

Bioensayos microbiológicos para un control eficiente de residuos de antibióticos en leche

Tumini, M.; Nágel, O.; Molina, P.; Althaus, R.

Cátedra de Biofísica. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Litoral (UNL).

ralthaus@fcv.unl.edu.ar

Proyecto CAI+D (PI 501201110152LI) de la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional del Litoral

Los residuos de antibióticos en la leche constituyen un potencial riesgo para los consumidores (reacciones alérgicas, antibiorresistencia, etc.) y las empresas lácteas (inhibición en la fermentación). Por ello, y con el propósito de evitar que los residuos lleguen al consumidor, se emplean métodos microbiológicos (Delvotest, Charm B-Y, Eclipse, etc.) que utilizan esporas de *Geobacillus stearothermophilus*. Estos métodos presentan buena sensibilidad para detectar residuos de betalactámicos, sulfamidas y tetraciclinas. Sin embargo, no detectan residuos de quinolonas y macrólidos^{1,2}. Debido a la ausencia de un método de “screening ideal” que detecte la totalidad de los antibióticos en la leche, Nagel *et al.* (2012) proponen el uso de métodos que complementen a los screening comerciales³. Por ello, en el presente trabajo se evalúan diferentes microorganismos mesófilos esporulados que puedan utilizarse como bacteria-test para aquellas moléculas que no son detectadas por los actuales métodos comerciales. Se preparó medio de cultivo Mueller Hinton (38 g/L) fortificado con glucosa (10 g/L) a pH=7,2 con una mezcla de indicadores redox (200 mg/L de negro Brillante y 10 mg/L de azul de toluidina) en condiciones estériles. Este medio se fraccionó en cuatro alícuotas para elaborar cuatro bioensayos que fueron inoculados con *Bacillus cereus* ssp. *mycoides* ATCC 11778 (2.106 esp/mL), *Bacillus subtilis* BGA (5.106 esp/mL), *Bacillus pumilus* CECT 510 (2.108 esp/mL), *Bacillus megaterium* ATCC 9885 (1.109 esp/mL). Con cada alícuota que contiene diferente bacteria-test se prepararon 14 bioensayos en microplacas ELISA, utilizando 100 µL de medio de cultivo por cada uno de los 96 pocillos de cada placa. Los bioensayos se sellaron con bandas aluminizadas y se conservaron a 4°C hasta su utilización. En cada bioensayo se analizaron 8 réplicas de 12 concentraciones de leche (1 microplaca por cada antibiótico) de 3 tetraciclinas (clortetraciclina, oxitetraciclina, tetraciclina), 4 macrólidos (eritromicina, espiramicina, tilosina y tilmicosina), 3 aminoglucósidos (estreptomina, gentamicina y neomicina) y 4 quinolonas (enrofloxacina, ciprofloxacina, marbofloxacina y norfloxacina), debido a que estas moléculas prácticamente no son detectadas por los métodos comerciales². Las microplacas se dejaron 1 hora a temperatura ambiente (25°C) para que tenga lugar la predifusión de los antibióticos en el medio agarizado. A continuación, cada placa se enjuagó tres veces con agua destilada para eliminar los residuos de grasa de la leche y se sellaron luego con bandas adhesivas. Las placas se incubaron a 40°C (*B. cereus*, *B. subtilis*, *B. pumilus*) y 45°C (*B. megaterium*) durante un tiempo de 6 horas hasta viraje de color de los indicadores (de negro a amarillo). Los resultados se interpretaron visualmente en términos de positivo (negro) y negativo (amarillo). Se calculó el límite de detección como la concentración que detecta el 95% de resultados positivos.

En la siguiente tabla se resumen los límites de detección de los 14 antibióticos detectados por los cuatro bioensayos y los Límites Máximos de residuos (LMRs) establecidos por la legislación.

Tabla 1. Límites de detección de antibióticos en leche determinados por bioensayos

Antibiótico	LMR	Límite de detección (µg/L)			
		<i>B. cereus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. pumilus</i>	<i>B. megaterium</i>
Clortetraciclina	100	500	420	600	200
Oxitetraciclina	100	150	260	350	180
Tetraciclina	100	200	430	400	200
Estreptomicina	200	7000	5000	1100	600
Gentamicina	100	4000	700	3600	2500
Neomicina	1500	7000	4000	1400	600
Eritromicina	40	130	30	300	45
Espiramicina	200	1700	300	3400	250
Tilmicosina	50	1000	100	600	94
Tilosina	50	960	120	620	95
Ciprofloxacina	100	2300	150	840	390
Enrofloxacina	100	2400	150	3000	850
Marbofloxacina	75	3100	160	1300	770
Norfloxacina	-	6500	200	1500	900

De todas las bacterias-test utilizadas en este trabajo, el bioensayo que contiene esporas de *B. subtilis* permite detectar residuos de quinolonas (ciprofloxacina, enrofloxacina, marbofloxacina y norfloxacina) y macrólidos (eritromicina, espiramicina, tilosina y tilmicosina) a niveles cercanos a sus respectivos LMRs⁴. Por su parte, *B. megaterium* presenta adecuados niveles de detección para los residuos de macrólidos, pero no detecta residuos de quinolonas a niveles cercanos a sus LMRs.

Los métodos comerciales tales como Delvotest, Charm B-Y o Eclipse no detectan residuos de quinolonas y macrólidos (a excepción de tilosina) a niveles legales^{1,2}. Por ello, la implementación un método microbiológico comercial en forma conjunta con el bioensayo que contiene *B. subtilis* permitiría detectar una mayor cantidad de moléculas de antibióticos en la leche. En síntesis, en este trabajo se propone el uso simultáneo de un bioensayo con esporas de *B. subtilis* BGA que complemente la detección de residuos de quinolonas y macrólidos en leche que no detectan los métodos comerciales. De esta forma el empleo conjunto de un método comercial y el bioensayo con *B. subtilis* constituye un sistema más eficiente para el control de residuos para mejorar la inocuidad de los productos lácteos, evitando problemas a la salud del consumidor y la industria láctea.

Bibliografía

1. **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. p.186. Lausanne, Switzerland.
2. **IDF (International Dairy Federation).** (2010) Current situation & compilation of commercially available screening methods for the detection of inhibitors /antibiotics residues in milk.. IDF-FIL, Bull N° 442. International Dairy Federation. Bruselas, Bélgica.
3. **Nagel O.G., Beltran M.C., Molina M.P., Althaus, R.L.** (2012). Novel microbiological system for antibiotic detection in ovine milk. Small Ruminant Research. 102: 26-31.
4. **Nagel O. G., Molina M. P., Althaus R. L.** (2013). Use of chemometric techniques to design a microbiological method for sulfamide detection in milk. Czech Journal of Food Sciences. 31: 627-632.