lo tanto estos residuos podrían llegar al consumidor a pesar de haber sido tratados térmicamente en

la industria (Zorraquino, 2005; Roca, 2008; Zorraquino et al., 2008a, b, 2009).

3. Productor agropecuario: En caso que el productor entregue leche contaminada con antibióticos a la industria láctea, debe afrontar una penalización por la totalidad del contenido del camión cisterna contaminado. Las autoridades sanitarias pueden prohibir la comercialización de la leche cruda, al ser calificada esta como “no apta para consumo humano” por contener residuos de medicamentos contemplados en la ley N° 18.284. Una vez que se confirma la presencia de residuos de antibióticos a niveles superiores a los permitidos por la legislación, deberá ser decomisada y se considera no apta para la comercialización (Reglamento UE N° 37/2010, Código Alimentario Argentino Art. 556, Res 2270, 14.9.83).
4. Problemas ambientales: Numerosas moléculas de ATBs no se metabolizan y se eliminan a través de la leche o se excretan por la orina y/o estiércol (Finley et al., 2013; Topp et al., 2013) pudiendo llegar al suelo y como consecuencia pueden pasar a las aguas subterráneas (Batt et al., 2006; Zhang y Li, 2011), o aguas adyacentes a áreas de producción ganadera (Davis et al., 2006; Batt et al., 2006; Bowman et al., 2011). Se debe señalar que el crecimiento y desarrollo de cultivos (Jjemba, 2002; Liu et al., 2009) y la composición de la flora microbiana (Chander et al., 2005) pueden modificarse debido a la presencia de ciertas moléculas de antibióticos. Por otra parte, los residuos de ATBs pueden generar cepas de microorganismos resistentes en el suelo a través de excrementos procedentes de animales

tratados (Knapp et al., 2010). Como consecuencia de ello, tanto los animales como los seres humanos están en peligro de contraer enfermedades microbianas resistentes en caso que los microorganismos adquieren resistencia a través de la transferencia genética (Andersson y Hughes, 2012; Wellington et al., 2013). Por estos motivos, las infecciones resistentes son cada vez más frecuentes y representan un potencial peligro para la sociedad (Finley et al., 2013). Sin embargo, en Argentina, los estudios realizados por Nosetti (2002) demostraron que de los efluentes generados en las instalaciones de ordeño, un 58,53% de los tambos eliminan sus desechos en lagunas artificiales. A su vez, el 80% de estos efluentes se eliminan en las lagunas en algún curso de agua. El mismo estudio, señala que un 20% de tambos vierten sus efluentes sin previo tratamiento a algún curso de agua (arroyos o lagunas), mientras que el resto de los tambos elimina sus desechos en algún potrero del establecimiento como destino final. El potencial riesgo que implica el vertido de suero procedente de animales tratados debe analizarse rigurosamente.

I.3. Aspectos legales: Límites Máximos de Residuos

El concepto de calidad de la leche ha cobrado más importancia debido a los grandes inconvenientes que pueden ocasionar los antibióticos tanto para la industria láctea como para los consumidores (Khan *et al.*, 2000; Packham *et al.*, 2001; Demoly y Romano, 2005; Wilke *et al.*, 2005; Berruga *et al.*, 2007; Bradley y Green, 2009).

Por ello, el Límite Máximo de Residuo (LMR) de Medicamentos Veterinarios (RMV) se define como: *“el contenido máximo (concentración) de residuos resultante de la utilización de un medicamento veterinario (expresado en mg/kg o g/kg sobre la base del peso en fresco) autorizada en la Comunidad o reconocida como admisible en un producto alimenticio”* (SENASA, 2009).

Con el propósito de proteger la salud pública, la Comunidad Europea establece los Límites Máximos de Residuos (EU-LMRs) y los procedimientos para su determinación mediante Regulación (EC) 470/2009 (European Union, 2009) y Regulación (EU) 37/2010 (European Union, 2010). En Estados Unidos, Food and Drug Administration (FDA) determina los niveles de tolerancia de residuos de antibióticos en la leche para la protección de los consumidores (FDA, 2005). En forma similar el Codex Alimentarius, (CODEX, 2010) fija los LMRs en la leche. Los valores establecidos por las distintas legislaciones se exponen en Tabla I.2.

En Argentina, el plan CREHA (Plan Nacional de Control de Residuos e Higiene en Alimentos) persigue como objetivo preservar los productos de la alimentación humana según lo establecido por SENASA. Cap. IX del Dec. 4238/68 - Resolución 290/95 modificada. Este plan prioriza los residuos químicos, aditivos, toxinas y microorganismos que se controlarán mediante un programa anual. Además, determina aquellos que constituyen un mayor riesgo para la salud pública, cumpliendo de esta manera con las exigencias y los Límites Máximos de Residuos establecidos en el Codex Alimentarius. Mediante este plan, SENASA exige a las empresas lácteas el análisis de residuo de antibióticos y sulfonamidas, entre otros. Los resultados deben ser inferiores a los LMRs que establece el CODEX y los

métodos analíticos recomendados para analizar las muestras de leche son la cromatografía en capa fina, HPLC, electroforesis, ELISA, bioensayos, métodos microbiológicos, entre otros (SENASA, 1999a, 1999b, 2001, 2003).

Tabla I.2. Límites máximos de residuos (LMRs) establecidos por el Codex Alimentarius, Unión Europea y tolerancia en USA de antimicrobianos en leche

Sustancia	LMR Codex ¹	LMRs EU ²	SL/Tolerancia USA ³
<i>β-lactámicos</i>			
Penicilina (Benzil-G)	4	4	5
Ampicilina		4	10
Amoxicilina		4	10
Cloxacilina		30	10
Dicloxacilina		30	-
Oxacilina		30	-
Nafcilina		30	-
Ceftiofur [®]	100	100	50
Cefapirina		60	20
Cefquinoma		20	-
Acido Clavulánico		200	-
<i>Tetraciclinas</i>			
Clortetraciclina		100	300
Oxitetraciclina	100	100	300
Tretetraciclina		100	300
<i>Sulfonamidas (todas)</i>			
Sulfadimetoxina		100	10
Sulfameracina		100	10
Sulfatiazol		100	10
Sulfadiazina		100	10
<i>Macrólidos</i>			
Eritromicina		40	50
Espiramicina	200	200	-
Tilmicosina		50	-
Tilosina		50	50
<i>Aminoglucósidos</i>			
Gentamicina		100	30
Neomicina	500	1500	150
Espectinomicina		200	-
DH/Estreptomina	200	200	125
<i>Quinolonas</i>			
Enrofloxacina		100	-
Marbofloxacina		75	-

<i>Varios</i>		
Cloranfenicol	0	0
Novobiocina	50	100
Trimetoprim	50	-

Unidades: $\mu\text{g/Kg}$. ¹Codex Alimentarius (Codex, 2010). ²Food and Drug Administration (FDA, 2005). ³Regulation EU 37/2010 (European Union, 2010).

Dentro de las metodologías analíticas de screening para la detección de antimicrobianos en leche, se autoriza el uso de métodos de tipo microbiológicos, inmunoenzimáticos, colorimétricos o de receptores (CAA, 2001).

I.4. Detección de residuos de antibioticos en leche

I.4.1. Clasificación de los métodos de detección

Los primeros métodos de detección de residuos de antibióticos se comenzaron a utilizar a mediados del siglo XX (Bishop y White, 1984) y fueron de tipo microbiológico (Mitchell et al., 1998). Desde entonces, las propiedades de estos métodos se ha perfeccionado con el propósito de mejorar la rapidez de respuesta, sensibilidad hacia un mayor número de antimicrobianos en la leche, disminución de la frecuencia de resultados falsos positivos o dudosos, facilidad de aplicación, etc.

Los actuales sistemas de control de antibióticos en leche proponen un sistema integrado de control de estos residuos, que consta de dos etapas. En una primer etapa de cribado o screening se realiza un control primario y se utilizan métodos cualitativos (Microbiológicos, Rápidos, Microbiológicos multiplaca) que proporcionan un tipo de respuesta positivo/negativo en un tiempo relativamente breve, a un bajo costo que facilita la posibilidad de analizar una gran cantidad de muestras de leche con personal no especializado. Posteriormente, en una etapa de

identificación se utilizan técnicas de cromatografía HPLC o electroforesis capilar (Vera Candiotti, 2009) y se procede a una identificación y cuantificación “inequívoca” de la molécula específica del grupo de antimicrobiano detectado en la etapa anterior (Figura I.3).

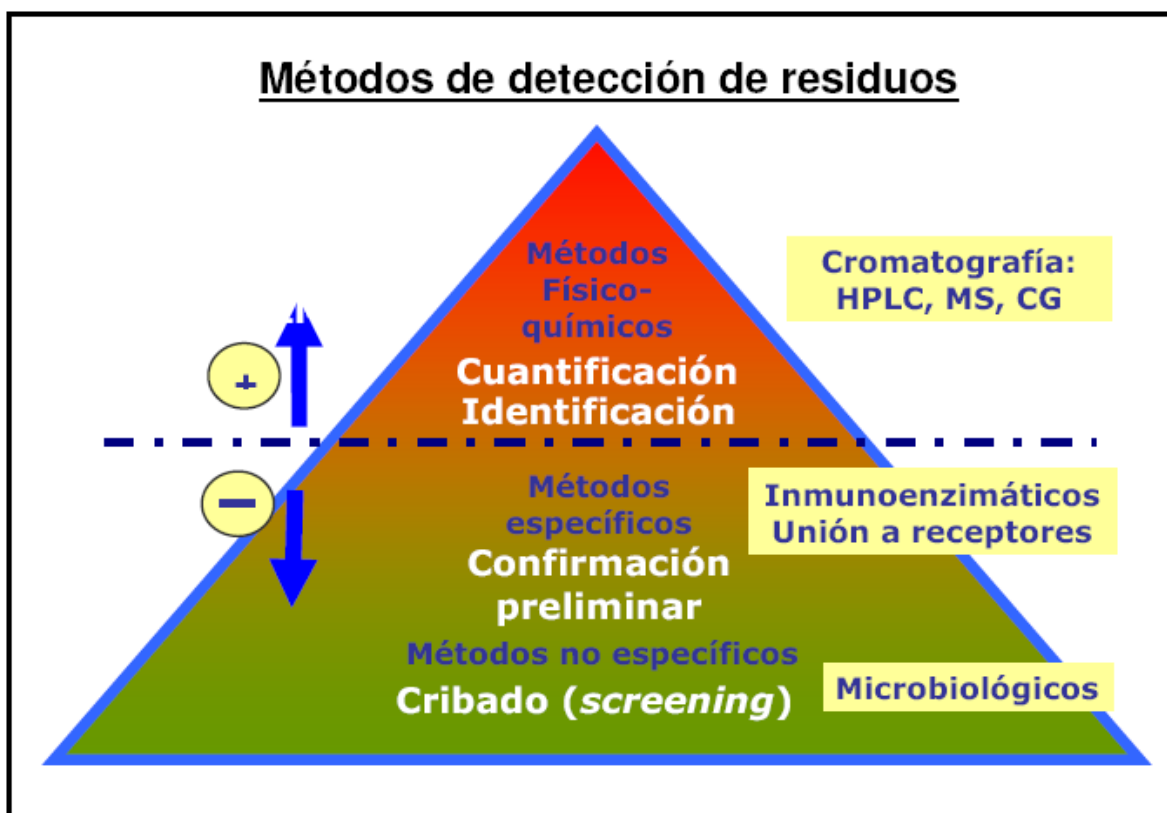


Figura I.3. Sistema integrado de control de residuos de antibióticos y sulfamidas en leche.

En la actualidad se adoptaron las directivas 2002/657/CE (CEE, 2002) la cual provee de reglamentos para los métodos analíticos que deben ser utilizados para el control de muestras oficiales y los criterios comunes para la interpretación de los resultados en los laboratorios oficiales de residuos. Además la comisión directiva califica los métodos analíticos de detección de residuos de antibióticos en dos grupos:

1. Métodos cualitativos: Técnicas que identifican la sustancia basada en sus propiedades físicas, químicas o biológicas, como los métodos microbiológicos, de receptores proteicos, inmunoenzimáticos, sistemas multiresiduos, etc.
2. Métodos cuantitativos: Técnicas que determinan la cantidad o fracción de masa de una sustancia que pueda ser expresada en un valor numérico en una unidad apropiada.
3. Entre las técnicas cualitativas utilizadas con mayor frecuencia en laboratorios de control se encuentran los métodos microbiológicos, que permiten detectar la “presencia” o “ausencia” de residuos de antibióticos en leche a niveles cercanos a los LMRs mediante el cambio de color de un indicador presente en el test (Botsoglou y Fletouris, 2001).

Dentro de estos test de screening se destacan los métodos microbiológicos que se basan en la inhibición del crecimiento de una bacteria específica (microorganismo de prueba o bacteria-test), que está incorporada en un medio de cultivo agarizado que contienen hidratos de carbono, sustancias mejoradoras de la sensibilidad (como trimetoprim, cloranfenicol, etc.) e indicadores de pH (o redox) de manera que el resultado se puede interpretar visualmente mediante el cambio en la coloración (Pikkemaat et al., 2009).

Una vez colocada la muestra de leche a analizar, el método se coloca a incubar. En caso que la muestra esté libre de antibiótico, se producirá el desarrollo del microorganismo y se observará un cambio en la coloración del indicador ácido-base (o redox), mientras que la presencia de antibióticos en la leche no permitirá el

desarrollo del microorganismo de prueba y por lo tanto se conservará el color inicial del indicador ácido-base (o redox).

1.4.2. Principales métodos microbiológicos comerciales

Actualmente, las pruebas microbiológicas comerciales aplicadas con mayor frecuencia en la detección de antibióticos en la leche utilizan *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* como microorganismo de prueba, ya que se trata de una bacteria-test muy sensible a los antibióticos betalactámicos que se emplean ampliamente para el tratamiento de las mastitis. Por ello, los métodos BRT[®] AiM (Analytic in Milk Productions-und Vertriebs-GmbH, Alemania), Delvotest (DSM Food Specialties, Delf, Holanda), Charm[®] Blue Yellow (Charm Sciences Inc, Massachussets, USA) y Eclipse[®] (ZEU-Inmunotec S.A. Zaragoza, España) representan actualmente los principales métodos microbiológicos más comúnmente utilizados, con características que presentan diferencias entre ellos, según se muestra en Tabla I.3. Además, estos métodos poseen la capacidad de detectar niveles cercanos a sus respectivos LMR para un gran número de sustancias que pertenecen a este grupo de antimicrobianos (Tabla I.4). Ahora bien, estos métodos no llegan a detectar antibióticos pertenecientes a todos los grupos o familias de antibióticos como quinolonas, tetraciclinas, aminoglucósidos y macrólidos (Le Breton et al, 2007).

Como se puede observar en dicha tabla, los métodos microbiológicos poseen límites de detección cercanos o inferiores a los LMRs en el caso de los antibióticos betalactámicos. Sin embargo no llegan a detectar los residuos de

tetraciclinas, sulfamidas (a excepción del Delvotest SP-NT), quinolonas, eritromicina y espiramicina a niveles cercanos a los LMRs.

Tabla I.3. Principales bioensayos microbiológicos para la detección de residuos de antibióticos en leche

Test	Microorganismo	Incubación	Indicador
BR Test (BRT AiM, BR Test AS, Blue Star, 6, 7, ASSpecial, AS-Brilliant)	<i>G.stearothermophilus</i> var. calidolactis ATCC 10149 en agar	2.5 a 3.5 h a 60 67°C en microplacas	Negro brillante (visual, cambio color) o fotométrico
Test Eclipse	<i>G.stearothermophilus</i> var. calidolactis ATCC 10149 en agar	2.5 a 3.5 h a 65°C en microplacas	Púrpura de bromocresol (visual, cambio color) o Fotométrico
Charm Farm test	<i>G.stearothermophilus</i>	3.8 h a 67°C en tubo	Púrpura de bromocresol(visual, cambio color)
Charm inhibition Assay	<i>G.stearothermophilus</i> var. calidolactis ATCC 10149	2.3 a 64°C en placas de agar	Púrpura de bromocresol(visual, cambio color)
Delvotest P/SP	<i>G.stearothermophilus</i> var. calidolactis ATCC 10149	2.5 h a 64°C en ampollas o en microplacas de poliestireno	Púrpura de bromocresol(visual, cambio color) o Fotométrico

Por ello, y ante la ausencia de un único método de screening que permita detectar la totalidad de los antibióticos utilizados en la terapéutica del ganado vacuno lechero, Nagel et al. (2013) proponen el empleo de dos métodos de

screening que utilizan diferentes bacteria test (*G. stearothersophilus* y *B. subtilis*) porque detectan antibióticos en forma complementaria, es decir, *B. subtilis* presenta sensibilidad para aquellas moléculas que no son detectadas por *G. stearothersophilus*.

Tabla I.4. Límites de detección ($\mu\text{g}/\text{kg}$) de los métodos microbiológicos comerciales para diferentes antibióticos en leche

Antibiótico	LMR	Delvotest SP-NT	BRT Test	Eclipse 100	Blue Yellow
Betalactámicos					
Bencilpenicilina	4	1-2	2-3	4	3-4
Ampicilina	4	4	2-3	4	5
Amoxicilina	4	2-3	2-3	5	5-6
Oxacilina	30	10	10-20	25	-
Cloxacilina	30	20	20-30	-	30-50
Dicloxacilina	30	10	10-20	-	-
Nafcilina	30	-	10-15	-	-
Cefapirina	60	4-6	4-5	8	10
Ceftiofur	100	25-50	50-100	-	50-100
Cefoperazona	50	-	200-300	-	-
Cefalexina	100	-	200-300	75	-
Cefalonio	20	-	10-20	-	-
Cefazolina	50	-	10-25	-	-
Cefquinoma	20	-	100-200	-	-
Cefacetilo	125	-	-	-	-
Tetraciclinas					
Tetraciclina	100	250-500	200-400	150	-
Oxitetraciclina	100	250-500	500-750	100	300
Clortetraciclina	100	-	-	-	-
Sulfamidas					
Sulfametazina	100	25-100	500-750	200	-
Sulfadimetoxina	100	-	500-750	-	50
Sulfatiazol	100	-	200-400	75	-
Sulfadiazina	100	25-50	500-750	-	-
Macrólidos					
Eritromicina	40	40-80	40-60	300	-
Espiramicina	200	400-600	400-600	1000	-
Tilmicosina	50	-	-	-	-
Tilosina	50	30	25-50	80	75-100
Aminoglucósidos					
Gentamicina	100	50	200-300	500	300-400
Neomicina	1500	100-200	500-750	1500	-
Kanamicina	150	-	-	6000	-
DH/Estreptomina	200	-	100-1500	2500	-
Quinolonas					

Enrofloxacin	100	-	-	-	-
Flumequina	50	-	-	-	-
Otros					
Cloranfenicol*	0*	-	5000-7500	-	-
Trimetoprim	50	50-100	-	-	-
Dapsona*	0*	0,5-1	-	-	-

*Sustancias prohibidas (Reglamento UE 37/2010); LMR: Límite Máximo de Residuos

1.4.3. Validación de métodos de screening para la detección de antibióticos

El objetivo de la validación de un procedimiento analítico es demostrar que el mismo resulta conveniente para el propósito previsto. La Tabla I.5 sintetiza las principales propiedades que deben evaluarse durante el proceso de la validación de diferentes técnicas analíticas (CEE, 2002), dentro de los cuales se encuentran los métodos de screening.

Tabla I.5. Propiedades a evaluar para la validación de diferentes métodos analíticos

Características	Método cualitativo		Método cuantitativo	
	Screening	Confirmatorio	Screening	Confirmatorio
Limite de detección $CC\beta$	+	+	+	+
Limite de decisión $CC\alpha$	-	+	-	+
Recuperación	-	-	-	+
Precisión	-	-	+	+
Selectividad	+	+	+	+
Robustez estabilidad	+	+	+	+

Fuente: CEE, 2002.

Se observa que, en caso de métodos cualitativos, tipos “screening” o “cribado”, se deben evaluar únicamente los parámetros de selectividad, límite de detección y robustez. Los laboratorios de referencia han publicado el documento

“Guidelanes for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines” (CRLs, 2010) con el objetivo de establecer los requisitos mínimos necesarios para la validación de los métodos de screening. En dicha guía se contempla los estudios de las características propias de los métodos, tales como especificidad, límite de detección, CC β , robustez y ensayos de estabilidad de los métodos.

1.4.3.1. Límites de detección

El límite de detección (LD) se define como “el menor contenido a partir del cual resulta posible deducir la presencia de sustancias analizadas con seguridad estadística razonable” (CEE, 1993).

La Federación Internacional de Lechería (IDF-FIL, 1997, 2002) propone la metodología que debe utilizarse para la determinación de los límites de detección de antibióticos en leche cuando se emplean métodos de screening.

Para la construcción de la curva dosis-respuesta se deben evaluar al menos cuatro concentraciones diferentes entre el control negativo y la concentración que se espera que sea positiva, las cuales deben estar distribuidas en forma equidistante entre ellas según una escala lineal o logarítmica. Además, debe incluirse una concentración que sea al menos 1.5 a 2 veces superior al valor positivo esperado y una concentración equivalente al LMR del antibiótico (IDF- FIL, 2002).

En caso de efectuar calificaciones visuales de los resultados, para cada concentración de antibiótico se deben ensayar entre 10 y 20 réplicas, mientras que

en caso de efectuar determinaciones fotométricas, el número de replicas se reduce a valores comprendidos entre 3 y 5.

Una vez analizadas las muestras, se procede a calcular las frecuencias relativas de resultados positivos (en caso de calificaciones visuales) o las absorbancias relativas (en caso de lecturas fotométricas) para cada concentración de antibiótico. Luego se construye la curva dosis-respuesta y se ajusta mediante el modelo de regresión logística. El límite de detección se calcula como la concentración que corresponde a la intersección de la curva dosis respuesta con la línea que representa el 95% de resultados positivos (Althaus et al., 2002, 2003; Molina et al., 2003; Montero et al., 2005; Linage et al., 2007) en caso de utilizar calificaciones visuales. En caso de emplearse lecturas fotométricas, el límite de detección se calcula como el valor de la concentración para el cual se alcanza el 45% de la máxima absorbancia relativa porcentual (Althaus et al., 2003).

1.4.3.2. Capacidad de detección ($CC\beta$)

La determinación experimental de la capacidad de detección de un método de screening se establece en las “Guidelines for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines” por la Comunidad de Laboratorios de Referencias (CRLs, 2010) acorde a las directrices de la Commission Decision n° 657/2002 de la Comunidad Económica Europea (CCE, 2002).

La metodología propone fortificar muestras de leche libres de antibióticos con concentraciones equivalentes a 0,5 LMR, 0,75 LMR y 1 LMR del antibiótico a investigar. Lógicamente, para poder calcular esta propiedad el antibiótico debe

tener publicado su LMR, de lo contrario el cálculo del límite de detección constituye una propiedad independiente del método. Posteriormente, la reglamentación propone analizar 20 (0,5 LMR), 40 (0,75 LMR) o 60 (1 LMR) replicas. Esto implica que, en la medida que nos aproximamos al valor de LMR la cantidad de replicas que le vamos a pedir al método de validar es mayor, en virtud de la necesidad de garantizar la inocuidad de las muestras de leche.

A modo de ejemplo, en la Tabla 1.6 se muestran los valores de $CC\beta$ de los antibióticos betalactámicos determinados para leche de cabra y oveja por los principales métodos microbiológicos determinados por Beltran et al. (2015).

Tabla 1.6. Capacidad de detección ($CC\beta$) de métodos microbiológicos de screening para la detección de antimicrobianos en leche de cabra y oveja

Betalactámicos	LMR ^a ($\mu\text{g/Kg}$)	$CC\beta^b$ cabra/oveja ($\mu\text{g/Kg}$)			
		BRT MRL	Delvotest SP-NT	Delvotest DA	Eclipse 100
Amoxicilina	4	4/3	3/4	3/4	$\frac{3}{4}$
Ampicilina	4	3/2	3/2	3/3	4/4
Benzylpenicilina	4	3/2	3/2	3/2	4/2
Cefacetriilo	125	$\leq 63/\leq 63$	$\leq 63/\leq 63$	$\leq 63/\leq 63$	$\leq 63/\leq 63$
Cefalonium	20	20/15	$\leq 10/15$	20/15	20/15
Cefapirina	60	$\leq 30/\leq 30$	$\leq 30/\leq 30$	$\leq 30/\leq 30$	$\leq 30/\leq 30$
Deacetylcefapirina	*	$\leq 30/\leq 30$	$\leq 30/\leq 30$	$\leq 30/\leq 30$	$\leq 30/\leq 30$
Cefazolin	50	$\leq 25/\leq 25$	$\leq 25/\leq 25$	$\leq 25/\leq 25$	$\leq 25/\leq 25$
Cefoperazone	50	$> 50/> 50$	$> 50/> 50$	$> 50/> 50$	$> 50/> 50$
Cefquinoma	20	$> 20/> 20$	$> 20/> 20$	$> 20/> 20$	$> 20/> 20$
Ceftiofur	100	$> 100/> 100$	100/ > 100	100/ > 100	100/ > 100
Desfuroylceftiofur	*	$> 100/100$	75/100	100/100	100
Cephalexina	100	$> 100/> 100$	$\leq 50/75$	$\leq 50/\leq 50$	$\leq 50/\leq 50$
Cloxacilina	30	23/23	$\leq 15/23$	$\leq 15/23$	23/23
Dicloxacilina	30	$\leq 15/\leq 15$	$\leq 15/\leq 15$	$\leq 15/\leq 15$	23/ ≤ 15
Nafcilina	30	$\leq 15/\leq 15$	$\leq 15/\leq 15$	$\leq 15/\leq 15$	$\leq 15/\leq 15$
Oxacilina	30	$\leq 15/\leq 15$	$\leq 15/\leq 15$	$\leq 15/\leq 15$	$\leq 15/\leq 15$

Fuente: Beltran et al. (2016); ^aLímite Máximo de Residuo; ^bCapacidad de detección.

Como se puede observar, los límites se expresan en una fracción de su respectivo LMR (50%, 75% o 100%), mientras que aquellos antibióticos que presentan un $CC\beta$ superior al LMR se expresan con el signo mayor que (>).

1.4.3.3. Especificidad

La especificidad de un método de screening es un parámetro que está asociado a la presencia de resultados “falsos positivos”. Para el cálculo de la especificidad se debe disponer de un elevado número de muestras negativas (IDF-FIL, 2002). Para llevar a cabo este estudio, deben utilizarse muestras de leche provenientes de animales no tratados con medicamentos antes de iniciarse el estudio y que se encuentren a mitad de la lactancia con una composición química (grasa, proteínas, lactosa y sólidos totales), recuentos de células somáticas y recuentos de gérmenes totales considerados normales para el ganado vacuno lechero. La selectividad se calcula como la frecuencia relativa porcentual entre los resultados negativos al método de screening, partido por el número total de muestras analizadas (Sischo y Burns, 1993).

En este sentido, un buen método de screening debe presentar elevados valores de selectividad, es decir, un bajo porcentaje de resultados positivos, también llamados “falsos positivos”.

1.4.3.4. Robustez

La robustez de un método analítico es la medida de su capacidad para que sus resultados no se vean afectados por pequeñas variaciones deliberadas del método. Dicho parámetro indica un indicio de su veracidad o fiabilidad durante el uso normal de un método.

Los límites de detección de los métodos, pueden verse afectados por los diferentes lotes de producción. Para evaluar estas diferencias, IDF-FIL (2002) recomienda llevar a cabo estudios para obtener información acerca de la variación en las respuestas de los métodos microbiológicos debido a diversos factores propios de la fabricación, como por ejemplo, nivel del indicador, concentración de nutrientes presentes en el medio de cultivo, concentración de esporas de microorganismos, volumen del medio de cultivo utilizado en el bioensayo, período de almacenamiento, etc. Cabe esperar que la variación en la respuesta de los métodos puede verse afectada por el período comprendido entre su fabricación y el control de cada lote de elaboración.

I.5. Sistemas microbiológicos multiplacas para la detección y clasificación de antibióticos en la leche

Los Sistemas Microbiológicos Multiplaca (SMMP) fueron propuestos para la detección y posterior clasificación de los antibióticos en grupos de antibióticos utilizando diferentes bacterias-test específicas para cada familias, tales como, betalactámicos, tetraciclinas, sulfamidas, aminoglucósidos, macrólidos o quinolonas.

El principio de los SMMP se basa en la difusión de los antimicrobianos contenidos en la muestra de leche a un medio agarizado con diferentes microorganismos de prueba, medios de cultivo, condiciones de pH, temperatura de incubación y tiempo de lectura. Actualmente, según el formato donde se lleva a cabo la difusión de los antibióticos, los sistemas microbiológicos se clasifican en Sistemas Microbiológicos en Placas de Petri (SMMP: difusión radial) y Sistemas Microbiológicos en microplacas de microtitulación (SMpm: difusión axial en microtubo). A continuación se exponen las principales características de estos sistemas multiresiduos.

1.5.1. Sistemas microbiológico multiresiduo en placas de Petri (SMMP)

Para lograr una mayor detección de estos residuos en familias de antibióticos, diversos autores (Nouws et al., 1999^{a,b}; Gaudin et al., 2004; Althaus et al., 2009) han propuesto el uso de diferentes Sistemas Microbiológicos Multiplaca en placas de Petri (SMMP) mediante el empleo de diferentes microorganismo de prueba, o también llamadas bacterias-test con sensibilidad apropiada para cada familia de antibióticos para lograr detectar correctamente los residuos de antibióticos en leche a niveles permitidos por la legislación. El principio de estos métodos en placas de Petri se basa en la difusión radial de los antimicrobianos de la muestra a analizar en un agar bajo diferentes condiciones de pH y concentración de esporas. La inhibición de la bacteria test, se manifiesta mediante la presencia de halos de inhibición luego de incubar las muestras durante un tiempo comprendido entre 18 y 24 horas (Pickematt, 2009).

Dentro de estos SMMP, el “Instituto para la calidad de los productos alimentarios” del Ministerio de Agricultura holandés (Rijks-Kwaliteitsinstituut voor lan-en tuinbouw-producten, RIKILT-DLO) desarrolló un Sistema Microbiológico Multiresiduo para leche propuesto por Nouws et al. (1999a,b), que consta de 7 placas de Petri con diferentes microorganismos en formas esporuladas o vegetativas (Betalactámicos: *G. stearothermophilus* var. *calidolactis* C953 en medio de cultivo Agar de Recuento en Placa pH 8; Aminoglucósidos: *B. subtilis* BGA en medio de cultivo Agar de Recuento en Placa pH 8; Macrólidos: *Kocuria rhizophila* ATCC 934 en Mueller Hinton pH 8; Quinolonas: *Escherichia coli* ATCC 11303 en Agar de Recuento en Placa fortificado con extracto de carne a pH 6; Tetraciclinas: *Bacillus cereus* var. *mycoides* ATCC11778 en medio Standard II Nähragar a pH 6; Sulfamidas: *Bacillus subtilis* BGA en medio de cultivo Mueller Hinton de pH 7 suplementado con trimetoprim). Cada placa específica es incubada a una temperatura determinada por la naturaleza de la bacteria–test empleada por un tiempo que comprendido entre 6 a 24 horas.

Para este sistema, se aprecia que la mayoría de los niveles de detección obtenidos son menores que los LMR establecidos por la Unión Europea, demostrando una gran capacidad para detectar la mayoría de los residuos de antibióticos en leche (betalactámicos, tetraciclinas, sulfonamidas, macrólidos, aminoglucósidos y quinolonas). Si bien las placas de Petri con *B. cereus*, *E. coli* y *K. rhizophila* presentan una alta especificidad para detectar tetraciclinas, quinolonas y macrólidos, respectivamente, la placa que utiliza esporas de *G. stearothermophilus* presenta interferencias para gentamicina y neomicina, mientras

que la placa con *B. subtilis* (sulfonamidas) muestra especificidades cruzadas para betalactámicos, macrólidos, enrofloxacina, marbofloxacina y gentamicina (Nouws *et al.*, 1999a, b).

Posteriormente, investigadores del Laboratorio de Referencia de la Comunidad (AFSSA, Francia) desarrollan un sistema microbiológico denominado STAR (Screening Test for Antibiotic Residues), que consta de 5 placas de Petri para la detección de betalactámicos-sulfamidas (*G. stearothermophilus* var. calidolactis ATCC 10149 en medio Diagnostic susceptibility Test Agar pH 8 suplementado con trimetoprim), macrólidos (*Kocuria varians* ATCC 9341 en medio Test Agar a pH 8), quinolonas (*Escherichia coli* ATCC 11303 en Test Agar a pH 8), tetraciclinas (*Bacillus cereus* ATCC 11778 en Test Agar a pH 6) y aminoglucósidos (*Bacillus subtilis* BGA en Test Agar a pH 7.2).

El perfil de detección del protocolo STAR demostró que 21 antibióticos fueron detectados en o por debajo del LMR, y otros 27 medicamentos se detectaron hasta 4 y 150 veces su LMR (Gaudin *et al.*, 2004). Se observaron mejoras en la detección de quinolonas, tetraciclinas y macrólidos con respecto a otros sistemas multiresiduos, aunque los tiempos de respuestas son lentos (15 - 24 horas).

Por su parte, Tsai y Kondo (2001) evaluaron los niveles de detección de 31 agentes antimicrobianos sobre diversas combinaciones de 6 bacterias-test y 5 medios de cultivo. Los autores concluyen que una combinación de 6 placas con 4 bacterias-test permiten detectar adecuadamente antibióticos betalactámicos (*G. stearothermophilus* var. calidolactis C953 en Mannitol Salt Agar pH 7.0),

tetraciclinas (*B. subtilis* BGA en Mueller Hinton pH 6), macrólidos (*Kocuria rhizophila* ATCC 9341 en Mueller Hinton pH 8), quinolonas (*E. coli* ATCC 27166 en Muller Hinton pH 6), aminoglucósidos (*B. subtilis* BGA en Muller Hinton pH 8) y sulfamidas (*B. subtilis* BGA en Muller Hinton suplementado con trimetoprim).

A modo de síntesis, se puede establecer que los SMMP presentan adecuados niveles de detección para la mayoría de los agentes antimicrobianos empleados en la terapéutica del ganado; sin embargo, poseen como desventajas su escasa practicidad en el momento de implementarse en forma rutinaria, demandan mucho tiempo y requieren personal entrenado en microbiología, la medición de un halo inhibitorio resulta dificultoso de cuantificar, brindan la respuesta en un tiempo comprendido entre 18 y 24 horas y utilizan bacterias en forma vegetativa que repercute en una reducida fecha de caducidad de las placas de Petri elaboradas.

1.5.2. Sistemas microbiológico en placas de microtitulación

Los sistemas microbiológicos en placas de microtitulación (SMpm) presentan ciertas ventajas con respecto al SMMP, tales como, análisis de un elevado número de muestras, uso de bacterias esporuladas (prolongación del periodo de almacenamiento refrigerado), no necesita personal calificado para la elaboración de los métodos, presentan tiempos de incubación reducidos (2,5 - 6 horas) y la respuesta es de tipo dicotómica positivo (presencia) – negativo (ausencia).

Cada bioensayo esta compuesto por un medio de cultivo agarizado que contiene esporas de una bacteria-test específica para detectar un determinado

grupo de antimicrobiano, sustancias mejoradoras de la sensibilidad (trimetoprim, cloranfenicol, etc.) e indicadores de pH (o redox), de manera que el resultado se pueda interpretar visualmente mediante el cambio en la coloración del ensayo. Luego que se adiciona una muestra de leche en el pocillo del bioensayo, se incuba en a una temperatura–tiempo determinada por el tipo de bacteria-test. En caso que la muestra esté libre de antimicrobiano, se producirá el desarrollo del microorganismo acompañado de un cambio en la coloración del indicador ácido-base (o redox), mientras que la presencia de antimicrobianos en la leche no permitirá el desarrollo del microorganismo de prueba y por lo tanto se conservará el color inicial del indicador.

En este contexto, Nagel et al. (2011) proponen un sistema microbiológico conformado por dos bioensayos (BT y BS) que contienen esporas de *G. stearothermophilus* var. *calidolactis*, medios de cultivo (Agar de Recuento en Placa y Mueller Hinton), sustancias mejoradoras de sensibilidad e indicadores (Púrpura de bromocresol y Negro Brillante-azul de Toluidina).

La placa para la detección de antimicrobianos betalactámicos en leche fue optimizada previamente mediante el empleo de herramientas quimiométricas y el modelo de regresión logística (Nagel et al. 2009b). En este trabajo se logró obtener un bioensayo robusto frente a diferentes variables operativas tales como tiempo de incubación y tiempo de predifusión controlando las variables de diseño, como concentración de esporas del *G. stearothermophilus* y volumen de medio de cultivo. Luego, Nagel et al. (2009a) incrementan la sensibilidad de este bioensayo con *G. stearothermophilus* para la detección de tetraciclinas en leche mediante la

incorporación de cloranfenicol en el medio de cultivo y el uso de diseños experimentales aplicados a la optimización de métodos de respuestas dicotómicas.

Del mismo modo, se optimizó un bioensayo BS para la detección de antibióticos betalactámicos y sulfamidas que utiliza *G. stearothermophilus* incorporando trimetoprim en el medio de cultivo, a fin de producir un efecto sinérgico con las sulfamidas presentes en la muestra de leche y de esta forma disminuir los límites de detección del método microbiológico para dichas sustancias (Nagel et al., 2011b).

El uso simultáneo de ambos bioensayos (BT y BS) permite la detección y clasificación de residuos en betalactámicos, tetraciclinas y sulfamidas, pero no presenta una adecuada sensibilidad para otros grupos de antimicrobianos, tales como macrólidos, aminoglucósidos y quinolonas.

Posteriormente, este grupo de investigación diseña y optimiza un Sistema Microbiológico en Microplacas (SMmp) que utiliza tres bacterias-test para la detección y clasificación de residuos de antibióticos pertenecientes a betalactámicos, tetraciclinas, sulfamidas y quinolonas (Nagel et al., 2013). Dicho SMmp presenta respuesta de tipo dicotómica (positiva o negativa) mediante cambios en el color de los indicadores (ácido-base y redox) evitando la medición de los halos inhibitorios. La tabla 1.7 describe la composición de los diferentes bioensayos utilizados en el sistema microbiológico en placas de microtitulación propuesto por Nagel et al. (2013).

A fin de obtener un bioensayo específico para detectar residuos de antibióticos betalactámicos (bioensayo B), se utilizó el modelo de regresión logística

y la función deseabilidad para determinar la concentración de esporas de *G. stearothermophilus* (bacteria-test) y el tiempo de incubación adecuados para lograr bajos límites de detección de betalactámicos y baja especificidad cruzada con las tetraciclinas en un tiempo inferior a las 5 horas (Nagel et al., 2012).

El bioensayo que utiliza *Bacillus cereus* (bioensayo T) para la detección de tetraciclinas en leche fue diseñado y optimizado de modo tal de disminuir el tiempo de respuesta a 5 horas, en comparación con las 18 a 24 horas que demandan los SMMP (Nagel et al., 2011a). Para esta optimización se emplearon técnicas quimiométricas en forma sucesiva que incluyen diseños Plackett and Burman, diseños tipo Dohelert y función deseabilidad a métodos de respuesta dicotómica (positivo o negativo).

Tabla I.7. Composición de los bioensayos que componen el sistema microbiológico en placas de microtitulación

Bioensayo	Bacteria test	Medio agar	Temperatura de incubación
B	<i>G. stearothermophilus</i> subsp. calidolactis C-953	Müller Hinton, glucosa, negro brillante, azul de toluidina.	64 °C, 4 h
T	<i>B. cereus</i> subsp. mycoides ATCC 11778	Plate Count Agar, glucosa, púrpura de bromocresol, rojo fenol, cloranfenicol.	40 °C, 6 h
QS	<i>B. subtilis</i> BGA,	Müller Hinton, glucosa, trifeniltetrazolium, azul de toluidina, trimetoprim.	40 °C, 5 h
BS	<i>G. stearothermophilus</i> subsp. calidolactis C-953,	Müller Hinton, glucosa, negro brillante, azul de toluidina, trimetoprim.	64 °C, 4 h

B: betalactámicos; T: tetraciclinas; QS: quinolonas-sulfamidas; BS: betalactámicos-sulfamidas. Fuente: Nagel et al. (2013).

En forma similar, Nagel et al. (2013) optimizan un bioensayo que emplea *B. subtilis* para la detección de sulfamidas y quinolonas que brinda una respuesta binaria (positiva - negativa) en un tiempo de 5 horas. Este método diseñado mediante el empleo de diferentes técnicas experimentales para métodos de screening presenta límites de detección de las sulfamidas similares a su LMR. Además, el sistema incorpora el bioensayo BS que contiene esporas de *G. stearothermophilus* en Mueller Hinton, trimetoprim y mezcla de indicadores redox para clarificar la detección de sulfamidas y quinolonas del bioensayo QS (Nagel et al., 2011b).

El perfil de detección del SMmp muestra que bioensayo B y BS detectan niveles de betalactámicos cercanos a los LMRs, y también neomicina, lincomicina y tilosina. Además, las tetraciclinas fueron detectadas por el bioensayo T sin presentar inconvenientes de especificidad cruzada con otros antibióticos. El bioensayo que utiliza *B. subtilis* (Bioensayo QS) permite detectar concentraciones de ciprofloxacina, enrofloxacina, sulfamidas y espiramicina levemente superiores a su LMR. Por último, el bioensayo BS también presenta límites de detección de sulfamidas a niveles de LMR, gracias al efecto sinérgico de trimetoprim en el medio de cultivo. En este SMmp de cuatro bioensayos los betalactámicos se clasifican por la presencia de resultados positivos en el Bioensayo "B" y en el Bioensayo "BS". Las tetraciclinas serán clasificadas por la presencia de resultados positivos a los Bioensayo "T", mientras que las sulfamidas brindarán respuestas positivas al

Bioensayo “S” y al Bioensayo “BS”. Se clasificarán como quinolonas, aquellos resultados positivos que se presente únicamente en el Bioensayo “S”.

Sin embargo, estos autores no llegan a identificar la totalidad de los agentes antimicrobianos utilizados en la terapéutica del ganado vacuno productor de leche, tales como los aminoglucósidos y macrólidos. Por todo ello, en la presente tesis doctoral se pretende desarrollar un SMmp que sea capaz de clasificar residuos de antimicrobianos pertenecientes al menos a cinco familias de las seis más utilizadas (betalactámicos, tetraciclinas, sulfamidas, quinolonas, y macrólidos) mediante el uso de herramientas quimiométricas, tales como técnicas de diseños experimental y modelo de regresión logística.

I.6. Hipótesis de trabajo

Debido a la ausencia de un método microbiológico ideal, que sea capaz de detectar la mayor parte de los residuos de antibióticos en la leche que se utilizan para el tratamiento del ganado vacuno lechero a niveles establecidos por la legislación; la presente Tesis Doctoral plantea la hipótesis que se puede diseñar un sistema microbiológico integrado por cinco bioensayos que utilizan diferentes microorganismos, con el propósito de detectar una cantidad mas amplia de antibióticos que los actuales métodos microbiológicos.

Objetivos II

II.1. Objetivo general

En este trabajo se contempló el diseño y la optimización de un Sistema Microbiológico en microplacas que consiste en cinco bioensayos que utilizan bacterias-test específicas para cada familia de antimicrobianos. Este sistema utiliza diferentes microorganismos esporulados con adecuada sensibilidad hacia un determinado grupo de antibióticos, diferentes indicadores redox o ácido base, medios de cultivos específicos para el crecimiento de cada bacteria test, sustancias mejoradoras de la sensibilidad (trimetopim, cloranfenicol, etc), que resulte económico y fácil de implementar en las industrias lácteas y los laboratorios lactológicos encargados del control de la calidad.

II.2. Objetivos específicos

Para realizar la presente tesis doctoral se proponen los siguientes objetivos específicos descritos en forma de capítulos:

Capítulo III. Bioensayo microbiológico que utiliza *Bacillus pumilus* para la detección de tetraciclinas en leche

El trabajo tuvo como objetivo diseñar y optimizar un método microbiológico que contiene *B. pumilus* para la detección de residuos de tetraciclinas en leche con una elevada especificidad. En este estudio, se determinó la concentración de esporas que producen un cambio en la absorbancia relativa del bioensayo en un período de tiempo corto (5h). Posteriormente, se evaluó la concentración de cloranfenicol en el medio de cultivo necesaria para disminuir los límites de detección de tetraciclinas presentes en la muestra de leche sin afectar la especificidad del método.

Capítulo IV. Método microbiológico que emplea *Bacillus megaterium* y ácido fusídico para la detección de macrólidos en leche

Se optimizó un bioensayo de inhibición microbiológica en placa de microtitulación que utiliza un medio de cultivo con esporas de *Bacillus megaterium* y diferentes concentraciones de ácido fusídico para detectar residuos de macrólidos en leche mediante lecturas ópticas de sus respuestas. Se analizaron las absorbancias relativas obtenidas mediante modelos de regresión logística adecuados y se determinó aquella concentración de ácido fusídico en el medio de cultivo que disminuye los límites de detección de macrólidos a niveles similares a sus LMRs.

Capítulo V. Novedoso bioensayo con *B. megaterium* para detectar tetraciclinas en leche

Se propuso el diseño de un método microbiológico en placas de microtitulación que emplea *Bacillus megaterium* para la detección de residuos de tetraciclinas en leche a niveles similares a sus Límites Máximos de Residuos mediante el uso de un lector fotométrico. Las absorbancias relativas se analizaron por modelos logísticos. Se determinaron nivel de cloranfenicol adecuado para la detección de tetraciclinas en leche y especificidad en forma simultánea.

Capítulo VI. Ensayo microbiológico con *Bacillus licheniformis* para la fácil detección de las quinolonas en la leche

El trabajo propone como objetivo, el desarrollo de un bioensayo que contiene esporas de *Bacillus licheniformis* para la detección de residuos de quinolona en leche utilizando un lector fotométrico. Además, se evaluó la especificidad cruzada para otros antibióticos en leche y la especificidad del bioensayo.

Capítulo VII. Detección de betalactámicos en leche mediante *Geobacillus kaustophilus* y *Geobacillus stearothermophilus*

El objetivo del trabajo fue evaluar y comparar los límites de detección de antibióticos betalactámicos en leche mediante dos bioensayos que contienen esporas de *Geobacillus kaustophilus* y *Geobacillus stearothermophilus* de forma tal de recomendar un método microbiológico que presente límites de detección similares a los permitidos por la legislación. Se analizaron curvas dosis respuestas para ocho betalactámicos y se determinó la especificidad de cada bioensayo.

Capítulo VIII. Sistema de cinco bioensayos microbiológicos para la detección rutinaria de residuos de antibióticos y que aseguren evaluar la calidad de la leche

El propósito de este capítulo fue evaluar un sistema microbiológico en placas de microtitulación para detectar y clasificar residuos de antibióticos pertenecientes a cinco grupos de antimicrobianos (betalactámicos, tetraciclinas, sulfonamidas, quinolonas y macrólidos) en leche mediante respuestas visuales de tipo dicotómico (positivo o negativo) en menos de 6 horas.

Capítulo III

Bioensayo microbiológico que utiliza *Bacillus pumilus* para la detección de tetraciclina en leche.

Tumini M, Nagel O, Althaus R.

Cátedra de Biofísica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral, R.P.L., Kreder 2805, 3080, Esperanza, Argentina.

Journal of Dairy Research (2015) 82 248–255. © Proprietors of Journal of Dairy Research 2015. doi:10.1017/S0022029915000138.

Resumen

Las tetraciclinas (TCs) se utilizan ampliamente para el tratamiento de diversas enfermedades del ganado vacuno, sin embargo, sus residuos pueden estar presentes en la leche. Para controlar estos residuos resulta necesario disponer de métodos de screening que permitan su detección a bajo costo, que resulten fáciles de implementar y permitan analizar un gran número de muestras. Por ello, el objetivo de este estudio fue diseñar un bioensayo de inhibición microbiológica en placas de microtitulación con esporas de *Bacillus pumilus* para detectar residuos de TCs a concentraciones equivalentes a sus Límites Máximos de Residuos (LMR). Para tal fin, se realizaron un conjunto de experimentos complementarios. En el primer estudio, se determinó la concentración de esporas que produce un cambio en la absorbancia relativa del bioensayo en un corto período de tiempo. Posteriormente, se evaluó la concentración de cloranfenicol (CAP) necesaria para disminuir el límite de detección (LD) de las TCs a niveles de su LMR. Después, se evaluaron los principales parámetros del método: especificidad, límites de detección y especificidad cruzada. Se concluye que el bioensayo más apropiado contiene una concentración de $1,6 \times 10^9$ esporas *B. pumilus*/ml, fortificado con 2500 µg CAP/l en el medio de cultivo Mueller Hinton, usando negro brillante y azul de toluidina como indicadores redox. Este bioensayo detecta 117 µg/l de clortetraciclina, 142 µg/l de oxitetraciclina y 105 µg/l de tetraciclina, por medio de un cambio en el color del indicador en un periodo de 5 horas. El método mostró una buena especificidad (97,9%), que disminuyó ligeramente (93,3%) en muestras de

leche con altos recuentos de células somáticas (≥ 250.000 células/ml). Además, otros antimicrobianos estudiados (excepto la neomicina) deben estar presentes en leche a concentraciones elevadas (más de 5 a 100 veces el LMR) para producir resultados positivos en este bioensayo, hecho que pone de manifiesto una muy baja especificidad cruzada.

Palabras clave: *Bacillus pumilus*, bioensayo, método de inhibición microbiológica, leche, tetraciclinas.

III.1. Introducción

Las TCs son antibióticos (ATB) de amplio espectro con actividad antimicrobiana hacia una gran variedad de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas (Hlavka y Boothe, 1985; Roberts, 1996). Estas moléculas impiden el crecimiento bacteriano mediante la inhibición de la síntesis de proteínas (Rasmussen et al., 1991). Específicamente, las TCs interfieren en la unión entre el aa-tRNA y el sitio 30S de la subunidad ribosomal, que inhibe la elongación de la cadena peptídica (Chopra et al., 1992).

En medicina veterinaria, las TCs se utilizan para la prevención y el tratamiento de varias enfermedades del ganado vacuno, cerdo, pollo y pescado (Aga et al., 2003). En el ganado lechero, las TCs se emplean con frecuencia para el tratamiento de enteritis bacteriana, metritis, mastitis y queratoconjuntivitis infecciosa. Investigaciones llevadas a cabo por la Federación Europea de Salud Animal sobre el uso de ATB en medicina veterinaria indican que las TCs representan el 65% de los agentes antibacterianos utilizados con fines terapéuticos o preventivos (Bogialli et al., 2006).

La presencia de residuos de ATBs en leche puede causar diferentes enfermedades o trastornos en los consumidores humanos (Dewdney et al., 1991; Demoly y Romano, 2005; Wilke et al., 2005). Por otra parte, estos residuos pueden modificar o inhibir los procesos de fermentación durante la elaboración de los productos lácteos como el queso y el yogur (Packham et al., 2001).

Por esta razón, el seguimiento de residuos de ATBs es muy importante para el control de la seguridad y la inocuidad alimentaria. Además, se estableció 100 µg/l

como Límite Máximo de Residuo (LMR) para las tres TCs en la leche por varias autoridades de control, tales como la Unión Europea (Reglamento de 2009) y el Codex Alimentarius (2010). Los métodos de Inhibición microbiológica se utilizan con éxito para asegurar los niveles mínimos de residuos de antimicrobianos en la leche, además permiten el análisis de un elevado número de muestras en un tiempo relativamente corto y a bajo costo (Toldra y Reig, 2006; IDF, 2010). También, las pruebas de unión a receptor se utilizan para detectar tetraciclina en la leche, porque proporcionan una respuesta en un tiempo breve (IDF, 2010).

El método microbiológico utilizado con mayor frecuencia contienen esporas de *Geobacillus stearothermophilus* subsp. *calidolactis* (Pikkemaat, 2009) debido a su rápido crecimiento a elevadas temperaturas (64 °C) y buena sensibilidad para detectar betalactámicos en la leche, aunque esta prueba microbiológica exhibe una sensibilidad limitada para los residuos de TCs (Diserens et al., 2005; Navratilova, 2008; Nagel et al., 2013).

Debido a esta sensibilidad limitada para detectar adecuadamente a las TCs, Nagel et al., (2011) propuso el uso de técnicas quimiométricas para el diseño de un bioensayo en placas de microtitulación que emplea *Bacillus cereus* para la detección de estos residuos. Este bioensayo resulta fácil de utilizar en los laboratorios para el análisis de un elevado número de muestras, porque genera una respuesta dicotómica de simple interpretación (positivo o negativo) en un corto periodo de tiempo (5 h). Sin embargo, el uso de este microorganismo puede presentar riesgos debido a que las células vegetativas o esporas de *B. cereus*

pueden producir enterotoxinas y toxina emética (Logan y De Vos, 2009), que causan el síndrome de diarrea y síndrome emético (Abiet et al., 2011).

Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue aplicar técnicas experimentales de diseño y un modelo de regresión logística para optimizar un bioensayo en placas de microtitulación con *Bacillus pumilus* para la detección de residuos de TCs en leche a niveles cercanos a sus Límites Máximos de Residuos, ya que se trata de una bacteria inocua.

III.2. Material y métodos

III.2.1. Elaboración de los bioensayos

Medio de cultivo Mueller Hinton (38 g/l, Biokar, Francia, Ref. 10272) fue fortificado con glucosa (10 g/l, Anhedra[®], Argentina, Ref. 6837), ajustado a pH= 8,0 ± 0,1. Se agregó una combinación de indicadores redox (Negro brillante 200 mg/l, Sigma Aldrich[®], Ref. 211842 y Azul de toluidina 10 mg/l, Anhedra[®], Argentina, Ref. 6356). A continuación, se inoculó este medio con diferentes concentraciones de esporas de *B. pumilus* CECT510 y CAP (1000 µg/ml, Sigma Aldrich[®], ref. C0378), según se detallan a continuación de cada experimento.

Cada pocillo de la microplaca se llenó con 100 µl de medio de cultivo usando un dispensador electrónico (Eppendorf Research[®] Pro, Eppendorf, Alemania). Posteriormente, las microplacas fueron selladas con bandas aluminizadas y se preservó a temperatura de refrigeración (4 °C).

III.2.2. Análisis de las curvas dosis-respuesta

En cada experimento se eligió una escala de concentración de antibiótico apropiada para el estudio de las curvas dosis-respuesta del bioensayo, que se detalla en cada experimento. Para cada ATBs, 16 repeticiones de 12 concentraciones se ensayaron con el fin de obtener dos resultados negativo en los primeros niveles de ABT y dos resultados positivos en las últimas dos concentraciones testeadas. Una vez elaboradas las microplacas, a cada pocillo se agregó un volumen de 50 µl de leche fortificada con diferentes concentraciones de antibiótico. Entonces, el bioensayo se dejó a temperatura ambiente durante un tiempo de 1 hora para permitir que difunda el ATB en el medio de cultivo. Posteriormente, las microplacas se lavaron 3 veces con agua destilada y se incubaron en baño de agua flotante a 40 ± 1 °C hasta el cambio de color de las muestras control negativa. Las lecturas fotométricas se midieron mediante un lector ELISA (Biotek ELx800TM, Biotek Instrument Inc., Winooski, Vernont, USA.) utilizando una longitud de onda de 550 nm.

Las mediciones fotométricas se transformaron en frecuencias relativas empleando la siguiente ecuación:

$$A = (A_x - A_0) / (A_{100} - A_0) \quad (\text{Ec 1})$$

Donde: A= absorbancia relativa, A_x = absorbancia de la muestra de leche con una concentración 'x' de ATB; A_0 = absorbancia de ATB libre de leche (control negativo) y A_{100} : absorbancia de la muestra de leche que produjo 100% de resultados positivos. Estos valores de absorbancia relativos fueron analizados utilizando el procedimiento logístico del paquete estadístico Statgraphics Plus versión 5.1 Centurion® (2008). Entonces, para cada experimento, los límites de

detección se calcularon como la concentración de ATBs que produce el 45% de absorbancia relativa porcentual (Luitz y Suhren, 1995).

III.2.3. Efecto de la concentración de esporas en el tiempo de respuesta del bioensayo

Se preparó el medio de cultivo según se describió en párrafos anteriores y el volumen del medio se dividió en cinco alícuotas para evaluar el efecto de diferente concentración de esporas de *B. pumilus* ($1,6 \cdot 10^9$; $8,0 \cdot 10^7$; $6,4 \cdot 10^6$; $1,2 \cdot 10^6$ y $2,5 \cdot 10^5$ esporas/ml) sobre el límite de detección y tiempo de respuesta del bioensayo.

Estas concentraciones se obtuvieron mediante diluciones seriadas de una suspensión madre de esporas de *B. pumilus* ($1,6 \cdot 10^{11}$ esporas/ml) que fueron determinadas mediante el conteo en placas Petrifilm (3M, St. Paul, MN, USA).

Para la construcción de las curvas dosis respuesta se eligió la oxitetraciclina (Sigma O-5750) y se analizaron 12 concentraciones crecientes (OTC: 0, 500, 750, 1000, 1250, 1500, 1750, 2000, 2500, 3000, 4000, 5000 $\mu\text{g/l}$). Cuando las muestras de control negativo cambiaron de color (negro a amarillo), se registraron el tiempo de incubación y la absorbancia relativa. Para el cálculo estadístico, se utilizó el siguiente modelo de regresión logística:

$$L_{ijk} = \text{Logit} [A_{ijk}] = \beta_0 + \beta_1 OTC_i + \beta_2 \text{Log} S_j + \beta_{12} \text{Log} S_{ij}^2 + \varepsilon_{ijk} \quad (\text{Ec } 2)$$

Donde: L_{ijk} = Modelo logístico lineal; A_{ijk} = absorbancia relativa (Ec 1); β_0 = intercepto; β_1 , β_2 , β_3 = parámetros estimados para el modelo; OTC= concentración de oxitetraciclina (i : 1, 2, ... 12 concentraciones); $\text{Log } S_j$ = transformación logarítmica de

la concentración de esporas; $\text{Log } S_j^2$ = cuadrado de la transformación logarítmica de la concentración de esporas y ε_{ijk} = error residual.

III.2.4. Efecto de la concentración de CAP sobre los límites de detección de TCs

El medio de cultivo preparado como se describió en párrafos anteriores se inoculó con $1,6 \times 10^9$ esporas/ml de *B. pumilus*. Luego, se dividió en cuatro alícuotas para evaluar diferentes concentraciones de CAP (CAP: 0, 1500, 2000 y 2500 $\mu\text{g/l}$). Luego, los límites de detección de las TCs se analizaron utilizando la siguiente escalas de concentración: oxitetraciclina (Sigma S-5750, OTC: 0, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 600, 800 $\mu\text{g/l}$), tetraciclina (Sigma T-3258, TC: 0, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 800, 1000 $\mu\text{g/l}$) y clortetraciclina (Sigma C-4881, CTC: 0, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 800, 1000, 1500 $\mu\text{g/l}$). De esta forma la curva dosis-respuesta debe incluir al menos dos concentraciones negativas y dos concentraciones positivas (Codex Alimentarius, 2010). Para el análisis estadístico se utilizó el modelo de regresión logística:

$$L_{ijk} = \text{Logit} [A_{ijk}] = \beta_0 + \beta_1 [TC]_i + \beta_2 [CAP]_j + \beta_{12} ([TC] * [CAP])_{ij} + \varepsilon_{ijk} \quad (\text{Ec 3})$$

Donde: L_{ijk} = modelo de regresión lineal; $[A_{ijk}]$ = absorbancia relativa (Ec 1); $[TC]_i$ = efecto de la concentración de tetraciclina ($i= 1, 2, \dots, 12$ concentraciones); $[CAP]_j$ = efecto de las concentraciones de cloranfenicol ($j= 0, 1500, 2000$ o $2500 \mu\text{g/l}$); $([TC] \times [CAP])_{ij}$ = efecto de la interacción entre las concentraciones de tetraciclina y cloranfenicol; $\beta_0, \beta_1, \beta_2$ y β_{12} = coeficientes estimados para el modelo y ε_{ijk} = error residual.

III.2.5. Especificidad del bioensayo.

Las muestras de leche utilizadas en este estudio provinieron de animales Holstein Friesian no tratados ni medicamentados a lo largo del estudio. Los valores de pH, composición química, recuento de células somáticas (SCC<400000 células/ml) y el recuento de bacterias (CFU<100000 ufc/ml) fueron aceptables para el ganado lechero. La composición química, SCC y CFU se determinaron con Milko Scan FT-120 (Foss somática USA), 90 Fossomatic (Foss eléctrica, USA) y BactoScan 8.000 (Foss eléctrica, USA), respectivamente.

Las muestras de leche se analizaron por duplicado usando bioensayos sin CAP y con 2500 µg CAP/l. Se realizaron interpretaciones visuales por tres personas calificadas para la categorización de las respuestas en términos de “positivo” o “negativo”. Solamente se consideraron como valederas aquellas respuestas con al menos dos (de tres) coincidencias. La especificidad se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Especificidad} = (\text{muestras negativas} / \text{total de muestras}) * 100 \quad (\text{Ec } 4)$$

III.2.6. Especificidad cruzada, límites de detección para otros ATBs.

Los bioensayos se prepararon utilizando la composición del medio de cultivo detallada anteriormente y se emplearon inoculos de $1,6 \cdot 10^9$ esporas/ml de *B. pumilus* con 2500 µg CAP/l. Los límites de detección se analizaron para 8 betalactámicos (amoxicilina, ampicilina, cloxacilina, oxacilina, penicilina 'G', cefoperazona, ceftiofur y cefalexina), 3 aminoglucósidos (kanamicina, neomicina y

estreptomicina) 3 macrólidos (eritromicina, tilosina y tilmicosina) 4 sulfamidas (sulfadiazina, sulfadimetoxina, sulfametoxazol, y sulfatiazol) y 3 quinolonas (ciprofloxacina, enrofloxacina y marbofloxacina). Para cada ATB, se ensayaron las concentraciones descritas en Tabla III.1.

Tabla III.1. Concentraciones de antibióticos utilizadas para determinar los límites de detección del ensayo biológico usando *Bacillus pumilus*

Antimicrobianos	Concentraciones ($\mu\text{g/l}$ o $^*\text{mg/l}$)
Betalactámicos	
Amoxicilina	0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 800, 1000, 2000, 3000, 5000
Ampicilina	0, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500
Cloxacilina	0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 800, 1000, 2000, 3000, 5000
Oxacilina	0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 800, 1000, 2000, 3000, 5000
penicilina "G"	0, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 800, 1000, 2000, 3000
Cefalexina	0, 50, 100, 150, 200, 400, 600, 800, 1000, 1500, 2000, 3000
Cefoperazone	0, 50, 100, 150, 200, 400, 600, 800, 1000, 1500, 2000, 3000
ceftiofur [™]	0, 50, 100, 150, 200, 400, 600, 800, 1000, 1500, 2000, 3000
Aminoglucósidos	
Kanamicina	0, 100, 150, 200, 300, 400, 600, 800, 1000, 2000, 3000, 4000
Neomicina	0, 50, 100, 150, 200, 400, 600, 800, 1000, 1500, 2000, 3000
Estreptomicina	0, 50, 100, 150, 200, 400, 600, 800, 1000, 1500, 2000, 3000
Macrólidos	
Eritromicina	0, 40, 80, 120, 160, 200, 300, 400, 600, 800, 1000, 1200
Tilosina	0, 25, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 600, 800, 1000, 1500
Tilmicosina	0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 600, 800, 1000
Sulfamidas	
sulfadiazina*	0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10, 20, 40, 60*
sulfadimetoxina*	0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10, 20, 40, 60*
sulfametoxazol*	0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10, 20, 40, 60*
sulfatiazol*	0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10, 20, 40, 60*
Quinolonas	
ciprofloxacina	0, 50, 100, 150, 200, 400, 600, 800, 1000, 2000, 3000, 4000
enrofloxacina	0, 50, 100, 150, 200, 400, 600, 800, 1000, 2000, 3000, 4000
marbofloxacina	0, 50, 100, 150, 200, 400, 600, 800, 1000, 2000, 3000, 4000

El análisis estadístico de las absorbancias relativas se efectuó con el siguiente modelo de regresión logística:

$$L_{ij} = \text{Logit} [A_{ij}] = \beta_0 + \beta_1 [ATB]_i + \varepsilon_{ij} \text{ (Ec 5)}$$

Donde: L_{ij} = modelo lineal logístico; $[A_{ij}]$ = absorbancia relativa; $[ATB]_i$ = efecto de la concentración de antibiótico ($i= 1, 2, \dots, 12$ concentraciones, Tabla 1); β_0 y β_1 = coeficientes estimado y ε_{ij} = error residual.

III.3. Resultados y discusión

III.3.1. Efecto de la concentración de esporas sobre el tiempo de respuesta del bioensayo

El efecto de la concentración de esporas sobre la curva dosis-respuesta de OTC en la leche para el bioensayo que contiene *B. pumilus* indica efectos significativos para los términos lineales y cuadráticos ($\log S$, $\chi^2= 4,795$; $\log^2 S$; $\chi^2= 3,090$, respectivamente) de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Logit } P = 8,353 + 0,014 \text{ OTC} - 2,919 \log S + 0,162 \log S^2 \text{ (C= 90,95\%)}$$

La Figura III.1 visualiza el tiempo de incubación y el límite de detección obtenido para diferentes niveles de *B. pumilus*. Un aumento de la concentración de esporas produce un aumento de los límites de detección de OTC acompañado por una disminución en el tiempo de respuesta debido a un cambio en el potencial redox originado por *B. pumilus*, que se visualiza debido a un cambio más rápido en el color del indicador.

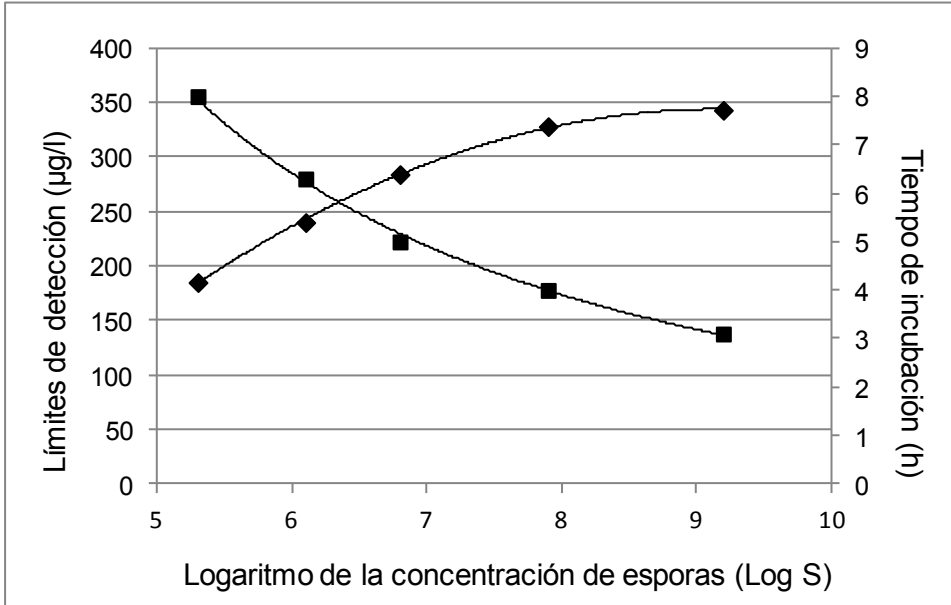


Fig. III.1. Efecto de la concentración de esporas sobre el tiempo de incubación (■) y Límites de detección (◆) del bioensayo.

III.3.2. Efecto de la concentración de CAP sobre los límites de detección de las TCs

La Tabla III.2 muestra los valores de " χ^2 " y "p" para los factores incluidos en el modelo (Ec 3). Los efectos TCs y CAP fueron significativos ($p < 0,05$), mientras que sus interacciones no resultaron significativas ($p > 0,05$). Para las tres TCs ensayadas, los coeficientes χ^2 del efecto CAP fueron altos (χ^2 OTC= 8,696; χ^2 TC= 5,416; χ^2 CTC= 4,560) indicando la importancia de la incorporación de CAP para mejorar la sensibilidad del bioensayo para este grupo de antimicrobianos.

La interacción de ambos términos (TCs*CAP) no fue significativa para las tres TCs. Esto indica que no hubo efecto sinérgico entre estos antimicrobianos. Por lo tanto, se puede establecer que el modelo aditivo se cumple en la Ec 3. Esta

ausencia de sinergismo se observó por Nagel et al. (2009, 2011), quienes destacan que la incorporación de CAP en el medio de cultivo mejora notablemente la sensibilidad de los métodos para la detección de TCs cuando los bioensayos contienen esporas de *G. stearothermophilus* y *B. cereus*, respectivamente.

Tabla III.2. Valores de χ^2 y probabilidad estimada para los factores que afectan la respuesta del bioensayo con adición de CAP para la detección de TC

Tetraciclinas	[TCs]		[CAP]		[TCs]*[CAP]	
	valores " χ^2 "	valores "p"	valores " χ^2 "	valores "p"	valores " χ^2 "	valores "p"
Clortetraciclina	58,3029	0,0001	8,6958	0,0032	3,8612	0,0514
Oxitetraciclina	55,1469	0,0001	4,0308	0,0447	1,7093	0,1911
Tetraciclina	49,2518	0,0001	5,4158	0,0200	2,2306	0,1353

TC: tetraciclina; CAP: cloranfenicol

Las ecuaciones calculadas mediante el modelo de regresión logística para los factores que afectan significativamente la respuesta del bioensayo ([TCs] y [CAP]) se resumen en la Tabla III.3. Todos los modelos mostraron coeficientes de concordancia adecuados (OTC= 89,9%; TC= 87,6% y CTC= 87,6%). Los coeficientes " β_1 " indican un aumento en el porcentaje de las absorbancias relativas a medida que se incrementan las concentraciones de TCs en leche. Estos coeficientes denotan que *B. pumilus* tiene mayor sensibilidad para la detección de residuos de OTC ($\beta_1= 0,0115$) que de TC ($\beta_1= 0,0090$) y CTC ($\beta_1= 0,0070$).

Los coeficientes " β_2 " indican el efecto del CAP sobre las absorbancias relativas del bioensayo. La adición de CAP produce mayor efecto en la detección de CTC ($\beta_2= 0,0013$) en comparación con OTC ($\beta_2= 0,0009$) y TC ($\beta_2= 0,0009$). Por

lo tanto, la adición de CAP dará lugar a una mayor reducción de los límites de detección de CTC que OTC y TC. Por el contrario, Nagel et al. (2011) obtuvieron valores más altos de “ β_2 ” para OTC ($\beta_2= 0,0051$) y TC ($\beta_2= 0,0057$) en comparación con CTC ($\beta_2= 0,0023$) durante la optimización de un bioensayo que emplea *B. cereus*.

Tabla III.3. Modelos de regresión logística representando los efectos de la concentración de cada uno de las TCs y los diferentes niveles de CAP en la respuesta del bioensayo

TCs	$L = \text{logit } [P] = \beta_0 + \beta_1 [\text{TCs}] + \beta_2 [\text{CAP}]$	C%
Clortetraciclina	$L = -4,1921+0,0070*[\text{CTC}]+0,0013*[\text{CAP}]$	87,6
Oxitetraciclina	$L = -4,1875+0,0115*[\text{OTC}]+0,0009*[\text{CAP}]$	89,9
Tetraciclina	$L = -3,7999+0,0090*[\text{TC}]+0,0009*[\text{CAP}]$	87,6

TCs: tetraciclinas; CAP: cloranfenicol; CTC: clortetraciclina; OTC: oxitetraciclina; TC: tetraciclina; C%: coeficiente de concordancia

Figura III.2 representa los efectos de [CAP] y [TCs] sobre las absorbancias relativas del bioensayo. Para las tres TC evaluadas, el porcentaje de la absorbancia relativa aumenta en la medida que las concentraciones en la leche se incrementan. Esta adición de CAP produce un desplazamiento de las curvas dosis-respuesta hacia niveles de detección inferiores, que es más marcada para la CTC que para OTC y TC (Fig. 2), debido a su mayor coeficiente “ β_2 ” (Tabla III.3). Las curvas dosis-respuesta construidas usando el modelo logístico sobreestiman las absorbancias relativas a bajas concentraciones de TCs. Por lo tanto, las curvas logísticas estimadas por el modelo mostraron absorbancias mayores para las muestras libres de antibióticos (TCs concentración= 0 $\mu\text{g/l}$).

Se calcularon los límites de detección del bioensayo (Tabla III.4) para las tres TCs en leche con diferentes niveles de CAP mediante el criterio de 45% de la absorbancias relativas de las ecuaciones. Los valores se resumen en la Tabla III.4. Además, en dicha Tabla se muestra los LMR para las tres TC establecidas por la legislación vigente (100 µg/l).

Tabla III.4. Efecto de la concentración de CAP en los límites de detección de las TC en muestras de leche

TCs	Concentración CAP (µg/l)				LMRs (µg/l)
	0	1500	2000	2500	
Clortetraciclín	575	299	208	117	100
Oxitetraciclina	346	223	183	142	100
Tetraciclina	380	330	175	105	100

TC: tetraciclinas; CAP: cloranfenicol; LMR: límite máximo de residuos

La incorporación de CAP en el medio de cultivo (desde 0 hasta 2500 µg/l) produce una disminución de los límites de detección para OTC (346-142 µg/l), TC (380-105 µg/l) y CTC (575 a 117 µg/l). Los niveles detectados por los bioensayos fortificados con 2500 µg CAP/l son apropiados y ligeramente superiores al LMR establecido por la legislación (100 µg/l). El LD de TC resultó similar al valor reportado por Nagel et al. (2009), cuando incorporaron 400 µg de CAP/l en un bioensayo usando *G. stearothermophilus* (LD_{TC}: 158 µg/l). Sin embargo, *B. pumilus* detecta concentraciones más bajas de OTC y CTC (Tabla III.4) que *G. stearothermophilus* (LD_{OTC}: 273 µg/l, LD_{CTC}: 316 µg/l) razón por la cual se puede recomendar su implementación rutinaria para un control más eficiente de los residuos de TCs en leche.

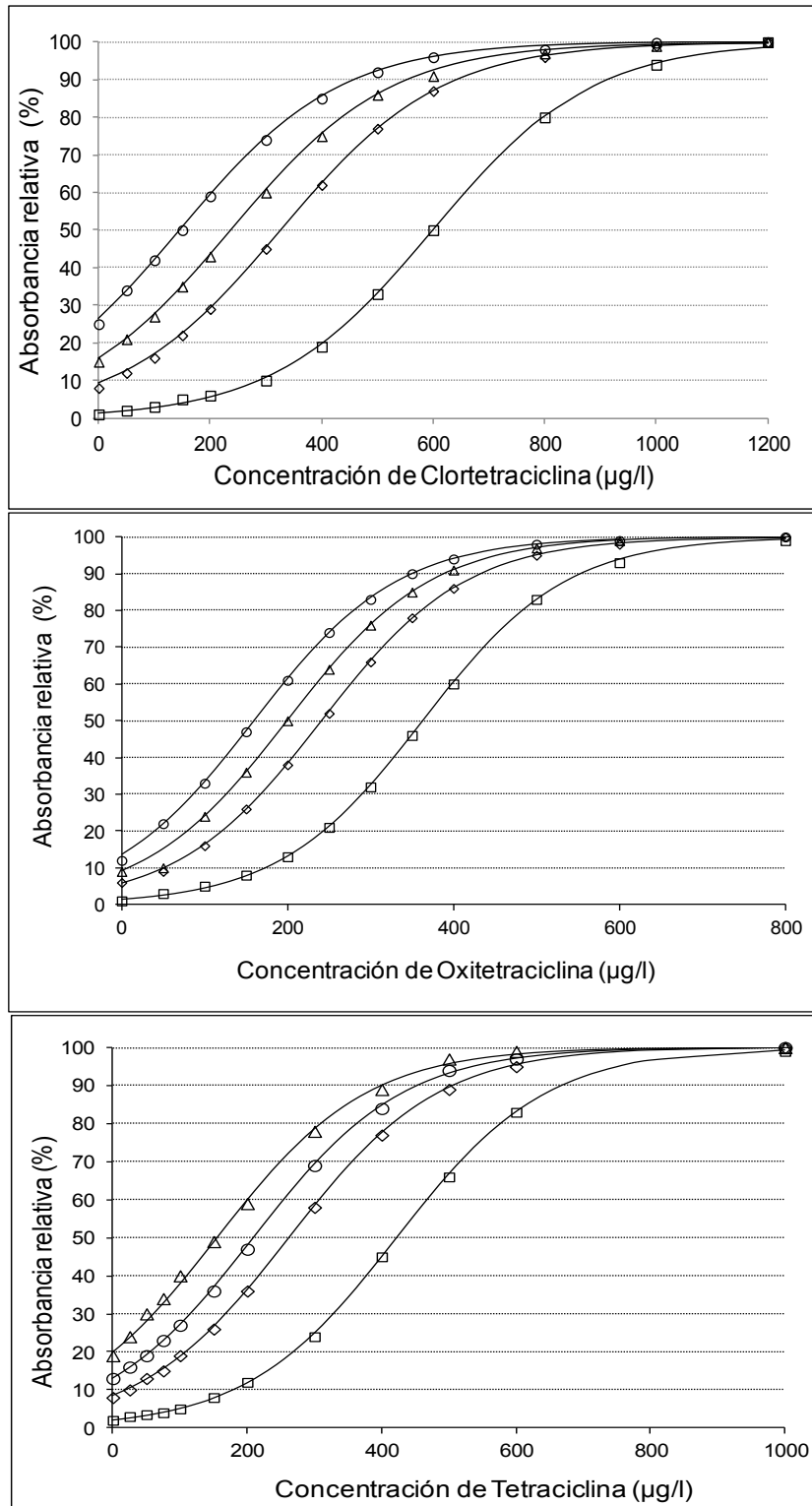


Fig. III.2. Curvas dosis-respuesta para diferentes tetraciclonas y concentraciones de cloranfenicol (\square CAP: 0 $\mu\text{g/l}$; \diamond CAP: 1500 $\mu\text{g/l}$; Δ CAP: 2000 $\mu\text{g/l}$; \times CAP: 2500 $\mu\text{g/l}$).

En otro estudio, Nagel et al. (2011) detectaron 100 µg OTC/l y 109 µg TC/l en leche cuando optimizaron un bioensayo que contiene esporas de *B. cereus* (Log S. 5,12) y CAP (470 µg/l), aunque no obtuvieron niveles de sensibilidad para la detección de CTC en leche, en comparación con el alcanzado con el bioensayo con *B. pumilus* (117 µg/l vs 250-300 µg/l para *B. cereus*). Aunque los niveles de detección de *B. cereus* son satisfactorios, el uso de esta bacteria podría cuestionarse porque puede causar trastornos digestivos (Abee et al., 2011), a diferencia de *B. pumilus* que es un microorganismo más inocuo.

No existen estudios previos que utilicen bioensayo con esporas de *B. pumilus* para la detección de residuos de ATBs en leche. Sin embargo, Pikkemaat et al., (2008) detectaron 1000 µg OTC/l, 700 µg TC/l y 400 µg CTC/l en fluido de pelvis renal cuando utilizan un método en placas de Petri con esporas de *B. pumilus* fortificada con 7 µg trimetoprim/l en medio de cultivo, después de un periodo de incubación de 18 horas a 37°C, valores que son mayores a los determinados en este trabajo para el bioensayo de difusión en microtubos (40 °C - 5 horas).

Los bioensayos de inhibición microbiológicos disponibles comercialmente que utilizan esporas de *G. stearothermophilus* var. *calidolactis* no poseen sensibilidad adecuada para detectar residuos de TCs en leche. Por ejemplo, Delvotest® detecta 600 µg CTC/l y 500 µg OTC/l en leche, mientras que el BRT® AiM detecta 750 µg OTC/l y 400 µg TC/l (Diserens et al., 2005). Por lo tanto, estos

métodos microbiológicos no garantizan la ausencia de residuos de TCs en niveles similares a los LMR (100 µg/l).

III.3.3. Especificidad del bioensayo

Las frecuencias absolutas de la no conformidad de los resultados fue en aumento de 2 (especificidad: 98,9%) a 4 (especificidad: 97,9%) cuando los bioensayos se prepararon con 0 µg CAP/l y 2500 µg CAP/l, respectivamente. La especificidad calculada para el bioensayo con 2500 µg CAP/l fue similar al 98% reportado por Sischo y Burns (1993) y 95% indicado por Charm y Zomer (1995) al evaluar el metodo Delvotest[®] con muestras de leche ATB-libres.

III.3.4. Especificidad cruzada: límites de detección para otros ATBs

Las ecuaciones del modelo de regresión logística para otros grupos ATBs en leche se muestran en la Tabla III.5. Se puede observar que los coeficientes de concordancia fueron altos, al estar comprendidos entre 88,2% (sulfadiazina) y 98,9% (tilosina), indicando un buen ajuste mediante el modelo logístico. Los valores de los coeficientes " β_1 " calculados con la (Ec 5) para betalactámicos: (0,0022-0,0058), aminoglucósidos (0,0014-0,0019), macrólidos (0,0013-0,0083), sulfamidas (0,0001-0,0002) y quinolonas (0,0011-0,0030) fueron inferiores a los determinados para las TCs (β_1 OTC= 0,0115; β_1 TC= 0,0090 y β_1 CTC= 0,0070); poniendo de manifiesto una menor sensibilidad para la detección de otros ATBs. La Figura III.3 muestra los LD relativos a sus correspondientes LMR para todos los ATB analizados. La figura poligonal utiliza una escala logarítmica estandarizada

Tabla III.5. Coeficientes del modelo de regresión logística para las curvas dosis-respuesta del bioensayo

Antimicrobianos	Logit [P] = $\beta_0 + \beta_1$ [ATB]	C%
Betalactámicos		
Amoxicilina	Logit [P]= -2,0027 + 0,0043*[ATB]	95,4
Ampicilina	Logit [P]= -1,5405 + 0,0024*[ATB]	95,9
Cloxacilina	Logit [P]= -1,5146 + 0,0055*[ATB]	94,1
Oxacilina	Logit [P]= -2,6700 + 0,0047*[ATB]	96,3
penicilina "G"	Logit [P]= -2,0807 + 0,0058*[ATB]	93,8
Cefalexina	Logit [P]= -2,8758 + 0,0022*[ATB]	97,6
cefoperazone	Logit [P]= -3,6330 + 0,0025*[ATB]	97,8
ceftiofur [®]	Logit [P]= -2,6175 + 0,0036*[ATB]	97,8
Aminoglucósidos		
Kanamicina	Logit [P]= -3,9729 + 0,0016*[ATB]	97,6
Neomicina	Logit [P]= -2,2009 + 0,0014*[ATB]	90,5
estreptomicina	Logit [P]= -2,3299 + 0,0019*[ATB]	97,5
Macrólidos		
Eritromicina	Logit [P]= -2,0929 + 0,0062*[ATB]	95,4
Tilosina	Logit [P]= -3,4374 + 0,0052*[ATB]	96,9
Tilmicosina	Logit [P]= -5,1718 + 0,0083*[ATB]	98,9
Sulfamidas		
sulfadiazina*	Logit [P]= -1,8324 + 0,0001*[ATB]	88,2
sulfadimetoxina*	Logit [P]= -1,2455 + 0,0002*[ATB]	89,8
sulfametoxazol*	Logit [P]= -1,1616 + 0,0001*[ATB]	88,8
sulfatiazol*	Logit [P]= -2,0206 + 0,0001*[ATB]	89,4
Quinolonas		
ciprofloxacina	Logit [P]= -2,7605 + 0,00304*[ATB]	95,6
enrofloxacina	Logit [P]= -3,6242 + 0,0011*[ATB]	96,2
marbofloxacina	Logit [P]= -3,4711 + 0,0024*[ATB]	97,2

ATB: antibiótico; C%: coeficiente de concordancia.

(LD/LMR) propuestos por Suhren et al. (1996) para estos estudios de sensibilidad.

El polígono externo (1) representa concentraciones equivalentes a 0,1 veces los respectivos LMR, el polígono (2) corresponde a niveles equivalentes a LMR, mientras que el polígono (3) corresponde a muestras de leche que contienen 10 veces el LMR y en el interior del polígono (4) concentraciones iguales a 100 veces

el LMR. Esta figura visualiza que este bioensayo detecta correctamente las TC y los residuos neomicina, pero no detecta en concentraciones adecuadas los demás ATBs.

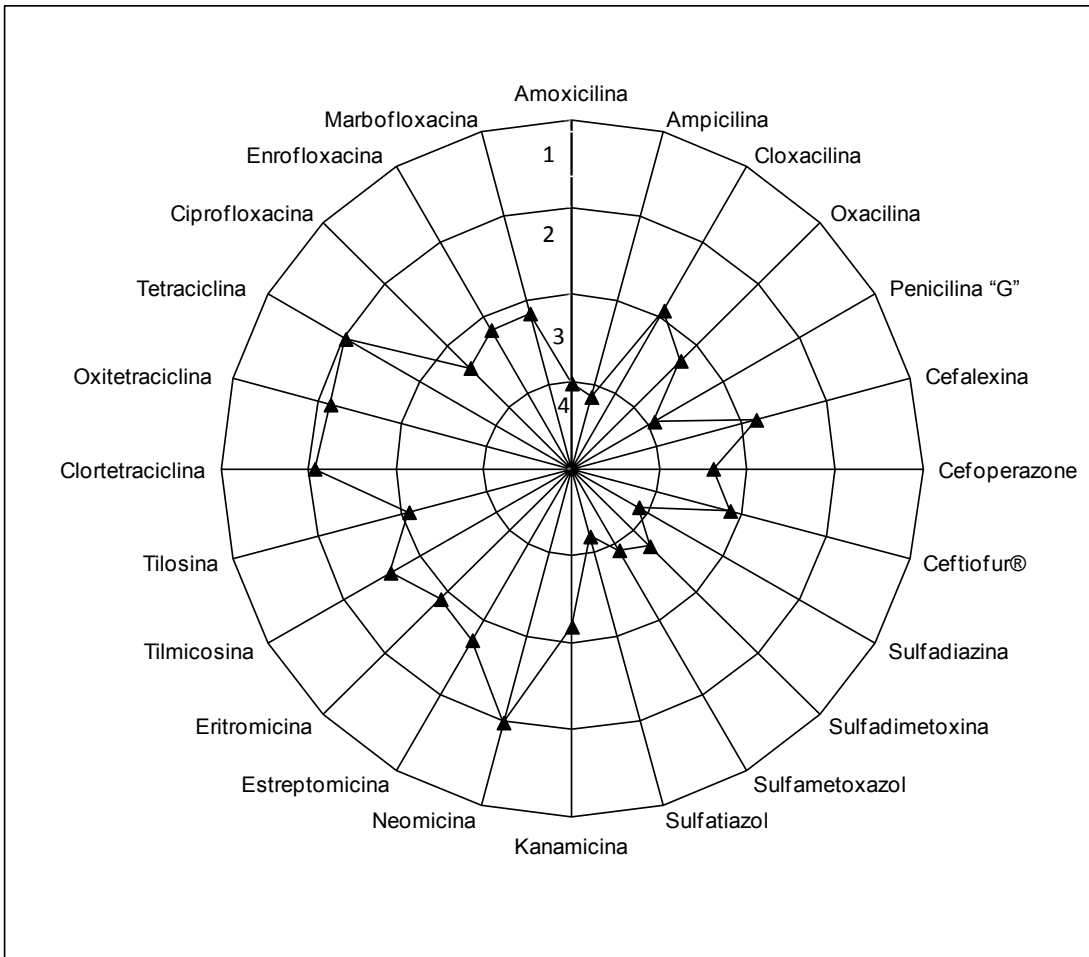


Fig. III.3. Patrón de detección (LD/LMR) del bioensayo. Polígono 1= 0,1 LMR, polígono 2= LMR, polígono 3= 10 LMR y polígono 4= 100 LMR.

Por esta razón, excepto neomicina (Con LD similar a LMR), el resto de los ATBs presentaron niveles elevados de detección que están comprendidos entre 5 (tilmicosina) y 150 (sulfatiazol) veces sus respectivos LMR. A modo de síntesis se puede establecer que el bioensayo con *B. pumilus* tiene reducidos inconvenientes

de especificidad cruzada (excepto con neomicina). Este método de screening se puede utilizar para clasificar las TC en leche por medio de un Sistema microbiológico en placas de microtitulación (SMmp) y sustituir el bioensayo de *B. cereus* propuesto por Nagel et al., (2013), debido a que *B. cereus* puede presentar ciertos riesgos para la salud de los técnicos de laboratorio.

III.4. Conclusiones

El bioensayo de inhibición microbiológica que contiene $1,6 \times 10^9$ esporas/ ml de *B. pumilus* fortificado con 2500 µg CAP/I permite detectar niveles adecuados de residuos de TCs en leche con una respuesta interior a las 5 horas. Este método microbiológico tiene buena especificidad (97,9%), con escasos problemas de especificidad cruzada (excepto la neomicina), ofreciendo una simple interpretación de los resultados y una fácil aplicación en los laboratorios de control de calidad.

Además, este bioensayo se puede incorporar a un sistema multirresiduo en microplacas microbiológica (SMmp) para la clasificación previa de las TC en muestras de leche antes de su cuantificación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Capítulo IV

**Método microbiológico que utiliza *Bacillus megaterium* con ácido fusídico
para la detección de macrólidos en leche.**

Tumini M¹, Nagel O¹, Molina P², Althaus R¹.

¹Cátedra de Biofísica, Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral, R.P.L Kreder 2804. (3080) Esperanza, República Argentina.

²Instituto de Ciencia y Tecnología Animal, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera 14, (46071) Valencia, Spain.

Resumen

El objetivo del trabajo fue diseñar un método microbiológico que utiliza *Bacillus megaterium* con ácido fusídico a fin de lograr una mejor detección de macrólidos en leche. Para ello, se preparó medio de cultivo Mueller-Hinton enriquecido con glucosa, una combinación de indicadores redox (negro brillante y azul de toluidina) y diferentes concentraciones de ácido fusídico. La adición de ácido fusídico en el medio de cultivo mejoró la sensibilidad de esta bacteria test y disminuyó los límites de detección del bioensayo a medida que se incrementa la concentración de la sustancia mejoradora. La adición de 200 µg/l de ácido fusídico en el medio de cultivo que contiene *B. megaterium* permite la detección de 35 µg/l de eritromicina, 58 µg/l de tilosina y 57 µg/l de tilmicosina en leche. Por todo ello, este bioensayo microbiológico podría ser utilizado como un método de prueba alternativo para la detección de macrólidos en leche, contribuyendo a garantizar la seguridad de los alimentos.

Palabras claves: macrólidos; prueba microbiológica; antibiótico; ácido fusídico; leche.

IV.1.Introducción

Los macrólidos (MC) son compuestos bacteriostáticos eficaces contra una amplia variedad de bacterias Gram-positivas (Shiomi y Omura, 2002), pero con limitada actividad hacia bacterias Gram-negativas (Edder et al., 2002). Estas moléculas se unen al dominio rRNA 23S del ribosoma bacteriano de manera reversible, produciendo la inhibición de la síntesis de proteínas (Douthwaite y Champney, 2001; Zhanel et al., 2001).

En medicina veterinaria, estos antibióticos (ATB) se utilizan principalmente para el tratamiento de enfermedades del tracto respiratorio superior, bronconeumonías, enteritis, metritis, infecciones urinarias, y artritis, entre otros. Puntualmente, se proporciona eritromicina para el tratamiento de la mastitis clínica y subclínica en vacas en periodo de lactancia (Wang y Leung, 2007). El uso inapropiado de macrólidos o el insuficiente tiempo de retiro aumenta la probabilidad de encontrar sus residuos en los productos de origen animal, incluyendo la leche (Edder et al., 2002). La presencia de estos antibióticos en alimentos puede causar efectos tóxicos en los consumidores, tales como reacciones alérgicas o inducción de resistencia bacteriana, e.g, *Streptococcus pyogenes* (Dixon y Lipinski 1974), *Campylobacter jejuni* (Burridge et al., 1986), *Mycoplasma pneumoniae* (Stopler y Branski 1986), *Lactobacillus* spp. (Rinckel y Savaje 1990), *Staphylococcus* spp. (Moats y Medina 1996), y los miembros de las enterobacterias (Mulazimoglu et al., 2005).

A fin de resguardar la salud del consumidor, las autoridades de control de calidad de alimentos establecieron Límites Máximos de Residuos (LMR) de 40 µg/l

para eritromicina y 50 µg/l para tilosina o tilmicosina (Council Directives, 2009; Codex Alimentarius, 2010).

Existen en el mercado diversos métodos de detección con *G. stearothermophilus* para la detección precisa de residuos de antibióticos en leche (Toldra y Reig, 2006; Diserens, 2010), pero no son lo suficientemente sensibles para detectar quinolonas (Montero et al., 2005), espiramicina, lincomicina (Linage et al., 2007), eritromicina, y estreptomina (Althaus et al., 2003; Molina et al., 2003). Para el control específico de macrólidos, algunos autores proponen el uso de *Kocuria rhizophila* como bacteria de ensayo en placas de Petri (Nouws et al., 1999; Pikkemaat et al., 2008, 2009, 2011; Althaus et al., 2009), sin embargo estos métodos que utilizan células vegetativas en placas de Petri resultan difíciles de implementar como técnica rutinaria en un laboratorio de control de residuos ya que requieren la preparación previa de un cultivo de células en fase exponencial, un prolongado periodo de incubación (16-24 horas) y presentan cortos periodos de conservación en refrigeración.

Por todo ello, el propósito de este estudio fue desarrollar y optimizar un bioensayo en placas de microtitulación utilizando esporas de *Bacillus megaterium* con ácido fusídico (AF) para la detección de macrólidos en leche en un tiempo de incubación relativamente corto. Este método de cribado podría procesar fácilmente un gran número de muestras de leche debido a su diseño de placa de microtitulación de 96 pocillos.

IV.2. Materiales y métodos

IV.2.1.Elaboración del bioensayo

Se preparó un medio de cultivo Mueller-Hinton (38 g/l, ref 10272; Biokar[®] Diagnostics, Allonne, Francia) a pH 8,0, fortificado con 10 g/l de glucosa (Ref G8270; Sigma Aldrich[®], St. Louis, USA), 200 mg/l de negro brillante (Ref. 211.842; Sigma Aldrich[®]) y 10 mg/l de azul de toluidina (Ref 89640; Aldrich[®] Sigma). Luego, se inoculó con diferentes concentraciones de esporas de *B. megaterium* (ATCC 9885; American Type Culture Collection, Manassas, USA) y ácido fusídico (Ref F0756; Sigma Aldrich[®]) según se detalla en cada experimento. La concentración de esporas de la suspensión madre o stock ($5,6 \cdot 10^{10}$ esporas/ml, Log S= 10,75) se determinó utilizando placas Petrifilm para recuentos de bacterias totales (3M, St. Paul, USA).

Posteriormente, se dispensó un volumen de 100 µl de medio de cultivo a cada pocillo de las microplaca mediante el uso de una micropipeta electrónica (Eppendorf Research[®] Pro, Hamburgo, Alemania). A continuación, los bioensayos fueron sellados con bandas aluminizadas recubiertas con polipropileno y refrigeradas a 4°C hasta el momento de su uso.

IV.2.2. Análisis de las curvas de dosis-respuesta

Para la elaboración de la curva dosis respuesta, dieciséis réplicas de doce concentraciones (que se detallan en cada experimento) se analizaron para cada antibiótico, de modo tal de obtener dos resultados negativos en las concentraciones más bajas y dos resultados positivos en los niveles más altos.

Se añadió 50 µl de una disolución de leche con antibióticos a cada pocillo de las microplacas y se dejó reposar 1 hora a 25°C para que las sustancias antimicrobianas difundan en el medio agararizado. Luego, las microplacas se lavaron tres veces con agua destilada a fin de retirar los restos de leche depositada y se incubaron en un baño de agua flotante a 45 ± 1°C (Dalvo, Santa Fe, Argentina) hasta producir el cambio de color del indicador en las muestras control negativa (negro a amarillo). La coloración de los indicadores redox (negro brillante y azul de toluidina) cambia de color negro (original) al amarillo (crecimiento) debido a los procesos de reducción que ocurren durante el desarrollo de la bacteria test.

Posteriormente, se realizaron lecturas fotométricas con la ayuda de un lector de microplacas ELISA (Biotek ELx800TM; Biotek Instrument Inc., Winooski, USA) a 550 nm y los resultados se expresaron en términos de absorbancias relativas de acuerdo con la siguiente transformación:

$$A = (A_x - A_0) / (A_{100} - A_0) \quad (\text{Ec 1})$$

Donde: A: absorbancia relativa, A_x = absorbancia de la muestra de leche con una concentración 'x' de ATB; A_0 : absorbancia de la muestra de leche libre de ATB (control negativo) y A_{100} : absorbancia de la muestra de leche que produjo 100% de resultados positivos.

Estos valores de absorbancia relativas se analizaron utilizando el procedimiento logístico del paquete estadístico Statgraphics Plus Centurion®, versión 16. Luego, los límites de detección (LD) se calcularon como aquella

concentración de antibióticos que produce el 45% de absorbancia relativa (Nagel et al., 2011).

IV.2.3. Efecto de la concentración de esporas sobre el tiempo de respuesta y los límites de detección del bioensayo

El medio de cultivo se dividió en cinco alícuotas para evaluar el efecto de diferentes porcentajes (Logaritmo de la concentración de cada alícuota) de la suspensión de esporas madre en el medio de cultivo: 0,008% (Log S= 6,6), 0,04% (Log S= 7,3), 0,2% (Log S= 8,0), 1% (Log S= 8,7) y 2% (Log S= 9,1). Con el propósito de visualizar el efecto de los diferentes niveles de esporas sobre la curva dosis respuesta, se ensayaron doce concentraciones de tilosina (0, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 400, y 500 µg/l). Una vez que las muestras control negativo cambiaron de color (de negro a amarillo) se registraron los tiempos de incubación de los bioensayos elaborados con diferentes niveles de esporas. Los resultados de tiempo de incubación y concentración de esporas se ajustaron utilizando un modelo de regresión exponencial negativa.

IV.2.4. Efecto de la concentración de ácido fusídico sobre los límites de detección del bioensayo

Se inoculó un medio de cultivo con $2,8 \cdot 10^8$ esporas/ml de *B. megaterium* y se dividió en 4 alícuotas para estudiar el efecto de 0, 100, 150 y 200 µg/l de ácido fusídico (AF). Para cada nivel de AF se ensayaron 16 repeticiones de 12 concentraciones de eritromicina (Sigma E-6376, St. Louis: 0, 10, 15, 20, 30, 40, 50,

60, 80, 100, 150, y 200 µg/l), tilosina (Sigma T-6134: 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120, 150, 200 µg/l) y tilmicosina (Vetranal 33864TM 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120, 150, 200 µg/l). Luego, los bioensayos se incubaron en un baño de agua flotante a $45 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 5 horas. Los resultados se analizaron utilizando el siguiente modelo de regresión logística:

$$L_{ijk} = \text{Logit} [A_{ijk}] = \beta_0 + \beta_1 [MC]_i + \beta_2 [AF]_j + \beta_{12} ([MC] * [AF])_{ij} + \varepsilon_{ijk} \quad (\text{Eq 2})$$

Donde: L_{ijk} = modelo de regresión lineal; $[A_{ijk}]$ = absorbancia relativa (Ec 1); $[MC]_i$ = efecto de la concentración de macrólidos ($i= 1, 2, \dots 12$ concentraciones); $[AF]_j$ = efecto de las concentraciones de ácido fusídico ($j= 50, 100, 150, 200$ µg/l); $([MC]*[AF])_{ij}$ = efecto de la interacción entre las concentraciones de macrólidos y ácido fusídico; $\beta_0, \beta_1, \beta_2$ y β_{12} = coeficientes estimados para el modelo y ε_{ijk} = error residual.

IV.2.5. Especificidad del bioensayo

Se analizaron triplicados de 192 muestras individuales de leche provenientes de vacas Holstein que no recibieron tratamiento antimicrobiano, en bioensayos elaborados con 0 y 200 µg/l de ácido fusídico. Las respuestas fueron interpretadas visualmente (positiva o negativa) por tres personas calificadas cuando presentaron al menos dos coincidencias. La especificidad se calculó según la siguiente expresión:

$$\text{Especificidad} = (\text{muestras negativas} / \text{total de muestras}) * 100 \quad (\text{Ec 3})$$

IV.2.6. Especificidad cruzada del bioensayo

Se elaboraron 42 bioensayos utilizando un medio de cultivo según el apartado IV.2.1 e inoculado con $2,8 \cdot 10^9$ esporas/ml de *B. megaterium* y 200 µg/l de ácido fusídico.

Se evaluaron los límites de detección del método desarrollado para ocho betalactámicos (amoxicilina, ampicilina, cloxacilina, oxacilina, penicilina G, cefoperazona, ceftiofur, y cefalexina), tres aminoglucósidos (kanamicina, neomicina y estreptomina), tres tetraciclinas (clortetraciclina, oxitetraciclina y tetraciclina), cuatro sulfamidas (sulfadiazina, sulfadimetoxina, sulfametoxazol y sulfatiazol), y tres quinolonas (ciprofloxacina, enrofloxacina, y marbofloxacina). Para ello, se ensayaron dieciséis repeticiones de doce concentraciones y los resultados fueron analizados mediante el siguiente modelo de regresión:

$$L_{ij} = \text{Logit} [A_{ij}] = \beta_0 + \beta_1 [ATB]_i + \varepsilon_{ij} \text{ (Ec 5)}$$

Donde: L_{ij} = modelo lineal logístico; $[A_{ij}]$ = absorbancia relativa; $[ATB]_i$ = efecto de la concentración de antibiótico ($i= 1, 2, \dots, 12$ concentraciones); β_0 y β_1 = coeficientes estimado y ε_{ij} = error residual.

IV.3. Resultados y discusión

IV.3.1. Efecto de la concentración de esporas sobre el tiempo de respuesta del bioensayo

El aumento de la concentración de esporas (Log S= 6,6; 7,3; 8,0; 8,7 y 9,0) en el medio de cultivo produce una disminución en el tiempo de respuesta del bioensayo ($t= 8,5, 6,0, 5,0, 4,5, \text{ y } 4,4$ h, respectivamente). Dicho efecto también fue observado

por Nagel et al. (2011) en la optimización de un bioensayo utilizando *Bacillus cereus* para la detección de las tetraciclina en leche.

La ecuación que relaciona el tiempo (t) y la transformación logarítmica de la concentración de esporas (Log S) fue: $t (h) = \exp^{(-0,3551 + 16.108 / \text{Log S})}$. El coeficiente de correlación cuadrática fue alta ($R^2 = 98,1\%$) indicando un adecuado ajuste del modelo. Se observa que los bioensayos elaborados con una concentración mayor a $\text{Log S} = 8,7$ no producen una disminución significativa en el tiempo de respuesta, razón por la cual dicha concentración de esporas ($\text{Log S} = 8,7$) se utilizará en los experimentos posteriores.

IV.3.2. Efecto del ácido fusídico sobre los límites de detección del bioensayo

El análisis estadístico del modelo de regresión indica que la concentración de macrólidos fue significativa para las tres moléculas ensayadas ($P < 0,0001$). Por otra parte, la interacción entre las concentraciones de macrólidos y ácido fusídico ($[\text{MC}] * [\text{AF}]$) fue significativa para eritromicina ($\chi^2 = 11,341$; $p = 0,0008$) y tilosina ($\chi^2 = 20,937$; $p = 0,0001$) indicando un efecto sinérgico entre estos antimicrobianos. Sin embargo, cuando se analiza tilmicosina, se observa que ácido fusídico $[\text{AF}]$ presenta un efecto inhibitorio individual ($\chi^2 = 22,096$; $p = 0,0001$), pero no así su interacción $[\text{MC}] * [\text{AF}]$ con este antibiótico ($\chi^2 = 0,105$; $p = 0,774$).

También, Garrett y Richards (1974) observan un efecto sinérgico entre eritromicina y el AF utilizando diferentes microorganismos patógenos, aunque no evaluaron esta posible interacción con tilosina y tilmicosina.

La Tabla IV.1 resume las ecuaciones de regresión logística con los efectos significativos del modelo (Ec. 2). Los porcentajes de concordancia resultan adecuados en todos los casos (eritromicina= 93,3%; tilmicosina= 95,3%; tilosina= 93,3%).

Tabla IV.1. Ecuaciones de regresión logística que representan el efecto de la concentración de macrólidos y los niveles de ácido fusídico en las absorbancia relativa del bioensayo

Macrólidos	$L = \beta_0 + \beta_1[MC] + \beta_2[AF] + \beta_{1-2}[MC]*[AF]$	C%
Eritromicina	$L = -2,2094 + 0,0359[MC] + 0,0001[MC]*[AF]$	93,3
Tilmicosina	$L = -4,7282 + 0,0484[MC] + 0,0088[AF]$	95,3
Tilosina	$L = -3,3749 + 0,0335[MC] + 0,0001[MC]*[AF]$	93,3

L : Modelo Logístico ; MC: Macrólidos; FA: Ácido Fusídico; C%: Porcentajes de concordancia.

El coeficiente β_1 indica el aumento de las absorbancias relativas a medida que se incrementan las concentraciones de MC en leche. Este coeficiente β_1 indica que *B. megaterium* tiene una buena sensibilidad para detectar los tres macrólidos en leche, ya que los valores fueron elevados ($\beta_{1,eritromicina} = 0,0359$; $\beta_{1,tilmicosina} = 0,0485$ y $\beta_{1,tilosina} = 0,0336$). Por su parte, el coeficiente β_2 muestra el efecto individual de ácido fusídico ($\beta_{2,tilmicosina} = 0,0088$), mientras que el coeficiente β_{1-2} describe el efecto de la interacción entre los macrólidos y el ácido fusídico $[MC]*[AF]$ ($\beta_{1-2,eritromicina} = 0,0001$; $\beta_{1-2,tilosina} = 0,0001$). Los efectos significativos de los factores $[MC]$, $[AF]$ y/o $[MC]*[AF]$ sobre la absorbancia relativa del bioensayo se muestran en la Figura IV.1. Se observa que un aumento en las concentraciones de MC en leche produjo un aumento de las absorbancias relativas.

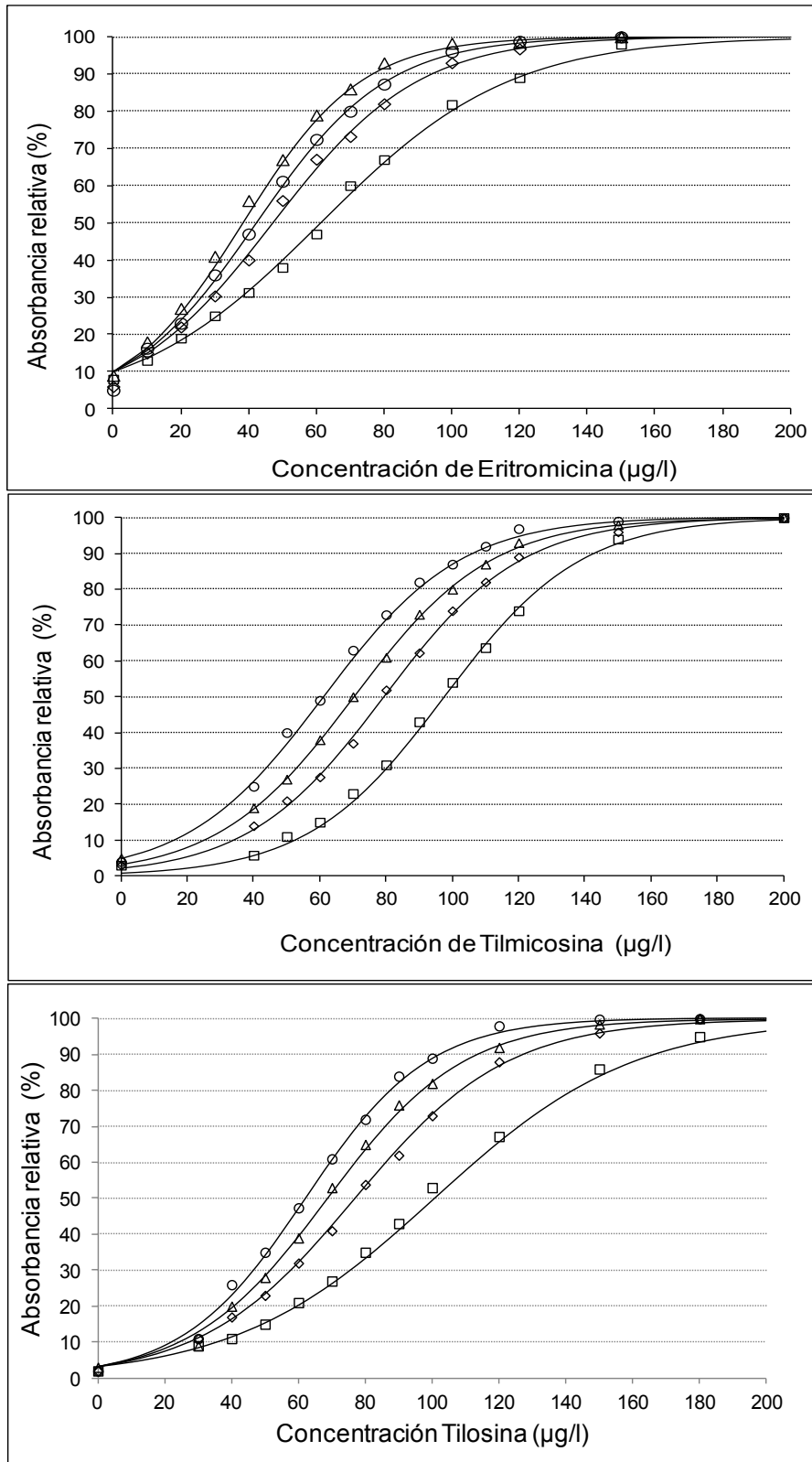


Fig IV.1. Efecto del ácido fusídico en las curvas de dosis-respuesta de los macrólidos en leche (□ AF= 0 µg/l; ◇ AF= 100 µg/l; Δ AF= 150 µg/l; ○ AF= 200 µg/l).

Además el incremento en las concentraciones de AF provoca desplazamientos de las curvas logísticas para detectar concentraciones más bajas, indicando una mejora en la sensibilidad de los bioensayos. Los límites de detección de macrólidos para diferentes niveles de ácido fusídico y sus respectivos LMRs se muestran en la Tabla IV.2. La adición de AF al medio de cultivo (de 0 a 200 µg/l) provoca una disminución en los límites de detección de eritromicina (46 a 35 µg/l), tilosina (95 a 58 µg/l) y tilmicosina (94-57 µg/l) a niveles similares a sus LMRs.

Tabla IV.2. Efecto de ácido fusídico sobre los límites de detección de macrólidos (µg/l) en leche

Macrólidos	Concentración de Ácido Fusídico (µg/l)				LMR
	0	100	150	200	
Eritromicina	46	44	39	35	40
Tilmicosina	95	73	65	58	50
Tilosina	94	75	66	57	50

LMR: Límite máximo de residuo (µg/l).

El uso de *B. megaterium* en placas de Petri (45°C 18 h) permitió la detección de 30 µg/l de eritromicina en fluido de riñón (Dey et al., 2005), que es similar a 35 µg/l detectado en 6 h con el bioensayo optimizado en este trabajo (Tabla IV.2). Los métodos microbiológicos en placas de Petri que utilizan *Kocuria rhizophila* como bacteria específica para la detección de MC (30°C 24 h) no pueden detectar residuos de los principales MC utilizados en la terapéutica del ganado vacuno lechero. De esta forma, Nouws et al., (1999) detecta 30 µg/l de eritromicina y 10 µg/l de tilmicosina en leche de vaca, pero no logra detectar tilosina (500 µg/l) a niveles cercanos a su LMR (50 µg/l).

En matrices cárnicas, Pikkemaat et al. (2008), calcularon capacidades de detección ($CC\beta$) de 150 $\mu\text{g/l}$ para eritromicina, 400 $\mu\text{g/l}$ para tilosina, y 300 $\mu\text{g/l}$ para tilmicosina cuando utilizan fluido de pelvis renal en placa específica para MC (*K. rhizophila*) que integra el NAT (Nouws Antibiotics Test) post-screening de 16-18 horas. En muestras de riñón de la especie porcina y bovina, Pikkemaat et al., (2009) estimaron $CC\beta$ de 30 $\mu\text{g/l}$ para la eritromicina, 50 $\mu\text{g/l}$ para la tilosina y 60 $\mu\text{g/l}$ para tilmicosina con el método de cribado NAT (16-18 h). Por otro lado, Gaudin et al., (2010) detectaron 200 $\mu\text{g/l}$ de eritromicina y 100 $\mu\text{g/l}$ de tilosina cuando se analizó músculo crudo mediante el método STAR (Screening Test for Antibiotic Residues). Por todo ello, sería interesante evaluar el rendimiento de este bioensayo en otras matrices (leche de cabra, leche de oveja, carne vacuna, pollo, etc.), ya que presenta bajos límites de detección para los macrólidos utilizados en el tratamiento del ganado.

IV.3.3. Especificidad del bioensayo

La especificidad calculada a partir del análisis de 192 muestras de leche en bioensayos elaborados con 0 y 200 $\mu\text{g AF/l}$ fue de 98,9% (2 casos positivos) y 96,8% (6 casos positivos), respectivamente. En forma similar, Sischo y Burns (1993), y Charm y Zomer (1995), obtuvieron especificidades de 98 y 95%, respectivamente, cuando analizan muestras de leche con bajo recuento de células somáticas mediante el método Delvotest[®].

IV.3.4. Especificidad cruzada.

La Tabla IV.3 resume las ecuaciones de regresión logística, los límites de detección de los bioensayos y los LMR de los veintidós ATB ensayados.

Tabla IV.3. Coeficientes del modelo de regresión logística para las curvas dosis-respuesta del bioensayo

Antibióticos	Logit [P] = $\beta_0 + \beta_1$ [ATB]	C%	LD	LMR
Betalactámicos				
Amoxicilina	L [P]= -0,7484 +0,0065[ATB]	85,8	85	4
Ampicilina	L [P]= -1,5402 +0,002[ATB]	95,9	76	4
Cloxacilina	L [P]= -1,3340 +0,0049[ATB]	83,1	228	30
Oxacilina	L [P]= -1,3329 +0,0049[ATB]	82,1	250	30
penicilina "G"	L [P]= -1,7180 +0,0053[ATB]	82,4	287	4
Cefalexina	L [P]= -2,5631 +0,0029[ATB]	94,5	812	100
Cefoperazone	L [P]= -2,2783 +0,0009[ATB]	92,9	2158	50
Ceftiofur [™]	L [P]= -2,3120 +0,0035[ATB]	74,5	598	100
Aminoglucósidos				
Kanamicina	L [P]= -1,0657+0,0012[ATB]	86,2	670	150
Neomicina	L [P]= -0,5384+0,0024[ATB]	72,5	550	1500
Estreptomina	L [P]= -0,8063 +0,0010[ATB]	77,5	600	200
Tetraciclina				
Clortetraciclina	L [P]= -0,7870 +0,0032[ATB]	76,8	185	100
Oxitetraciclina	L [P]= -1,4974 +0,0078[ATB]	89,6	170	100
Tetraciclina	L [P]= -1,6921 +0,0070[ATB]	82,8	213	100
Sulfamidas				
Sulfadiazina	L [P]= -1,4294 +0,0002[ATB]	87,7	5800	100
Sulfadimetoxina	L [P]= -2,4032 +0,0005[ATB]	94,3	4380	100
Sulfametoxazol	L [P]= -1,9999 +0,0008[ATB]	88,5	2100	100
Sulfatiazol	L [P]= -2,1719 +0,0005[ATB]	83,8	3900	100
Quinolonas				
Ciprofloxacina	L [P]= -1,6426 +0,0037[ATB]	92,3	390	50
Enrofloxacina	L [P]= -2,5559 +0,0027[ATB]	96,2	848	100
Marbofloxacina	L [P]= -2,8595 +0,0034[ATB]	94,4	767	75

L: Modelo logístico; ATB: Antibiótico; C%: porcentaje de concordancia; LMR: límites máximos de residuos ($\mu\text{g}/\text{l}$). LD: límites de detección.

Los porcentajes de coeficientes de concordancia fueron aceptables, entre 79,5% (neomicina) a 96,2% (enrofloxacina), lo que indica un ajuste adecuado con el modelo de regresión logística.

Los valores de los coeficientes β_1 (comprendidos entre 0,0002 para sulfadiazina y 0,0078 para oxitetraciclina) presentan un orden de magnitud más bajo que los calculados para MC (Tabla IV.3), mostrando baja sensibilidad de *B. megaterium* para detectar otros ATB, a excepción de la neomicina (por debajo del LMR) y tetraciclinas (ligeramente superiores que sus LMR).

Finalmente, este bioensayo se puede incorporar en sistemas microbiológico en placas de microtitulación (SMMP) que clasifican los residuos de betalactámicos, tetraciclinas, sulfamidas y quinolonas (Nagel et al., 2013) y por lo tanto aumentar el número de grupos de ATB a clasificar. De hecho, la clasificación previa de ATB por el bioensayo de MC de bajo costo facilita el posterior análisis cromatográfico.

IV.4. Conclusión

En resumen, un bioensayo que contiene esporas de *B. megaterium* proporciona límites de detección de macrólidos en leche cercanos a su LMR (Tabla IV.2) en un tiempo de respuesta relativamente corto en comparación con otros métodos microbiológicos en placas de Petri (16-18 horas). Además, el uso de esporas en lugar de células vegetativas permite prolongar el tiempo de conservación de los métodos microbiológicos en refrigeración para su posterior comercialización.

Por lo tanto, este bioensayo se podría utilizar como una técnica analítica complementaria a los métodos de cribados disponibles en el mercado, proporcionando una mayor seguridad alimentaria de los productos lácteos.

IV.5. Agradecimientos

Este trabajo de investigación ha sido llevado a cabo como parte de los proyectos CAI + D`11 (PI 501 201101 00575 LI, H.C.D. Resol 205/13 Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina) y PICT 2011-368 (Res. 140/12 N°, Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica).

Capítulo V

**Novedoso bioensayo con *Bacillus megaterium* para detectar
tetraciclina en leche**

Tumini M¹, Nagel O¹, Molina P², Althaus R¹

¹Cátedra de Biofísica, Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral, R.P.L. Kreder 2804, 3080 Esperanza, Argentina.

²Instituto de Ciencia y Tecnología Animal, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera 14, 46071 Valencia, España.

Revista Argentina de Microbiología Volume 48, Issue 2, Abril-Junio 2016, Páginas 143–146

Resumen

Las tetraciclinas son antibióticos que se utilizan para la prevención y el control de las enfermedades del ganado lechero; los residuos de estos medicamentos pueden ser excretados en la leche. El objetivo de este estudio fue desarrollar un método microbiológico con esporas de *Bacillus megaterium* para detectar las tetraciclinas en la leche. Con el propósito de aproximar los límites de detección del bioensayo al límite máximo de residuo permitido para tetraciclinas en leche por la legislación (100 µg/l), se analizaron diferentes concentraciones de cloranfenicol (0, 1000, 1500 y 2000 µg/l). Los límites de detección resultaron similares a sus respectivos límites máximos de residuos cuando se utiliza un bioensayo con esporas de *Bacillus megaterium* ATCC9885 ($2,8 \cdot 10^8$ esporas/ml) y cloranfenicol (2000 µg/l). Este bioensayo detectó 105 µg/l de clortetraciclina, 100 µg/l de oxitetraciclina y 134 µg/l de tetraciclina en 5 horas. Por lo tanto, este método es adecuado para su implementación en un sistema microbiológico multiresiduo para la identificación de tetraciclinas en leche.

Palabras clave: tetraciclinas; leche; *Bacillus megaterium*; antibióticos; detección; bioensayo.

V.1. Introducción

Las tetraciclinas (TCs) son antibióticos utilizados para la prevención y el control de una variedad de enfermedades infecciosas. Estos compuestos son activos frente a bacterias gram-negativas y bacterias gram-positivas (Pastor Navarro et al., 2009). En el ganado lechero, las TCs se utilizan para el tratamiento de enteritis bacteriana, metritis infecciosa, mastitis colibacilar y queratoconjuntivitis.

Las vacas metabolizan aproximadamente entre el 25-50% de las tetraciclinas administradas (Rysz y Alvarez, 2004) y una cantidad apreciable de estos fármacos se puede eliminar en leche. Por este motivo, los residuos de TC pueden causar efectos en los consumidores, tales como reacciones alérgicas, daño al hígado, amarilleo de los dientes y desordenes gastrointestinales. En la industria láctea, los residuos de TCs producen cambios en las características organolépticas de los productos fermentados (Packham 2001).

Por esta razón, el control de residuos por parte de autoridades tales como la Unión Europea (2009) y el Codex Alimentarius (2010) ha recomendado un Límite máximo de residuos (LMR) de 100 µg/l para la clortetraciclina, oxitetraciclina y tetraciclina en leche.

Los residuos de antibióticos en leche se controlan rutinariamente utilizando métodos de inhibición microbiológica. Algunos autores proponen el uso de *Bacillus cereus* ATCC11778 en placa de Petri para detectar residuos de TC en leche (Nouws et al., 1999; Gaudin et al., 2004; Althaus et al., 2009; Raspor Lainscek et al., 2014). Estos métodos microbiológicos son muy sensibles a las TC, pero

requieren de personal entrenado y un tiempo de incubación prolongado para medir su respuesta (18-24 horas).

Con el fin de disminuir el tiempo de respuesta de estos métodos microbiológicos, Nagel et al., (2011) y Tumini et al., (2015) recomiendan el uso de bioensayos en placas de microtitulación que contienen esporas de *Bacillus cereus* o *Bacillus pumilus*, respectivamente a fin de reducir el tiempo de respuesta (5-6 horas). Sin embargo, hay que señalar que esporas de *B. cereus* presentan riesgos para los técnicos de laboratorio, ya que producen toxinas que causan disturbios gastrointestinales (Abee et al., 2011). Además, el bioensayo desarrollado por Tumini et al., (2015) requiere el uso de un lector fotométrico para interpretar los resultados.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue diseñar un bioensayo de inhibición microbiológica en placas de microtitulación utilizando *Bacillus megaterium* con una respuesta dicotómica (positivo-negativo) que se pone de manifiesto mediante un cambio en el color del indicador redox presente en el medio de cultivo. Este bioensayo resulta económico y fácil de implementar en un laboratorio para el control de residuos en leche.

V.2. Materiales y métodos

V.2.1. Elaboración de los bioensayos

Para la elaboración de los bioensayos, el medio de cultivo agar Mueller Hinton (38 g/l, Biokar[®], Ref. 10272, Francia) se fortificó con glucosa (10 g/l, Sigma Aldrich[®],

Ref. G8270, St. Louis, MO, USA) y se añadió una mezcla de indicadores compuesta por negro brillante (200 g/l de Sigma Aldrich[®], Ref. 211842, St. Louis, MO, USA) y azul de toluidina (10 g/l de Sigma Aldrich[®], Ref. 89640, St. Louis, MO, USA). Seguidamente se agregaron esporas de *B. megaterium* ATCC9885 ($2,8 \times 10^8$ esporas/ml) y se llevó a pH $8,5 \pm 0,1$. Esta concentración de espora se obtuvo mediante la dilución de una suspensión Stock de esporas de *B. megaterium* ($5,6 \times 10^{10}$ esporas/ml) determinado por recuento con placas Petrifilm TM (3M, St. Paul, MN, USA). El medio de cultivo se fraccionó en cuatro alícuotas y una solución de cloranfenicol (CAP) se añadió para obtener concentraciones de 0, 1000, 1500 y 2000 µg CAP/l en el medio de cultivo.

Posteriormente, se añadió 100 µl de la preparación a cada pocillo de la microplaca usando un dispensador electrónico (Eppendorf Research[®] Pro, Hamburgo, Alemania). Las microplacas se sellaron con film aluminizado a 180°C y se conservaron a 4 °C hasta su uso.

V.2.2. Análisis de las curvas dosis-respuestas

A continuación, se ensayaron dieciséis repeticiones de doce concentraciones (0, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 300, 500 µg/l) de clortetraciclina (CTC, Sigma C-4881), oxitetraciclina (OTC, Sigma O-5750) y tetraciclina (TC, Sigma T-3258). La curva dosis respuesta se construyó para cada tetraciclina de modo tal de obtener al menos dos resultados negativos en las concentraciones más bajas y dos resultados positivos en los niveles más altos. Posteriormente, 50 µl de cada disolución de leche fortificada con antibiótico se agregó a cada pocillo de la

microplaca y se dejó a temperatura ambiente durante un tiempo de 1 hora para que difundan los antimicrobianos al agar medio. Las microplacas se lavaron tres veces con agua destilada con el propósito de retirar los vestigios de leche. Luego se sellaron con bandas adhesivas y se incubaron en un baño de agua flotante (Dalvo, Santa Fe, Argentina) a 45 ± 1 °C hasta que se produjo el cambio de color de los controles negativos (de negro a amarillo). Las interpretaciones visuales se efectuaron por tres personas calificadas para este tipo de lecturas. Los resultados de los análisis se evaluaron en términos de "negativo" o "positivo".

V.2.3. Análisis estadístico

Dado que la evaluación visual del bioensayo es una variable ordinal con dos niveles ("negativa" y "positiva"), resulta apropiado utilizar un modelo logístico para el análisis de estos datos. Los resultados se analizaron mediante el procedimiento paso a paso utilizando la opción de regresión logística de SAS (2001). El modelo de regresión logística empleado fue el siguiente:

$$L_{ijk} = \text{Logit} [A_{ijk}] = \beta_0 + \beta_1 [TCs]_i + \beta_2 [CAP]_j + \beta_{12} ([TCs]_* [CAP])_{ij} + \varepsilon_{ijk} \quad (\text{Ec } 1)$$

Donde: L_{ijk} = variable dependiente o respuesta lineal del modelo logístico; $[P_{ijk}] = [P_p / (1 - P_p)]$ relación de probabilidad de una respuesta "positiva"/ probabilidad de una respuesta "negativa"; $[TCs]_i$ = efecto de las concentraciones de tetraciclina ($i= 1, 2, \dots, 12$ concentraciones), $[CAP]_j$ = efecto de las concentraciones de cloranfenicol ($j= 0, 1000, 1500$ o $2000 \mu\text{g/l}$), $([TC]_* [CAP])_{ij}$ = efecto de la interacción entre las concentraciones de tetraciclina y cloranfenicol; $\beta_0, \beta_1, \beta_2,$ y β_{12} = coeficientes

estimados para interceptar términos, tetraciclina, cloranfenicol y la interacción entre tetraciclina y cloranfenicol, respectivamente; y ε_{ijk} = error residual. Los límites de detección del bioensayo se calcularon como la concentración de antibiótico que produce 95% de la frecuencia positiva.

V.3. Resultados

El análisis estadístico de los datos señala que los términos [CAP] y [TCs] fueron significativos para las tres tetraciclinas analizadas ($p < 0,05$); sin embargo, su interacción [CAP]*[TCs] no fue significativa ($p > 0,05$). Este hecho indica que CAP no produce un efecto sinérgico con las tetraciclinas analizadas con este bioensayo (Nagel et al., 2011; Tumini et al., 2015). Valores “ χ^2 ” altos para CAP ($\chi^2_{CTC} = 199,02$; $\chi^2_{OTC} = 204,68$; $\chi^2_{TC} = 134,23$) mostró que la incorporación de CAP en el medio de cultivo mejora la sensibilidad del bioensayo para la detección de TCs en leche, es decir, produce un efecto aditivo.

Los coeficientes calculados para los factores que se mostraron efectos significativos al modelo de regresión logística se presentan en la Tabla V.1. Los porcentajes de concordancia fueron adecuados (CTC= 88,5%; OTC= 93,3%; TC= 89,8%) demostrando un buen ajuste mediante el uso de este modelo logístico. El coeficiente β_1 indica un aumento en la frecuencia de los resultados positivos en la medida que se incrementa la concentración de TC en la leche. Estos coeficientes mostraron que *B. megaterium* tiene sensibilidad similar para la detección de los tres antibióticos en leche, ya que los valores β_1 fueron similares ($\beta_{1CTC} = 0,0534$; $\beta_{1OTC} = 0,0730$; $\beta_{1TC} = 0,0570$). El coeficiente “ β_2 ” evidencia el efecto antimicrobiano de

CAP; los valores obtenidos también resultaron similares para las tres TC ($\beta_{2CTC}= 0,0049$; $\beta_{2OTC}= 0,0058$; $\beta_{2TC}= 0,0037$), hecho que evidencia un comportamiento antimicrobiano similar del CAP para las tetraciclinas.

Tabla V.1. Modelos de regresión logística que representan TC y CAP efectos sobre la respuesta bioensayo

TCs	$L = \log [P] = \beta_0 + \beta_1 [TCs] + \beta_2 [CAP]$	C%
Clortetraciclina	$L = -12,436 + 0,0534 * [CTC] + 0,0049 * [CAP]$	88,5
Oxitetraciclina	$L = -16,111 + 0,0730 * [OTC] + 0,0058 * [CAP]$	93,3
Tetraciclina	$L = -12,137 + 0,0570 * [TC] + 0,0037 * [CAP]$	90,8

TCs: tetraciclinas; CAP: cloranfenicol; C%: coeficiente de concordancia.

La Figura V.1 presenta las curvas dosis respuestas confeccionadas mediante los coeficientes calculados con el modelo de regresión logística (β_0 , β_1 y β_2). Se visualiza el efecto de [TC] y [CAP] sobre la frecuencia relativa de los resultados positivos en este bioensayo. La frecuencia de los resultados positivos aumenta cuando se incrementan las concentraciones de antibióticos en leche. La adición de CAP al medio de cultivo desplaza las curvas dosis respuesta a niveles de detección más bajos (Nagel et al., 2011; tumini et al., 2015). Los límites de detección de los bioensayos para cada tetraciclina y diferentes niveles de CAP (Tabla V.2) se calcularon mediante la aplicación del modelo de regresión logística como la concentración que produce un 95% de frecuencia relativa de resultados positivos. Además, la Tabla V.2 muestra los LMR establecidos por la legislación.

La incorporación de CAP al medio de cultivo (0-2000 $\mu\text{g/l}$) disminuye los límites de detección de las TC del bioensayo (CTC: desde 290 hasta 105 $\mu\text{g/l}$; OTC: desde 260 hasta 100 $\mu\text{g/l}$; TC: desde 268 hasta 134 $\mu\text{g/l}$). Cuando el

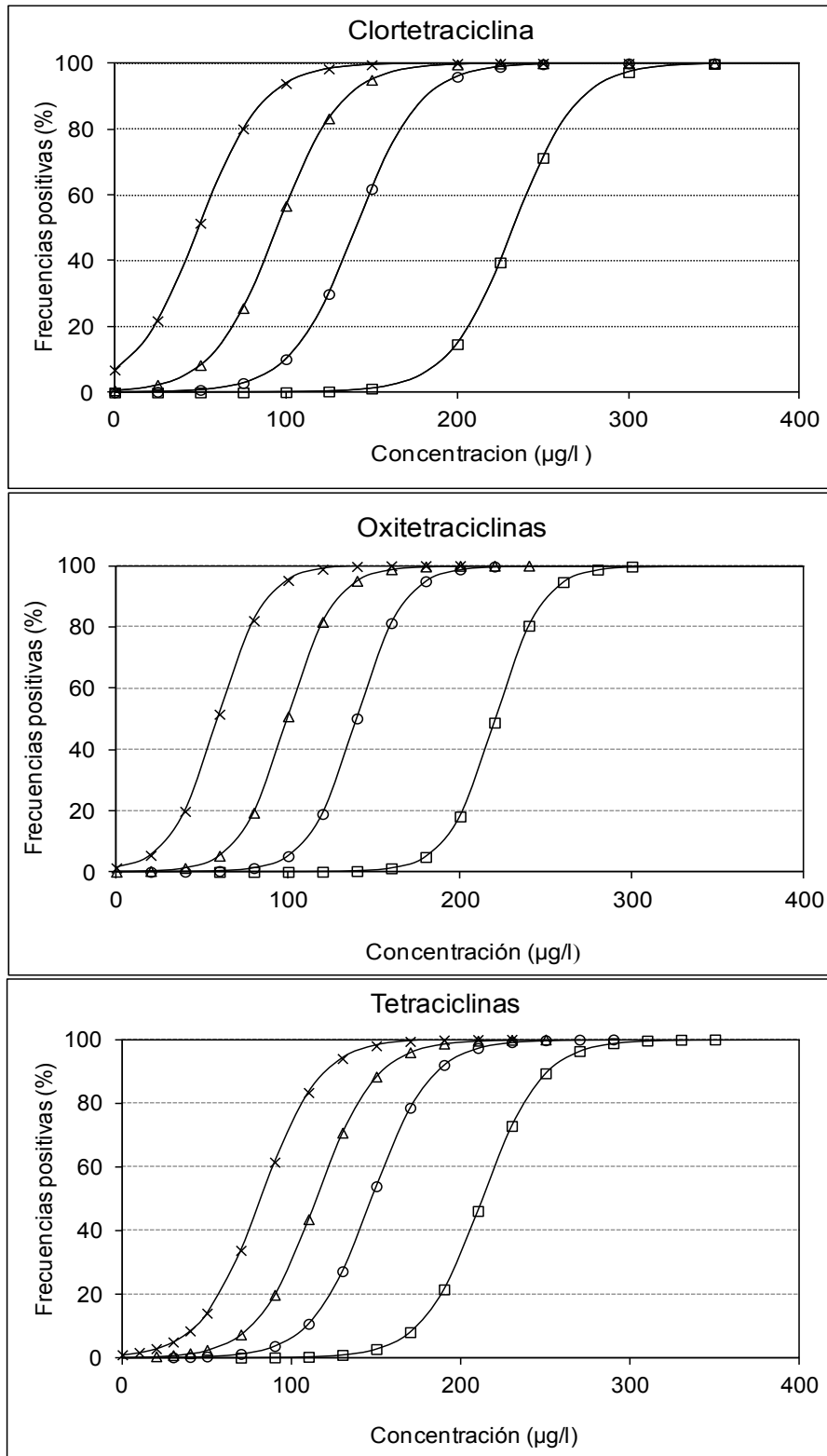


Fig V.1. Curvas dosis-respuestas de las tetraciclinas para las diferentes concentraciones de cloranfenicol (□CAP: 0 µg/l; ○CAP: 1000 µg/l; △CAP: 1500 µg/l; ×CAP: 2000 µg/l).

Tabla V.2. Efecto de cloranfenicol sobre los límites de detección ($\mu\text{g/l}$) de tetraciclinas en leche.

TCs	Concentración CAP ($\mu\text{g/l}$)				LMRs ($\mu\text{g/l}$)
	0	1000	1500	2000	
Clortetraciclina	290	198	154	105	100
Oxitetraciclina	260	182	140	100	100
Tetraciclina	268	199	167	134	100

TCs: Tetraciclinas; CAP: cloranfenicol; LMRs: Límite máximo de residuos.

bioensayo se fortifica con 2000 $\mu\text{g/l}$ de CAP, los niveles detectados resultan similares a los LMR establecidos por la legislación (100 $\mu\text{g/l}$).

Los métodos microbiológicos tradicionales desarrollados en placas de Petri requieren un período de incubación comprendidos entre las 18 y 24 horas. Mediante el empleo de estos métodos, Nouws et al., (1999) reportaron sensibilidades de 100 $\mu\text{g/l}$ para TC, 100 $\mu\text{g/l}$ de OTC y 15 $\mu\text{g/l}$ de CTC cuando utilizan *B. cereus*. En un estudio similar, Raspor Lainscek et al., (2014) determinaron 100 $\mu\text{g/l}$ de TC, 100 $\mu\text{g/l}$ para OTC, 80 $\mu\text{g/l}$ de CTC en leche cuando utilizan *B. cereus* ATCC11778 en el protocolo STAR. Por su parte, Gaudin et al., (2004) detectaron concentraciones más altas para OTC (250 $\mu\text{g/l}$) y TC (250 $\mu\text{g/l}$) y una buena sensibilidad para CTC (50 $\mu\text{g/l}$). En leche de oveja, Althaus et al (2009) obtuvieron bajos niveles de detección para tetraciclina en un método de placa de Petri con *B. cereus* (DL_{CTC} : 25 $\mu\text{g/l}$; DL_{OTC} : 75 $\mu\text{g/l}$; DL_{TC} : 85 $\mu\text{g/l}$).

Posteriormente, Nagel et al. (2011) optimizaron un bioensayo en placas de microtitulación utilizando la misma bacteria test con la incorporación de 470 μg CAP/l. Estos autores detectaron 100 $\mu\text{g/l}$ de OTC y 109 $\mu\text{g/l}$ de TC, pero no

detectaron CTC (300 µg/l) a niveles del LMR (100 µg/l). Por el contrario, el bioensayo que emplea *B. megaterium* desarrollado en este trabajo tiene una mejor sensibilidad para detectar CTC (105 µg/l). Además, los límites de detección calculados con las lecturas visuales (105 µg/l de CTC, 100 µg/l de OTC y 134 µg/l de TC) son similares a los calculados por Tumini et al. (2015) cuando utilizan un lector fotométrico para interpretar los resultados de un bioensayo con esporas de *B. pumilus* (DL_{CTC}: 117 µg/l; DL_{OTC}: 142 µg/l; DL_{TC}: 105 µg/l).

V.4. Conclusión

El presente bioensayo de inhibición microbiológica con esporas de *B. megaterium* y 2000 µg/l de CAP detecta niveles adecuados de tetraciclinas en leche en un tiempo de respuesta de 5 horas. Además, este método proporciona una respuesta dicotómica que facilita la interpretación de los resultados porque no requiere de un lector fotométrico. Por otra parte, este bioensayo puede ser incorporado en un sistema microbiológico multiresiduo para la identificación de TCs en leche con el fin de seleccionar aquellas muestras positivas para una posterior confirmación inequívoca de estas moléculas utilizando técnicas de cromatografía de alta resolución tales como HPLC-MS- MS.

V.5. Agradecimientos

Este trabajo de investigación ha sido llevada a cabo como parte de los proyectos CAI + D`11 (PI 501 201101 00575 LI, H.C.D. Resol 205/13 Universidad Nacional

del Litoral, Santa Fe, Argentina) y PICT 2011-368 (Res. 140/12 N°, Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica).

Capítulo VI

Método microbiológico con *Bacillus licheniformis* para la fácil detección de quinolonas en leche.

Tumini M¹, Nagel O¹, Molina P², Althaus R¹

¹Cátedra de Biofísica, Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral, R.P.L. Kreder 2804, 3080 Esperanza, Argentina.

²Instituto de Ciencia y Tecnología Animal, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera 14, 46071 Valencia, España.

Resumen

En este trabajo se propone un método microbiológico en placas de microtitulación para la detección de residuos de quinolonas en leche. El método utiliza esporas de *Bacillus licheniformis* en medio de cultivo con una combinación de indicadores redox que brinda una respuesta en un tiempo de 5,5 horas. Este método permite detectar 92 µg/l de ciprofloxacina, 63 µg/l de danofloxacina, 109 µg/l de enrofloxacina, 101 µg/l de marbofloxacina y 109 µg/l de sarafloxacina en leche. Además, este bioensayo resulta fácil de elaborar para su implementación en un laboratorio de control de residuos, adopermitiendo de esta forma el análisis de un elevado número de muestras a un bajo costo. Debido a su buena sensibilidad hacia las quinolonas, este ensayo se puede utilizar como una prueba complementaria de los métodos microbiológicos comerciales y de ese modo mejorar la seguridad alimentaria.

VI.1. Introducción

Las quinolonas son antibióticos sintéticos que poseen adecuada actividad frente a bacterias gram-negativas y gram-positivas (Kaartinen et al., 1995; Hammer y Heeschen, 1995). Estos antibióticos se utilizan en medicina veterinaria para el tratamiento de neumonías, infecciones urinarias y gastrointestinales, entre otras (Jiménez Lozano et al., 2002).

El aumento en el uso de estos antibióticos en producción animal (Di Corcia y Nazzari, 2002; Stolker, 2005) produce como consecuencia un aumento en la frecuencia de estos residuos en los productos y subproductos derivados de los animales tratados (Van Hoof et al, 2005). Por otra parte, la presencia de estas sustancias en los alimentos constituye una amenaza potencial para la salud de los consumidores debido a la aparición de bacterias resistentes a las quinolonas, tales como *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Campylobacter jejuni*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* (Acar y Goldstein, 1997; Drlica, 2003; Silbergeld et al., 2008; De Jong et al, 2012; García Migura et al., 2014). Estas sustancias también pueden causar alteraciones en la calidad de los productos lácteos fermentados (Yoon et al, 2003) por la inhibición de los cultivos de *Streptococcus thermophilus* (Chen et al., 2012).

Para garantizar la seguridad alimentaria, las autoridades encargadas del control de los residuos han establecido el Límite Máximo de Residuos (LMR) en algunos alimentos de origen animal, dentro de los cuales se destaca la leche (Commission Regulation, 2010; Codex Alimentarius, 2010). Así mismo, la Unión

Europea ha establecido un LMR de 30 µg/l para danoflaxacina, 75 µg/l para marbofloxacina y 100 µg/l para ambos enrofloxacina y ciprofloxacina.

Cabe señalar que los actuales métodos microbiológicos comerciales que utilizan *Bacillus stearothermophilus* no detectan residuos de quinolonas en leche (Molina et al., 2003; Montero et al., 2005; Linage et al., 2007) y por consiguiente, no garantizan la seguridad alimentaria de los productos lácteos. Por lo tanto, y debido a la ausencia de un método de cribado con capacidad para detectar la totalidad de los antibióticos que pueden aparecer en la leche, Nagel et al. (2012) propusieron el uso de métodos microbiológicos complementarios a los actuales métodos comerciales.

Algunos autores han sugerido el uso de métodos microbiológicos en placas de Petri con *E. coli* para detectar residuos de quinolonas en leche (Nouws et al., 1999; Gaudin et al., 2004, Althaus et al, 2009; Pikkemaat, 2009). Sin embargo, estos métodos requieren personal capacitado en microbiología para preparar las placas de Petri con células vegetativas que tienen una vida útil corta. Además, los períodos de incubación de estos métodos suelen ser prolongados (24 horas).

Para evitar algunas de estos inconvenientes, Appicciafuoco et al. (2015) analizaron el crecimiento de *E. coli* mediante lecturas turbidimétricas con un lector bio-óptico. El uso de este método acorta el tiempo de incubación (3-4 horas), a pesar de utilizar células vegetativas. Por otro lado, Nagel et al., (2013) propusieron un bioensayo microbiológico en placas de microtitulación que contienen esporas de *Bacillus subtilis*. No obstante, este bioensayo presenta especificidad cruzada con

otros antibióticos tales como penicilina "G", oxitetraciclina, eritromicina, espiramicina, tilosina y sulfamidas.

Debido a este inconveniente, el presente estudio tiene por objetivo desarrollar un bioensayo microbiológico que utilice esporas de *Bacillus licheniformis* para la detección de residuos de quinolona en leche, de modo tal de poder utilizarlo para el monitoreo rutinario de muestras de leche en los laboratorios lactológicos encargados de la seguridad alimentaria.

VI.2. Materiales y Métodos

VI.2.1. Elaboración del Bioensayo

El medio de cultivo Mueller Hinton Agar (38 µg/l, Biokar[®], Ref 10272, Francia.) enriquecido con glucosa (10 µg/l, Sigma Aldrich[®], Ref G8270, USA) y ajustado a un pH de $7 \pm 0,1$; se esterilizó a 121°C durante 15 minutos. La suspensión stock de esporas de *Bacillus licheniformis* ATCC14580 ($4,2 \cdot 10^{10}$ esporas/ml) se cuantificó utilizando el método PetrifilmTM (3M, St. Paul, MN, USA). Al medio de cultivo, se agregó una combinación de indicadores redox (Trifenil tetrazolium 200 g/l Sigma Aldrich[®], Ref. 88775, USA y Azul de Toluidina 10 g/l Sigma Aldrich[®], Ref. 89640, USA) y la suspensión madre de esporas (concentraciones detalladas en cada experimento).

Posteriormente, 100 µl de medio de cultivo se dispensó en cada uno de los 96 pocillos de las placas de microtitulación utilizando una pipeta multicanal electrónica (Eppendorf Research[®] Pro, Eppendorf, Alemania). Después de la

preparación, cada microplaca se selló con un film de polipropileno aluminizada y las placas se mantuvieron a 4 °C hasta su uso en los estudios posteriores que se detallan a continuación.

VI.2.2. Análisis de las curvas dosis-respuesta

Para cada antibiótico, la curva dosis-respuesta se construyó siguiendo las directrices del Codex Alimentarius (2010). Para ello, se ensayaron 16 replicas de muestras de leche fortificada con 12 concentraciones diferentes de cada antibiótico (2 microplacas/antibiótico) de tal manera que las dos concentraciones más bajas dieron resultados negativos y las dos concentraciones más altas dieron resultados positivos.

Las disoluciones se prepararon utilizando muestras de leche libres de antibióticos según las recomendaciones del Codex Alimentarius (2010). Las muestras de leche se fortificaron con droga estándar Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA). Después, se añadieron 50 µl de cada disolución de antibióticos a cada pocillo de la microplaca. Posteriormente, se sellaron con una película adhesiva y se incubaron en baño de agua flotante (Dalvo, Santa Fe, Argentina) a 45 ± 1 °C hasta que cambio el color de los controles negativos (de azul claro a rosa). Finalmente, los bioensayos se retiraron del baño de agua y se lavaron tres veces con agua destilada para eliminar restos de leche.

Dado que los resultados del bioensayo se pueden interpretar visualmente y fotométricamente, para aumentar la precisión del cálculo de los límites de detección se efectuaron lecturas fotométricas de cada microplaca a 550 nm usando un lector

de microplacas ELISA (Biotek ELx800TM, Biotek Instrument Inc., Winooski, Vermont, USA). El porcentaje de las absorbancias relativas se calculó empleando la siguiente ecuación:

$$A = (A_x - A_0) / (A_{100} - A_0) \quad (\text{Ec 1})$$

Donde: A: absorbancia relativa, A_x = absorbancia de la muestra de leche con una concentración 'x' de ATB; A_0 : absorbancia de ATB libre de leche (control negativo) y A_{100} : absorbancia de la muestra de leche que produjo 100% de resultados positivos. Posteriormente, se analizaron estos valores de absorbancia relativa usando el procedimiento logístico del paquete estadístico Statgraphics Plus Centurion® versión 5.1 (2008). Entonces, para cada antibiótico, los límites de detección se calcularon como la concentración de ATBs que produce 45% de la absorbancia relativa (Althaus et al., 2003).

VI.2.3. Efecto de la concentración de esporas sobre la respuesta del bioensayo

En este estudio se analizó el efecto de la concentración de *B. licheniformis* sobre el tiempo de respuesta del bioensayo y los límites de detección de ciprofloxacina. Este análisis se realizó utilizando cinco suspensiones de *B. licheniformis* ($1,7 \cdot 10^5$; $8,4 \cdot 10^5$; $4,5 \cdot 10^6$; $2,1 \cdot 10^7$ y $1,1 \cdot 10^8$ esporas/ml) preparadas en un medio de cultivo mediante la dilución de la suspensión madre de esporas. Posteriormente, la curva dosis-respuesta de ciprofloxacina (Cipro: 0, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 300, 400, 500 y 600 $\mu\text{g/l}$) se analizó de acuerdo con la sección VI.2.2. El modelo de

regresión logística se utilizó para construir las curvas dosis-respuesta y para calcular los límites de detección.

$$L_{ijk} = \text{Logit} [A_{ijk}] = \beta_0 + \beta_1 \text{CIPRO}_i + \beta_2 \text{Log} S_j + \beta_3 \text{Log} S_j^2 + \varepsilon_{ijk} \quad (\text{Ec } 2)$$

Donde L_{ijk} = Modelo logístico lineal; A_{ijk} = absorbancia relativa (Ec 1); β_0 = intercepto; β_1 , β_2 , β_3 = parámetros estimados para el modelo; CIPRO = concentración de ciprofloxacina ($i = 1, 2, \dots, 12$ concentraciones); $\text{Log } S_j$ = transformación logarítmica de la concentración de esporas; $\text{Log } S_j^2$ = cuadrado de la transformación logarítmica de la concentración de esporas y ε_{ijk} = error residual.

VI.2.4. Especificidad del bioensayo

Para este estudio, se utilizaron 196 muestras de leche de animales Holstein-Friesian no tratados ni medicamentados durante todo el experimento (Codex, 2010). Los valores de pH, composición química, recuento de células somáticas ($\text{SCC} < 400000$ células/ml) y recuento de bacterias ($\text{UFC} < 100000$ UFC/ml) fueron aceptables para el ganado lechero. La composición química, SCC y CFU se determinaron utilizando equipos automáticos Milko Scan FT-120 (Foss somática, USA), Fossomatic 90 (Foss eléctrica, USA) y BactoScan 8.000S (Foss eléctrica, USA), respectivamente. Los resultados se muestran en la Tabla VI.1.

Las muestras de leche se analizaron por triplicado con bioensayos que contienen *B. licheniformis* y Delvotest[®] SP-NT. Para este propósito, se añadieron 50 μl de muestras de leche en cada pocillo individual de ambos bioensayo (*B. licheniformis* y Delvotest[®] SP-NT) y después se incubaron en un baño de agua que

flotante a temperatura-tiempo para cada bioensayo (*B. licheniformis*: $45 \pm 1^\circ\text{C}$ -5,5 h; Delvotest[®] SP-NT: $64 \pm 1^\circ\text{C}$ -3 h).

Tabla VI.1. Composición química y parámetros higienicos de la leche de vaca Holstein-Friesian (n = 192)

Variable	Media	DE ^a	CV ^b	Rango
Ph	6,58	0,11	1,67	6,39-6,82
Grasa (%)	3,01	0,79	26,21	1,11-6,08
Proteina (%)	3,36	0,45	13,52	2,40-6,61
Lactosa (%)	4,83	0,55	11,34	3,71-5,39
SNG ^c (%)	9,03	0,45	5,02	7,31-9,78
ST ^d (%)	12,04	1,00	8,26	9,63-14,87
SCC ^e (x10 ³ /ml)	111	112	101	2-392
(log SCC)	4,81	0,48	9,93	3,30-5,59
CFU ^f (x10 ³ / ml)	50,20	19,02	37,89	13-99
(log CFU)	4,67	0,17	3,57	4,11-4,99

^aDesvio Estandar, ^bCoeficiente de Variacion (%), ^c Solidos no grasos, ^dSolidos totales, ^eRecuento de células somaticas, ^fRecuento de bacterias.

Para el estudio de la especificidad, se realizaron interpretaciones visuales de la respuesta bioensayo, lo que permite una clasificación dicotómica según la presencia (resultado positivo: color "azul claro") o ausencia (resultado negativo: color "rosa") de los inhibidores.

Para este propósito, las interpretaciones visuales se realizaron por tres personas calificadas y entrenadas previamente para estas lecturas. El cálculo de la especificidad del método se realizó considerando los resultados que presentaron al menos dos coincidencias de las interpretaciones visuales. Entonces, la especificidad se calculó utilizando la siguiente ecuación matemática:

$$\text{Especificidad} = (\text{muestras negativas/total}) \cdot 100 \text{ (Ec 3)}$$

VI.2.5. Límites de detección de quinolonas

Se preparó medio de cultivo con una concentración de esporas óptima como se detalló en el experimento anterior ($8,4 \cdot 10^5$ esporas de *B. licheniformis*/ml). Para determinar los límites de detección de cinco quinolonas en leche (ciprofloxacina, danofloxacina, enrofloxacina, marbofloxacina y sarafloxacina), 16 réplicas de 12 diluciones (0, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 300, 400, 500 y 600 µg/l) de cada antibiótico se ensayaron de acuerdo con lo detallado en el apartado VI.2.2. Los bioensayos se incubaron a 45 ± 1 °C durante 5,5 horas. Un modelo de regresión logística se utilizó para modelar la curva dosis-respuesta y para calcular los límites de detección:

$$L_{ij} = \text{Logit} [A_{ij}] = \beta_0 + \beta_1 [ATB]_i + \varepsilon_{ij} \text{ (Ec 4)}$$

Donde: L_{ij} = modelo lineal logístico; $[A_{ij}]$ = absorbancia relativa; $[ATB]_i$ = efecto de la concentración de antibiótico ($i = 1, 2, \dots, 12$ concentraciones); β_0 y β_1 = coeficientes estimado y ε_{ij} = error residual.

VI.2.6. Especificidad cruzada con otros antibióticos

Se calcularon los límites de detección de ocho betalactámicos (amoxicilina, ampicilina, cloxacilina, oxacilina, penicilina 'G', cefoperazona, ceftiofur y cefalexina), tres aminoglucósidos (kanamicina, neomicina y estreptomycin), tres macrólidos (eritromicina, tilosina y tilmicosina), y cuatro sulfamidas (sulfadiazina,

sulfadimetoxine, sulfametoxazol y sulfatiazol). Para cada antibiótico, la curva dosis-respuesta se construyó como se explica en el apartado VI.2.2. Los límites de detección se calcularon mediante un modelo de regresión logística descrito anteriormente.

VI.3. Resultados y discusión

VI.3.1. Efecto de la concentración de esporas sobre la respuesta del bioensayo

La opción paso a paso del modelo de regresión logística indicó diferencias significativas ($p < 0,05$) tanto en el término lineal ($\log S$; $\chi^2 = 5,3062$) como para el término cuadrático ($\log S$; $\chi^2 = 4,0738$) de la concentración de esporas, según el siguiente modelo:

$$\text{Logit } P = 13,844 + 0,0123[CIPRO] - 4,4993\text{Log}[S] + 0,2989(\text{Log}[S])^2 \quad C = 89,7\%$$

Esta ecuación indica que un aumento de la concentración de esporas disminuye la frecuencia de resultados positivos en el bioensayo, que equivale a establecer que aumenta los límites de detección del método. El bioensayo que contiene $8,4 \cdot 10^5$ esporas de *B. licheniformis*/ml tiene un límite de detección adecuado (LD: 92 $\mu\text{g/l}$) y un tiempo de respuesta baja (5,5 horas) en comparación con las otras concentraciones de esporas.

VI.3.2. Especificidad del bioensayo

La especificidad obtenida para el bioensayo con *B. licheniformis* fue de 98,9% (dos muestras positivas), mientras que para Delvotest[®] SP-NT fue 99,4% (una muestra

positiva). Del mismo modo, Sischo y Burns (1993) y de Charm y Zomer (1995) informaron especificidades de 98% y 95%, respectivamente, cuando se evalúa el método Delvotest® SP con muestras de leche libres de antibióticos.

VI.3.3. Límites de detección de las quinolonas

Las ecuaciones logísticas y las curvas dosis-respuesta para cada quinolona analizada se presentan en la Tabla VI.2 y en la Fig. VI.1, respectivamente. Los porcentajes de concordancia fueron adecuados (86,2%-97,8%), lo que indica un buen ajuste mediante la implementación del modelo logístico. Los coeficientes " β_1 " muestran la pendiente de la curva dosis-respuesta, marcando un aumento en el porcentaje de la absorbancia relativa cuando aumenta la concentración de quinolonas en leche. Los altos valores de este coeficiente (entre 0,014 y 0,049) indican que *B. licheniformis* tiene aceptable sensibilidad a estas moléculas. Del mismo modo, Nagel et al. (2013) obtuvieron coeficientes similares para ciprofloxacina (0,073), enrofloxacina (0,046) y marbofloxacina (0,060) en un bioensayo que contiene esporas de *Bacillus subtilis*.

Tabla VI.2. Modelos de regresión logística que representan los efectos de las concentraciones de quinolonas en un bioensayo con *Bacillus licheniformis*

Quinolonas	Logit [A] = $\beta_0 + \beta_1$ [ATB]	C
Ciprofloxacina	L= -2,528+0,025*[ATB]	86,2
Danofloxacina	L= -3,305+0,049*[ATB]	97,4
Enrofloxacina	L= -1,726+0,014*[ATB]	90,0
Marbofloxacina	L= -1,922+0,017*[ATB]	97,8
Sarafloxacina	L= -3,276+0,028*[ATB]	97,3

Logit: Modelo logístico; [A]= absorbancia relativa; ATB: concentración de antibióticos; C: Porcentaje de concordancia (%).

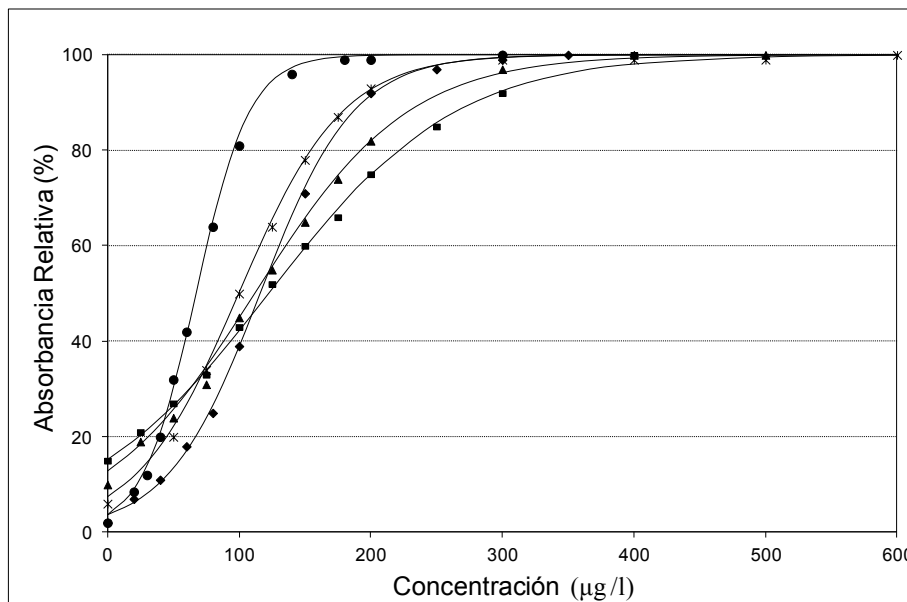


Fig. VI.1. Curvas dosis-respuesta de quinolonas para el bioensayo con *B. licheniformis* (× ciprofloxacina; ● danofloxacina; ■ enrofloxacina; ▲ marbofloxacina; • sarafloxacina).

La Tabla VI.3 muestra los límites de detección para las cinco quinolonas ensayadas. De ella se aprecia que el método detecta ciprofloxacina (92 µg/l), danofloxacina (63 µg/l), enrofloxacina (109 µg/l), marbofloxacina (101 µg/l) y sarafloxacina (109 µg/l) en leche en niveles cercanos a los LMR. Estos límites fueron mayores que los determinados por Gaudin et al. (2004) y Nouws et al. (1999) en los ensayos de placa de Petri con células de *E. coli*. Estos autores obtienen valores de 10 µg/l (ciprofloxacina), 15 µg/l (danofloxacina) y rangos de 4-20 µg/l (enrofloxacina) y 5-30 µg/l (marbofloxacina) después de un periodo de incubación de 24 horas.

En un bioensayo de respuesta dicotómica con esporas de *Bacillus subtilis* en microplacas, Nagel et al. (2013) detectaron 150 µg/l (ciprofloxacina) y 160 µg/l (enrofloxacina y marbofloxacina) en 6 horas. Estos valores son ligeramente

superiores a los resultados alcanzados con bioensayo conteniendo *B. licheniformis* (ciprofloxacino: 92 µg/l; enrofloxacin: 109 µg/l y marbofloxacina 101 µg/l) que se exponen en la Tabla VI.3. Los valores calculados para la enrofloxacin y ciprofloxacina (Tabla VI.3) son similares a los reportados por Appicciafuoco et al. (2015) en su análisis de crecimiento de *E. coli* por medio de un lector bio-óptico, mientras que marbofloxacina y danofloxacin deben estar al menos 2 y 4 veces su MRL para ser detectados por este método bio-óptico.

Tabla VI.3. Límites de detección para el bioensayo con *Bacillus licheniformis*

Quinolonas	DL	MRLs
Ciprofloxacina	92	100
Danofloxacin	63	30
Enrofloxacin	109	100
Marbofloxacina	101	75
Sarafloxacin	109	-

VI.3.4. Especificidad cruzada de otros antibióticos

La implementación del modelo de regresión logística señala que los coeficientes de concordancia fueron adecuados, comprendidos entre el 81,3% (sulfametoxazol) y 98,3% (tetraciclina). Los coeficientes " β_1 " calculados para los betalactámicos (0,0018-0,0089), aminoglucósidos (0,00003-0,0004), macrólidos (0,0025-0,0042), sulfamidas (0,0011-0,0017) y tetraciclinas (0,0004-0,0030) fueron inferiores a los determinados para las quinolonas, poniendo de manifiesto la baja especificidad cruzada de este bioensayo para otros antimicrobianos presentes en la leche. Por el contrario, Nagel (2013) obtuvo coeficientes " β_1 " más altos para la penicilina "G" (2,0317), oxitetraciclina (0,0391), eritromicina (0,2741), espiramicina (0,0306),

tilosina (0.1161) y sulfamidas (0,0195 hasta 0,0392) en un bioensayo con *B. subtilis*, destacando que dicho bioensayo presenta problemas de especificidad cruzada con estas moléculas.

El perfil de detección de los antibióticos analizados para el bioensayo desarrollado en este trabajo se visualiza en la Fig. VI.2.

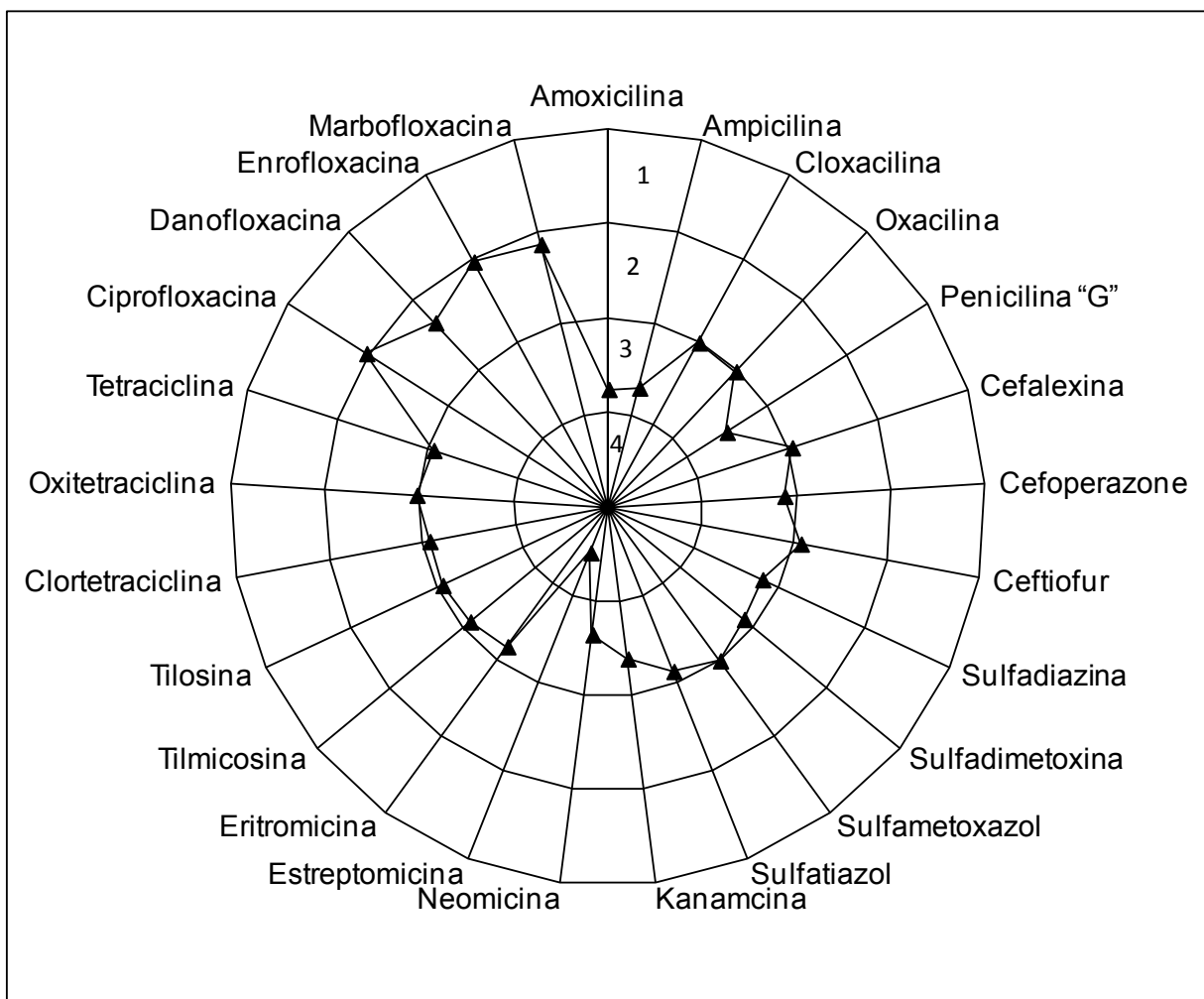


Fig. VI.2. Patrones de detección (Log DL/LMR) de los antibióticos para el bioensayo con *B. licheniformis*. Polígono 1= 0,1 LMR, polígono 2= LMR, polígono 3= 10 MRL y polígono 4= 100 LMR. LD: Límite de detección; LMR: límites máximos de residuos

Este diagrama poligonal representa la transformación logarítmica del límite de detección (DL) con relación a los respectivos LMR (Log DL/LMR) de cada molécula de antibiótico en leche. Las coordenadas de origen corresponden a las concentraciones más altas (infinita). Cuando los límites de detección relativos disminuyen, su representación se encuentra en los polígonos exteriores. Por lo tanto, el polígono exterior "1" representa las concentraciones de 0,1 veces el LMR, el polígono "2" corresponde a niveles iguales al LMR, mientras los polígonos "3" y "4" representan muestras de leche que contienen 10 y 100 veces el LMR, respectivamente. Esta figura demuestra que el bioensayo con esporas de *B. licheniformis* detecta quinolonas en concentraciones cercanas a los LMR (polígono "2"), mientras que otros antibióticos muestran los límites de detección más altos (10 a 100 veces el LMR), revelando así una especificidad cruzada escasa o limitada de este bioensayo.

VI.4. Conclusión

El bioensayo microbiológico que contiene $8,4 \cdot 10^5$ esporas de *B. licheniformis*/ml proporciona una respuesta en un tiempo de 5,5 horas y permite la detección de quinolonas en leche a niveles similares a los LMR. Además, este bioensayo no muestra problemas de especificidad cruzada con otros grupos de antibióticos (betalactámicos, aminoglucósidos, macrólidos, tetraciclinas y sulfamidas). Por lo tanto, este método microbiológico sensible para las quinolonas puede incorporarse como un método complementario de los actuales métodos microbiológicos comerciales debido a que contribuiría a mejorar la seguridad alimentaria. Por otra

parte, este bioensayo puede integrar un sistema microbiológico multi-residuos para clasificar los residuos de quinolonas en leche antes de una cuantificación posterior por técnicas cromatográficas de HPLC.

VI.5. Agradecimientos

Este trabajo de investigación se llevó a cabo como parte de los Proyectos CAI + D`11 PI 501 20110100575 LI, H.C.D. Resol 205/13, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina) y la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, PICT 2011-368 Res. N ° 140/12.

Capítulo VII

**Detección de betalactámicos en leche mediante *Geobacillus kaustophilus* y
Geobacillus stearothermophilus.**

Tumini M¹, Nagel O¹, Molina MP², Althaus RL¹

¹ Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral, R.P.L. Kreder
2805- (3080) Esperanza, Santa Fe, Argentina.

² Instituto de Ciencia y Tecnología Animal, Universidad Politécnica de Valencia,
Camino de Vera s/n (46021) Valencia, España.

Jornada de Ciencia y Tecnología Cytal 2016. En prensa.

Resumen

Los antibióticos betalactámicos se utilizan preferentemente para el tratamiento de vacas con mastitis. La Federación Internacional de Lechería recomienda métodos microbiológicos que utilicen *Geobacillus stearothermophilus* para el control de estos antimicrobianos en leche. Sin embargo, este microorganismo no presenta adecuados límites de detección para todos los betalactámicos, por lo que se plantea llevar a cabo estudios con otras especies de *Geobacillus* a fin de detectar betalactámicos a valores inferiores a los LMRs. Por ello, el objetivo del trabajo fue evaluar y comparar los límites de detección de betalactámicos mediante dos bioensayos que contienen *Geobacillus kaustophilus* y *Geobacillus stearothermophilus*. Se elaboraron 16 bioensayos en placas de microtitulación conteniendo esporas de *G. kaustophilus* ($1,6 \cdot 10^5$ esporas/ml) y 16 bioensayos con *G. stearothermophilus* ($2,0 \cdot 10^6$ esporas/ml) en medio agarizado. El medio de cultivo estuvo compuesto por Agar Mueller Hinton (38 g/l), glucosa (10 g/l), Negro Brillante (200 mg/l) y Azul de toluidina (10 mg/l). Se calcularon los límites de detección de penicilina, amoxicilina, ampicilina, oxacilina, cloxacilina, cefalexina, cefoperazone y ceftiofur en leche. Se concluye que el bioensayo con *G. kaustophilus* presenta límites de detección más elevados que bioensayo con *G. stearothermophilus*. Se deberían investigar otras bacterias termofílicas esporuladas para mejorar los límites de detección.

Palabras Clave: bioensayo; test microbiológico; leche; *Geobacillus kaustophilus*; *Geobacillus stearothermophilus*

VII.1. Introducción

El tratamiento del ganado vacuno lechero con antibióticos (ATBs) betalactámicos durante el periodo de lactación constituye una práctica habitual para el control de mastitis (Diserens et al. 2005, Samanidou et al. 2009). Esta patología es muy frecuente y representa una de las principales causas en la aparición de residuos de betalactámicos en leche (Erskine et al. 2003, Dalton 2006, Kress et al. 2007).

La presencia de estas sustancias puede ocasionar serios inconvenientes para los consumidores, dentro de las cuales se destacan sensibilización producida por una ingestión repetida de pequeñas dosis de antibióticos, procesos alérgicos que en casos extremos pueden producir anafilaxia, perturbaciones pasajeras en la flora intestinal, reacciones de intoxicación frente a determinadas moléculas de antibióticos (Wilke et al. 2005, Demoly y Romano 2005, Khaskheli, 2008). También, la industria puede verse perjudicada debido a que las bacterias lácticas utilizadas en la fabricación de productos fermentados son afectadas por los residuos de antibióticos provocando retrasos en la acidificación, dificultad del cuajado y la maduración de los quesos (Packham et al. 2001, Berruga et al. 2007, Nawas et al. 2011).

A fin de evitar estos inconvenientes, diferentes legislaciones, tales como el Codex Alimentarius (2010), la Directiva de la Unión Europea (Commission Regulation 2010) y el Código Alimentario Argentino (CAA 2014) han establecido los Límites Máximos de Residuos (LMRs) a fin de garantizar la inocuidad de la leche.

Para el control rutinario de residuos de medicamentos en alimentos se utilizan comúnmente métodos de inhibición microbiológica, ya que permiten el análisis de un elevado número de muestras en un tiempo relativamente corto y a bajo costo (Toldra y Reid 2006, IDF 2010). La Federación Internacional de Lechería (IDF 2010) recomienda métodos microbiológicos que utilicen *Geobacillus stearothermophilus* para el control de antibióticos. Sin embargo, este microorganismo no presenta adecuados límites de detección (LD) para todos los betalactámicos empleados en la terapéutica ganadera, por lo que se plantea la necesidad de llevar a cabo estudios de límites de detección de otras especies de *Geobacillus* a fin de detectar betalactámicos a niveles inferiores a los LMRs. Por este motivo, el presente trabajo presenta como objetivo evaluar y comparar los límites de detección de dos bioensayos elaborados con *Geobacillus kaustophilus* y *Geobacillus stearothermophilus* como bacteria test para la detección de residuos de betalactámicos en leche.

VII.2. Materiales y Métodos

VII.2.1. Elaboración de los bioensayos

Se utilizó un medio de cultivo constituido por Agar Mueller Hinton (38 g/l, pH=7,0±0,1; Biokar, Francia, Ref. 10272) glucosa (10 g/l, Anhedra[®], Argentina, ref. 6837), mezcla de indicadores redox (200 mg/l Negro Brillante, Sigma Aldrich[®], Ref. 211842; 10 mg/l Azul de toluidina, Anhedra[®], Argentina, Ref. 6356). Posteriormente, se dividió en dos alícuotas que fueron inoculadas independientemente con $2,0 \cdot 10^6$ esporas/ml de *Geobacillus stearothermophilus* C-

953 y $1,6 \cdot 10^5$ esporas/ml de *Geobacillus kaustophilus* DSM 7263. Se dispensó un volumen de 100 μ l/pocillo en placas de microtitulación utilizando un dispensador electrónico multicanal (Research® Pro, Eppendorf, Alemania). Los bioensayos fueron sellados con bandas aluminizadas de polipropileno y se conservaron refrigeradas a 4 °C hasta el momento de uso. Se efectuaron un total de 16 bioensayos por cada bacteria-test (32 bioensayos en total).

VII.2.2. Disoluciones de fármacos y muestras adicionadas de antibióticos

Se prepararon disoluciones en el momento de efectuar los análisis, que fueron utilizadas dentro de las dos horas posteriores a su elaboración, a fin de evitar cualquier desvanecimiento debido al tiempo o la acción de la luz.

Para su preparación se pesó en una balanza analítica, 0.0100 g de cada sustancia (teniendo en cuenta la pureza informada por la casa fabricante), y se disolvió en un matraz de 10 ml utilizando el disolvente más adecuado para cada sustancia. De esta manera se obtuvieron las soluciones “stock” con una concentración de 1000 mg/l. A partir de esta se prepararon diluciones de cada antibiótico que correspondieron a concentraciones de 100, 10 y 1 mg/l.

Las muestras de leche adicionadas de ATBs se prepararon en matraces aforados de 10 ml. Para cada caso se tomó, con una micropipeta, la cantidad necesaria de las diluciones de antibiótico preparadas anteriormente (100, 10 y 1 mg/l, “stock”), siguiendo las recomendaciones de la IDF (IDF 2002) y el Codex Alimentarius (Codex 2010) que indican emplear un volumen de las soluciones de ATBs inferior al 1% del volumen de disolución final. Para la preparación de las

disoluciones de leche se utilizó leche libre de antibióticos obtenida a partir de animales individuales, no tratados con medicamentos durante el experimento (IDF 2002).

Para el estudio de límites de detección de cada antimicrobiano se construyeron curvas dosis-respuestas para la cual se ensayaron 16 repeticiones de 12 concentraciones para cada uno de los 8 antibióticos betalactámicos (Sigma Aldrich): amoxicilina (A-8523), ampicilina (A-9518), cloxacilina (C-9393), oxacilina (O-1002), penicilina 'G (PEN-Na), cefoperazona (C-4292), ceftiofur (32422) y cefalexina (C-4895). Las concentraciones de antimicrobianos se seleccionaron de modo tal de obtener dos resultados negativos en los niveles más bajos y dos resultados positivos en los niveles más altos (IDF 2002).

En cada pocillo de las placas, se depositaron 50 µl de las disoluciones de antibiótico preparadas previamente. Luego, los bioensayos se incubaron en baño de agua flotante a 65 °C (Dalvo, Santa Fe, Argentina) durante 3,5 horas, período en el que se produce el cambio de color de las muestras control negativo (negro a amarillo) como consecuencia del crecimiento bacteriano.

A continuación, las microplacas fueron lavadas con agua bidestilada para retirar restos de muestras de leche y se realizaron lecturas fotométricas mediante un lector ELISA (Biotek ELx800TM; Biotek Instrument Inc., Winooski, USA) a 550 nm. A partir de los resultados obtenidos se calcularon las absorbancias relativas de acuerdo a la siguiente transformación:

$$A = (A_x - A_0) / (A_{100} - A_0) \text{ (Ec 1)}$$

Donde: A: Absorbancia relativa, A_x = absorbancia de las muestras de leche con una "x" concentración de antibiótico; A_0 : absorbancia de las muestras de leche libre de antibióticos (control negativo) y A_{100} : absorbancia de las muestras de leche que producen 100% resultados positivos.

Estas absorbancias relativas se analizaron en forma estadística mediante el modelo de regresión logístico del paquete estadístico Statgraphics Centurion XV (StatGraphics 2008):

$$L_{ij} = \text{Logit} [A_{ij}] = \beta_0 + \beta_1 [ATB]_i + \varepsilon_{ij} \text{ (Ec 2)}$$

Donde: L_{ij} = Modelo lineal Logístico; $[A_{ij}]$ = absorbancia relativa; $[ATB]_i$ = concentración de antibiótico ($i = 1, 2, \dots, 12$ niveles); β_0 and β_1 = coeficientes estimados y ε_{ij} = error residual. Los límites de detección se calcularon como aquellas concentraciones de antibióticos que producen el 45% de absorbancias relativas (Althaus et al. 2003).

VII.3. Resultados y Discusión

Las ecuaciones de regresión logística que modelan las curvas dosis-respuestas para los diferentes antibióticos betalactámicos se muestran en la Tabla VII.1. Los coeficientes de concordancia fueron elevados y estuvieron comprendidos entre 91,3% para penicilina (Bioensayo *G. kaustophilus*) y 99,3 para cloxacilina (Bioensayo *G. stearothermophilus*). El coeficiente " β_1 " indica la pendiente de la curva dosis-respuesta para cada bacteria-test y la sensibilidad hacia los antibióticos. Los valores de los coeficientes " β_1 " son más elevados para el bioensayo con *G. stearothermophilus* ($\beta_{1,\text{ceftiofur}}: 0,0149$ - $\beta_{1,\text{penicilina}}: 1,6088$) en

comparación con *G. kaustophilus* ($\beta_{1,\text{cefalexina}}:0,0079-$ $\beta_{1,\text{penicilina}}:0,4075$), poniendo de manifiesto una mayor sensibilidad por parte de *G. stearothermophilus* en comparación *G. kaustophilus*.

Tabla VII.1. Ecuaciones de regresión logística que modelan las curvas dosis-respuesta de betalactámicos para bioensayos que utilizan dos bacterias test

Betalactámicos	<i>G. stearothermophilus</i>		<i>G. kaustophilus</i>	
	Logit [A] = $\beta_0 + \beta_1$ [ATB]	C%	Logit [A] = $\beta_0 + \beta_1$ [ATB]	C%
Amoxicilina	L=-3,3171+ 0,4957[AMO]	91,6	L=-2,9755+0,2882[AMO]	95,9
Ampicilina	L=-1,6819+0,3231[AMPI]	92,4	L=-2,1433+0,2034[AMPI]	92,0
Cloxacilina	L=-6,1341+0,1614[CLOXA]	99,3	L=-4,3379+0,1036[CLOXA]	99,2
Oxacilina	L=-2,8041+0,1441[OXA]	93,6	L=-3,9842+0,0929[OXA]	95,1
Penicilina "G"	L=-5,1136+1,6088[PEN]	96,4	L=-2,8053+0,4075[PEN]	91,3
Cefalexina	L=-3,6154+0,0285[CLX]	96,1	L=-2,7075+0,0079[CLX]	95,7
Cefoperazone	L=-4,5812+0,0527[CPZ]	93,5	L=-3,6636+0,0136[CPZ]	95,8
Ceftiofur [®]	L=-2,5882+0,0149[CFR]	93,6	L=-3,5239+0,0111[CFR]	94,3

ATB: Antibiótico, AMO: Amoxicilina, AMPI: Ampicilina, CLOXA: Cloxacilina, OXA: Oxacilina, PEN: Penicilina, CLX: Cefalexina, CPZ: Cefoperazone, CFR: Ceftiofur, C%: Coeficiente de concordancia.

La Figura VII.1 representa las curvas dosis-respuesta de los ocho antibióticos betalactámicos analizados mediante bioensayos elaborados con *G. stearothermophilus* y *G. kaustophilus*. Se logra visualizar que las curvas dosis-respuesta obtenidas para el bioensayo que contiene *G. stearothermophilus* poseen mayor pendiente (β_1) en comparación con bioensayo con *G. kaustophilus*, por lo cual, pequeños cambios en las concentraciones de antibióticos producen un aumento en las absorbancias relativas, denotando una mayor sensibilidad por parte de la bacteria test *G. stearothermophilus*.

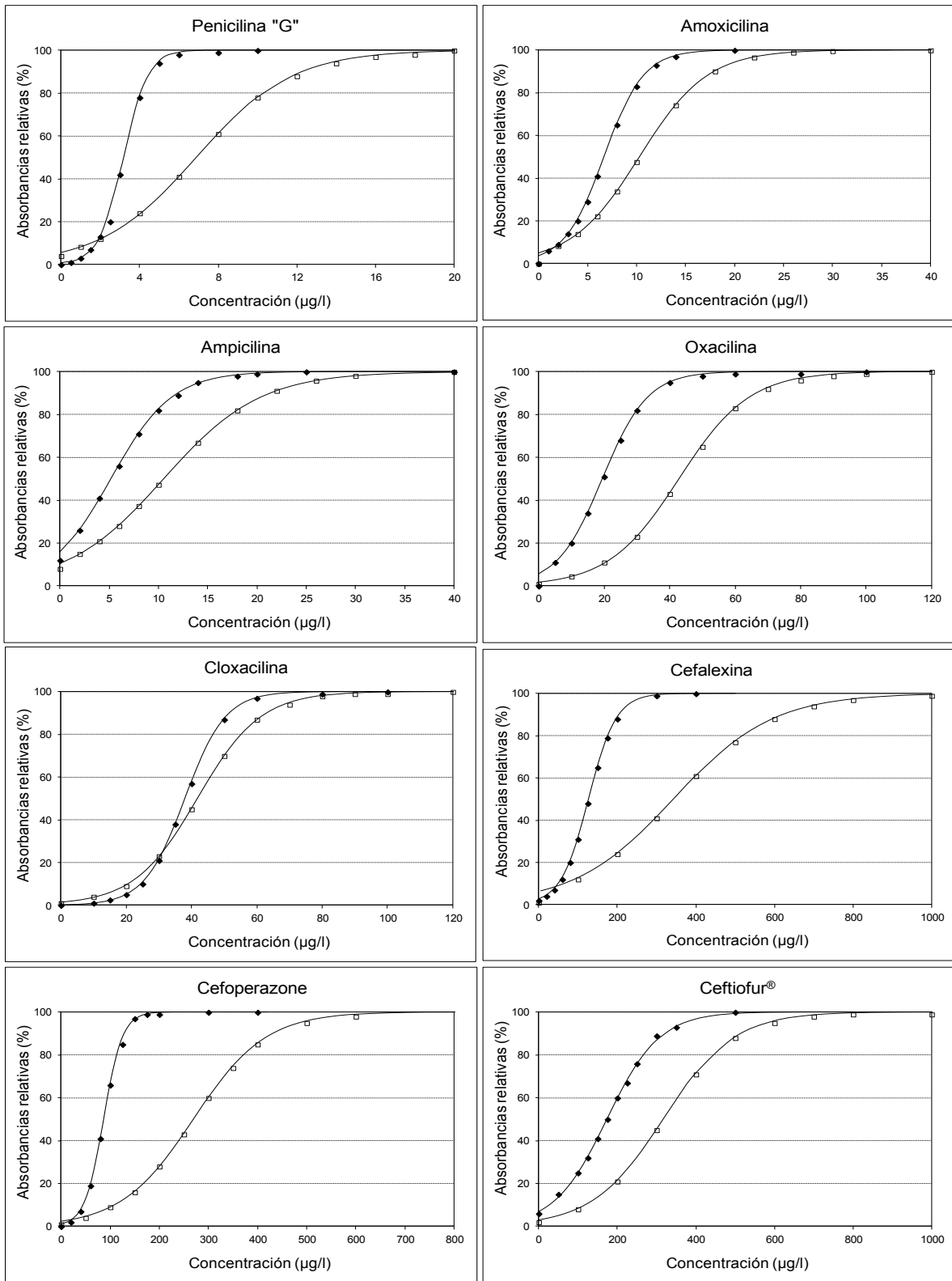


Fig. VII.1. Curvas dosis-respuesta de betalactámicos de un bioensayo con *G. stearothermophilus* (♦) y *G. kaustophilus* (□).

Los límites de detección (LD) de los bioensayos para los betalactámicos analizados se resumen en la Tabla VII.2. Se evidencia que bioensayo con *G. stearothermophilus* presenta LDs inferiores a los calculados para *G. kaustophilus* para amoxicilina (6 µg/l vs. 10 µg/l), ampicilina (5 µg/l vs. 10 µg/l), oxacilina (18 µg/l vs. 41 µg/l), penicilina G (3 µg/l vs. 6 µg/l), cefalexina (120 µg/l vs. 314 µg/l), cefoperazone (83 µg/l vs. 253 µg/l) y ceftiofur (160 µg/l vs. 299 µg/l). Residuos de cloxacilina (37-40 µg/l) en leche son detectados a concentraciones similares por ambos bioensayos. Por su parte, *G. stearothermophilus* presenta LDs cercanos a los Límites Máximos de Residuos de cada antibiótico. Por ello, se recomienda como método de screening para la detección de estas sustancias en leche.

Tabla VII.2. Límites de detección (µg/l) de betalactámicos para bioensayos con *G. stearothermophilus* y *G. kaustophilus*

Betalactámicos	<i>G. stearothermophilus</i>	<i>G. kaustophilus</i>	LMR
Amoxicilina	6	10	4
Ampicilina	5	10	4
Cloxacilina	37	40	30
Oxacilina	18	41	30
Penicilina "G"	3	6	4
Cefalexina	120	314	100
Cefoperazone	83	253	50
Ceftiofur®	160	299	100

LMR: Límite Máximo de residuo (µg/l).

Los límites de detección obtenidos por Nouws et al. (1999) cuando utilizan *G. stearothermophilus* en placa de Petri (4 µg/l para amoxicilina y ampicilina, 30 µg/l para cloxacilina y oxacilina, 3 µg/l para penicilina, 80 µg/l para cefalexina y 55

µg/l para cefoperazone y ceftiofur) también fueron inferiores a los obtenidos en este trabajo, aunque requieren 18-24 horas de incubación.

Un estudio realizado por Gaudin et al. (2004) revela que la placa específica (*G. stearothermophilus*) para detectar betalactámicos en leche presenta límites de detección de amoxicilina (16 µg/l), cloxacilina (50 µg/l) y penicilina (16 µg/l) superiores a los reportados para los bioensayos con *G. stearothermophilus* y *G. kaustophilus*. Por el contrario, residuos de ampicilina (6 µg/l), oxacilina (30 µg/l), cefalexina (30 µg/l), cefoperazone (80 µg/l) y ceftiofur (125 µg/l) son detectados con mayor sensibilidad por parte del método microbiológico en placas de Petri que emplea entre 18 y 24 horas en obtener la respuesta.

Los LDs obtenidos en este trabajo son similares a los 14 µg/l de amoxicilina, 8 µg/l de ampicilina, 49 µg/l de cloxacilina, 25 µg/l de oxacilina, 4 µg/l de penicilina, 190 µg/l de cefalexina, 140 µg/l de cefoperazone y 190 µg/l para ceftiofur, obtenidos por Nagel et al. (2013) cuando elaboran un bioensayo de respuesta dicotómica con esporas de *G. stearothermophilus*.

VII.4. Conclusión

A modo de síntesis se puede establecer que *G. stearothermophilus* presentó adecuados límites de detección para residuos de antibióticos betalactámicos en comparación con *G. kaustophilus*. No obstante deberían estudiarse, otras especies del género *Geobacillus* tales como *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, o *G. vulcani*, entre otros.

VII.5. Agradecimientos

Este trabajo se llevo a cabo con parte del proyecto CAI+D'11 (PI 501 201101 00575 LI, H.C.D. Resol. 205/13 Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina) y PICT 2011-368 (Res. N° 140/12, Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica).

Capítulo VIII

**Sistema de cinco bioensayos microbiológicos para la detección rutinaria de
residuos de antibióticos y evaluación de la calidad de la leche.**

Tumini M¹, Nagel O¹, Althaus R¹.

¹ Cátedra de Biofísica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del
Litoral-R.P.L., Kreder 2805, 3080
Esperanza, Argentina.

Resumen

Este capítulo propone evaluar un sistema microbiológico en placas de microtitulación para la detección y clasificación de residuos pertenecientes a cinco grupos de antibióticos en la leche. Para ello se seleccionaron los métodos microbiológicos previamente estudiados que mejores condiciones presentaron para constituir el sistema. Así se utilizó *Bacillus stearothermophilus* (Bioensayo B) para detectar betalactámicos por que presentó límites de detección inferiores en comparación con *Geobacillus kaustophilus*. Para la detección de macrólidos se utilizó *Bacillus megaterium* con ácido fusídico (Bioensayo M). Para la detección de quinolona se utilizó *Bacillus licheniformis* (Bioensayo Q) y para la detección de sulfamidas se incorporo un bioensayo que contiene *Bacillus Licheniformis* con el agregado de trimetoprim (Bioensayo QS). Para detectar tetraciclinas de utilizó *Bacillus megaterium* con cloranfenicol (Bioensayo T) por presentar mayor sensibilidad para detectar estos antibióticos en comparación con *Bacillus pumilus*, además requiere igual temperatura de incubación (45°C) que *Bacillus Licheniformis* facilitando así la capacidad operativa.

La respuesta de cada bioensayo se interpretó en forma visual (colorimétrica) mediante el cambio en el color de sus indicadores redox (positivo o negativo) en un tiempo comprendido entre 4 y 5.5 horas. Los bioensayos presentaron límites de detección similares a los Límites Máximos de Residuos para cada grupo de antibiótico.

Palabras claves: leche, antibiótico, detección, clasificación, bioensayo, sistema microbiológico.

VIII.1. Introducción

El uso de medicamentos para el tratamiento y prevención de enfermedades del ganado productor de leche representan una práctica muy frecuente. Actualmente, las principales patologías que afectan al vacuno son mastitis, metritis, neumonías, enteritis y cojeras (Zwald et al., 2004; Sawant et al., 2005). Para el tratamiento de mastitis, los antibióticos que más se utilizan son las penicilinas (Botsoglou y Fletouris 2001; Gruet et al., 2001), ceftiofur para la metritis (Kaufmann et al., 2010), oxitetraciclina para neumonías (Stanton et al., 2010), tilosina (Di Corcia y Nazzari, 2002) y oxitetraciclina (Berry et al., 2010) para infecciones podales, y quinolonas para enteritis (Jiménez Lozano et al., 2002), entre otros.

Sin embargo, los residuos de estas moléculas podrían permanecer en leche y producir efectos adversos sobre la salud de los consumidores (Demoly y Romano, 2005). Entre los principales problemas que producen estos residuos se destacan la sensibilización por ingestión repetida de pequeñas dosis, los procesos alérgicos y el desarrollo de resistencias bacterianas (Tollefson y Karp, 2004; Khaskheli, 2008; Oliver, 2011). Además, los antibióticos pueden producir inconvenientes a las industrias lácteas, tales como retrasos en la acidificación de productos fermentados, dificultad en la formación del cuajado y maduración de los quesos (Packham et al., 2001, Berruga et al., 2008, Berruga et al., 2011).

Con el propósito de prevenir los riesgos que producen los residuos de antibióticos en la leche, la Comunidad Europea establece los Límites Máximos de Residuos (EU-LMR) y los procedimientos para su determinación mediante Regulación (EC) 470/2009 (European Union, 2009) y Regulación (EC) 37/2010

(European Union, 2010). En Estados Unidos, The Food and Drug Administration (FDA) determina los niveles o tolerancias de residuos de antibióticos en leche para la protección del consumidor (FDA, 2005).

Para el control de estos residuos de antibióticos, algunos métodos de screening se desarrollaron (Toldra y Reig, 2006). Los métodos microbiológicos se utilizan ampliamente en los programas de vigilancia de residuos de medicamentos veterinarios (Pikkemat, 2007), porque permiten analizar un elevado número de muestras a un bajo costo y en forma simple. Además, estos métodos presentan límites de detección similares a los Límites Máximos de Residuos (LMR) para betalactámicos, tetraciclinas y sulfamidas en leche, no obstante, los residuos de otros antibióticos tales como macrólidos y quinolonas no llegan a ser detectados (ISO/IDF, 2010).

Por lo tanto debido a la ausencia de un método de screening que detecte la totalidad de los antibióticos empleados en la terapéutica del ganado lechero, Nagel et al. (2012) sugieren el uso de bioensayos microbiológicos que empleen diversas bacterias test con sensibilidad complementaria para diferentes grupos de antibióticos. Para una mayor cobertura de moléculas de antimicrobianos, Nagel et al. (2013) desarrollaron un sistema microbiológico en placas de microtitulación que detecta y clasifica residuos de cuatro grupos de antibióticos (betalactámicos, tetraciclinas, sulfamidas y quinolonas) mediante el uso de diferentes microorganismos. Estos bioensayos proporcionan respuestas dicotómicas (positivo o negativo) fáciles de interpretar en un tiempo máximo de 6 horas, aunque poseen

especificidad cruzada con algunos macrólidos (tilosina, tilmicosina, eritromicina) y aminoglucósidos (neomicina).

Por ello, el objetivo de este trabajo fue evaluar un sistema microbiológico en placas de microtitulación para detectar y clasificar residuos de antibióticos en leche perteneciente a cinco grupos (betalactámicos, tetraciclinas, sulfamidas, quinolonas y macrólidos) que brinde una respuesta dicotómica (positivo o negativo) en un tiempo inferior a las 6 horas y que pueda utilizarse de forma rutinaria en los laboratorios de control de calidad de leche.

VIII.2. Materiales y métodos

VIII 2.1. Preparación de los bioensayos

El sistema microbiológico se compone de cinco bioensayos. Cada uno de ellos fue optimizado previamente mediante el uso de un lector fotométrico porque permitió determinar las mejores condiciones de elaboración de una forma más exacta y precisa. Sin embargo, las lecturas visuales de los bioensayos son más simples y prácticas de realizar a la hora de utilizar el sistema de control en forma rutinaria. En este trabajo, se utilizaron los bioensayos previamente optimizados para la detección de antibióticos betalactámicos (Nagel et al, 2011), tetraciclinas (Tumini et al., 2016a), macrólidos (Tumini et al., 2016b) y quinolonas (Tumini et al., 2016c).

Los cinco bioensayos se prepararon en placas de microtitulación y contienen esporas de microorganismos sensibles a cada grupo de antibióticos y sustancias mejoradoras de la sensibilidad apropiadas para cada familia. La composición de los bioensayos y las condiciones de incubación de bioensayo B (G.

stearothermophilus) para betalactámicos, bioensayo T (*B. megaterium* con clornfenicol) para tetraciclinas, bioensayo M (*B. megaterium* con ácido fusídico) para macrólidos, bioensayo Q (*B. licheniformis*) para quinolonas y bioensayo QS (*B. licheniformis* con trimetoprim) para quinolonas y sulfamidas, se detallan en Tabla VIII.1.

Para la preparación de los bioensayos se utilizó medio de cultivo Mueller Hinton Agar (38 g/l, Biokar[®], Ref. 10272, Francia) fortificado con glucosa (10 g/l, Sigma Aldrich[®], Ref. G8270, USA) y esterilizado a 121 °C durante 15 minutos. A continuación, cada bioensayo fue adicionado con indicadores redox, esporas de microorganismos específicos, sustancias mejoradoras de la sensibilidad (cloranfenicol, ácido fusídico o trimetoprim, según corresponda) como se detalla en Tabla VIII.1. Luego, 100 µl de medio fue dispensado en cada uno de los 96 pocillo de cada placa de microtitulación con un dispensador electrónico (Eppendorf Research[®] Pro, Hamburg, Germany). Posteriormente, las placas fueron termoselladas con papel de aluminio recubierto en polipropileno y se conservaron en heladera (4 °C) hasta el momento del uso.

VIII.2.2. Disoluciones de antibióticos y muestras fortificadas

Para la preparación de las disoluciones se utilizaron patrones de antibióticos Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Las disoluciones acuosas se prepararon para cada antimicrobiano en matraz aforado de 10 ml a una concentración de 1000 mg/l en el momento de efectuar su análisis, a fin de evitar posibles alteraciones de las moléculas y/o sus propiedades.

Tabla VIII.1. Composición de los bioensayos que integran el Sistema Microbiológico

Bioensayo	Bacteria test	Agar medio	Incubación	Respuesta de color	
				Negativo	Positivo
B	<i>G. stearothermophilus</i> subsp. calidolactis C 953 (2.10 ⁶ esporas/ ml)	Negro brillante (100 mg/l) azul de toluidina (270 mg/l), pH 8.2	64 °C - 4 h	Amarillo	Negro
T	<i>B. megaterium</i> ATCC 9885 (2,8. 10 ⁸ esporas/ ml)	Negro brillante (200 mg/l) azul de toluidina (10 mg/l), pH 8.5, cloranfenicol (20 00 µg/l),	45 °C - 5 h	Amarillo	Negro
M	<i>B. megaterium</i> ATCC 9885 (2,8. 10 ⁸ esporas/ ml)	Negro brillante (200 mg/l) azul de toluidina (10 mg/l), pH 8.0, ácido fusídico (200 µg/l),	45 °C - 5 h	Amarillo	Negro
Q	<i>B. licheniformis</i> ATCC 14580 (4.2 10 ¹⁰ esporas/ ml)	Trifenil tetrazolium (200 mg/l) azul de toluidina (10 mg/l), pH 7.0	45 °C - 5,5 h	Rosa	Azul
QS	<i>B. licheniformis</i> ATCC 14580 (4.2 10 ¹⁰ esporas/ ml)	Trifenil tetrazolium (200 mg/l) azul de toluidina (10 mg/l), pH 7.0, trimetoprim (100 µg/l)	45 °C - 5,5 h	Rosa	Azul

B: Betalactámicos; T: Tetraciclinas; M: Macrólidos; Q: Quinolonas; QS: Quinolonas-Sulfamidas

VIII.2.3. Curvas dosis-respuesta

Las curvas dosis respuesta se construyeron para ocho antibióticos betalactámicos (amoxicilina, ampicilina, cloxacilina, oxacilina, penicilina 'G', cefoperazone, ceftiofur y cefalexina), tres tetraciclinas (clortetraciclina, oxitetraciclina y tetraciclina), tres macrólidos (eritromicina, tilosina y tilmicosina), tres quinolonas (ciprofloxacina, enrofloxacin y marbofloxacina), cuatro sulfamidas (sulfadiazina, sulfadimetoxina, sulfametoxazol y sulfatiazol) y tres aminoglucósidos (kanamicina, neomicina y estreptomicina) de acuerdo a las directrices del Codex Alimentarius (2010).

Para ello, se analizaron 16 réplicas de 12 concentraciones de modo tal de obtener resultados negativos en los dos primeros niveles y resultados positivos en las dos últimas concentraciones testeadas. Luego, se agregó 50 µl de las disoluciones fortificadas con antibióticos a cada pocillo de los bioensayos. Las microplacas se sellaron con film adhesivo y se incubaron bajo condiciones de tiempo y temperatura que permitan el viraje de color de las muestras negativas (Tabla VIII.1).

VIII.2.4. Interpretación de resultados de los bioensayos

Las respuestas de los bioensayos se interpretaron visualmente por tres especialistas en forma independiente. Cada análisis se clasificó en términos de “positivo” o “negativo” cuando se produjeron al menos dos coincidencias en las respuestas.

Las muestras de leche que no contienen antibióticos o están presentes a una concentración inferior al límite de detección del método, permitirán el

crecimiento de la bacteria-test, acompañado de un cambio en el potencial redox del medio de cultivo, que se manifiesta por un cambio en la coloración de los indicadores redox. Así, los bioensayos B, M y T que contienen negro brillante y azul de toluidina, cambiarán al amarillo (resultado negativo), mientras que los bioensayos Q y QS que contienen trifeniltetrazolium y azul de toluidina, cambiarán al color rosa (resultado negativo), transcurrido el tiempo de incubación (Tabla VIII.1).

Por el contrario cuando una muestra de leche contiene residuos de antibióticos a un nivel superior al límite de detección de cada molécula para un bioensayo, no se producirá el crecimiento del microorganismo, y por lo tanto no habrá cambio en el potencial redox manteniéndose el color original del bioensayo. Así, la persistencia del color negro en algunos de los bioensayos B, T y M, pondrán de manifiesto la presencia de antibióticos en leche, mientras que la persistencia del color azul en alguno de los bioensayos Q y QS también indicará presencia de antibióticos en leche.

VIII.2.5. Cálculo de los Límites de detección

Las frecuencias de resultados positivos se analizaron según el siguiente modelo de regresión logística (StatGraphics Plus version 5.1 Centurion[®], 2008):

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

Donde: L_{ij} = Modelo lineal Logístico; $[P_{ij}]$ = logit $[P_p / (1 - P_p)]$: (probabilidad de una respuesta "positiva"/probabilidad de una respuesta "negativa"), β_0 , β_1 = parámetros calculados por el modelo logístico; $[ATB]_i$ = concentración de antibiótico

($i= 1, 2,.. 12$ niveles); y ε_{ij} = error residual. Para cada antibiótico, el límite de detección se calculó como aquella concentración que produce el 95% de frecuencias positivas (Codex Alimentarius, 2010; EEC, 2002).

VIII.2.6. Especificidad de los bioensayos

Para este estudio, se utilizaron 160 muestras de leche procedentes de animales raza Holstein Friesian que tuvieron sus partos un período comprendido entre 60 y 90 días antes del muestreo. Las muestras de leche presentaron valores normales de composición química (proteínas: 2,10-5,75 g/100ml, grasas: 2,38-6,03 g/100ml, lactosa: 3,63-5,17 g/100ml, sólidos totales: 9,31-12,86 g/100ml), recuento de bacterias totales (BCC: 13,000-99,000/ml) y recuento de células somáticas (SCC: 2,000-392,000/ml) acorde a Codex Alimentarius (2010). La composición química, SCC y BCC se determinó con Milko Scan FT-120 (Foss Somatic, USA), Fossomatic 90 (Foss Electric, USA) y BactoScan 8.000S (Foss Electric, USA), respectivamente.

Las muestras de leche se analizaron por triplicado con los cinco bioensayos. Para este propósito, 50 μ l de muestras de leche se añadió en cada pocillo individual de cada bioensayo (B, T, M, Q y QS), después se incubó en un baño de agua flotante a una temperatura-tiempo para cada bioensayo (Tabla VIII.1). Las muestras también se analizaron simultáneamente con el método Delvotest[®] (DSM, Delft, The Netherlands), que se considera un test de cribado referente (AOAC, 2000). Para el cálculo de este parámetro, se utilizó la siguiente ecuación matemática:

$$Especificidad = \frac{negativo}{total\ muestras} \times 100 \text{ (Ec 2)}$$

VIII.3. Resultados y discusión

VIII.3.1. Límites de detección de los bioensayos

En Tabla VIII.2 se presentan los resultados obtenidos mediante la aplicación del modelo de regresión logística para los 24 antibióticos analizados mediante los cinco bioensayos (B, T, M, Q y QS). Los ajustes obtenidos con el modelo de regresión logística fueron buenos, puesto que los coeficientes de concordancia porcentuales estuvieron comprendidos entre 98,7% (sulfametacina con el bioensayo QS) y 99,4% (penicilina con el bioensayo B).

Los parámetros β_1 señalan la pendiente de la curva dosis respuesta. Valores superiores de este coeficiente indican que la bacteria-test posee buena sensibilidad para detectar antibióticos en leche. Así, bioensayos B presenta valores mayores de coeficiente β_1 para los antibióticos betalactámicos (comprendidos entre 0,0616 y 5,5301), además de tilosina (0,1458) y neomicina (0,0099), bioensayo T muestra elevados valores de β_1 para las tres tetraciclinas estudiadas ($\beta_{1\text{Clortetraciclina}} = 0,1637$; $\beta_{1\text{Oxitetraciclina}} = 0,1258$; $\beta_{1\text{Tetraciclina}} = 0,0809$), mientras que bioensayo M presenta elevados valores de este coeficiente para los macrólidos ($\beta_{1\text{Eritromicina}} = 0,2181$; $\beta_{1\text{Tilmicosina}} = 0,1425$; $\beta_{1\text{Tilosina}} = 0,1198$). El bioensayo Q mostró similares coeficientes β_1 para las tres quinolonas (comprendidos entre 0,1060 y 0,1106) y bioensayo QS (con trimetoprim) presentó también elevados coeficientes β_1 para las sulfamidas (comprendidos entre 0,2052 y 0,2707).

Tabla VIII.2. Coeficientes calculados por el Modelo de regresión logística para la curva dosis respuesta de los bioensayos

Antibióticos	B		T		M		Q		QS	
	β_0	β_1	β_0	β_1	β_0	β_1	β_0	β_1	β_0	β_1
Betalactámicos										
Amoxicilina	-6,3773	1,9392	-4,9124	0,0545	-4,9057	0,0537	-9,1554	0,0219	-8,7600	0,0261
Ampicilina	-8,8622	3,0737	-6,1354	0,0937	-6,1772	0,0924	-4,7193	0,0384	-4,4617	0,0377
Cloxacilina	-11,836	0,4084	-5,1654	0,0335	-5,1424	0,0389	-9,1554	0,0219	-8,3468	0,0206
Oxacilina	-16,313	0,8706	-4,8035	0,0339	-4,8032	0,0325	-7,2449	0,0267	-7,2674	0,0259
Penicilina "G"	-15,299	5,5301	-10,916	0,0752	-10,955	0,0724	-5,0872	0,1476	-5,0768	0,1456
Cefalexina	-9,7361	0,1112	-4,8526	0,0120	-4,8602	0,0117	-10,237	0,0151	-10,364	0,0153
Cefoperazone	-5,9080	0,0995	-4,8658	0,0033	-4,8596	0,0032	-6,3529	0,0129	-6,3398	0,0127
Ceftiofur®	-4,2313	0,0616	-11,861	0,0239	-11,859	0,0233	-7,1114	0,0128	-7,1498	0,0127
Aminoqlicosidos										
Kanamicina	-18,733	0,0026	-15,398	0,0246	-15,332	0,0259	-7,3300	0,0017	-7,8288	0,0017
Neomicina	-10,903	0,0099	-2,9801	0,0061	-2,9754	0,0064	-8,8972	0,0002	-8,9971	0,0002
Streptomycin	-12,197	0,0045	-13,685	0,0276	-13,537	0,0262	-11,057	0,0002	-10,906	0,0002
Macrólidos										
Eritromicina	-6,5414	0,0337	-5,6254	0,0907	-4,1801	0,2181	-5,5534	0,0079	-5,5484	0,0080
Tilmicosina	-5,7655	0,0262	-6,6341	0,0901	-4,0196	0,1428	-10,822	0,0146	-10,819	0,0141
Tilosina	-4,6664	0,1454	-7,4681	0,0998	-3,0152	0,1198	-8,7288	0,0205	-8,7291	0,0209
Sulfamidas										
Sulfadiazina	-10,884	0,0007	-14,268	0,0060	-14,188	0,0059	-12,282	0,0102	-16,282	0,2123
Sulfadimetoxina	-16,567	0,0023	-18,394	0,0103	-18,321	0,0102	-11,982	0,0096	-21,825	0,2541
Sulfametoxazol	-15,294	0,0044	-14,895	0,0074	-14,961	0,0075	-13,912	0,0120	-15,912	0,2052
Sulfatiazol	-19,432	0,0051	-13,701	0,0054	-13,698	0,0055	-11,709	0,0119	-23,709	0,2707
Tetraciclinas										
Clortetraciclina	-4,6026	0,0012	-13,119	0,1637	-9,3559	0,0576	-11,647	0,0137	-11,723	0,0134
Oxitetraciclina	-10,811	0,0072	-8,6151	0,1258	-10,999	0,0691	-7,3439	0,0121	-7,3774	0,0123
Tetraciclina	-18,384	0,0124	-7,4310	0,0809	-10,174	0,0591	-7,1065	0,0088	-7,1163	0,0085
Quinolonas										
Ciprofloxacina	-6,3695	0,0337	-15,356	0,0521	-15,329	0,0518	-7,0710	0,1060	-7,0712	0,1097
Enrofloxacin	-12,297	0,0037	-3,9754	0,0064	-3,9535	0,0067	-7,9332	0,1106	-7,9877	0,1112
Marbofloxacina	-7,3085	0,0015	-3,9744	0,0066	-3,9986	0,0067	-6,5049	0,1091	-6,5235	0,1035

B: betalactámicos; T: tetraciclínas; M: macrólidos; Q: quinolonas; QS: quinolonas-sulfamidas. β_0 y β_1 : parámetros calculados por el modelo logístico.

Los límites de detección (LD) calculados para cada molécula mediante el modelo de regresión logística y los respectivos LMR (Codex Alimentarius, 2010) se resumen en Tabla VIII.3. Con respecto a los antibióticos betalactámicos, el bioensayo B presentó niveles de detección similares a los LMRs para amoxicilina: 5 µg/l, ampicilina: 4 µg/l, cloxacilina: 36 µg/l, oxacilina: 22 µg/l, penicilina "G": 3 µg/l, cefalexina: 114 µg/l, cefoperazone: 89 µg/l y ceftiofur: 116 µg/l). Por el contrario, los antibióticos betalactámicos tienen que estar presentes en la leche a niveles superiores a 5 LMR para producir resultados positivos en los bioensayos M, T, Q y QS.

Los LD de betalactámicos calculados mediante bioensayo B (Tabla VIII.3) fueron inferiores a los reportados por Nagel et al., (2013) para un bioensayo en placas de microtitulación que utiliza *G. stearothermophilus* (4 µg/l de penicilina, 14 µg/l de amoxicilina, 8 µg/l de ampicilina, 49 µg/l de cloxacilina, 25 µg/l de oxacilina, 190 µg/l de ceftiofur, 190 µg/l de cefalexina y 140 µg/l de cefoperazona). Para ensayos en placas de Petri que utilizan *G. stearothermophilus*, Nouws et al. (1999) indican niveles inferiores de detección (2 µg/l de penicilina, 3 µg/l de amoxicilina, 2 µg/l de ampicilina, 15 µg/l de cloxacilina, 20 µg/l de oxacilina, 30 µg/l de ceftiofur, 45 µg/l de cefalexina, 30 µg/l de cefoperazona). En forma similar, Gaudin et al. (2004) señalan límites de detección similares a los obtenidos en este trabajo (Tabla VIII.3) cuando emplean ensayos en placas de Petri (12-16 µg/l de penicilina G, 5-6 µg/l de ampicilina, 16 µg/l de amoxicilina, 50 µg/l de cloxacilina, 30 µg/l de oxacilina, 125 µg/l de ceftiofur, 80 µg/l de cefoperazona y 30 µg/l de cefalexina).

Tabla VIII.3. Límites de detección ($\mu\text{g/l}$) de los sistemas microbiológicos en microplacas

Antibióticos	LMR	Bioensayos				
		B	T	M	Q	QS
Betalactámicos						
Amoxicilina	4	5	150	140	550	540
Ampicilina	4	4	97	100	200	190
Cloxacilina	30	36	242	208	550	550
Oxacilina	30	22	229	250	380	390
Penicilina "G"	4	3	184	200	54	55
Cefalexina	100	114	650	670	870	870
Cefoperazone	50	89	2360	2500	720	730
Ceftiofur®	100	116	500	500	780	795
Aminoglicosidos						
Kanamicina	100	8300	620	590	5900	6020
Neomicina	1500	1400	460	450	59300	59500
Streptomycin	200	3400	490	500	70100	69200
Macrólidos						
Eritromicina	40	280	94	33	1070	1100
Tilmicosina	50	350	106	44	700	760
Tilosina	50	52	104	50	450	400
Sulfamidas						
Sulfadiazina	100	18100	2400	2400	1500	76
Sulfadimetoxina	100	8200	1800	1800	1500	85
Sulfametoxazol	100	4100	1900	1900	1400	77
Sulfatiazol	100	4400	2500	2500	1200	87
Tetraciclinas						
Clortetraciclina	100	5900	98	214	1060	1100
Oxitetraciclina	100	1800	92	202	850	840
Tetraciclina	100	1700	88	222	1200	1100
Quinolonas						
Ciprofloxacina	100	4100	290	300	94	91
Enrofloxacin	100	4000	590	560	98	98
Marbofloxacina	75	6800	1050	1100	79	77

Abreviaciones: B: betalactámicos; T: tetraciclinas; M: macrólidos; Q: quinolonas; QS: quinolonas-sulfamidas.

Por su parte, bioensayo T presentó niveles de detección similares al LMR (100 $\mu\text{g/l}$) para clortetraciclina (98 $\mu\text{g/l}$) y oxitetraciclina (92 $\mu\text{g/l}$) y levemente

superior de tetraciclina (128 µg/l), debido al aumento de la sensibilidad de *B. megaterium* mediante la incorporación de cloranfenicol en el medio de cultivo (Tumini et al., 2016a). Sin embargo, bioensayo M que utiliza el mismo microorganismo sin la adición de cloranfenicol muestra resultados positivos cuando las tetraciclinas están presentes a niveles superiores a 2 veces el LMR (Tabla VIII.3).

Los límites de detección calculados para las tetraciclinas mediante bioensayo T (Tabla VIII.3) fueron levemente inferiores a los calculados por Nagel et al., (2013) cuando utilizan un bioensayo con esporas de *B. cereus* en placas de microtitulación (clortetraciclina: 330 µg/l, oxitetraciclina: 110 µg/l, tetraciclina: 110 µg/l). Tumini et al. (2015) señalan límites de detección similares a los obtenidos en este trabajo para un bioensayo en microplacas que contiene esporas de *B. pumilus* (clortetraciclina: 117 µg/l, oxitetraciclina: 142 µg/l, tetraciclina: 105 µg/l).

Para ensayos en placas de Petri, Nouws et al. (1999) obtienen valores inferiores a los calculados en este trabajo cuando utilizan *B. cereus* luego de 18 horas de incubación (10 µg/l de clortetraciclina, 30 µg/l de oxitetraciclina y 30 µg/l de tetraciclina). Por otra parte, Tsai y Kondo (2001) y Gaudin et al. (2004) indicaron niveles más altos a los calculados en este trabajo (Tabla VIII.3) con *B. megaterium* en placas de Petri (clortetraciclina: 100-200 µg/l, oxitetraciclina: 200-250 µg/l, tetraciclina: 200-250 µg/l).

En cuanto a los macrólidos, bioensayo M presentó adecuados límites de detección para eritromicina (33 µg/l), tilmicosina (49 µg/l) y tilosina (50 µg/l). Esta adecuada sensibilidad hacia estos compuestos se puede atribuir a la incorporación

de ácido fusídico en el medio de cultivo que contiene *B. megaterium* (Tumini et al., 2016b). Por el contrario, las moléculas de macrólidos deben estar presentes en la leche a concentraciones comprendidas entre 2 y 3 veces los LMR para producir resultados positivos en bioensayo T (Tabla VIII.3).

Los LD de los macrólidos obtenidos para Bioensayo M (Tabla VIII.3) fueron superiores a los reportados por Nouws et al., (1999) para eritromicina (10 µg/l) y tilmicosina (6 µg/l) pero inferior a tilosina (100 µg/l) cuando utiliza *Kocuria rizophila* en placas de Petri. También, Gaudin et al., (2004) calcularon LD similares para eritromicina (20-30 µg/l), y tilmicosina (25-50 µg/l) y superiores para tilosina (150-200 µg/l) en un ensayo en placas de Petri con el mismo microorganismo, aunque ambos autores obtienen la respuesta transcurridas 18-24 horas de incubación.

Los residuos de quinolonas en leche son detectados por bioensayos Q y QS porque poseen límites de detección para ciprofloxacina (Q: 94 µg/l y QS: 91 µg/l), enrofloxacina (Q y QS: 98 µg/l) y marbofloxacina (Q: 87 µg/l y QS: 91 µg/l) similares a sus respectivos LMRs.

Para los residuos de quinolonas, los límites de detección de los bioensayos Q y QS (Tabla 3) fueron inferiores a los señalados por Nagel *et al.*, (2013) cuando emplean un método microbiológico en placas de microtitulación que contiene esporas de *B. subtilis* (150 µg/l de ciprofloxacina, 160 µg/l de enrofloxacina y 160 µg/l de marbofloxacina). Para bioensayos en placas de Petri que contienen células de *E. coli*, Nouws et al. (1999) (4 µg/l de enrofloxacina y 5 µg/l de marbofloxacina) y Gaudin et al. (2004) (10 µg/l de ciprofloxacina, 20 µg/l de enrofloxacina y 30 µg/l

de marbofloxacina) detectan bajas concentraciones de quinolonas en leche aunque demoran un tiempo de 24 horas en obtener las respuestas.

Con respecto a las sulfamidas, caba destacar que la incorporación de trimetoprim al medio de cultivo que contiene esporas de *B. licheniformis* (bioensayo QS) mejora notablemente la detección de sulfadiazina (76 µg/l), sulfadimetoxina (85 µg/l), sulfametoxazol (77 µg/l) y sulfatiazol (87 µg/l) en comparación al bioensayo Q que no contiene trimetoprim (Tabla VIII.3).

Se debe mencionar que los límites de sulfamidas en leche calculados para bioensayo QS (Tabla VIII.3) fueron inferiores a los señalados por Nagel et al. (2013) para sulfadiazina (160 µg/l), sulfadimetoxina (260 µg/l), sulfametoxazol (120 µg/l) y sulfatiazol (110 µg/l) cuando utilizan un bioensayo con esporas de *B. subtilis* y trimetoprim en el medio de cultivo. Sin embargo, en un ensayo de placas de Petri con esporas de *B. subtilis* que requiere 18-24 horas de incubación, Nouws et al. (1999) obtienen niveles más bajos para los residuos de sulfadiazina (30 µg/l) y sulfadimetoxina (20 µg/l) que los reportados en Tabla VIII.3, mientras que Gaudin et al., (2004) determinan límites de detección superiores para sulfadiazina (100 µg/l), sulfadimetoxina (175 µg/l), sulfametoxazol (100 µg/l) y sulfatiazol (1000 µg/l).

VIII.3.2. Especificidad de los bioensayos

Los resultados de especificidad para cada bioensayo se detallan en Tabla VIII.4. Se puede observar que bioensayos B, T y Q presentan valores elevados de especificidad (99.4%), al igual que el método de referencia Delvotest[®] SP. Mientras que las especificidades de bioensayos M (98.8%) y QS (98.1%) fueron ligeramente

inferiores a los demás métodos. Se debe destacar que Sischo y Burns (1993) y Charm y Zomer (1995) reportaron especificidades de 98% y 95% respectivamente cuando evalúan el método Delvotest® SP con muestras de leche libre de antibióticos.

Tabla VIII.4. Especificidad del sistema microbiológico

Bioensayos	Muestras de	Positivo	Negativo	Especificidad
B	160	1	159	99,4
T	160	1	159	99,4
M	160	2	158	98,8
Q	160	1	159	99,4
QS	160	3	157	98,1
Delvotest® SP	160	1	159	99,4

Especificidad (%): (negativas/total muestras) ×100.

VIII.3.3. Especificidad cruzada del sistema de cinco bioensayos

Con el propósito de visualizar en forma simultánea los perfiles de detección de los cinco bioensayos para los 24 antibióticos estudiados se confeccionó la Fig. VIII.1. El diagrama radial se construyó utilizando una escala en base logarítmica, debido a la gran amplitud del rango de límites de detección del sistema (Table VIII.3) ya que los LD están comprendidos entre 3 µg/l (penicilina con bioensayo B) y 70100 µg/l (estreptomomicina con bioensayo Q). Además, se eligió una escala logarítmica en términos relativa a los respectivos LMRs de cada molécula (Log LD/LMR). La implementación de esta escala permite visualizar la similitud o discrepancia entre el LD y el LMR de cada antibiótico. En este diagrama el círculo 1 corresponde a valores de Log LD/LMR= 0,1 (el bioensayo detecta antibióticos a niveles inferiores

al LMR), el círculo 2 corresponde a $\text{Log LD/LMR} = 1$ (límites de detección equivalentes al LMR), el círculo 3 señala $\text{Log LD/LMR} = 10$ LMR y el círculo 4 indica $\text{Log LD/LMR} = 100$ LMR (el bioensayo no detecta el antibiótico).

Se aprecia que bioensayo B (línea azul) detecta los ocho antibióticos betalactámicos, además de tilosina y neomicina; bioensayo T (línea roja) detecta las tres tetraciclinas y neomicina; bioensayo M (línea verde) detecta los tres macrólidos y neomicina; bioensayo Q (línea negra) detecta únicamente las tres quinolonas y bioensayo QS (línea púrpura) detecta las cuatro sulfamidas y tres quinolonas. También se puede observar que kanamicina y estreptomicina no son detectados por los cinco bioensayos.

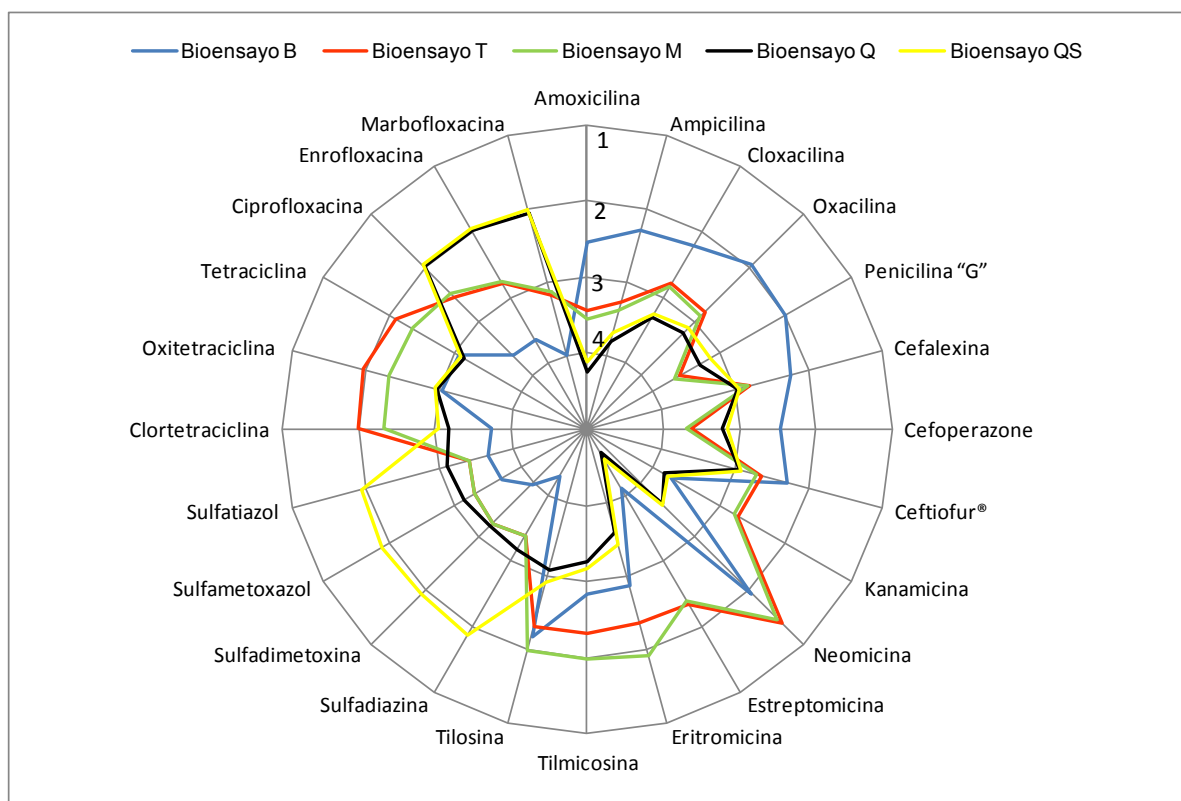


Fig. VIII.1. Patrón de detección (LD/LMR) para el sistema de cinco bioensayos microbiológicos. Círculo 1= 0,1 LMR, círculo 2= LMR, círculo 3= 10 LMR y círculo 4= 100 LMR.

En resumen, cada bioensayo detecta un grupo específico de antibiótico (a excepción de bioensayo Q y QS que clasifican simultáneamente las quinolonas), neomicina (detectado por bioensayos B, T y M) y tilosina (detectado por bioensayos B y M). De esta forma, el simple análisis visual de la coloración de cada bioensayo permite clasificar en forma sencilla a un residuo de antibiótico en cinco categorías o grupos.

Además, la detección simultánea de quinolonas mediante dos bioensayos (Q y QS), tilosina en dos bioensayos (B y M) y neomicina en tres bioensayos (B, T y M) constituye una herramienta de aseguramiento para el control de residuos en la cadena láctea, mejorando de este modo la seguridad alimentaria.

VIII.3.4. Clasificación de antibióticos mediante el sistema de cinco bioensayos

Tabla VIII.5 sintetiza la interpretación visual de los resultados obtenidos mediante el análisis simultáneo de los cinco bioensayos. Las respuestas se observan visualmente por el cambio de color en cada método. Para los bioensayos B, T y M el color amarillo implica resultado negativo y el color negro señala presencia de antibióticos en leche. Para los bioensayos Q y QS, el color rosa señala resultado negativo y el azul denota la presencia de antibiótico en la leche.

La presencia de betalactámicos en leche se visualiza por la persistencia del color negro original del bioensayo B. Los residuos de tetraciclinas se ponen de manifiesto por la persistencia del color negro en bioensayo T y los residuos de macrólidos se observan por la persistencia del color negro en bioensayo M. Las

sulfonamidas se manifiestan por la persistencia del color azul original del bioensayo QS, mientras que los residuos de quinolonas se evidencian por la conservación del color azul original de los bioensayos Q y QS.

Tabla VIII.5. Interpretación de los resultados del Sistema microbiológico en microplacas

Antibióticos	Resultados				
	B	T	M	Q	QS
Betalactámicos	+ ^(a)	-	-	-	-
Tetraciclinas	-	+ ^(b)	-	-	-
Macrólidos	-	-	+ ^(c)	-	-
Quinonas	-	-	-	+	+
Sulfamidas	-	-	-	-	+

B: betalactámicos; T: tetraciclinas; M: macrólidos; Q: quinolonas; QS: quinolonas-sulfamidas; interferencias cruzadas con (a) neomicina o tilosina, (b) neomicina, (c) neomicina; + y -, respuestas positivas y negativas respectivamente

Además, en la Tabla VIII.5 se aprecia que los residuos de neomicina se ponen de manifiesto por la persistencia de los colores originales de bioensayos B, T y M, mientras que los residuos de tilosina se manifiestan por la persistencia de los colores originales de los bioensayos B y M, según se señaló en Tabla VIII.3. Por último, se debe destacar que las muestras de leche que producen viraje de color en los cinco bioensayos, se clasifican como muestras negativas porque no tienen antibiótico o poseen a niveles inferiores a los límites de detección de cada bioensayo.

VIII.4. Conclusión

A modo de síntesis se puede establecer que el sistema microbiológico en placas de microtitulación compuesto por bioensayo B (*G. stearothermophilus*), T (*B. megaterium*), M (*B. megaterium*), Q (*B. licheniformis*) y QS (*B. licheniformis*) permite detectar una amplia cantidad de residuos de antibióticos en la leche y clasificar los residuos en betalactámicos, tetraciclinas, macrólidos, quinolonas y sulfamidas. Este sistema proporciona respuestas dicotómicas colorimétricas de sencilla interpretación visual que permite analizar un gran número de muestras en un breve período de incubación (4-5.5 horas).

El empleo simultáneo de estos cinco bioensayos representa un mecanismo de control de antibióticos más eficiente y riguroso que el empleo de un único método microbiológico. En efecto, la implementación rutinaria de este sistema en los laboratorios de control de calidad contribuiría a mejorar la seguridad alimentaria. Además, este sistema diseñado en un formato de placas de microtitulación termoselladas con papel aluminizado conteniendo bacterias esporuladas, permitiría su posterior comercialización, transporte refrigerado y conservación a 4°C en los laboratorios antes de ser utilizadas, a diferencia de los sistemas microbiológicos en placas de Petri que deben utilizarse en forma inmediata a su elaboración. En un futuro, nuevos bioensayos que utilicen microorganismos con sensibilidad específica a aminoglucósidos deberían desarrollarse para mejorar el perfil de detección y la clasificación de los residuos de antibióticos en leche.

VIII.5. Agradecimiento

Este trabajo de investigación ha sido llevada a cabo como parte del proyecto CAI+D`11 (PI 501 201101 00575 LI, H.C.D. Resol 205/13 Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina) y PICT 2011-368 (Res. N° 140/12, Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica).

Bibliografía.

Abee T, Groot MN, Tempelaars M, Zwietering M, Moezelaar R, Van der Voort M. (2011). Germination and outgrowth of spores of *Bacillus cereus* group members: diversity and role of germinant receptors. *Food Microbiological*. 28, 199–208.

Abriouel H, Ben Omar N, Lucas López R, Gálvez A. (2008). La doble faceta del género *Enterococcus*, y su importancia en alimentos. *Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental*. 21,1, 154-168.

Acar JF, Goldstein FW. (1997). Trends in bacterial resistance to fluoroquinolones. *Clinical Infectious Diseases*. 24(1), S67-73.

Aga DS, Goldfish R, Kulshrestha P. (2003). Application of ELISA in determining the fate of the tetracyclines in land-applied livestock wastes. *Analyst*. 128, 658– 662.

Althaus R, Peris C, Montero A, Torres A, Molina MP, Fernandez N. (2002). Detection limits of antimicrobial agents in ewe milk by Delvotest®. *Milchwissenschaft*. 57, 660-664.

Althaus RL, Torres A, Montero A, Balach S, Molina MP. (2003). Detection Limits of Antimicrobials in Ewe Milk by Delvotest Photometric Measurements. *Journal Dairy Science*. 86, 457-463.

Althaus RL, Torres A, Montero A, Balach S, Molina M.P. (2003). Photometric Measurements for detection of antimicrobials in ewe milk. *Journal of Dairy Science*. 86, 457–463.

Althaus R, Molina MP, Peris C, Torres A, Fernández N. (2003). Accuracy of BRT and Delvotest Microbial inhibition test as affected by composition of ewe's milk. *J. Food Prot*. 66, 473-478.

Althaus R., Berruga M. I., Montero A., Roca M., Molina M. P. (2009). Evaluation of a microbiological multi-residue system on the detection of antibacterial substances in ewe milk. *Analytica chimica acta*. 632(1), 156-162.

Andersson, D. I., Hughes, D. (2012). Evolution of antibiotic resistance at non-lethal drug concentrations. *Drug Resistance Update*. 15,162–72.

Appicciafuoco B, Dragone R, Frazzoli C, Bolzoni G, Mantovani A., Ferrini A. (2015). Microbial screening for quinolones residues in cow milk by biooptical method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 106,179–185.

Beltrán M. C., Berruga M. I., Molina A., Althaus R. L., Molina M. P. (2015). Performance of current microbial tests for screening antibiotics in sheep and goat milk. *International Dairy Journal*, 41, 13-15.

Berruga MI, Molina MP, Noves B, Roman M, Molina A. (2007). In Vitro study about the effect of several penicillins during the fermentation of yogurt made from ewe's milk. *Milchwissenschaft*. 62, 303-305.

Berruga M.I., Novés B., Molina M.P., Román M., Molina A. (2008). Influence of cephalosporin on the coagulation time of yogurt made from ewe's milk *International Journal Dairy Technology*. 61, 372-378.

Berruga M, Beltnin B, Noves A, Molina M, Filolina P. (2011). Effect of penicillins on the acidification of yogurt made from ewe's milk during the storage. In *Science and Technology Against Microbial Pathogens. Research*.

Development and Evaluation. A. Mendez-Vilas, ed. World Scientific Publishing, Hackensack, NJ. 145-149

Bishop J, White C. (1984). Antibiotic residue detection in milk. A review. *J. Food Prot.* 47, 647-652.

Bogialli S, Curini R, Corcia AD, Lagana A, Rizzuti GA. (2006) Rapid confirmatory method for analyzing tetracycline antibiotics in bovine, swine, and poultry muscle tissues: matrix solidphase dispersion with heated water as extractant followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal Agric Food Chemistry*. 54, 1561–1570.

Botsoglou N, Fletouris J, (2001). Drugs residues in foods: Pharmacology, food safety, and analysis. In *Serie Food Science and technology*. Ed. Marcel Dekker, Inc. New York, USA.

Bowman S. M., Drzewiecki K. E., Mojica E. R., Zielinski A. M., Siegel A., Aga D. S., Berry J.O. (2011). Toxicity and reductions in intracellular calcium levels following uptake of a tetracycline antibiotic in *Arabidopsis*. *Environmental Science and Technology*, 45 (20), 8958-8964.

Bradley AJ, Green MD. (2009). Factors affecting cure when treating bovine clinical mastitis with cephalosporin-based intramammary preparations. *J. Dairy Sci.* 92, 1941-1953.

Burridge R, Warren C, Phillips I. (1986). Macrolide, lincosamide and streptogramin resistance in *Campylobacter jejuni/coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 17, 315–321.

CAA (Código Alimentario Argentino). (2001). Capítulo VIII: Alimentos Lácteos (artículos artículos 555, 556, 556 bis). Decreto 2126/71 del Código Alimentario Argentino.

Cerniglia C, Kotarski S. (1999). Evaluation of veterinary drug residues in food and their potencial to affect human intestinal microflora. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 29, 238-261.

Chander, Y., Kumar, K., Sagar, M. L. and Goyalb Gupta, S. C. (2005). Antibacterial Activity of Soil-Bound Antibiotics. *Journal Environmental Quality*, 34, 1952-1957.

Charm S, Zomer E. (1995). The evolution and direction of rapid detection/identification of antimicrobial drug residues. In *Residues of Antimicrobial Drugs and Other Inhibitors in Milk*. FIL-IDF Special Issue No. 9505, 224–233. Brussels, Belgium: International Dairy Federation.

Chen X, Wu L, Huang Y, Chen D, Gu R. (2012). Effect of ciprofloxacin residue on quality of *S. thermophilus* grx02 fermented milk. *Food Science*, 13, 038.

Chopra IP, Hawkey M, Hinton M. (1992). Tetracyclines, molecular and clinical aspects. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 29, 245–277.

CEE (Comunidad Económica Europea). 1993. *Diario Oficial de la Comunidad Europea (DOCE)*. Directiva 93/257/CEE del Consejo del 15 de abril de 1993, L 118, 75-79.

CEE (Comunidad Económica Europea). (2002). Decisión 2002/657/CEE del Consejo del 12 de Agosto de 2002 por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados. DOCE, L 73, 30-31.

Codex Alimentarius, (2010). Examen de la labor realizada por la FAO, OMS y OIE sobre la resistencia a los antimicrobianos. Codex Alimentarius, 3. Programa conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias. FAO. Roma, Italia.

Codex Alimentarius (2010) Codex committee on residues of veterinary drugs in foods. 9th session of the 30 August – 3 September 2010. Discussion paper on methods of analysis for residues of veterinary drugs in foods (CX/RVDF 10/19/6). Vermont, USA. Available on line: ftp://ftp.fao.org/codex/ccrvdf19/rv19_06e.pdf

Commission Regulation (2010). Council Directive n° 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. *Official Journal of the European Union*. 15, 1–72.

Council Regulation. (2009). Council Directive n° 37/2010 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. *Off J Eur Union*. 15, 1-72.

Council Regulation. (2009). Council Directive n° 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. *Official Journal of the European Union*. 15, 1–72. Batt A. L., Snow D. D., Aga D. S. (2006). Occurrence of sulfonamide antimicrobials in private water wells in Washington country, Idaho, USA. *Chemosphere*. 64, 1963–1971.

CRLs. (2010). Guidelines for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines. Community Reference Laboratories for residues. Available at http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/lab_analysis_en.htm (Last update: 20-01-2010).

Dalton, J. (2006). Antibiotic residue prevention in milk and dairy beef. *Western Dairy News*. 6, 71-79.

Davis, J. G., Truman, C. C., Kim, S. C., Ascough, J. C. and Carlson, K. (2006). Antibiotic transport via runoff and soil loss. *Journal Environmental Quality*, 35, 2250–2260.

De Jong A, Thomas V., Simjee S, Godinho K, Schiess B, Klein U, Butty P, Valle M, Marion H, Shryock TR. (2012). Pan-European monitoring of susceptibility to human-use antimicrobial agents in enteric bacteria isolated from healthy food-producing animals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 67, 638– 651.

Delepine B, Hurtaud-Pessel D. (2000). Proceedings of the Euroresidue IV, Veldhoven, The Netherlands. 350–355.

Demoly P, Romano A. (2005). Update on Beta-lactam allergy diagnosis. *Curr. Allergy Asthma Rep*. 1, 9-14.

Dey B, Thaker N, Bright S, Thaler A. (2005). Fast antimicrobial screen test (FAST): improved screen test for detecting antimicrobial residues in meat tissue. *Journal of AOAC International*. 88, 447–454.

Diserens J, Beck Henzelin A, Le Breton M, Savoy Perroud M. (2005). Antibiotics in milk : Actual situation & compilation of commercial available screening methods for the detection of inhibitors/antibiotics residues in milk. Informe técnico: Quality & Safety Department, Nestlé Research Center. Lausanne, Switzerland. Pp. 186.

Di Corcia A, Nazzari M. (2002). Liquid chromatographic-mass spectrometric methods for analyzing antibiotic and antibacterial agents in animal food products. *Journal of Chromatography*. 974, 53-89

Dixon J, Lipinski A. (1974). Infections with beta-hemolytic *Streptococcus* resistant to lincomycin and erythromycin and observations on zonal-pattern resistance to lincomycin. *Journal of Infectious Diseases*. 130, 351–356.

Douthwaite S, Champney W. (2001): Structures of ketolides and macrolides determine their mode of interaction with the ribosomal target site. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 48, 1–8.

Drlica K. (2003). The mutant selection window and antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 52, 11–17.

Edder P, Coppex L, Cominoli A, Corvi C. (2002). Analysis of erythromycin and oleandomycin residues in food by high performance liquid chromatography with fluorometric detection. *Food Additives & Contaminants*. 19, 232–240.

Erskine R, Wagner S, DeGraves F. (2003). Mastitis therapy and pharmacology *Vet. Clin. Food Anim.* 19, 109-138.

European Union (2009). European Union 2009 Regulation (EC) N° 470/2009 of 6 May 2009 laying down Community procedures for the establishment of residue limits of pharmacologically active substances in foodstuffs of animal origin, repealing Council Regulation (EEC) N° 2377/90 and amending Directive 2001/82/EC of the European Parliament and of the Council and Regulation (EC) N° 726/2004 of the European Parliament and of the Council. *Off. J. L1* 52 11-22.

European Union (2010). Regulation (EU) N° 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. *Official Journal of European Communities*, L 15, 1-72.

FDA (Food and Drug Administration Center for Veterinary Medicine). (2005). MI-05-05: Tolerance and/or Safe Levels of animal drug residues in milk. Accessed Nov.14,2011. <http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/ProductSpecificInformation/MilkSafety/CodedMemoranda/MemorandaofInformation/ucm077350.htm>.

Finley R. L., Collignon P., Larsson D. J., McEwen S. A., Li X. Z., Gaze W. H., Topp E. (2013). The scourge of antibiotic resistance: the important role of the environment. *Clinical Infectious Diseases*: 1-7.

Fritz JW, Zuo Y. (2001). Simultaneous determination of tetracycline, oxytetracycline, and 4-epitetracycline in milk by high-performance liquid chromatography. *Food Chem.* 129, 7-1301.

Garcia-Migura L, Hendriksen RS, Fraile L, Aarestrup FM. (2014). Antimicrobial resistance of zoonotic and commensal bacteria in Europe: The missing link between consumption and resistance in veterinary medicine. *Veterinary Microbiology*. 170, 1-9.

Garrett E, Richards A. (1974). Kinetics and mechanisms of drug action on microorganisms XX: integrated receptor site model rationalizing observed microbial rate dependencies on drug concentration and microbial kinetics affected by sodium fusidate. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 63, 884–894.

Gaudin V, Maris P, Fuselier J, Ribouchon N, Cadieu P, Rault A. (2004). Validation of a microbiological method: the STAR protocol, a five-plate test for the screening of antibiotic residues in milk. *Food Addit. Contam.* 21, 422-433.

Gaudin V, Hedou C, Rault A, Verdon E. (2010): Validation of a Five Plate Test, the STAR protocol, for the screening of antibiotic residues in muscle from different

animal species according to the European decision 2002/657/EC. Food Additives & Contaminants. 27, 935–52.

Gruet P, Maincent P, Berthelot X, Kaltsatos V. (2001). Bovine mastitis and intramammary drug delivery: review and perspectives. *Adv. Drug Delivery Rev.* 50, 245-259.

Hammer P, Heeschen W. (1995). Antibody-capture immunoassay for the detection of enrofloxacin in raw milk. *Milchwissenschaft.* 50, 513-520.

Hlavka JJ, Boothe JH. (1985). The Tetracyclines. In *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 78. (Eds. JJ Hlavka & JH Boothe), 451. Heidelberg, New York, USA: Springer.

IDF-FIL (International Dairy Federation). (1997). Guidance for the standardized description of microbial inhibitor test. IDF Grup E-503. Antibiotics, Appendix 3: 1-16.

IDF-FIL (International Dairy Federation). (2002). Guidance for the standardized description of microbial inhibitor test". IDF-FIL, Bull N° 183. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica.

IDF (International Dairy Federation). (2010). Current Situation & Compilation of Commercially Available Screening Methods for the Detection of Inhibitors/Antibiotics Residues in Milk. Brussels, Belgium: FIL-IDF Standard No. 442.

IFAH (International Federation for Animal Health). 2006. Improving the quality of life for animals and people. Annual Report. IFAH. Bruselas, Bélgica.

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: International Dairy Federation.

Jemba, P. K. (2002). The effect of chloroquine, quinacrine, and metronidazole on both soybean plants and soil microbiota. *Chemosphere*, 46, 1019–1025.

Jiménez-Lozano E, Marqués I, Barrón D, Beltrán JL, Barbosa J. (2002). Determination of pKa values of quinolones from mobility and spectroscopic data obtained by capillary electrophoresis and a diode array detector. *Analytica Chimica Acta.* 464, 37–45.

Kaartinen L, Salonen M, Alii L, Pyorala S. (1995). Pharmacokinetics of enrofloxacin after single intravenous, intramuscular and subcutaneous injections in lactating cows. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics.* 18, 357–362.

Kaufmann TV, Westermann S, Drillich M, Plöntzke J, Heuwieser W. (2010) Systemic antibiotic treatment of clinical endometritis in dairy cows with ceftiofur or two doses of cloprostenol in a 14-d interval. 121, 55-62.

Khan SA, Nawaz MS, Khan AA, Steele RS, Cerniglia CE. (2000). Characterization of erythromycin-resistant methylase genes from multiple antibiotic resistant *Staphylococcus* spp. Isolated from milk samples of lactating cows. *Am. J. Vet. Res.* 61, 1128–1132.

Khaskheli M, Malik R, Arain M, Soomro A, Arain A. (2008). Detection of β -Lactam Antibiotic Residues in Market Milk. *Pakistan Journal of Nutrition* 7 (5), 682-685.

Knapp C. W., Dolfing J. Ehlert, P. A.m Graham, D. W. (2010). Evidence of increasing antibiotic resistance gene abundances in archived soils since 1940. *Environmental Science Technology*, 44, 580–587.

Kress C, Seidler C, Kerp B, Schneider E, Usleber E. (2007). Experiences with an identification and quantification program for inhibitor-positive milk samples. *Anal. Chim.* 586, 257-279.

Le Breton MH, Savoy-Perroud MC, Diserens JM. (2007). Validation and comparison of the Copan Milk Test and Delvotest SP-NT for the detection of antimicrobials in milk. *Anal. Chim. Acta*, 586: 280-283.

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.

Liu F., Ying G. G., Tao R., Zhao J. L., Yang J. F., Zhao L. F. (2009). Effects of six selected antibiotics on plant growth and soil microbial and enzymatic activities. *Environmental Pollution*, 157 (5), 1636-1642.

Logan NA, De Vos P. (2009). *Bacillus*. In *The Firmicutes in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edition, Vol. III. 1450 (Eds P De Vos, G Garrity, D Jones, NR Krieg, W Ludwig, FA Rainey, K-H Schleifer & WB Whitman). Nueva York, USA: Springer.

Luitz M, Suhren G. (1995). Advantages of photometric evaluation of microbial inhibitor test. In *Residues of Antimicrobial Drugs and Other Inhibitors in Milk*. FIL-IDF Special Issue No. 9505, pp. 177–181. Brussels, Belgium: International Dairy Federation.

Lyn RY. (1992). A perspective of penicillin allergy. *Arch. Intern. Med.* 152: 930-937.
Macaulay, DM, Packard VS. (1981). Evaluation of methods used to detect antibiotic residues in milk. *J. Food Prot.* 44: 696.

Mathew AG, Cissell R, Liamthong S. (2007). Review: Antibiotic Resistance in Bacteria Associated with Food Animals: A United States Perspective of Livestock Production. *Foodborne pathogens and disease*, 4 (2), 115-133.

Mitchell J, Griffiths M, Ewen S, Nab W, Yee, A. (1998). Antimicrobial drug residues in milk and meat: causes, concerns, prevalence, regulations, test, and test performance. *J. Food. Prot.* 61, 742-756.

Molina MP, Althaus RL, Molina A, Torres A, Fernandez N. (2003). Antimicrobial agent detection in ewe milk by microbial inhibitor test (Brilliant Black Reduction Test –BRT®). *International Dairy Journal.* 13, 821–826.

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.

Moats WA, Medina MB. (eds) (1996): *Veterinary Drug Residues Food Safety.* ACS Symposium Series 636. In: 209th National Meeting of the American Chemical Society, April 2–7, 1995, Anaheim, USA. Washington, DC, American Chemical Society: i–iv.

Mulazimglu L, Tulkens P, Van Bambeke F. (2005): Macrolides. In: Yu VL, Edwards G, McKinnon P, Peloquin C, Morse G. (eds): *Antimicrobial Therapy and Vaccines.* Vol. II. Antimicrobial Agents. 2nd Ed. Pittsburg, Sun Technologies. 243–280.

Nagel O. G., Zapata M. L., Basílico J.C., Bertero J., Molina M. P., Althaus R. L. (2009a). Effect of chloramphenicol on a bioassay response for the detection of tetracycline residues in milk. *J. Food and Drug Analysis.* 17(1): 36-42.

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

Nagel O.G., Molina M.P., Althaus R.L. (2011a). Optimization of bioassay for tetracycline detection in milk by means of chemometric techniques. *Letters in Applied Microbiology.* 52, 245-252.

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

Nagel O.G., Molina M.P., Althaus RL (2012). Use chemometric techniques to optimization of a specific bioassay for betalactams in milk. *Letters in Applied Microbiology* 54, 32-38.

Nagel O. G., Molina M. P., Althaus, R. L. (2013a). Use of chemometric techniques to design a microbiological method for sulfamide detection in milk. *Czech Journal of Food Sciences.* 31 (6): 627 - 632.

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

Navrátilová P. (2008). Screening methods used for the detection of veterinary drug residues in raw cow milk- A review. *Czech Journal of Food Sciences*. 26, 393–401.

Nawaz M, Wang J, Zhou A, Chaofeng MA, Xiaokang WU, Moore J, Millar BC, Jiru XU. (2011). Characterization and Transfer of Antibiotic Resistance in Lactic Acid Bacteria from Fermented Food Products. *Current Microbiology*. 62, 1081–1089.

Nosetti L, Herrero MA, Pol M, Maldonado M, Iramain MS, Flores M. (2002). Cuantificación y caracterización de agua y efluentes en establecimientos lecheros. Demanda de agua y manejo de efluentes. *InVet.*, 4 (1), 37-43.

Nouws J, Van Egmond H, Shulders I, Loeffen G, Schouten J, Stegeman H. (1999)a. A microbiological assay system for assessment of raw milk exceeding EU maximum residue level. *Int. Dairy J.* 9, 85-90.

Nouws J, Van Egmond H, Loeffen , Schouten J, Keukens H, Smulders I, Stegeman H. (1999)b. Suitability of the charm hvs and a microbiological multiplate 153 system for detection of residues in raw milk at eu maximum residue levels.

The Veterinary Quarterly. 21, 21-27. Oliver SP, Murinda SE., Jarayao BM. (2011). Impact of antibiotic use in adult dairy cows on antimicrobial resistance of veterinary and human pathogens: a comprehensive review. *Foodborne Pathogens and Disease*, 3, 337-355.

Packham W, Broome M, Limsowtin G, Roginski H. (2001). Limitations of standard antibiotic screening assays when applied to milk for cheesemaking. *Australian J. Dairy Tech.* 56, 15-18.

Pastor Navarro N, Morais S, Maquieira A, Puchades R. (2009). Review on immunoanalytical determination of tetracycline and sulfonamide residues in edible products. *Anal Chim Acta*. 395, 907-920.

Perreten V, Teuber M. (1995). Antibiotic resistance bacteria in fermented dairy products a new challenge for raw milk cheese. En: *Residues of antimicrobial drugs and other inhibitors in milk*. IDF S.I. 9505. Kiel, Germany. p: 144-148.

Pikkemaat M, Oostra-van Dijk S, Schouten J, Rapallini M, Van Egmond H. (2008): A new microbial screening method for the detection of antimicrobial residues in slaughter animals: The Nouws antibiotic test (NAT-screening). *Food Control*. 19, 781–789.

Pikkemaat M, Oostra-van Dijk S, Schouten J, Rapallini M. (2009). Nouws antibiotics test: Validation of a postscreening method for antibiotic residues in kidney. *Food Control*. 20, 771–777.

Pikkemaat M. (2009) Microbial screening methods for detection of antibiotic residues in slaughter animals. *Anal. Bioanal. Chem*. 395, 893-905

Pikkemaat M, Rapallini M, Ostra-van Dijk S, Elferinka J. (2009). Comparison of three microbial screening methods for antibiotics using routine monitoring samples. *Anal. Chim. Acta.* 637, 298-304.

Pikkemaat M, Rapallini M, Zuidema T, Elferink J, Oostravan Dijk S, Driessen-van Lankveld W. (2011). Screening methods for the detection of antibiotic residues in slaughter animals: comparison of the European Union Four-Plate Test, the Nouws Antibiotic Test and the Premi®Test (applied to muscle and kidney). *Food Additives & Contaminants.* 28, 26–34.

Rasmussen B, Noller HF, Daubresse G, Oliva B, Misulovin Z, Rothstein DM, Ellestad GA, Gluzman Y, Tally FP, Chopra I. (1991). Molecular basis of tetracycline action: identification of analogs whose primary target is not the bacterial ribosome. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 35, 2306–2311.

Raspor Lainscek P, Biasizzo M, Henigman U. (2014). Implementation of the *Bacillus cereus* microbiological plate used for the screening of tetracyclines in raw milk samples with STAR protocol - the problem with false-negative results solved. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 31. 1840-9.

Reichmuth J, Shuren G, Beukers R. (1997). Evaluation of microbial inhibitor testtheIDF approach. *Milchwissenschaft.* 52, 691-695.

Rinckel L, Savage D. (1990). Characterization of plasmids and plasmid-borne macrolide resistance from *Lactobacillus* sp. strain 100-33. *Plasmid.* 23, 119–125.

Roberts MC. (1996). Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microbiology Reviews.* 19, 1–24.

Roca M. (2008). Termoestabilidad de sustancias antimicrobianas en la leche. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia, España. pp. 225.

Rysz M, Alvarez P. (2004). Amplification and attenuation of tetracycline resistance in soil bacteria: aquifer column experiments. *Water Res.* 38, 3705-12.

Samanidou VF, Giannakis DE, Papadaki A J. (2009) Development and validation of an HPLC method for the determination of seven penicillin antibiotics in veterinary drugs and bovine blood plasma. *Journal of Separation Science.* 32, 1302–1311.

SAS® Institute Inc. SAS users guide (2001). Statistics version 9.1. Cary, NC. Sarmah A, Meyer M, Boxall A. (2006). A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere.* 65, 725-759.

Sawant AA, Sordillo LM, Jayarao BM. (2005). A Survey on Antibiotic Usage in Dairy Herds in Pennsylvania. *J. Dairy Sci.* 88, 2991–2999.

SENASA (Servicio de Sanidad y Calidad Agroalimentaria). (1999)a. Decreto 815/1999. 24 de julio 1999. pp. 14.

SENASA (Servicio de Sanidad y Calidad Agroalimentaria). (1999)b, 2000. Normativa UE Tambos UE4, UE5, UE6. Parte de Supervisión. pp. 10-21.

SENASA (Servicio de Sanidad y Calidad Agroalimentaria). (2001). Dirección de Agroquímicos y Productos Farmacológicos y veterinarios. Coordinación Gral. De Productos Farmacológicos Veterinarios y Alimentos para Animales. Prohibiciones y Restricciones en la utilización de drogas en medicina veterinaria. Disponible en: <http://www.senasa.gov.ar/agro/prohibiciones>.

SENASA (Servicio de Sanidad y Calidad Agroalimentaria). (2003). Dirección de Agroquímicos, Productos Farmacológicos y veterinarios. Decreto 256/2003. Disponible en <http://www.senasa.gov.ar/contenido.php?to=n&in=1033&io=4379>.

Shiomi K, Omura S. (2002). Discovery of new macrolides. In: Omura S. (ed.): Macrolide Antibiotics. 2nd Ed. Amsterdam, Academic Press. 1–56.

Silbergeld EK, Graham J, Price BL. (2008) Industrial Food Animal Production, Antimicrobial Resistance, and Human Health. Annual review of public health, 29, 151-169.

Sischo W, Burns C. (1993). Field trial of four cow-side antibiotic residue screening test. Journal of the American Veterinary Medical Association. 202, 1249– 1254.

Stanton AL, Kelton DF, LeBlanc SJ, Millman ST, Wormuth J, Dingwell RT, Leslie KE. (2010). The effect of treatment with long-acting antibiotic at postweaning movement on respiratory disease and on growth in commercial dairy calves. Journal of Dairy Science. 93, 574-581.

Stolker A, Brinkman U. (2005). Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals—a review. Journal of Chromatography A. 67, 15–53.

Stopler T, Branski D. (1986). Resistance of *Mycoplasma pneumoniae* to macrolides, lincomycin and streptogramin B. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 18, 359–364.

Suhren G, Reichmuth J, Walte H. (1996). Detection of b-lactam antibiotics in milk by the penzym-test. Milchwissenschaft-Milk Science International. 51, 269– 273.

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

Tollefson L, Karp B. (2004). Human health impact from antimicrobial use in food animals. Méd. Mal. Infec. 34, 514-521.

Topp, E., Chapman, R., Devers-Lamrani, M., Hartmann, A., Marti, R., Martin-Laurent, F. and Sumarah, M. (2013). Accelerated Biodegradation of Veterinary Antibiotics in Agricultural Soil following Long-Term Exposure, and Isolation of a Sulfamethazine-degrading sp. *Journal Environmental Quality*, 42 (1), 173-178.

Tsai, C.; Kondo, F. 2001. Improved agar diffusion method for detecting residual antimicrobial agents. *J. Food Prot.* 64: 361-366.

Tumini M, Nagel O, Althaus R. (2015) Microbiological bioassay using *Bacillus pumilus* to detect tetracycline in milk. *Journal of Dairy Research*. 82, 248- 255.

Tumini M, Nagel O, Molina M, Althaus R. (2016)a. Novel bioassay using *Bacillus megaterium* to detect tetracycline in milk. *Revista Argentina de Microbiologia*. 48, 143-146.

Tumini M, Nagel O, Molina M, Althaus R. (2016)b. Microbiological method using *Bacillus megaterium* with fusidic acid for detection of macrolides in milk. *Czech J. Food Sci.* 34, 9-15

Tumini M, Nagel O, Molina M, Althaus R. (2016)c. Microbiological assay with *Bacillus licheniformis* for the easy detection of quinolones in milk. *International Dairy Journal*. 64, 9-14.

Van Hoof N, De Wasch K, Okerman L, Reybroeck W, Poelmans S, Noppe H, De Brabander H. (2005). Validation of a liquid chromatography–tandem mass spectrometric method for the quantification of eight quinolones in bovine muscle, milk and aquacultured products. *Analytica Chimica Acta*. 529, 265– 272.

Vera Candiotti L. (2009). Desarrollo de nuevas estrategias analíticas basadas en técnicas separativas acopladas a metodologías de pre-concentración y modelado quimiométrico para el análisis de fármacos y sus metabólicos en muestras complejas. Tesis Doctoral. Universidad Nacional del Litoral, Argentina. 237 pp.

Viola C, DeVincentis SJ. (2006). Overview of issues pertaining to the manufacture, distribution, and use of antimicrobials in animals and other information relevant to animal antimicrobial use data collection in the United States. *Preventive Veterinary Medicine*, 73 (2–3), 111–131.

Wang J, Leung D. (2007). Analyses of macrolide antibiotic residue in eggs, raw milk, and honey using both ultra-performance liquid chromatography/ quadrupole time-of-flight mass spectrometry and high-performance liquid chromatography/ tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21, 3213-3222.

Wellington, E. M., Boxall, A. B., Cross, P., Feil, E. J., Gaze, W. H., Hawkey, P. M. and Williams, A. P. (2013). The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *The Lancet infectious diseases*, 13 (2), 155-165.

Wilke MS, Andrew L, Lovering AL Strynadka NC. (2005). β -Lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Current Opinion in Microbiology* 8, 525-533.

Yoon SY, Kim HJ, Shin JG, Beak YJ. (2003). Quantitative determination of sulfonamide residues in milk by high performance liquid chromatography. *Journal of Korean Dairy Technology and Science*. 21, 1–6.

Zhanel G, Dueck M, Hoban D, Vercaigne L, Embil J, Gin A. (2001): Review of macrolides and ketolides. *Drugs*. 61, 443–98.

Zhang T, Li B. (2011). Occurrence, transformation, and fate of antibiotics in municipal waste water treatment plants. *Crit Rev Environ Sci Technol*. 41, 951–98.

Zorraquino M. (2005). Inactivación térmica de sustancias antimicrobianas en leche. Tesis Doctoral. Universidad Pública de Navarra, España. pp. 144.

Zorraquino M. (2008)a. Investigación de campo sobre tratamientos antimicrobianos en vacuno de leche en procesos patológicos no mamíticos. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid, España. 115 pp.

Zorraquino M, Roca, M, Castillo M, Althaus R, Molina M. (2008)b. Effect of thermal treatments on the activity of quinolones in milk. *Milchwissenschaft*. 63, 192-195.

Zorraquino M, Roca M, Fernandez N, Molina M, Althaus R. (2008)c. Heat inactivation of beta-lactam antibiotics in milk. *J. Food Prot*. 71, 1193-1198.

Zorraquino M. A, Althaus R. L, Roca M., Molina M. P (2009). Effect of Heat Treatments on Aminoglycosides in Milk. *Journal of Food Protection*. 6, 1338-1341.

Zwald AG, Ruegg PL, Kaneene JB, Warnick LD, Wells SJ, Fossler C, Halbert LW. (2004). Management Practices and Reported Antimicrobial Usage on Conventional and Organic Dairy Farms. American Dairy Science Association. *J. Dairy Sci*. 87, 191–200.

Anexo
