

DETECCIÓN ESPECÍFICA DE TETRACICLINAS EN LECHE MEDIANTE LECTURAS FOTOMÉTRICAS DE UN BIOENSAYO QUE UTILIZA *BACILLUS CEREUS*

NAGEL, O. G.¹; ALTHAUS, R. L.¹ & MOLINA, M. P.²

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue determinar los límites de detección de 26 antimicrobianos utilizando las lecturas fotométricas de un bioensayo que utiliza *Bacillus cereus*. Para ello, se ensayaron 16 réplicas de 12 concentraciones utilizando muestras de leche procedentes de vacas individuales no tratadas ni medicamentadas. Los límites de detección del bioensayo se calcularon mediante el modelo de regresión logística. Las tetraciclinas detectan 60 µg l⁻¹ de oxitetraciclina, 80 µg l⁻¹ de tetraciclina y 260 µg l⁻¹ de clortetraciclina, valores similares al LMR (100 µg l⁻¹). Este bioensayo no presenta especificidad cruzada con los antibióticos betalactámicos (24800 µg l⁻¹ amoxicilina, 37500 µg l⁻¹ ampicilina, 10280 µg l⁻¹ cloxacilina, 4500 µg l⁻¹ oxacilina, 31400 µg l⁻¹ penicilina G, 4330 µg l⁻¹ cefadroxilo, 3700 µg l⁻¹ cefalexina, 7400 µg l⁻¹ cefoperazone, 29200 µg l⁻¹ ceftiofur®, 11260 µg l⁻¹ cefuroxime), aminoglucósidos (2470 µg l⁻¹ gentamicina, 7000 µg l⁻¹ kanamicina, 9950 µg l⁻¹ neomicina, 8640 µg l⁻¹ estreptomina), macrólidos (1330 µg l⁻¹ eritromicina, 3470 µg l⁻¹ lincomicina, 1170 µg l⁻¹ tilosina), sulfamidas (65150 µg l⁻¹ sulfadiazina, 34160 µg l⁻¹ sulfamerazina, 43500 µg l⁻¹ sulfametazina, 69800 µg l⁻¹ sulfametoxazol, 52000 µg l⁻¹ sulfatiazol) y quinolonas (1640 µg l⁻¹ ciprofloxacina, 1690 µg l⁻¹ enrofloxacina, 1790 µg l⁻¹ marbofloxacina, 4830 µg l⁻¹ norfloxacina) por presentar límites de detección muy alejados de sus respectivos LMRs. Se concluye que el bioensayo resulta específico para la detección de residuos de tetraciclinas en leche. Además, a fin de evitar posibles errores debido a la interpretación de los resultados, se puede automatizar las lecturas mediante un lector de microplacas ELISA.

Palabras clave: antimicrobianos, *Bacillus cereus*, leche, método de inhibición microbiológica, detección fotométrica.

1.- Cátedra de Biofísica. Facultad de Ciencias Veterinarias (UNL). Kreder 2805. (3080) Esperanza, provincia de Santa Fe.

2.- Departamento de Ciencia Animal, Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera 14, 46072, Valencia, España.

Manuscrito recibido el 20 de agosto de 2013 y aceptado para su publicación el 13 de diciembre de 2013.

SUMMARY

Specific detection of tetracycline in milk by photometric readings of a bioassay with *Bacillus cereus*.

The aim of this work was to determine the detection limits of 26 antimicrobials using photometric readings of a bioassay that use *Bacillus cereus*. For this, 16 replicas were assayed using 12 concentrations of milk samples from untreated individual cows. The limits of detection of the bioassay were calculated by logistic regression model. Tetracyclines detect 60 mg l⁻¹ of oxytetracycline, 80 mg l⁻¹ of tetracycline and 260 mg l⁻¹ of chlortetracycline, similar values to the MRL (100 mg l⁻¹). This bioassay does not have cross-specificity with beta-lactam antibiotics (24800 mg l⁻¹ amoxicillin, 37500 mg l⁻¹ ampicillin, 10280 mg l⁻¹ cloxacillin, 4500 mg l⁻¹ oxacillin, 31400 mg l⁻¹ penicillin G, 4330 mg l⁻¹ cefadroxil, 3700 mg l⁻¹ cephalixin, 7400 mg l⁻¹ cefoperazone, 29200 mg l⁻¹ ceftiofur®, 11260 mg l⁻¹ cefuroxime), aminoglycosides (2470 mg l⁻¹ gentamicin, 7000 mg l⁻¹ kanamycin, 9950 mg l⁻¹ neomycin, 8640 mg l⁻¹ streptomycin), macrolides (1330 mg l⁻¹ erythromycin, 3470 mg l⁻¹ lincomycin, 1170 mg l⁻¹ tylosin), sulfonamides (65150 mg l⁻¹ sulfadiazine, 34160 mg l⁻¹ sulfamerazine, 43500 mg l⁻¹ sulfamethazine, 69800 mg l⁻¹ sulfamethoxazole, 52000 mg l⁻¹ sulfathiazole) and quinolones (1640 mg l⁻¹ ciprofloxacin, 1690 mg l⁻¹ enrofloxacin, 1790 mg l⁻¹ marbofloxacin, 4830 mg l⁻¹ norfloxacin) because their detection limit are greater than respective MRLs. It is concluded that, the bioassay is specific for detection of tetracycline residues in milk. In addition, to avoid possible errors due to the interpretation of the results, the readings can be automated through an ELISA microplate reader.

Key words: antimicrobial, *Bacillus cereus*, milk, microbial inhibitor test, photometric detection.

INTRODUCCIÓN

Las tetraciclinas (TCs) son antibióticos de amplio espectro que actúan inhibiendo la biosíntesis proteica mediante el bloqueo de la unión del ARN mensajero con la subunidad 30S del ribosoma bacteriano. Se utilizan con frecuencia en los tratamientos de infecciones bacterianas tales como mastitis, metritis y contra una amplia gama de patógenos, debido principalmente a su bajo costo y su relativa baja toxicidad (Chopra *et al.*, 1992; Roberts, 1996).

Estas sustancias, al igual que otros antibióticos, pueden causar problemas asociados con síntomas alérgicos, desarrollo de resistencias a microorganismos (McManus, 1997; Demoly & Romano, 2005). Además, pueden ocasionar pérdidas económicas a las

industrias de productos lácteos (inhibición de los cultivos iniciadores utilizados en la fermentación de quesos y yogures) o en la aceptación final de estos productos debido a modificaciones en sus propiedades organolépticas (Perreten & Teuber, 1995; Packham *et al.*, 2001, Berruga *et al.*, 2009).

Por ello, un monitoreo continuo de los residuos de antibióticos debe realizarse con el propósito de garantizar la seguridad en la cadena alimentaria. Por este motivo, la Comisión de Regulación de la Comunidad Europea (2010) determina los Límites Máximos Residuos (LMRs) para los diferentes productos veterinarios que pueden estar presentes en los alimentos, incluida la leche. En el caso concreto de las tetraciclinas, la legislación establece únicamente un nivel de 100 µg l⁻¹ para residuos de tetraciclina,