

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,

oxitetraciclina y clortetraciclina en leche.

Los residuos de antibióticos en leche se controlan, habitualmente, mediante métodos de inhibición microbiológica que utilizan como bacteria-test a *Geobacillus stearothermophilus*, tales como BRT[®] AiM, Delvotest[®], Charm[®] BY y Eclipse[®] (Diserens *et al.*, 2005; Toldra & Reig, 2006). Sin embargo, estos métodos no presentan una sensibilidad adecuada para la detección de tetraciclinas en leche, debido a que sus límites de detección son superiores al LMR (100 µg l⁻¹). Debido a ello, diferentes autores (Aureli *et al.*, 1996; Nouws *et al.*, 1999a,b; Gaudin *et al.*, 2004; Althaus *et al.*, 2009) proponen el uso de placas de Petri específicas que emplean *Bacillus cereus* subsp. *mycoides* ATCC 11778 para la detección de tetraciclinas en leche a niveles cercanos a los establecidos por la legislación.

No obstante, se debe considerar que los métodos de inhibición microbiológica en placas de Petri presentan ciertas desventajas en comparación con los bioensayos en microplacas ELISA (BRT[®] AiM, Delvotest[®], Eclipse[®], etc.), tales como, tiempos prolongados de incubación (18-24 h), cortos periodos de conservación de las placas elaboradas, medición de halos inhibitorios y la necesidad de personal especializado en técnicas microbiológicas.

Por esta razón, Nagel *et al.* (2009a,b; 2011; 2012; 2013b) proponen el uso de técnicas quimiométricas para la optimización de métodos microbiológicos en placas de microtitulación ELISA que reemplacen los clásicos métodos de difusión en placas de Petri. Estos bioensayos son económicos y fáciles de implementar en laboratorios, porque permiten analizar grandes cantidades de muestras en tiempos relativamente cortos, además de brindar respuesta de tipo dicotómico (positivo o negativo). No obstante, estas interpretaciones visuales pueden resultar subjetivas, debido a las posibles

diferencias individuales en las calificaciones de las respuestas de un método.

Con el propósito de evitar estas posibles discrepancias en los resultados visuales y a fin de realizar una lectura automatizada y objetiva, algunos autores (Luitz & Suhren, 1995; Luitz *et al.*, 1996; Althaus *et al.*, 2003) proponen el uso de un lector fotométrico de microplacas ELISA, tanto para el cálculo de los límites de detección, como para la interpretación de los resultados.

Por todo ello, el objetivo de este trabajo fue determinar los límites de detección de un bioensayo en placas de microtitulación que utiliza *B. cereus* para la detección específica de tetraciclinas en leche, por medio de un lector ELISA con el propósito de automatizar las lecturas de los resultados y evitar posibles subjetividades debidas al personal de laboratorio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación del bioensayo

Se utilizó un medio de cultivo constituido por 6,25 g l⁻¹ de peptona de caseína (Biokar, Beauvais, France), 2,25 g l⁻¹ de extracto de levadura (Britania, Buenos Aires, Argentina), 10 g l⁻¹ de glucosa (Cicarelli, San Lorenzo, Argentina) y 15 g l⁻¹ de agar (Britania, Buenos Aires, Argentina) a pH = 7,00, que se esterilizó en autoclave a 121 °C durante un tiempo de 15 minutos. Posteriormente, se inoculó el medio de cultivo con una suspensión de esporas de *Bacillus cereus* subsp. *mycoides* ATCC 11778 (2.10⁵ esporas ml⁻¹) y se adicionó púrpura de bromocresol (45 mg l⁻¹; Mallinckrodt[®], Ref. 2090), rojo fenol (270 mg l⁻¹; Sigma[®], Ref. P3532) y cloranfenicol (600 g l⁻¹) en condiciones de esterilidad (Flujo laminar vertical Sabella FLV, Buenos Aires, Argentina).

Las placas de microtitulación ELISA se llenaron mediante un dispensador electrónico Eppendorf Research® Pro (Hamburg, Germany) utilizando un volumen de 100 µL en cada pocillo. Una vez gelificado el medio, las microplacas se sellaron con bandas aluminizadas de poliestireno a 180 °C durante un tiempo de 2,5 s y se conservaron a 4 °C hasta el momento de su uso.

Muestras de leche

Los animales procedían de rebaños ubicados en el departamento Las Colonias (Santa Fe, Argentina). Para este estudio, se recolectaron muestras de leche procedentes de 16 vacas correspondientes al ordeño de la mañana (6,00 horas) que se encontraban a mitad de la lactancia (60 a 90 días post-parto). Los animales no recibieron ningún tratamiento farmacológico durante todo el periodo de muestreo (IDF, 2002). Las muestras seleccionadas tenían una composición química y valores de pH normales para la leche bovina, es decir, bajo recuento de células somáticas (SCC <400.000 células ml⁻¹) y un recuento de bacterias aceptable para la leche de vaca (CFU <100.000 ufc ml⁻¹).

Disoluciones de antimicrobianos y muestras de leche fortificadas

Para el cálculo de los límites de detección de 27 antibióticos (8 betalactámicos, 4 aminoglucósidos, 4 macrólidos, 3 quinolonas, 3 tetraciclinas y 5 sulfonamidas), se prepararon las disoluciones en leche que se detallan en el Cuadro 1.

Para la preparación de las diluciones se pesó una cantidad de sustancia de forma tal de obtener una disoluciones madre o “stock” con una concentración de 1000 mg l⁻¹. A partir de cada “disolución stock” de cada antibiótico se prepararon disoluciones que correspondían 100, 10 y 1 mg l⁻¹.

Las muestras fortificadas de leche, se prepararon adicionando una alícuota de estas disoluciones de antibiótico (100, 10 y 1 mg l⁻¹, “stock”) a 10 ml de leche de forma tal que el volumen de las disoluciones fortificadas no supere el 1% del volumen de disolución final (IDF, 1997; 2002). Para cada antibiótico se ensayaron 12 disoluciones (1 blanco de muestra de leche sin antibiótico y 11 disoluciones) según Cuadro 1.

Estudio de límites de detección

Para el estudio de los límites de detección de cada agente antimicrobiano se emplearon dos microplacas (16 réplicas de cada concentración). En cada pocillo de la microplaca se depositó 50 µl de disolución de leche previamente enriquecida con los niveles del Cuadro 1. Seguidamente, las microplacas fueron selladas e incubadas en un baño termostático a 45 °C durante un tiempo de 5 horas.

Inmediatamente después de de la incubación, se midió la absorbancia con lector de placas ELISA Biotek ELx800TM (Biotek Instrument Inc., Winooski, Vernont, USA) utilizando un filtro de 550 nm. Las mediciones fotométricas fueron expresadas en términos de absorbancias relativas porcentuales de acuerdo a la siguiente expresión:

$$\% A = (A_x - A_0) / (A_{100} - A_0) 100$$

Donde: % A: absorbancia relativa, Ax: absorbancia de la muestra de leche con “x” concentración de antibiótico, A₀: absorbancia de la muestra de leche negativa (control negativo), A₁₀₀: absorbancia de la muestra de leche con antibiótico que produce 100% de resultados positivos al bioensayo.

Análisis estadístico: Los resultados se analizaron utilizando el procedimiento Regresión Logística del paquete estadístico

StatGraphics Centurion XVI (StatGraphics, 2008). El modelo utilizado para evaluar el efecto de la concentración de antimicrobiano sobre la absorbancia relativa porcentual fue el siguiente:

$$L_{ij} = \beta_0 + \beta_1 A_i + \varepsilon_j$$

Donde: L_{ij} = modelo logístico lineal; β_0 , β_1 = coeficientes estimados por el modelo

de regresión; A_i = concentración de antimicrobiano; ε_j = residual error. Se calculó el coeficiente de concordancia como una estimación del ajuste logrado entre la absorción relativa observada y predicha por el modelo.

El límite de detección de las mediciones fotométricas de cada antibiótico se calculó como aquella concentración que produce 45 % de la máxima absorbancia relativa (Luitz & Suhren, 1995; Luitz *et al.*, 1996).

Cuadro 1: Concentraciones de agentes antimicrobianos utilizadas para la determinación de los límites de detección del bioensayo que utiliza *Bacillus cereus*.

Antimicrobiano	Concentraciones (* $\mu\text{g l}^{-1}$ or mg l^{-1})
Betalactámicos	
Amoxicilina (Sigma A-8523)	0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120
Ampicilina (Sigma A-9518)	0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120
Cloxacilina (Sigma C-9393)	0, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45
Oxacilina (Sigma O-1002)	0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 14
Penicilina "G" (Sigma PEN-Na)	0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120
Cefadroxilo (Sigma C-7020)	0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12
Cefalexina (Sigma C-4895)	0, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15
Cefoperazone (Sigma C-4292)	0, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 16
Ceftiofur [®] (Pharmacia & Upjohn ^a)	0, 10, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65
Cefuroxime (Sigma C-4417)	0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22
Aminoglucósidos	
Estreptomycin (Sigma S-6501)	0, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24
Gentamicina (Sigma G-3632)	0, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10
Kanamicina (Sigma K-4000)	0, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14
Neomicina (Sigma N-1876)	0, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24
Macrolidos	
Eritromicina (Sigma E-6376)	0, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5
Espiramicina (Sigma S-9136)	0, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 16
Lincomicina (Sigma L-6004)	0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12
Tilosina (Sigma T-6134)	0, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, 2, 2.2, 2.4, 2.6
Tetraciclinas	
Clortetraciclina (Sigma C-4881)	0, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 800, 1000, 1200, 1400 *
Oxitetraciclina (Sigma O-5750)	0, 10, 20, 30, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 *
Tetraciclina (Sigma T-3258)	0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220 *
Sulfamidazinas	
Sulfadiazina (Sigma S-8626)	0, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200
Sulfamerazina (Sigma S-8876)	0, 2.5, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160
Sulfametazina (Sigma S-5637)	0, 2.5, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160
Sulfametoxazol (Sigma S-7507)	0, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 100, 120, 140, 160
Sulfatiazol (Sigma S-0127)	0, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 100, 120, 140, 160
Quinolonas	
Ciprofloxacina (Sigma 17850-F)	0, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5, 1.75, 2, 2.25, 2.5, 3, 3.5
Enrofloxacin [®] Bayer	0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 6
Marbofloxacina [®] Vetoquinol	0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12
Norfloxacina (Sigma N-9890)	0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 16

^a Pharmacia & Upjohn Co. (Kalamazoo, MI, USA); ^b Bayer Health Care Div. Animal Health (Monheim, Germany); ^c Vetoquinol SA - B.P. 189 (Lure cedex, France); Sigma (St. Louis, MO, USA).

RESULTADOS Y DISCUSION

Límites de detección: Los resultados de la aplicación del modelo de regresión logística se muestran en el Cuadro 2. Es de notar que el grupo de antibióticos que corresponden a las tetraciclinas presentan coeficientes β_1 superiores al resto de las sustancias analizadas ($\beta_1=0,01038$ para clortetraciclina, $\beta_1=0,03711$ para oxitetraciclina y $\beta_1=0,02952$ para tetraciclina). Este hecho explica la elevada sensibilidad de *B. cereus* var. *mycoides* hacia este grupo de sustancias, debido a que pequeños cambios en la concentración de TCs produce un mayor incremento de la absorbancia relativa porcentual de la respuesta.

Por el contrario, el resto de los antimicrobianos muestran pequeños coeficientes " β_1 " comprendidos entre 0,00004 (sulfametazina) y 0,00293 (tilosina), poniendo de manifiesto una baja especificidad cruzada del microorganismo hacia los demás agentes antimicrobianos presentes en leche.

Además, en el Cuadro 2 se puede apreciar los elevados coeficientes de ajuste (C) obtenidos mediante el modelo de regresión logística para cada uno de los antibióticos, y se encuentran comprendidos entre 82,7% (amoxicilina) y 97% (ampicilina y ciprofloxacina).

Con el propósito de visualizar el efecto de las concentraciones de antibióticos sobre las absorbancias relativas porcentuales del bioensayo, se construyeron gráficas para penicilinas (Fig. 1), cefalosporinas (Fig. 2), aminoglucósidos (Fig. 3), macrólidos (Fig. 4), tetraciclinas (Fig. 5); sulfamidas (Fig. 6) y quinolonas (Fig. 7). En dichas figuras se observan tanto las absorbancias relativas medidas experimentalmente (puntos) como las curvas logísticas estimadas por el modelo (líneas). Estas curvas presentan la forma sigmoidea y en algunos casos sobreestiman las absorbancias medidas al origen como una

consecuencia de la estimación mediante el procedimiento de la máxima verosimilitud. Además, se observa que para producir el 100 % de los resultados positivos al bioensayo se necesitan concentraciones moderadas de tetraciclinas (comprendidos entre 150 - 200 $\mu\text{g l}^{-1}$ de oxitetraciclina y tetraciclina) en leche (Fig. 5), mientras que el resto de antibióticos requiere de mayores concentraciones en leche, desde 2000 $\mu\text{g l}^{-1}$ (tilosina y eritromicina) hasta 200.000 $\mu\text{g l}^{-1}$ (sulfadiazina).

En el Cuadro 3 se resumen los límites de detección del bioensayo calculados mediante los parámetros del modelo logístico del Cuadro 2 y el criterio de 45% de frecuencia de absorbancia relativa propuesto por Luitz *et al.* (1996). Se observa que de todos los grupos de antibióticos, el bioensayo que contiene *B. cereus* detecta bajos niveles de residuos de TCs en leche (60 $\mu\text{g l}^{-1}$ de oxitetraciclina, 80 $\mu\text{g l}^{-1}$ de tetraciclina y 260 $\mu\text{g l}^{-1}$ de clortetraciclina) que resultan cercanos a los 100 $\mu\text{g l}^{-1}$ permitidos por la legislación. Al contrario, el resto de antimicrobianos ensayados presentan elevados límites de detección, y se encuentran comprendidos entre 1170 $\mu\text{g l}^{-1}$ para tilosina y 69.800 $\mu\text{g l}^{-1}$ para sulfametoxazol.

Por su parte, Suhren y Heeschen (1993) alcanzan a detectar 50 $\mu\text{g l}^{-1}$ de tetraciclina y 50 $\mu\text{g l}^{-1}$ de oxitetraciclina cuando elaboran un bioensayo que utiliza 10^2 esporas ml^{-1} de *B. cereus* y trifeníltetrazolium como indicador redox en un bioensayo en microplacas ELISA. Dichos autores emplean oxalato de amonio como agente mejorador de la sensibilidad del método hacia las TCs, en lugar del cloranfenicol utilizado en el este trabajo. Se debe destacar además que estos autores, al trabajar con baja concentración de esporas comparación con este bioensayo, logran disminuir los límites de detección de las TCs, en detrimento de la rapidez de la respuesta del método (16 - 24 horas).

En forma similar, el Sistema Microbiológico Multiplaca (SMMP) propuesto por Nouws *et al.* (1999a,b) detecta 30 µg l⁻¹ de oxitetraciclina, 30 µg l⁻¹ de tetraciclina y 10 µg l⁻¹ de clortetraciclina cuando utilizan un método de difusión en placas de Petri que contiene 10⁵ esporas ml⁻¹ de *B. cereus* y 500 µg l⁻¹ de cloranfenicol, con un tiempo de respuesta comprendido entre 18 y 24

horas a 30 °C, superior al obtenido en este trabajo (5 horas a 40 °C). Para otro SMMP, Gaudin *et al.* (2004) detectan 200-250 µg l⁻¹ de tetraciclina, 200-250 µg l⁻¹ de TC y 50 µg l⁻¹ de clortetraciclina en leche cuando utilizan 10⁴ esporas ml⁻¹ de *B. cereus* en un ensayo de difusión en placas de Petri en un tiempo de incubación de 18 - 24 horas a 30 °C.

Cuadro 2: Coeficientes del modelo de regresión logística para las curvas dosis respuestas del bioensayo "T" utilizado la detección de tetraciclinas en leche.

Antimicrobiano	Logit [P] = β ₀ + β ₁ [Antimicrobiano]	C%
Betalactámicos		
Amoxicilina	Logit [P] = -2,3263 + 0,0000858454 [AMO]	82,7
Ampicilina	Logit [P] = -5,36294 + 0,000137813 [AMP]	97,0
Cloxacilina	Logit [P]= -3,04471 + 0,000276558 [CLOXA]	93,2
Oxacilina	Logit [P]= -2,61093+ 0,000519099 [OXA]	95,1
Penicilina "G"	Logit [P]= -3,77659 + 0,000113839 [PEN]	96,0
Cefadroxilo	Logit [P]= -5,45024 + 0,00122375 [CXL]	96,2
Cefalexina	Logit [P]= -1,88107 + 0,000455494 [CLX]	92,3
Cefoperazone	Logit [P]= -5,60103 + 0,000728418 [CPZ]	96,3
Ceftiofur [®]	Logit [P]= -5,0745 + 0,00016717 [CFR]	95,8
Cefuroxime	Logit [P]= -4,6427 + 0,000394567 [CFR]	96,7
Aminoglucósidos		
Estreptomina	Logit [P] = -6,34409+0,000710766 [ESTR]	94,9
Gentamicina	Logit [P] = -1,75427+0,00062847 [GEN]	91,6
Kanamicina	Logit [P]= -3,53446+0,000476451 [KANA]	91,6
Neomicina	Logit [P]= -3,17135+0,000298547 [NEO]	94,4
Macrolidos		
Eritromicina	Logit [P] = -3,88662+0,00277201 [ERI]	94,6
Espiramicina	Logit [P]= -3,65572+0,000541481 [ESPI]	95,6
Lincomicina	Logit [P] = -2,87002+0,000769384 [LINCO]	93,8
Tilosina	Logit [P]= -3,63296+0,00292653 [TILO]	96,2
Tetraciclinas		
Clortetraciclina	Logit [P] = -2,90098+0,0103762 [CLOR]	91,0
Oxitetraciclina	Logit [P] = -2,54415+0,0371075 [OXI]	86,6
Tetraciclina	Logit [P]= -2,52492+0,0295177 [TET]	86,6
Sulfamidas		
Sulfadiazina	Logit [P] = -2,9306+0,0000419055 [SDA]	91,3
Sulfamerazina	Logit [P] = -1,77832+0,0000461848 [SDM]	91,7
Sulfametazina	Logit [P]= -1,97715+0,0000408296 [SMT]	85,3
Sulfametoxazol	Logit [P]= -4,29487+0,000058663 [SMX]	92,8
Sulfatiazol	Logit [P] = -3,67342+0,0000667905 [STZ]	93,1
Quinolonas		
Ciprofloxacina	Logit [P] = -5,31564+0,0031258 [CIPRO]	97,0
Enrofloxacin	Logit [P] = -5,27394+0,00300647 [ENRO]	97,0
Marbifloxacin	Logit [P]= -2,8055+0,000714412 [MAR]	86,9
Norfloxacin	Logit [P]= -2,58841+0,000494569 [NOR]	91,6

C%. Porcentaje de concordancia

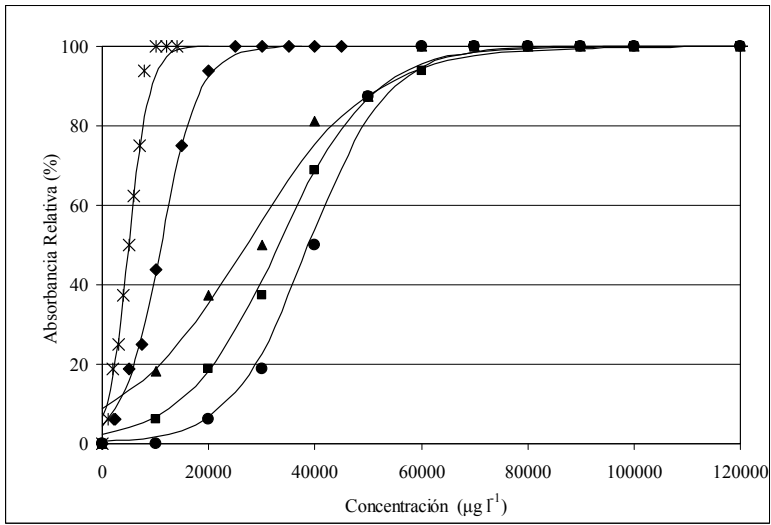


Fig. 1: Curvas dosis respuestas de penicilinas en leche analizadas por el bioensayo que utiliza *B. cereus* (■: penicilina, ▲: amoxicilina, ●: ampicilina, ◆: cloxacilina, X: oxacilina).

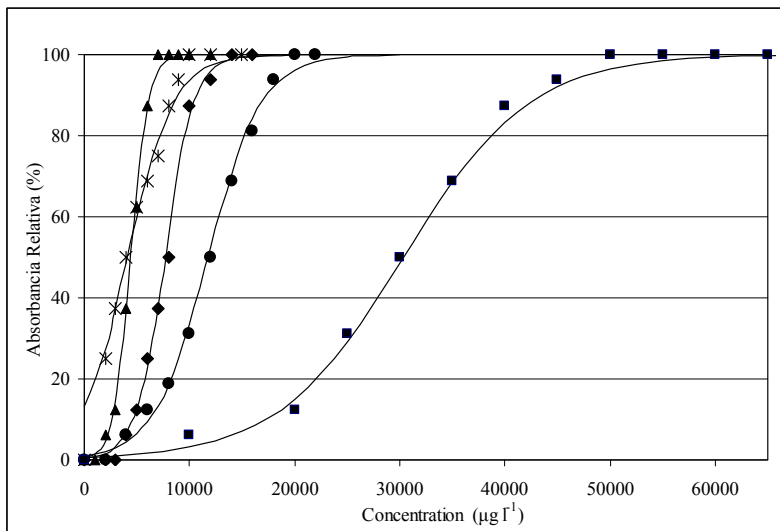


Fig. 2: Curvas dosis respuestas de cefalosporinas de leche analizadas por el bioensayo que utiliza *B. cereus* (▲: cefadroxil, X: cefalexina, ◆: ceroperazone, ●: cefuroxime, ■: ceftiofur®).

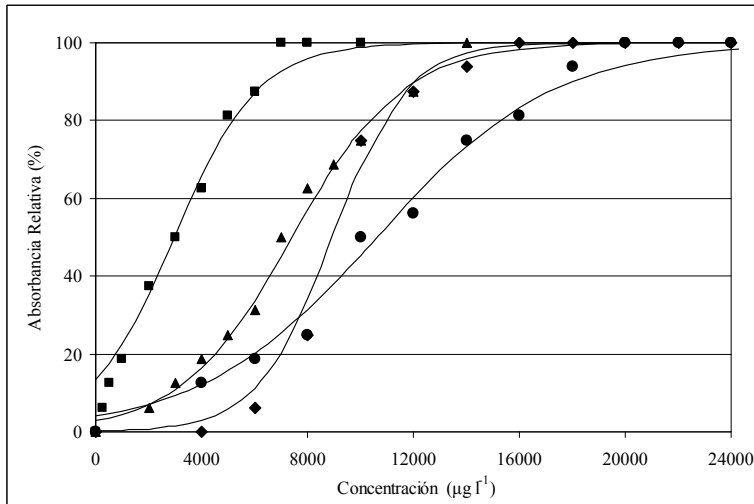


Fig. 3: Curvas dosis respuestas de aminoglucósidos en leche analizadas por el bioensayo que utiliza *B. cereus* (■ : gentamicina, ▲ : kanamicina, ● : neomicina, ◆ : estreptomycin).

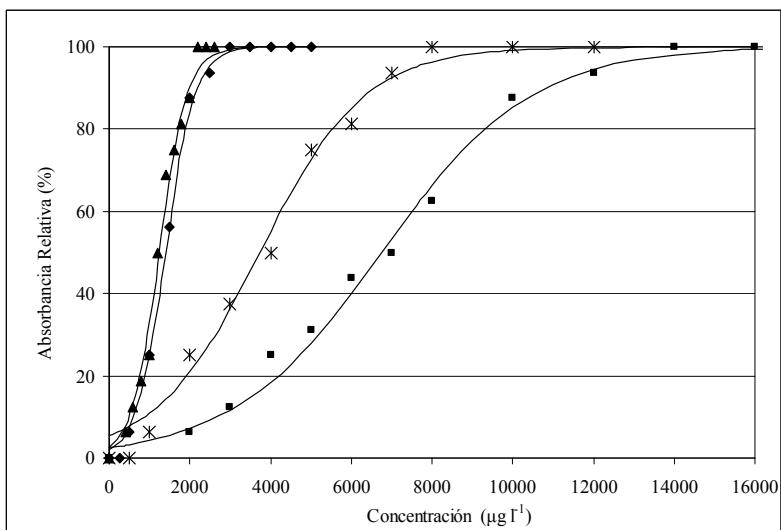


Fig. 4: Curvas dosis respuestas de macrólidos en leche analizadas por el bioensayo que utiliza *B. cereus* (▲ : tilosina, ◆ : eritromycin, X : lincomycin, ■ : espiramicina).

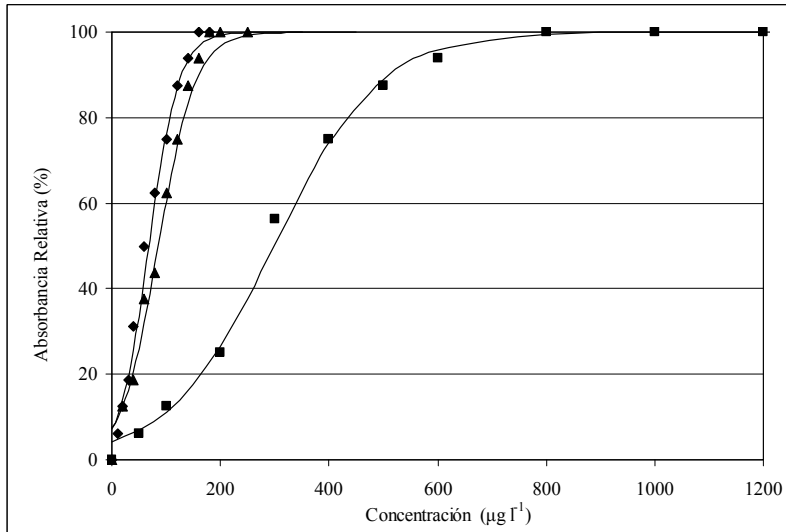


Fig. 5: Curvas dosis-respuesta de tetraciclinas en leche analizadas por el bioensayo que utiliza *B. cereus* (■: clortetracilina, ◆: oxitetracilina, ▲: tetraciclina).

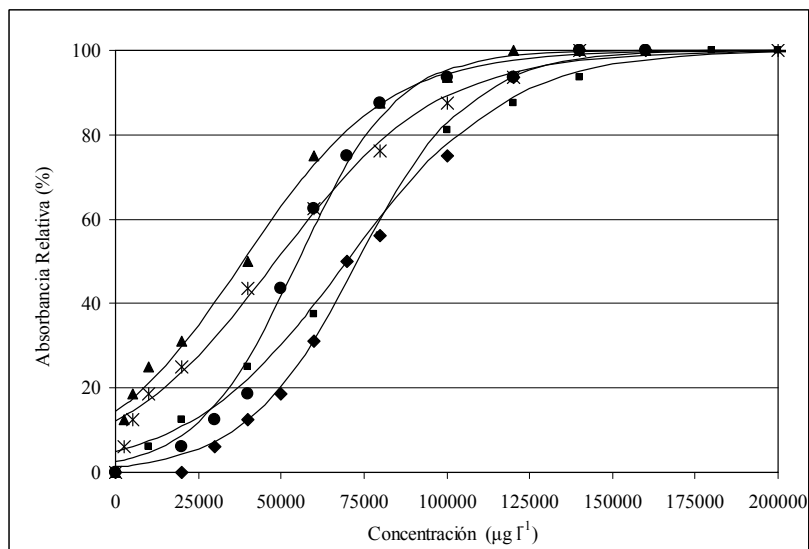


Fig. 6: Curvas dosis-respuesta de las sulfamidadas en leche analizadas por el bioensayo que utiliza *B. cereus* (●: sulfatiazol, ◆: sulfametoxazol, ▲: sulfamerazina, ■: sulfadiazina, X: sulfametazina).

Además, se debe destacar que la implementación de un lector fotométrico para la interpretación de las respuestas del bioensayo puede aplicarse en un futuro para realizar las lecturas de las diferentes placas que conforman el sistema microbiológicos multiplaca (SMmp) propuesto por Nagel *et al.* (2013a).

posibles interpretaciones subjetivos de las calificaciones visuales.

La implementación de este bioensayo constituye una alternativa eficaz para el control de residuos de tetraciclinas en leche, ya que su especificidad hacia estos antibióticos permite utilizarlo como un instrumento de clasificación previa a los análisis de confirmación inequívoca (ej. HPLC o SM-HPLC).

CONCLUSION

Las lecturas de absorbancias mediante un lector fotométrico del bioensayo que utiliza *Bacillus cereus* como bacteria test permite detectar en forma automatizada y específica residuos de oxitetraciclina, tetraciclina y clortetraciclina en leche a niveles cercanos a sus Límites Máximos de Residuos, evitando

AGRADECIMIENTOS

Trabajo realizado con fondos provenientes de los proyectos: CAI+D'09/12 (Nro. 033-173 Res. H.C.D. No. 100/09 - UNL), CAI+D'11/13 (Nro. 501-201101-00575 Res. H.C.D. No. 205/11 - UNL) y PICT 2011 (Nro. 368 Res. Dir. N° 140/12- ANPCyT).

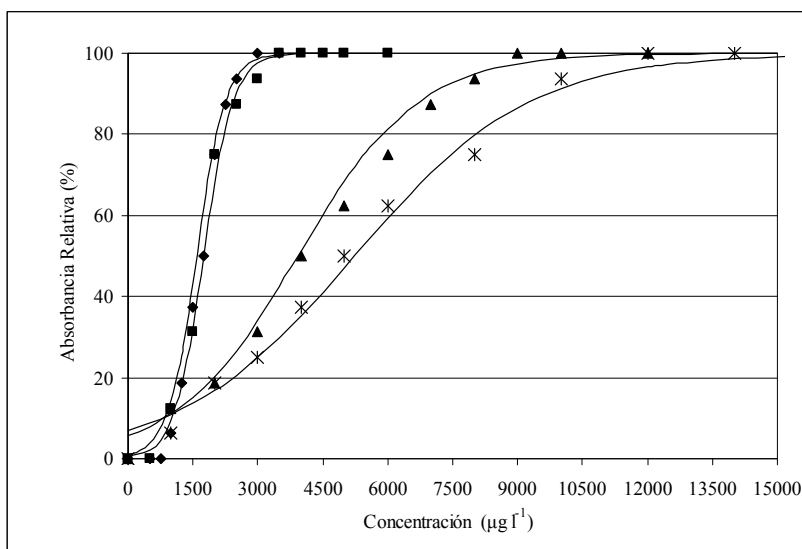


Fig. 7: Curvas dosis respuestas de quinolonas en leche analizadas por el bioensayo que utiliza *B. cereus* (◆: ciprofloxacina, ■: enrofloxacina, ▲: marbofloxacina, X: norfloxacina).

BIBLIOGRAFIA

ALTHAUS, R.; MOLINA, M. P.; PERIS, C.; TORRES, A.; & N. FERNÁNDEZ. 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.; MONTERO, A.; ROCA, M.; & M. MOLINA. 2009. Evaluation of a Microbiological Multi-Residue System on the detection of antibacterial substances in ewe Milk. *Anal. Chim. Acta.* 632: 156-162.

AURELI, P., FERRINI, A.; & AND V. MAN- NONI. 1996. Presumptive identification of sulfonamide and antibiotic residues in milk by microbial inhibitors tests. *Food Control.* 7: 165-168.

BERRUGA, M. I.; MOLINA, M. P.; NOVES, B.; ROMAN, M. ; & A. MOLINA. 2007. In Vitro study about the effect of several penicillins during the fermentation of yogurt made from ewe's milk. *Milchwissenschaft.* 62, 303-305.

Cuadro 3: Límites de detección para el bioensayo que utiliza B cereus.

Antimicrobianos	LD	LMR
Amoxicilina	24800	4
Ampicilina	37500	4
Cloxacilina	10280	30
Oxacilina	4600	30
Penicilina "G"	31400	4
Cefadroxil	4330	-
Cefalexina	3700	100
Cefoperazone	7400	50
Ceftiofur®	29200	100
Cefuroxime	11260	-
Gentamicina	2470	100
Kanamicina	7000	150
Neomicina	9950	1500
Estreptomycin	8640	200
Eritromicina	1330	40
Espiromicina	6380	200
Lincomicina	3470	150
Tilosina	1170	50
Clortetraciclina	260	100
Oxitetraciclina	60	100
Tetraciclina	80	100
Sulfadiazina	65150	100
Sulfamerazina	34160	100
Sulfametazina	43500	100
Sulfametoxazol	69800	100
Sulfatiazol	52000	100
Ciprofloxacina	1640	50
Enrofloxacin	1690	100
Marbofloxacin	1790	75
Norfloxacin	4830	-

LD: Límite de detección ($\mu\text{g l}^{-1}$), LMR: Límite Máximo de Residuo ($\mu\text{g l}^{-1}$).

- COMISIÓN DE REGULACIÓN DE LA COMUNIDAD EUROPEA.** 2010. Regulación 37/2010 de la Comunidad Económica Europea. Sustancias farmacológicamente activas y su clasificación respecto a límites máximos de residuos en los alimentos de origen animal. Journal Oficial de la Unión Europea. N° L 15, 1-72.
- DEMOLY, P.; & A. ROMANO.** 2005. Update on Beta-lactam allergy diagnosis. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 1, 9-14.
- DISERENS, J.; BECK HENZELIN, A.; LE BRETON, M.; & M. SAVOY PERROUD.** 2005. Antibiotics in milk: Actual situation & compilation of commercial available screening methods for the detection of inhibitors/antibiotics residues in milk. Technical report: Quality & Safety Department, Nestlé Research Center. Lausanne, Switzerland. Pp. 186.
- GAUDIN, V. ; MARIS, P. ; FUSELIER, J. ; RI-BOUCHON, N. ; CADIEU, P. ; & A. RAULT.** 2004. Validation of a micro-biological method: the STAR protocol, a fiveplate test for the screening of antibiotic residues in milk. *Food Add. Contam.* 21: 422-433.
- IDF (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION).** 1997. Guidance for the standardized description of microbial inhibitor test. IDF Grup E-503. Antibiotics, Appendix 3: 1-16.
- IDF (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION).** 2002. Guidance for the standardized description of microbial inhibitor test. IDF Bull. no. 183. Brussels, Belgium: International Dairy Federation.
- LUITZ, M.; & G. SUHREN.** 1995. Evaluation of microbial inhibitor test with indicator in microtitre plates by photometric measurements. *Milchwissenschaft*, 50: 465-470.
- LUITZ, M.; SUHREN, G.; & W. HESSCHEN.** 1996. Interactions of antimicrobials in milk-Consequences for the detection by a microbial inhibitor test. *Milchwissenschaft*. 51: 390-392.
- MCMANUS, M. C.** 1997. Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *Am. J. Health Syst. Pharm.* 54: 1420-1433.
- NAGEL, O.; ZAPATA, M.L.; BASILICO, J.C.; MOLINA, P.; & R. ALTHAUS.** 2009a. Effect of Chloramphenicol on a Bioassay Response for the Detection of Tetracycline Residues in Milk. *Journal of Food Drug Analysis.* 7: 36-42.
- NAGEL, O.; BASÍLICO, J.C.; ZAPATA, M.L.; MOLINA, M.P.; & R. ALTHAUS.** 2009b. Estudio del sinergismo entre sulfamidas en leche y trimetoprim en un bioensayo que utiliza *Geobacillus stearothermophilus*. *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral.* 8: 16-28.
- NAGEL, O. G.; MOLINA, M. P & R. L. ALTHAUS.** 2011. Optimization of bioassay for tetracycline detection in milk by means of chemometric techniques. *Lett. Appl. Microbiol.* 52: 245-252.
- NAGEL, O.; MOLINA, M. P.; & R. ALTHAUS.** 2012. Microbial system for identification of antibiotic residues in milk. *Journal of Food Drug Analysis.* 19 (3): 369-375.
- NAGEL, O. G.; MOLINA, M. P.; & ALTHAUS, R. L.** 2013a. Microbiological system in microtitre plates for detection and classification of antibiotic residues in milk. *Int. Dairy J.* 32: 150-155.
- NAGEL, O. G.; MOLINA, M. P.; & ALTHAUS, R. L.** 2013b. Use of chemometric techniques to design a microbiological method for sulfamide detection in milk. *Czech J. Food Sci.* In press.
- NOUWS, J.; VAN EGMOND, H.; SHULDERS, I.; LOEFFEN, G.; SCHOUTEN, J.; & H. STEGEMAN.** 1999a. 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, G.; SCHOUTEN, J.; KEUKENS, H.; SMULDERS, I.; & H. STEGEMAN.** 1999b. Suitability of the charm hvs and a microbiological multiplate system for detection of residues in raw milk at eu maximum residue levels. *Vet. Quart.* 21: 21-27.
- PACKHAM W.; BROOME, M. C; LIM-SOWTIN, G. K. ; & R. ROGINSKI.** 2001. Limitations of standard antibiotic screening assays when applied to milk for cheesemaking. *Australian. J. Dairy Tech.* 56, 15-18.
- PERRETEN, V. & TEUBER, M.** 1995. Antibiotic resistance bacteria in fermented dairy products a new challenge for raw milk cheese. In *Residues of antimicrobial drugs and other inhibitors in milk.* IDF S.I. 9505. Kiel, Germany, 144-148.
- ROBERTS, M. C.** 1996. Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microbiology Reviews.* 19: 124.
- STATGRAPHICS.** (2008). *Statgraphics Centurión XV* © 2006 by StatPoint, Inc. Version 15.2.05 1. 1982-2007.
- SUHREN, G.; & W. HEESCHEN.** 1993. Detection of tetracyclines in milk by a *Bacillus cereus* microtitre test with indicator. *Milchwissenschaft.* 48, 259-263.
- TOLDRA, F.; & M. REIG.** 2006. Methods for rapid detection of chemical and veterinary drug residues in animal foods. *Trends Food Sci Technol.* 17, 482-489.