

ESTUDIO DEL SINERGISMO ENTRE SULFAMIDAS EN LECHE Y TRIMETOPRIM EN UN BIOENSAYO QUE UTILIZA *GEOBACILLUS STEAROTHERMOPHILUS*

NAGEL, O. G.¹; ZAPATA, M. L.²; BASILICO, J. C.²;
GAPEL, C.; MOLINA, P.³ & ALTHAUS, R.¹

RESUMEN

Las sulfamidas son utilizadas frecuentemente en medicina veterinaria, y sus residuos en leche no siempre son detectados a nivel de sus Límites Máximos de Residuos por medio de métodos de inhibición microbiológica. El objetivo del trabajo fue evaluar el efecto de diferentes niveles de trimetoprim (TMP) en un bioensayo que utiliza *Geobacillus stearothermophilus* sobre la especificidad y los límites de detección de sulfamidas (SAs) en leche. Para ello, se prepararon 84 microplacas ELISA con Müeller Hinton, Negro Brillante (indicador) y *G. stearothermophilus* (bacteria-test). Dichas placas fueron fortificadas con diferentes niveles de TMP para evaluar la especificidad (0, 20, 40, 60 y 80 μg TMP/L) y los límites de detección (0, 20, 40 y 60 μg TMP/L) de seis sulfamidas.

No se observó efecto significativo del TMP (0, 20, 40 y 60 μg TMP/L) sobre especificidad del bioensayo (95,8 %), mientras que mayor concentración de TMP (80 μg TMP/L) produce una disminución en este parámetro (88,5 %). La aplicación del modelo de regresión logística señaló un efecto significativo para la concentración de SAs y la interacción concentración de SAs*TMP, debido a esto puede considerarse que existe un efecto sinérgico entre ambos antimicrobianos.

En la medida que la concentración de TMP se incrementa desde 0 hasta 60 mg/L los límites de detección de Sulfatiazol (4360 μg /L - 160 μg /L), Sulfametoxazol (4130 μg /L - 110 μg /L), Sulfadimetoxina (7100 - 380 μg /L), Sulfametazina (25400 μg /L - 730 μg /L), Sulfadiazina (19400 μg /L - 580 μg /L) y Sulfamerazina (30300 μg /L - 1170 μg /L), disminuyen notablemente.

Palabras clave: sulfonamidas, trimetoprim, leche, sinergismo, método de inhibición microbiológica.

SUMMARY

Study of synergism between sulphamides in milk and trimethoprim in a bioassay that using *Geobacillus stearothermophilus*.

The sulphamides are commonly used in veterinary medicine, and yet the residues they leave are not always detected by microbiological inhibitor at their Maximum Residue Limit levels. The main

1.- Cátedra de Biofísica, Departamento de Ciencias Básicas. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral, Kreder 2805. (3080) Esperanza, Santa Fe.

2.- Cátedra de Microbiología, Facultad de Ingeniería Química (UNL). Santiago del Estero 2826. (3000) Santa Fe.

3.- Departamento de Ciencia Animal, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera, 14. (46071) Valencia, España.

Manuscrito recibido el 12 de febrero de 2009 y aceptado para su publicación el 11 de mayo de 2009.

goal this paper was evaluated the effect of the incorporation of different trimetoprim (TMP) concentrations in a bioassay using *Geobacillus stearothermophilus* on the specificity and detection limits of sulphamides (SAs) in milk. Eighty-four microplates ELISA with Müller Hinton, Brilliant Black (indicator) and *G. stearothermophilus* (bacteria-test) were prepared. These plates were fortified with TMP different levels to evaluate the specificity (0, 20, 40, 60 and 80 µg TMP/L) and the detection limit (0, 20, 40 and 60 µg TMP/L) of six sulphamides.

No significant effect of the TMP (0, 20, 40 and 60 µg TMP/L) on bioassay specificity (95.8%) was observed, whereas greater concentration of TMP (80 µg TMP/L) cause a decrease in this parameter (88.5%). The application of a logistic regression model points to a significant effect to SAs concentration and SAs*TMP interaction, and thus, it can be considered that there is a synergic effect between both antimicrobials.

When the TMP concentration is increased from 0 to 60 µg/L, the detection limits of Sulfathiazole (4360 µg/L - 160 µg/L), Sulfamethoxazole (4130 µg/L - 110 µg/L), Sulfadimethoxine (7100 µg/L - 380 µg/L), Sulfamethazine (25400 µg/L - 730 µg/L), Sulfadiazine (19400 µg/L - 580 µg/L) y Sulfamerazine (30300 µg/L - 1170 µg/L) are observed to decrease notably.

Key words: sulphonamides, trimetoprim, milk, synergism, microbiological inhibitor test.

INTRODUCCIÓN

Las sulfonamidas (SAs) representan una clase de compuestos bacteriostáticos de origen sintético. Su mecanismo de acción se basa en la competencia con el ácido p-aminobenzóico durante la síntesis enzimática del ácido dihidrofólico de las bacterias, provocando una disminución en la capacidad de reducir folatos que resultan esenciales para la síntesis de ácidos nucleicos (Bushby & Hitchins, 1968; Darrell *et al.*, 1968; Huovinen, 2001).

Estos compuestos se emplean en medicina veterinaria para el tratamiento de una amplia variedad de infecciones bacterianas y protozoarias en vacuno, porcino y aves de corral (Lindsay & Blagburn, 1995), actúan como promotores de crecimiento (Stowe, 1965).

El uso inapropiado de estos quimioterápicos puede provocar la aparición de residuos en productos comestibles de origen animal tales como carne, leche, huevo y pescado (Agarwal, 1992).

La presencia de los residuos de SAs en leche representa una gran preocupación debido a sus características carcinogénicas (Littlefield *et al.*, 1990), además de promover la frecuencia de bacterias resistentes a los antibióticos, hecho que conduce a la ineficiencia de este medicamento con uso terapéutico (Haagsma *et al.*, 1987). Además, los tratamientos empleados en la pasteurización, no llegan a inactivar en forma completa estas moléculas, obteniéndose porcentajes elevados (81% de sulfanilamina y 74% de sulfametazina) después de una esterilización convencional (Zorraquino, 2005).

Por todo ello, la legislación de la Unión Europea (UE) fijó un Límite Máximo de Residuo (LMR) de 100 µg/L de SAs en leche (EEC 2377/90).

Un método de screening adecuado para el control de residuos de SAs en leche debe ser simple, sencillo, preciso, económico y capaz de detectar concentraciones cercanas al LMR. Entre los métodos utilizados en forma más frecuente, se destacan aquellos de inhibición microbiológica que emplean *G.*

stearothermophilus para la detección de penicilina (Nagel *et al.*, 2009_a), betalactámicos y sulfamidas (Korsrud *et al.*, 1998; Nouws *et al.*, 1999) o tetraciclinas (Nagel *et al.*, 2009_b) por brindar una respuesta más rápida que otros microorganismos, como por ejemplo *Bacillus subtilis*.

Por ello, algunos autores sugieren el empleo de antifolatos para mejorar la sensibilidad de *G. stearothermophilus* hacia las SAs. Así, Gudding (1976) propone una concentración de 25 µg/L de TMP en el medio de cultivo, Langeveld *et al.* (2005) un nivel de 60 µg/L, mientras que Adriany *et al.* (1995) utilizan una concentración de 50 µg/L. Por el contrario, Nouws *et al.* (1995) emplean concentraciones de TMP más elevadas (150 µg/L) en el diseño de un test microbiológico sensible a sulfamidas.

Debido a estas diferencias, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de diferentes niveles de TMP en un bioensayo que utiliza *G. stearothermophilus* sobre la especificidad y los límites de detección de SAs en leche.

MATERIALES Y MÉTODOS

I. Preparación de las microplacas: Se utilizó medio de cultivo Mueller Hinton (38 g/L, Biokar Diagnostics, Francia) fortificado con glucosa (20 g/L). Se llevó a un pH 8,00 y se esterilizó en autoclave a 121 °C por un tiempo de 15 minutos.

Una vez preparado el medio de cultivo, en condiciones estériles (equipo de flujo laminar vertical Sabella FLV, Argentina), se inoculó con una suspensión de esporas de *G. stearothermophilus* var. *calidolactis* C-953 (1.10⁸ esporas/mL, Merck®, Ref. 1.11499) de modo tal de obtener una concentración final de 5.10⁶ esporas/mL) e indicador de óxido-reducción Negro Brillante a una concentra-

ción final de 100 mg/mL. El medio de cultivo se fraccionó en cinco alícuotas con el propósito de analizar los siguientes niveles de trimetoprim (TMP, Sigma T-7883):

Especificidad: TMP = 0, 20, 40, 60 y 80 µg/L. Cuatro microplacas ELISA por cada nivel de TMP (20 microplacas).

Límites de detección: TMP = 0, 20, 40 y 60 µg/L. Cuatro microplacas ELISA por cada nivel de TMP y por cada sulfamida (64 microplacas).

Las microplacas se llenaron mediante un dispensador electrónico Eppendorf Research® Pro, utilizando un volumen de 100 µl por cada pocillo. Una vez enfriadas, se sellaron con bandas aluminizadas de poliestireno a 180°C durante un tiempo de 2,5 s y conservada a 4°C hasta el momento de su uso.

II. Estudio de especificidad del bioensayo:

Se utilizaron 192 muestras de leche procedentes del ordeño individual de vacas lecheras no tratadas ni medicamentadas de la raza Holando-Argentino pertenecientes al Departamento Las Colonias (Santa Fe, Argentina).

Las muestras seleccionadas presentaron valores normales de pH, composición química, recuentos de células somáticas (RCS < 400000 células/ml) y recuentos bacteriológicos aceptables para el ganado bovino (UFC < 100000 ufc/ml).

Cada muestra de leche se analizó por duplicado en dos microplacas ELISA diferentes fortificadas con los cinco niveles de TMP detallados previamente (TMP= 0, 20, 40, 60, y 80 µg/L).

Para el estudio de la especificidad, se agregó 50 µl de cada muestra de leche en los pocillos individuales de las microplacas elaboradas con diferentes niveles de TMP. Las muestras de leche se dejaron durante 1 h a 4°C para que tenga lugar la difusión de los antimicrobianos naturales. Seguidamente, las

microplacas se lavaron tres veces con agua destilada y se sellaron con bandas adhesivas. Se colocaron en baño de agua flotante a $64 \pm 1^\circ\text{C}$ durante un tiempo de 3,5 horas.

Además, las muestras de leche fueron analizadas por duplicado mediante el método Copan® test microplate P&S (Chr Hansen, Hoersholm, Denmark), para poder comparar los resultados de la especificidad con los calculados para diferentes niveles de TMP.

Las interpretaciones visuales de los resultados de las microplacas se realizaron por tres personas entrenadas y se evaluaron como “positivo” (color negro o tonalidad oscura) y “negativo” (color amarillo).

Para cada nivel de TMP, la especificidad se calculó mediante la siguiente expresión: Especificidad = “total de resultados negativos/total muestras analizadas”

III. Estudio de límites de detección del bioensayo: Las muestras de leche fueron fortificadas con seis sulfamidas: Sulfatiazol (STZ, Sigma: S-0127), Sulfametoxazol (SMX, Sigma: S-7507), Sulfadimetoxina (SDM, Sigma: S-7385), Sulfametazina (SMZ, Sigma: S-5637), Sulfadiazina (SDZ, Sigma: S-8626) y Sulfamerazina (SMR, Sigma: S-8876).

Las drogas empleadas para la preparación de las soluciones fueron conservadas, almacenadas y manipuladas siguiendo las recomendaciones de la casa fabricante. Todas las disoluciones se prepararon pesando 10 mg de cada sulfamida y disolviéndolas en matraces aforados de 10 ml (soluciones stock 1000 mg/L) previamente calibrados. Estas disoluciones se elaboraron en el momento de ser utilizadas a fin de evitar cualquier tipo de inconveniente por inestabilidad de las drogas.

Las disoluciones de antimicrobianos con leche se prepararon a partir de la disolución stock empleando leche libre de antimicrobianos al método Copan® test microplate P&S. Las concentraciones finales (mg/mL)

en leche de cada sulfamida se llevaron a cabo con disoluciones acuosas de modo tal que el volumen de la disolución concentrada no exceda al 1% del volumen final de la disolución a ser analizada (Reichmuth *et al.*, 1997; IDF, 1999).

Para cada sulfamida, se ensayaron 16 réplicas de 12 concentraciones (2 microplacas ELISA por cada nivel de TMP, 8 microplacas por cada sulfamida). En el Cuadro 1 se muestran las concentraciones empleadas para los cálculos de los límites de detección en las microplacas sin TMP y con TMP. Nótese que las concentraciones utilizadas en los bioensayos sin TMP son diferentes a las utilizadas con TMP debido a la acción bactericida combinada ente dichas sustancias, motivo por el cual, al emplear este antifolato deben disminuirse las concentraciones de sulfamidas a fin de construir la curva dosis respuesta.

Para el análisis de cada bioensayo se empleó un volumen de 50 μl de cada disolución de sulfamida en leche. Las condiciones de temperaturas y tiempos de difusión e incubación fueron las detalladas en el estudio de especificidad. Las interpretaciones visuales se efectuaron por tres personas calificadas y los resultados se evaluaron como “positivo” o “negativo”.

IV. Análisis estadístico de los datos: Por tratarse de una variable respuesta ordinal dicotómica a dos niveles (“positivo” o “negativo”) se utilizó el modelo de regresión logística por resultar más apropiado para el tratamiento estadístico de estos datos (Agresti, 1990).

Los resultados se evaluaron mediante el procedimiento stepwise del modelo de regresión logística contenido en el paquete estadístico SAS® (SAS, 1998), que permite ingresar en forma secuencial las variables más relevantes al modelo, de modo tal que aque-

Cuadro 1: Concentraciones de SAs utilizadas para la determinación de los límites de detección de los bioensayos con y sin TMP.

TMP	SAs	Concentración (µg/mL)											
Sin TMP	STZ	0	1	1,25	1,5	1,75	2	2,25	2,5	3	3,5	4	6
	SMX	0	1	1,25	1,5	1,75	2	2,25	2,5	3	3,5	4	8
	SDM	0	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5	5,5	6	7	8
	SMZ	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22
	SDZ	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22
	SMR	0	2	4	6	8	12	16	20	24	26	28	32
Con TMP	STZ	0	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5	0,6	0,8	1
	SMX	0	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,35	0,4	0,45	0,5	0,6
	SDM	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,8	1,0	1,2	1,5	1,8
	SMZ	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,8	1,0	1,2	1,4	1,6
	SDZ	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,8	1,0	1,2	1,4	1,6
	SMR	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,8	1,0	1,2	1,4	1,6

TMP: trimetoprim, SAs: Sulfamidas, STZ: sulfatiazol, SMX: sulfametoxazol, SDM: sulfadimetoxina, SMZ: sulfametazina, SDZ: sulfadiazina, SMR: sulfamerazina.

Las variables que presentan un valor de $\chi^2 \leq 3.94$ son incorporadas al modelo mientras que las variables que poseen un valor de $\chi^2 \leq 3.94$ son removidas del modelo. Se empleó el siguiente modelo de regresión logística:

$$L_{ijkl} = \text{logit} [P_{ijkl}] = \beta_0 + \beta_1 [S]_i + \beta_2 [TMP]_j + \beta_{12} [S]_i * [TMP]_j + e_{ijkl}$$

Donde: L_{ijkl} = modelo logístico múltiple ; $[P_{ijkl}] = \text{logit} [P_p / (1 - P_p)]$: probabilidad de resultados “positivos/negativos”; $\beta_0, \beta_1, \beta_2, \beta_{12}$ = coeficientes estimados por el modelo de regresión logística; $[S]_i$ = concentración

de sulfamida ($i=12$ niveles, Cuadro 1), $[TMP]_j$ = concentración de TMP ($j=4$ niveles: 0, 20, 40 y 60 µg/L), $[S]_i * [TMP]_j$ = interacción entre la concentración de sulfamida en la leche y la concentración de TMP en la microplaca ELISA, e_{ijkl} = error residual del modelo.

Para las microplacas elaboradas sin TMP, se estimaron únicamente los dos primeros términos de la ecuación anterior (β_0, β_1).

Se calculó el coeficiente de concordancia (SAS, 1998) como un parámetro que estima la correlación alcanzada entre las frecuencias de resultados positivos medidas y estimadas por el modelo.

Los límites de detección se calcularon para cada nivel de TMP como el valor de la concentración que produce el 95% de resultados positivos al bioensayo (Suhren *et al.*, 1996; IDF, 1999).

RESULTADOS

I. Estudio de especificidad del bioensayo:

Los resultados obtenidos cuando se analizaron duplicados de 192 muestras de leche en los bioensayos con diferentes niveles de TMP y el método Copan® Test se muestran en el Cuadro 2. Se observa la misma especificidad (95,8%) para los niveles de 20, 40 y 60 mg TMP/L que al emplear el método Copan® Test. Por el contrario, los menores valores de especificidad se alcanzaron para el bioensayo fortificado con 80 mg TMP/L de TMP (88,5%).

La concentración de 60 µg TMP/L fue sugerida por Langeveld *et al.* (2005), aunque Adriany *et al.* (1995) emplea un nivel levemente inferior (50 µg TMP/L). Por el contrario Nouws *et al.* (1995) recomienda una concentración muy elevada (150 µg TMP/L) para mejorar la sensibilidad del método hacia las sulfamidas.

Al respecto, se debe considerar que un buen método debe poseer adecuada sensibilidad para detectar el antimicrobiano presente en la muestra de leche sin disminuir su

especificidad. Por ello, el empleo de 80 µg TMP/L resulta perjudicial ya que incrementa la frecuencia de resultados “falsos positivos” al método.

II. Estudio de límites de detección del bioensayo:

Las ecuaciones matemáticas que expresan la frecuencia de resultados positivos como una función de las concentraciones de sulfamidas en leche se muestran en el Cuadro 3. También se pueden observar que en todos los casos resultó significativa la interacción entre las diferentes SAs estudiadas y el TMP. Los coeficientes de concordancia calculados mediante la aplicación del modelo de logístico para las seis sulfamidas estudiadas fueron buenos, al estar comprendidos entre 90,5 para SDZ sin TMP y 97,4 para SMZ con TMP.

En la Fig. 1 se observa el efecto de las concentraciones de las seis sulfamidas estudiadas sobre la frecuencia de resultados positivos para los bioensayos elaborados sin TMP. Se puede apreciar un comportamiento similar en las curvas dosis-respuesta para STZ, SMX y SDM (por presentar similares valores en sus coeficientes « β_1 », Cuadro 3), mientras que las curvas dosis-respuesta correspondientes a SMZ, SDZ y SMR muestran una respuesta más lenta ante el incremento en las concentraciones de SAs (menores valores de los coeficientes « β_1 », Cuadro 3).

Cuadro 2: Efecto de la concentración de TMP en el medio de cultivo sobre la especificidad de los bioensayos

Bioensayo	Número Muestras	Positivo	Negativo	Especificidad (%)
Bioensayo s/TMP	192	7	185	96,3
Bioensayo 20 µg TMP/L	192	8	184	95,8
Bioensayo 40 µg TMP/L	192	8	184	95,8
Bioensayo 60 µg TMP/L	192	8	184	95,8
Bioensayo 80 µg TMP/L	192	22	170	88,5
Copan® Test	192	8	184	95,8

Cuadro 3: Modelos logísticos que permiten estimar la frecuencia de resultados positivos para los bioensayos preparados sin y con TMP

TMP	SAs	Logit [P] = $\beta_0 + \beta_1$ [Sulfamida]	C
Sin TMP	STZ	Logit [P] = -10,243 + 0,0031 [STZ]	96,7
	SMX	Logit [P] = -11,964 + 0,0037 [SMX]	96,9
	SDM	Logit [P] = -13,215 + 0,0024 [SDM]	95,1
	SMZ	Logit [P] = -7,745 + 0,0004 [SMZ]	90,5
	SDZ	Logit [P] = -7,513 + 0,0006 [SDZ]	94,7
	SMR	Logit [P] = -6,343 + 0,00032 [SMR]	94,8
	Con TMP	STZ	Logit [P] = -7,315 + 0,0055 [STZ] + 0,0726 [TMP] + 0,0005 [STZ]*[TMP]
SMX		Logit [P] = -4,736 + 0,0844 [SMX] + 0,0341[TMP] + 0,0005 [SMX]*[TMP]	96,0
SDM		Logit [P] = -5,047 + 0,0031 [SDM] + 0,0505 [TMP] + 0,0002 [SDM]*[TMP]	94,9
SMZ		Logit [P] = -14,633 + 0,0050 [SMZ] + 0,4562 [TMP] + 0,0002 [SMZ]*[TMP]	97,4
SDZ		Logit [P] = -5,450 + 0,0030 [SDZ] + 0,0002 [SDZ]*[TMP]	97,3
SMR		Logit [P] = -7,328 + 0,0072 [SMR] + 0,0305 [TMP]	94,6

TMP: trimetoprim, STZ: sulfatiazol, SMX: sulfametoxazol, SDM: sulfadimetoxina, SMZ: sulfametazina, SDZ: sulfadiazina, SMR: sulfamerazina, C: concordancia porcentual.

Al analizar los coeficientes « β_{12} » del Cuadro 3, se puede observar que la incorporación de trimetoprim al medio de cultivo produce un efecto sinérgico para todas las sulfamidas (valores positivos de « β_{12} ») a excepción de SMR, dando lugar a un incremento en pendiente de la curva dosis-respuesta del bioensayo y un desplazamiento hacia menores concentraciones de SAs (Fig. 2).

El efecto sinérgico entre TMP y las SAs (SDM, SDZ, SMX, SMZ, STZ) se debe a que la acción antimicrobiana de la combinación de estas drogas es mayor que la suma de sus simples efectos individuales. La significancia estadística ($p < 0,05$) de esta interacción (TMP*SAs) queda demostrada mediante la

implementación del modelo logístico. Según Jawetz & Gunnison (1952), el efecto sinérgico se pone de manifiesto por un incremento en la velocidad de su acción bactericida, tal como se aprecia en la Fig. 2. En efecto, un incremento notorio en la pendiente de la curva dosis-respuesta se produce para un nivel de 60 μ g/L de TMP. Este hecho pone en relieve un efecto bactericida debido a la combinación de SAs y TMP.

Haciendo uso de las ecuaciones logísticas de la Tabla 3 y el criterio sugerido por Suhren *et al.* (1996) e IDF (1999), se calcularon los límites de detección de las seis sulfamidas para los bioensayos elaborados con diferentes niveles de TMP (Cuadro 4).

Los límites de detección de las SAs en leche calculados para el bioensayo sin TMP fueron altos, al igual que los reportados para otros métodos de inhibición microbiológica que no adicionan TMP. Así, Frank (1995) determina rangos muy elevados para STZ (5000-10000 $\mu\text{g/L}$) y SMR (15000-50000 $\mu\text{g/L}$) cuando utiliza el método BRT AiM^a, similares a los límites expuestos en el Cuadro 4. Por su parte, Charm y Ruth (1993); Heesch (1993) y Heesch & Blüthgen (1991) señalan valores próximos a 1000 $\mu\text{g/L}$ de SDZ.

En el Cuadro 4 se observa además los lí-

mites de detección calculados para diferentes niveles de TMP, se observa una disminución en los niveles de detección del bioensayo, conforme se incrementa la concentración de TMP en el medio de cultivo.

Considerando que el Límite Máximo de Residuo establecido por la Unión Europea para SAs en leche es de 100 $\mu\text{g/L}$, la incorporación de 60 $\mu\text{g/L}$ de trimetoprim permite obtener niveles de detección próximos al LMR para STZ (160 $\mu\text{g/L}$), SMX (110 $\mu\text{g/L}$), SDM (380 $\mu\text{g/L}$) y no tan cercanos para SMZ (730 $\mu\text{g/L}$), SDZ (580 $\mu\text{g/L}$) y SMR (1170 $\mu\text{g/L}$).

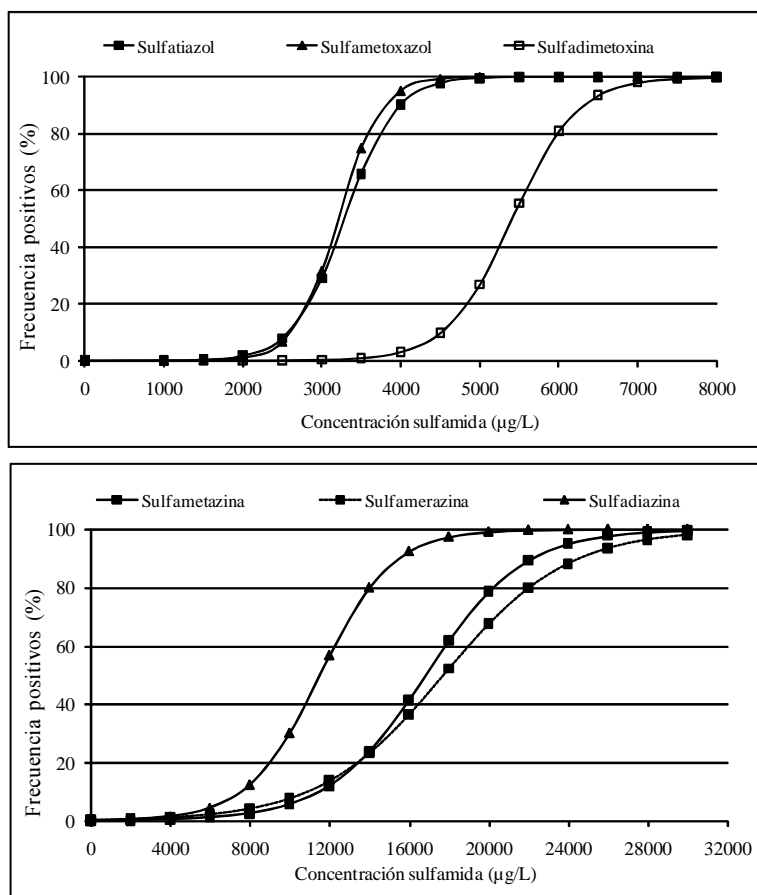


Fig. 1: Curvas dosis-respuestas de sulfamidas en leche para el bioensayo sin trimetoprim en el medio de cultivo.

Los límites de detección del bioensayo fortificado con trimetoprim resultan similares a los límites calculados para otros métodos de inhibición microbiológicos que utilizan *G. stearothermophilus* e incorporan antifolatos en su composición, como por ejemplo el método Delvotest[®] «SP» que permite detectar 260 $\mu\text{g/L}$ de SDM y 110 $\mu\text{g/L}$ de SMX en leche de oveja (Althaus *et al.*,

2002). Aunque, Charm y Ruth (1993) señalan un límite de detección de 1000 $\mu\text{g/L}$ de SDZ en leche de vaca para este método.

El método microbiológico Eclipse[®] «100ov» cuando se utiliza con leche de oveja permite detectar 170 $\mu\text{g/L}$ de SDM, 750 $\mu\text{g/L}$ de SMZ y 250 $\mu\text{g/L}$ de STZ (Montero *et al.*, 2004), valores muy cercanos a los límites de detección calculados en el Cuadro 4.

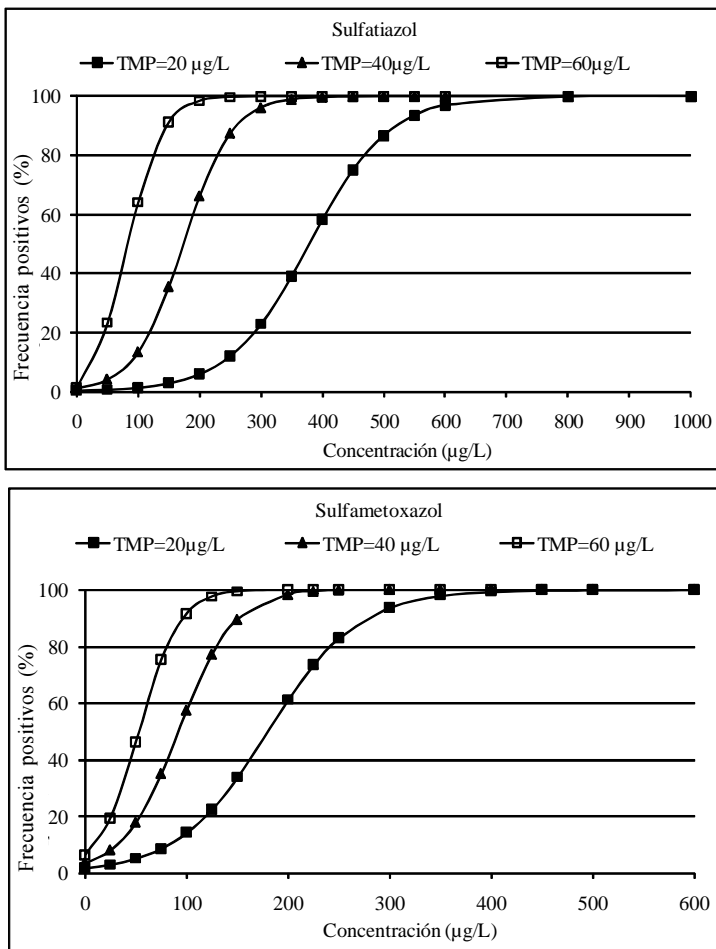


Fig. 2: Efecto de los niveles de trimetoprim en el medio de cultivo del bioensayo sobre las curvas dosis-respuestas de sulfamidas en leche.

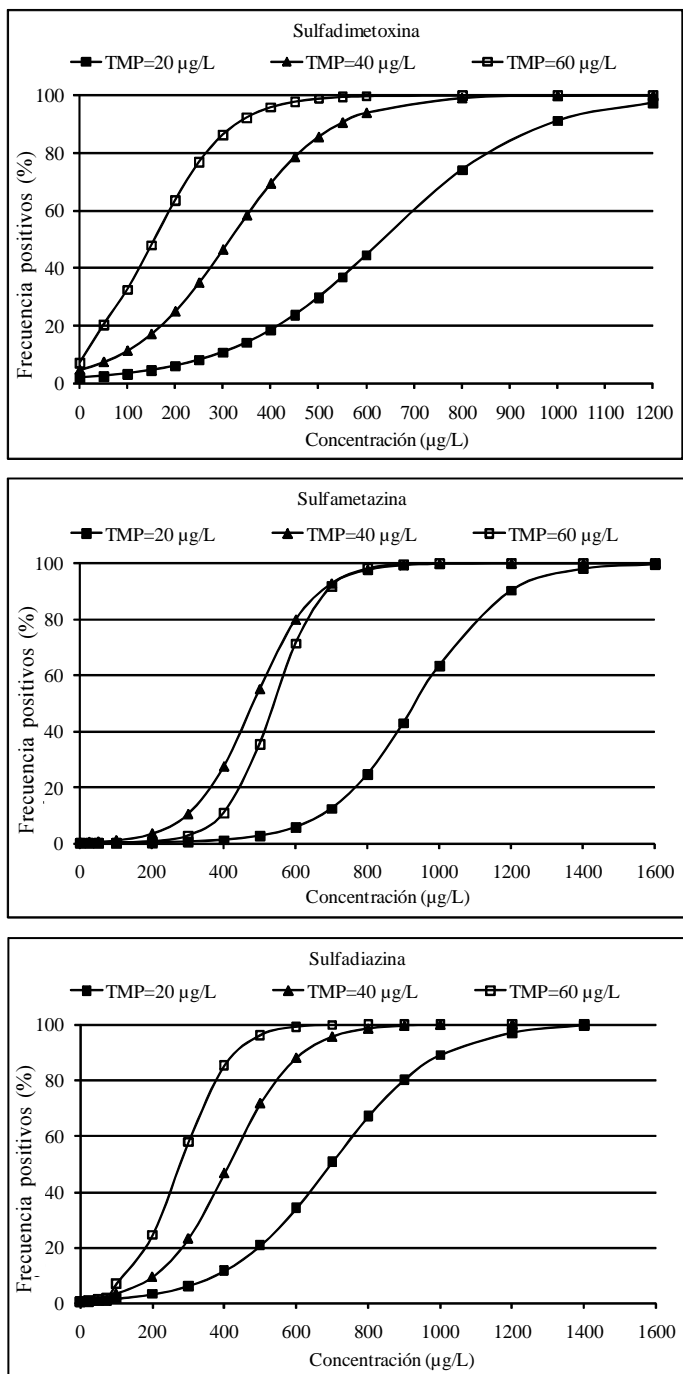


Fig. 2 (Contin.): Efecto de los niveles de trimetoprim en el medio de cultivo del bioensayo sobre las curvas dosis-respuestas de sulfamidas en leche.

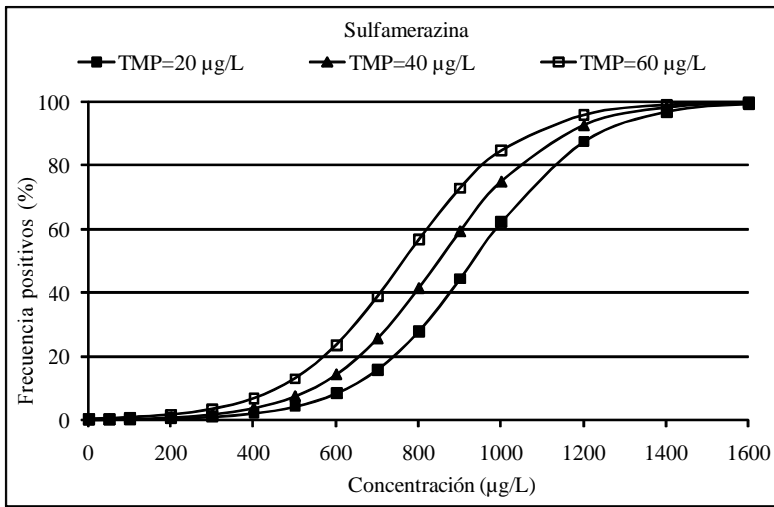


Fig. 2 (Contin.): Efecto de los niveles de trimetoprim en el medio de cultivo del bioensayo sobre las curvas dosis-respuestas de sulfamidas en leche.

Cuadro 4: Efecto de las concentraciones de TMP sobre los límites de detección (µg/L) de SAs en leche

Sulfamida	Sin TMP	20 µg TMP/L	40 µg TMP/L	60 µg TMP/L	LMR
STZ	4360	570	290	160	100
SMX	4130	310	170	110	100
SDM	7100	1100	620	380	100
SMZ	25400	1280	730	730	100
SDZ	19400	1220	780	580	100
SMR	30300	1340	1250	1170	100

CONCLUSIONES

A modo de síntesis, se puede establecer que el uso de 60 µg TMP/L en la elaboración del bioensayo que utiliza *G. stearotherophilus* resulta adecuado, puesto que no produce un incremento en la frecuencia de resultados “falsos positivos” al método y presenta una gran mejora en los límites de detección de las sulfamidas en leche. No obstante, algunos de estos límites

de detección no llegan a ser cercanos al Límite Máximo de Residuos, por ello, sería conveniente diseñar un bioensayo que utilice otro microorganismo de prueba más sensible a las sulfamidas, como *B. subtilis*.

Por último, se debe destacar que la aplicación del modelo de regresión logística constituye un instrumento valioso para evaluar el sinergismo de drogas, al permitir analizar la interacción entre el trimetoprim y las sulfonamidas.

AGRADECIMIENTO

Trabajo realizado con fondos provenientes de la Universidad Nacional del Litoral, a través del Programa de Curso de Acción para la Investigación y el Desarrollo CAI+D'05/07 Proyecto N° 033-213 (Res. H.C.D.N° 302) de la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional del Litoral.

BIBLIOGRAFIA

- ADRIANY, A.; MÄRTLBAUER, E. & K. J. ZAADHOF.** 1995. A modified brilliant black-reduction test (BRT) with improved sensitivity for tetracyclines and sulfonamides. Proceedings of the IDF-Symposium Residues of antimicrobial drugs and other inhibitors in milk, Kiel, Germany, August 28-31. p 172.
- AGARWAL, V. K.** 1992. High-performance liquid chromatographic methods for the determination of sulfonamides in tissues, milk and eggs. *J. Chromatogr.* 624: 411-423.
- AGRESTI, A.** 1990. *Categorical Data Analysis.* Ed. John Wiley and Sons. U.K.
- ALTHAUS, R.L.; C. PERIS; A. MONTERO; A. TORRES; P. MOLINA & N. FERNANDEZ.** 2002. Detection limits of antimicrobial agents in ewe milk by Delvotest®. *Milchwissenschaft.* 57: 660-664.
- ANON..** 1990. Council Regulation (EEC) No. 2377/90 laying down a community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. 26th June 1990. Official Journal of the European Communities. N° L224.:1-8.
- BUSHBY, S. R. M. & G. H. HITCHINGS.** 1968. Trimethoprim, a sulphonamide potentiator. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy.* 33: 72-90.
- CHARM, S. E. & G. P. RUTH.** 1993. Advances in Charm technology for Antimicrobial residues in milk. Pages: 32-46. *In* Inhibitory Substances in Milk-Current Analytical Practice. IDF Bull. N° 283. International Dairy Federation, Brussels, Belgium.
- DARRELL, J. H., GARROD, L. P. & P. M. WATERWORTH.** 1968. Trimethoprim: laboratory and clinical studies. *Journal of Clinical Pathology.* 21: 202-209.
- FRANK, S.** 1995. Bestimmung der Nachweisgrenzen ausgewählter Antibiotika und Sulfonamide im Brillantschwarz-Reduktionstest. Diss. Universität Diplomarbeit Thier. Triesdorf, Germany.
- GUDDING, R.** 1976. An improved bacteriological method for the detection of sulphonamide residues in food. *Acta vet. Scand.* 17: 458-464.
- HAAGSMA, N.; PLUIJMAKERS, H. G.; AETS, M. M. & W. M. BEEK.** 1987. Rapid sample preparation methods for analysis of residues of sulfamethazine and its N4-acetyl and desamino metabolites in swine tissue by HPLC. *Biomed. Chromatogr.* 2: 41-45.
- HEESCHEN, W.** 1993. Residues of Antibiotics and Sulfonamides in Milk. 3-12. *En* Inhibitory Substances in Milk-Current Analytical Practice. IDF Bull. N° 283, International Dairy Federation. Bruselas, Belgica.
- HEESCHEN, W. H. & A. BLÜTHGEN.** 1991. Veterinary drugs and pharmacologically active compounds. Pages: 16-39. *In* Residues and contaminants in milk products. IDF Special Issue N° 9101. International Dairy Federation, Brussels, Belgium.
- HUOVINEN, P.** 2001. Resistance to trimetoprim-sulfamethoxazole. *Clin. Infect Dis.* 32:1608-1614.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (IDF).** 1999. Guidance for the standardized evaluation of microbial inhibitor test. IDF

- Standard N° 183. International Dairy Federation. Brussels. Belgium.
- JAWETZ, E. & J. B. GUNNISON.** 1952. An experimental basis of combined antibiotic action. *Journal of the American Medical Association.* 150: 693-695.
- KORSRUD, G.; BOISON, J.; NOUWS, J. & J. MACNEIL.** 1998. Bacterial inhibition tests used to screen for antimicrobial veterinary drug residues in slaughtered animals. *J. AOAC int.* 81: 21-24.
- LANGEVELD, P.; BEUKERS, R.; BOMMELE, M. & J. STARK.** 2005. A rapid microbiological test for the detection of antibacterial compounds. US 6,867,015, Mar. 15. 2005.
- LINDSAY, D. D. & B. L. BLAGBURN.** 1995. Antiprotozoan drugs. In *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*; Adams, H. R., Ed.; Iowa State University Press: Ames. IA: 955-983.
- LITTLEFIELD, N. A.; SHELDON, W. G.; ALLEN, R. & D. W. GAYLOR.** 1990. Chronic toxicity/carcinogenicity studies of sulphametaine in Fischer 344/N rats: two generation exposure. *Food Chem. Toxicology.* 28: 157-167.
- MONTERO, A.; ALTHAUS, R. L.; MOLINA, A.; BERRUGA, I & P. MOLINA.** 2004. Detection of antimicrobial agents by a specific microbiological method (Eclipse[®] 100ov) for ewe milk. *Small Ruminant Research.* 57: 229-237.
- NAGEL, O.G.; MOLINA, M.P.; BASÍLICO, J.C.; ZAPATA, M.L; ALTHAUS, R.L.** 2009_a. Robust experimental design for optimizing the microbial inhibitor test for penicillin detection in milk. *Letters in Applied Microbiology.* 48: 744-749.
- NAGEL, O. G.; ZAPATA, M. L.; BASÍLICO, J.C.; BERTERO, J; MOLINA, M. P.; ALTHAUS, R. L.** 2009_b. Effect of chloramphenicol on a bioassay response for the detection of tetracycline residues in milk. *J. Food and Drug Analysis.* 7(1): 36-42.
- NEUMAN, M.** 1971. *Vade-mecum des Antibiotiques et Agents Chimiotherapiques Anti-Infectieux*; Maoine: Paris, France: 365-381.
- NOUWS, J.; LOEFFEN, G.; SCHOUTEN, J.; VAN EGMOND, H. & H. STEGEMAN.** 1995. Improvement of the tube diffusion test with respect to detection of tetracycline, macrolide, aminoglycoside and sulfonamide residues in raw milk. *Proceedings of the IDF-Symposium Residues of antimicrobial drugs and other inhibitors in milk*, Kiel, Germany, August 28-31. p 223.
- NOUWS, J.; VAN EGMOND, H.; LOEFFEN, G.; SCHOUTEN, J.; KEUKENS, H.; SMULDERS, I. & H. STEGEMAN.** 1999. Suitability of the Charm HVS and a microbiological multiplate system for detection of residues in raw milk at EU maximum residue levels. *Vet. Q.* 21: 21-27.
- REICHMUTH, J. SUHREN, G. & R. BEUKERS.** 1997. Evaluation of microbial inhibitor test-the IDF approach. *Milchwissenschaft.* 52: 691-695.
- SAS Institute Inc.,** 1998. *SAS Users guide: statistics version 6.12.* Cary, NC.
- STOWE, C. M.** 1965. *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, L. M. Jones (Ed.), Iowa University Press, Ames. pp 457.
- SUHREN, G., REICHMUTH, J. & H. G. WALTE.** 1996. Detection of b-lactam antibiotics in milk by the Penzym-test. *Milchwissenschaft.* 51: 269-273.
- ZORRAQUINO, M. A.** 2005. Inactivación térmica de sustancias antimicrobianas en la leche. Ph.D. Diss., Universidad Pública de Navarra, Navarra, Spain.