

“MÉTODO DE LAS 5 PLACAS” PARA LA DETECCIÓN DE RESIDUOS DE ANTIBACTERIANOS EN LECHE.

“The Five Plate Method” for the Detection of Antibacterial Residues in Milk.

Cristina Gatica P.¹ y Erika Gesche R.²

¹ Médico Veterinario. Mg. Sci. Dr. (c) Sc. Vet. Instituto de Medicina Preventiva Veterinaria. Programa de Doctorado en Ciencias Veterinarias. Universidad Austral de Chile. Becario Proyecto MECESUP AUS=005. Fax: 56-63-221548. cgatica@uach.cl

² Médico Veterinario. Dr. Agr. Instituto de Medicina Preventiva Veterinaria, Universidad Austral de Chile, Casilla 567, Valdivia, Chile.

RESUMEN

Los residuos de antibacterianos en leche traen consigo graves problemas, tanto para la salud pública como para la industria lechera, por lo que se hace necesario disponer de un método estandarizado, de bajo costo, de fácil implementación y capaz de detectar la mayoría de los antibacterianos de uso rutinario. Es por ello que el objetivo del presente trabajo fue la evaluación de la sensibilidad de una técnica microbiológica para la detección de estos residuos en leche, acorde a la evolución del uso de este tipo de medicamentos en Chile. Se propone el “Método de las 5 placas”, el cual utiliza como cepas sensibles *Bacillus stearothermophilus* a pH 7,0; *Bacillus subtilis* a pH 6,0; 7,2 y 8,0 y *Escherichia coli* a pH 8,0. Se utilizaron los 18 antibacterianos de mayor oferta en Chile para vacas de lechería (ampicilina, cefoperazona, ceftiofur sódico, cloxacilina, penicilina G, pirlimicina, nafcilina, dihidroestreptomicina, gentamicina, neomicina, enrofloxacin, espiramicina, cloramfenicol, lincomicina, oxitetraciclina, tetraciclina, sulfadimidina y sulfadoxina) y se determinó la placa más sensible a cada uno de ellos. Cada antibacteriano analizado fue detectado en alguna de las 5 placas. Posteriormente, en la placa más sensible a cada antibacteriano y mediante la confección de curvas de calibración, se determinó la concentración mínima detectable para cada uno de éstos, resultando cada placa sensible a dos o más antibacterianos, demostrando así el método una adecuada sensibilidad a los antibacterianos analizados.

Palabras clave: Residuos, antibacterianos, leche, técnica microbiológica.

ABSTRACT

Serious problem come out for public health as for the milk industry when antibiotics residues appear in milk products. It has

become necessary to have a standardized method, of low cost, easy to perform and able to detect most of the antibiotics used now a days. The aim of this work was the evaluation of the sensibility of a novel microbiological technique able to detect these residues in milk, in order to go with the evolution of the use of these drugs in dairy cows in Chile. The technique proposed was named “The 5 Plates Method” and uses as sensible strains *Bacillus stearothermophilus* at pH 7.0, *Bacillus subtilis* at pH 6.0, 7.2 y 8.0 y *Escherichia coli* at pH 8.0. Eighteen antimicrobials where studied, those of greater offer in Chile for dairy cows (ampicillin, cefoperazone, ceftiofur, cloxacillin, penicillin G, pirlimycin, nafcillin, dihydrostreptomycin, gentamicin, neomycin, enrofloxacin, spiramycin, chloramphenicol, lincomycin, oxitetracycline, tetracycline, sulfadimidine and sulfadoxin). The most sensitive plate was determined for each one of them. Each antimicrobials analysed with “The 5 Plates Method” was detected in one of the 5 plates. Later, on the plate determined as the most sensitive to each antimicrobial, calibration curves where made to point out the minimum detectable concentration for each one of them, resulting to be each plate sensitive to at least 2 or more antimicrobials demonstrating therefore that this method has an suitable sensitivity to these antimicrobial.

Key words: Residues, antimicrobials, milk, microbiological method.

INTRODUCCIÓN

Cuando se trata de enfermedades transmitidas por alimentos, la sociedad exige alimentos sanos y seguros [17], sobre todo tratándose de productos lácteos, cuyos consumidores principales en su mayoría son niños, la cual constituye una población de alto riesgo.

La evolución del uso de antibacterianos en animales domésticos sigue muy de cerca el desarrollo de la terapéu-

tica utilizada en salud humana [13]. El uso de antibióticos y sulfas debe ir ligado a una prescripción médica, ya que, aunque beneficiosos, presentan al igual que otros fármacos, reacciones adversas y su utilización va unida a un aumento de la resistencia bacteriana [29]. Su uso indiscriminado recarga los costos de la atención, debido al desperdicio de tratamientos no indicados, dosificaciones o duración de tratamientos no adecuados y, por lo tanto, ineficaces [4, 15]. Por esto, la vigilancia en el consumo de antibióticos es fundamental en la toma de decisiones en salud pública, con el fin de evitar el aumento de los costos sanitarios, además de posibles efectos ecológicos que conducirían a la selección de formas bacterianas resistentes [4].

Los antibacterianos son comúnmente utilizados en vacas de lechería para el tratamiento de mastitis [2, 3], pero también de otras enfermedades como, patologías podales, enfermedades respiratorias y del tracto reproductivo, lo cual contribuye a la existencia de poblaciones bacterianas zoonóticas resistentes [19, 25]. Los programas para el control incluyen ensayos diagnósticos, separación de manada, eliminación de animales, inmersión del pezón, y tratamiento antibiótico. El tratamiento antibiótico, sin embargo, puede ser costoso así como controvertido debido a la contaminación ambiental y otras preocupaciones [33]. Por otro lado, la transmisión de bacterias resistentes de animales al hombre está documentada para algunas de ellas y ésta se produce especialmente a través de la cadena alimentaria [13].

Uno de los mayores inconvenientes en cuanto a la presencia de residuos de antibacterianos en leche tiene que ver con la problemática de la efectividad de los métodos de detección de inhibidores. Entre los aspectos a considerar están: el tipo de antibacteriano que se pretende encontrar, el LMR (Límite Máximo Residual) establecido para éste en la leche, métodos de detección, y la importancia del control de residuos de antibacterianos en la leche de consumo, para asegurar así un producto de la mejor calidad, tanto higiénica como sanitaria [27].

Los métodos de inhibición microbiológica o métodos “screening” o de “monitoreo” [2, 13, 23, 35], aprobados y estandarizados por la Federación Internacional de Lechería [9] continúan siendo de gran utilidad para la detección de los residuos de antibacterianos en diferentes fluidos de origen animal, como es el caso de la leche, dado que se consideran más prácticos y económicos, además de presentar una adecuada confiabilidad en su sensibilidad [28]. Éstos, son cualitativos, detectan un gran número de sustancias inhibidoras, son fáciles de realizar, relativamente económicos y no pretenden más que evidenciar la presencia o ausencia de una sustancia inhibidora en la muestra de leche [22]. Además es posible cuantificar la sensibilidad de los diferentes antibacterianos través de curvas de calibración, confrontando los valores de concentración del antibacteriano versus tamaño del halo que éste produce [11].

Actualmente, los métodos microbiológicos utilizan *Bacillus stearothermophilus* con el fin de detectar la presencia de betalactámicos en leche, dada su alta sensibilidad a este tipo de droga [7]. Con la excepción de un determinado número de betalactámicos y sulfonamidas, la sensibilidad de los métodos microbiológicos aplicados rutinariamente es insuficiente para satisfacer los LMRs estipulados para otros antibacterianos, sin embargo, no excluye la presencia de otro tipo de antibacteriano el cual no es detectado por la cepa sensible comúnmente utilizada [7, 13].

Según Sawant y col. [29], los antibacterianos más utilizados en vacas de lechería son aquellos pertenecientes a las familias de los betalactámicos y de las tetraciclinas. Siendo esto muy similar a lo que ocurre en Chile donde se ofrecen para vacas de lechería [31] 7 antibacterianos y quimioterápicos tanto para tratamiento inyectable como para tratamiento intramamario de mastitis. De éstos, un 39% contienen betalactámicos en su formulación, 16,2% aminoglicósidos, 10,6% presentan antibacterianos de la familia de las tetraciclinas, 10,6% contienen sulfamidas, un 4,1% contienen cloramfenicol y un 19,2% encierra al resto de los antibacterianos ofrecidos. Esto indica que un 61% de los antibacterianos utilizados en Chile, no presentan betalactámicos en su formación. Para solventar este problema de detección de antibacterianos y quimioterápicos diferentes a betalactámicos, el objetivo de este trabajo fue evaluar la sensibilidad del “Método de las 5 Placas”, el cual combina el uso de tres cepas bacterianas sensibles y 4 niveles de pH. Este método fue diseñado especialmente para la detección de grupos específicos de antibacterianos, a una concentración mínima detectable (CMD) más baja a lo establecido en el LMR, y a concentraciones tan bajas que otros métodos microbiológicos comúnmente utilizados en leche no pueden detectar [8, 9, 12].

MATERIALES Y MÉTODOS

De acuerdo a la metodología propuesta por Ellerbroek y col. [8], FIL/IDF [9] y Gesche y col. [12] se utilizaron tres cepas sensibles con cuatro niveles de pH:

- *Bacillus stearothermophilus* var *calidolactis* American Type Culture Collection (ATCC) 10149, pH 7,0 (Placa 1).
- *Bacillus subtilis* BGA ATCC 6633 a pH 6,0 (Placa 2).
- *Bacillus subtilis* BGA ATCC 6633 a pH 7,2 con Trimetoprim como antifolante (Placa 3).
- *Bacillus subtilis* BGA ATCC 6633 a pH 8,0 (Placa 4).
- *Escherichia coli* ATCC 11303 a pH 8,0 (Placa 5).

Se utilizó como medio de cultivo un agar nutritivo estándar el cual fue inoculado con una suspensión de bacterias a una concentración final de 1×10^4 ufc/ml. Para la placa con *Bacillus stearothermophilus*, la temperatura de incubación fue de 55°C y para el resto de las placas, *Bacillus subtilis* BGA a pH

6,0; 7,2 y 8,0, así como *Escherichia coli*, la temperatura de incubación fue de 35°C.

Se utilizaron 18 antibacterianos pertenecientes a 8 familias (TABLA I). A partir de cada antibacteriano se prepararon soluciones madres pesando 10 mg del producto comercial y utilizando como solvente agua destilada estéril y/o metanol, dependiendo de las características fisicoquímicas de la droga. A partir de estas soluciones madres se prepararon los estándares en diluciones decrecientes en solución Ringer [9]. Estas soluciones decrecientes se prepararon 1:10 a partir de la solución madre, luego nuevamente 1:10 a partir de la última dilución y así sucesivamente hasta obtener la concentración deseada. Si era necesario en alguno de los pasos se diluyó 1:1 para obtener la concentración requerida.

Para la aplicación de los estándares se utilizó el método de los orificios o pocillos [9]. En cada placa se realizaron 7 perforaciones de 8 mm de diámetro en el sustrato de cultivo, con un sacabocado de acero inoxidable, con una separación de al menos 3 cm entre sí, en las cuales se depositaron 100 µl de cada dilución a analizar. Cada placa se confrontó con cada antibacteriano en sus diferentes diluciones. Las placas inoculadas se sometieron a incubación con lo cual se logró una opacidad del medio de cultivo provocado por el crecimiento de la cepa sensible.

La presencia de una zona clara alrededor del pocillo en que se depositó el inoculo constituyó la zona de inhibición (FIG. 1). El tamaño del halo se obtuvo mediante un promedio de tres mediciones, desde el borde del pocillo en el agar hasta

el borde del crecimiento bacteriano con un calibrador digital con una precisión de 0,01 mm. Cada experimento se realizó en tres repeticiones consecutivas.

En una primera etapa se determinó la placa más sensible a cada antibacteriano, siendo aquella única placa en la cual la menor cantidad de antibacteriano produce un halo de inhibición o la cual produce el halo de inhibición más grande si se presentase en más de una placa. Posteriormente y habiendo elegido la placa más sensible a cada antibacteriano, se procedió a utilizar éstas para determinar la concentración mínima detectable (CMD) de cada antibacteriano en la placa del método que resultó ser la más sensible a éste. Se consideró la CMD aquella concentración de antibacteriano que produce un halo de inhibición de 1 mm en la placa más sensible.

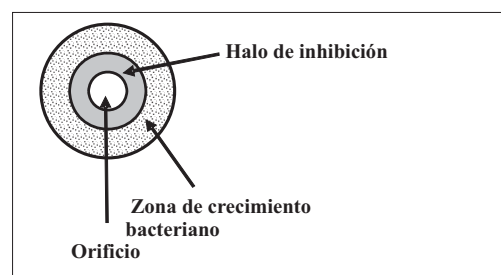


FIGURA 1. ESQUEMA DE LAS TRES MEDICIONES DEL HALO DE INHIBICIÓN, ORIFICIO Y ZONA DE CRECIMIENTO BACTERIANO/ GROWTH INHIBITION ZONE, PUNCH HOLE AND BACTERIAL GROWTH ZONE DIAGRAM.

TABLA I
FAMILIA, PROCEDENCIA Y POTENCIA O PUREZA DE LOS ANTIBACTERIANOS UTILIZADOS/
FAMILY, SOURCE, AND STRNGTH OF THE ANTIMICROBIALS USED

Familia	Antibacteriano	Procedencia	Potencia µg/mg	Pureza %
Betalactámicos	Ampicilina	Sigma		≥98%
	Cefoperazona	Sigma		Aprox 98%
	Ceftiofur	Upjohn*	n/i	
	Cloxacilina	Sigma	918 µg/mg	
	Penicilina G	Merck		> 99%
	Nafcilina	Sigma	885 µg/mg	
Aminoglicósidos	Dhestreptomina	Sigma		100%
	Neomicina	Sigma	687 µg/mg	
	Gentamicina	Sigma	638 µg/mg	
Macrólidos	Espiramicina	Sigma	1180 µg/mg	
	Pirlimicina	Upjohn*	868 µg/mg	
Lincosamidas	Lincomicina	Sigma	833 UI/mg	
Tetraciclinas	Oxitetraciclina	Sigma		100%
	Tetraciclina	Sigma	987 µg/mg	
Quinolonas	Enrofloxacino	Lab. Chile*		100,11%
Sulfamidados	Sulfadimidina	Sigma		Min. 99%
	Sulfadoxina	Lab. Chile*	n/i	
Anfenicoles	Cloramfenicol	Sigma		100%

* = suministrado por laboratorio respectivo. n/i = no indica.

Con los datos obtenidos en aquella placa que resultó más sensible a cada antibacteriano se confeccionaron curvas de calibración por medio de una recta o función lineal [5], considerando los valores de concentración como variable independiente (x) y los de tamaño de halo como variable dependiente (y).

A fin de evidenciar el grado de asociación entre las dos variables de la curva de calibración se obtuvo para cada antibacteriano el coeficiente de correlación (r) que permitió verificar el grado de relación lineal entre las variables en cuestión. Además se obtuvo el valor de (r^2) o coeficiente de determinación, que permite conocer la proximidad de los valores observados a la ecuación de la línea recta y cuantificar en qué medida el valor de la concentración de antibacteriano determina el valor de tamaño de halo [6, 28, 30].

Considerando los valores de intercepto (a) y de pendiente (b) de las curvas de calibración de los antibacterianos en estudio, se calculó la concentración (x) mínima detectable en base a un valor de halo (y) de 1 mm adecuando la ecuación de la recta a la variable concentración como incógnita: $x = \frac{1-a}{b}$

En este ensayo se realizaron tres repeticiones para cada antibacteriano en la placa respectiva, obteniéndose con éstas el promedio y la desviación estándar. Para el cálculo de los

componentes de la curva de calibración como son la pendiente y el intercepto, necesarios para la obtención de la concentración mínima detectable del método, se utilizó el comando estadístico de la planilla electrónica del programa Excel 2000 de Microsoft. Las tres repeticiones de los tamaños de halo en la placa más sensible, tanto como las concentraciones mínimas detectables de los antibacterianos en su placa se analizaron mediante estadística descriptiva como la media, y desviación estándar.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El criterio de selección de la placa más sensible a un determinado antibiótico consideró aquella en que a la más baja concentración del antibacteriano fuese la única en producir halo de inhibición o aquella que presentase el halo de mayor tamaño, en el caso que más de una placa diera resultado positivo. Fue así que se confeccionó la TABLA II en que se destaca el halo de mayor tamaño obtenido para cada antibacteriano a una concentración determinada, en cada una de las placas o sustratos de análisis.

Como se puede apreciar en la TABLA II, para la mayoría de los antibacterianos estudiados la mayor o menor sensibili-

TABLA II

TAMAÑO DE HALO (MM) PROMEDIO DETECTADOS A LA MENOR CONCENTRACIÓN (μ G) DE CADA ANTIBACTERIANO, QUE PROVOCÓ INHIBICIÓN DE LA CEPA BACTERIANA EN A LO MENOS UNA DE LAS 5 PLACAS. AVERAGE SIZE OF THE INHIBITION ZONE (MM) DETECTED AT THE LOWEST CONCENTRATION OF EACH ANTIBACTERIAL AND INHIBITED THE BACTERIAL GROWTH IN AT LEAST ONE OF THE 5 PLATES.

Antibacteriano	Concentración en μ g a la placa	B. stearoth. pH 7,0	B. subtilis pH 6,0	B. subtilis pH 7,2	B. subtilis pH 8,0	E. coli pH 8,0
Ampicilina	0,005	7,38	0,0	0,97	2,97	0,0
Cefoperazona	0,005	0,63	0,0	0,0	0,0	3,53
Ceftiofur	0,01	0,73	0,0	0,0	0,0	0,52
Cloxacilina	0,01	1,25	0,0	0,0	0,0	0,0
Nafcilina	0,005	3,45	0,0	0,0	0,0	0,0
Penicilina G	0,0003	0,94	0,0	0,0	0,0	0,0
DHestrepomicina	0,06	0,0	0,0	0,0	0,71	0,0
Gentamicina	0,01	0,0	0,0	0,0	0,91	0,0
Neomicina	0,03	0,0	0,0	3,28	3,97	0,0
Espiramicina	0,05	0,57	0,0	0,0	1,46	0,0
Pirlimicina	0,087	0,35	0,0	0,0	3,66	0,0
Tetraciclina	0,2	0,0	2,77	2,38	0,0	0,0
Oxitetraciclina	0,03	0,0	3,69	2,13	0,0	0,0
Sulfadimidina	0,25	0,0	0,0	0,69	0,0	0,0
Sulfadoxina	0,25	0,0	0,0	4,31	0,0	0,0
Cloramfenicol	0,4	0,0	0,87	0,82	0,62	0,69
Enrofloxacino	0,000375	0,0	0,0	0,0	0,0	2,04
Lincomicina	0,1	1,16	0,0	0,0	0,0	0,0

dad de las placas se evidencia claramente en una u otra, sin embargo, existen casos en los cuales la sensibilidad de las placas es similar para un mismo antibacteriano. Tal es el caso de la neomicina, la cual presentó valores de tamaño de halo muy parecidos en las placas de *Bacillus subtilis* BGA, tanto a pH 7,2 como pH 8,0. La tetraciclina se comportó de igual forma, obteniendo valores muy parejos entre las placas de *Bacillus subtilis* BGA a pH 6,0 y 7,2. Lo mismo ocurrió con el cloramfenicol, el cual demostró una sensibilidad semejante entre las tres placas de *Bacillus subtilis* BGA como también con la placa de *Escherichia coli*.

En el "Método de las 5 Placas", las diferencias de tamaños de halo obtenidas entre las distintas placas, inducen a descartar ciertos antibacterianos. Como se muestra en la TABLA II, existen antibacterianos que se presentan única y exclusivamente en una sola placa hecho que prepara y orienta al investigador para un posterior análisis de identificación [12, 24].

En los casos en que se presentó la situación antes mencionada, se eligió la placa más sensible con apoyo de la bibliografía consultada [12], y es así que para neomicina se determinó que la placa a utilizar sería *Bacillus subtilis* BGA a pH 8,0, en tanto para tetraciclina y cloramfenicol ésta sería la de *Bacillus subtilis* BGA a pH 6,0.

Los resultados concernientes a la sensibilidad de las placas a los 18 antibacterianos, demuestran que cada antibacteriano se detectó más fácilmente en una de las 5 placas que componen el método, siendo cada una de las placas sensible a 2 o más antibacterianos (TABLA II) demostrando así la necesidad de utilizar la totalidad de las placas que componen el método si se pretende detectar estos 18 antibacterianos.

Una vez seleccionada la placa más sensible a la detección de cada antibacteriano en estudio se procedió a determinar la concentración mínima detectable de los antibacterianos en el sustrato respectivo (TABLA III).

Una gran ventaja del "Método de las 5 Placas" es su amplio espectro y bajos niveles de detección (TABLA III). El método en estudio, logra detectar aminoglicósidos, tetraciclinas, macrólidos y sulfamidados en bajas concentraciones, gracias a la incorporación de las otras 4 placas con *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli* además del *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*, los que son altamente sensibles a ellos. Nouws y col. [24] proponen un método similar de 7 placas como técnica de "postmonitoreo", con el fin de confirmar la presencia de antibacterianos en la leche en niveles cercanos o levemente inferiores a los LMR permitidos. Esto, con el fin de evitar la eliminación de la leche y sanciones no justificadas al productor, como cuando se confirma la presencia de residuos con méto-

TABLA III
PLACA MÁS SENSIBLE PARA CADA ANTIBACTERIANO UTILIZADO Y CONCENTRACIÓN MÍNIMA DETECTABLE (CMD)
DEL "MÉTODO DE LAS 5 PLACAS"/ MOST SENSITIVE PLATE FOR EACH ANTIMICROBIAL USED AND MINIMUM INHIBITORY
CONCENTRATION (CMD) OF "THE 5 PLATE METHOD".

Antibacteriano	Placa más sensible	Método de 5 placas. CMD en ppb.
Ampicilina	1	3
Ceftiofur	<i>Bacillus stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i> a pH 7,0	56
Cloxacilina		28
Nafcilina		30
Penicilina G		4
Lincomicina		469
Tetraciclina	2	16
Oxitetraciclina	<i>Bacillus subtilis</i> BGA a pH 6,0	168
Cloramfenicol		3850
Sulfadimidina	3	291
Sulfadoxina	<i>Bacillus subtilis</i> BGA a pH 7,2	593
DHEstreptomicina	4	367
Gentamicina	<i>Bacillus subtilis</i> BGA a pH 8,0	63
Neomicina		41
Espiramicina		286
Pirlimicina		68
Enrofloxacino	5	1
Cefoperazona	<i>Escherichia coli</i> a pH 8,0	26

ppb = partes por billón.

dos muy sensibles (HPLC, Inmunológicos), cuyos niveles de detección están muy por debajo de los LMR establecidos, dando lugar a falsos positivos [24].

Si bien el uso del cloramfenicol no está permitido en el ganado de abasto [18, 36] por lo cual el LMR es de 0 ppb [32], el "Método de las 5 Placas" lo detecta en una concentración de 3850 ppb la cual, a pesar de estar muy lejos de 0 ppb es considerablemente más baja que los otros métodos que únicamente utilizan *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* como cepa sensible como son el "Discofiltro" y el Delvotest "SP" lo detectan en concentraciones tan elevadas como de 15000 ppb y 12000 ppb respectivamente [3, 9].

Al comparar la metodología del "Método de las 5 Placas" con aquella del "Discofiltro" [14], el cual para Rushing y Wessen, [26] es el método de elección para la detección de inhibidores en leche, se observa que una ventaja del método en estudio está dado por el volumen de muestra depositado en el pocillo (100 µl) el cual es siempre el mismo, no así el volumen que absorbe el "Discofiltro". Este último, utiliza discos de papel filtro, sin especificar que tipo de papel ni que grosor debe tener éste; además, el diámetro de los discos según la Norma Chilena [14] es de 12 mm a 15 mm, teniendo una diferencia entre ambos en su superficie de un 56%, el primero con respecto al segundo, diferencia que también se esperaría encontrar en cuanto al volumen de muestra absorbida.

Las desventajas presentadas por el método en estudio, son sin duda el mayor número de placas utilizadas lo que implica un mayor tiempo de ejecución; además, al usar tres cepas diferentes necesita en este caso dos temperaturas de incubación diferentes (55°C y 35°C). Otro aspecto que juega en contra del "Método de las 5 Placas", es el tiempo necesario para la obtención de resultados, 18 a 20 hrs versus 2½ a 5 horas, lo cual es una gran desventaja para la industria, pero cuando se trata de análisis con fines de salud pública, esta desventaja no presenta mayor relevancia, ante la eficiencia del método.

El Reglamento Sanitario de los Alimentos de Chile [21] estipula que será obligatoria la pasteurización de la leche cruda inmediatamente después de su recepción. Considerando esta disposición, y el hecho que los tratamientos térmicos como pasteurización y esterilización, a los cuales es sometida la leche destruyen en mayor o menor grado algunos antibacterianos [34], se propone que previo a someter la leche a la detección de inhibidores, las muestras individuales sean sometidas a un tratamiento de pasteurización, ya sea un proceso de pasteurización lenta o baja a 63°C por 30 minutos [1]. La aplicación del tratamiento térmico a la leche previo a su análisis es recomendado [23], ya que este procedimiento reduce los resultados "falsos positivos" [16] o "dudosos" a valores menores del 1% al inicio de la lactancia y aproximadamente 3% al final de ésta en leche de oveja. Otros autores [17] obtuvieron similares resultados, demostrando que el tratamiento térmico previo al análisis de las muestras inactiva los inhibidores naturales en la leche y puede ser utilizado para probar los resulta-

dos falsos-positivos derivados del análisis con Delvotest. Al ser este tratamiento una pasteurización verdadera, no sólo inactivaría los inhibidores naturales de la leche [16], sino también la flora contaminante que pudiese interferir con los métodos de detección de antibacterianos, aunado a que es este el tipo de leche que llega al consumidor y no la leche cruda que es la que se analiza habitualmente.

Al utilizar cualquier método microbiológico para la detección de antibacterianos en alimentos, se debe tener en consideración una eventual mutación de la cepa bacteriana sensible hacia una cepa resistente, lo cual es impredecible y espontáneo [20]. El control periódico de sensibilidad de las cepas se sugiere realizar a cada placa con cada uno de los antibacterianos en concentraciones tales que produzcan un halo de inhibición de alrededor de 6 mm [10].

Las técnicas microbiológicas, por su adecuada confiabilidad, fácil ejecución a gran escala y bajos costos [24], deberían ser consideradas en el país como métodos de rutina en la vigilancia de residuos de antibacterianos en alimentos de origen animal [28]. Otros métodos, como por ejemplo la Cromatografía líquida de alta presión (HPLC) y los inmunológicos, aún cuando son métodos muy sensibles, sus altos costos limitarían su uso, justificándose quizás en instituciones supervisoras a nivel gubernamental [25].

CONCLUSIONES

Con respecto a la técnica propuesta y considerando sus beneficios y limitaciones se prevé la utilización del "Método de las 5 Placas" con fines de salud pública y para estudios de vigilancia epidemiológica, dada la amplia gama de antibacterianos que detecta y bajos niveles de detección.

AGRADECIMIENTO

Al Instituto de Medicina Preventiva Veterinaria de la Universidad Austral de Chile y al Estado de Chile, quien a través de CONICYT ayudó a financiar en parte estudios de postgrado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ALAIS, C. *Ciencia de la Leche. Principios de técnica lechera*: Editorial Reverté. 873 pp. 1985.
- [2] ALTHAUS, R.L.; TORRES, A.; MONTERO, A.; BALASCH, S.; MOLINA, M.P. Detection Limits of Antimicrobials in Ewe Milk by Delvotest Photometric Measurements. **J. of Dairy Sci.**: 457-463. 2003.
- [3] ANDREWS, S.M.; FROBISH, R.A.; PAAPE, M.J.; MATURIN, L.J. Evaluation of Selected Antibiotics Residue Screening Tests for Milk from Individual Examination of Factors That Affect the Probability of False-Positive Outcomes. **J. of Dairy Sci.** 80: 3050-3057. 1997.

- [4] BAVESTRELLO, L.; CABELLO, A.; CASANOVA, D. Impacto de medidas regulatorias en la tendencia de consumo comunitario de antibióticos en Chile. **Rev. Méd. Chile** 130: 1265-1272. 2002.
- [5] CUMSILLE, F. *Módulo Métodos Estadísticos, Programa de Salud Ambiental*. Metepec. Estado de México. México: Organización Panamericana de la Salud. Organización Mundial de la Salud. 136 pp. 1990.
- [6] DANIEL, W.W. *Bioestadística: Bases para el Análisis de las Ciencias de la Salud*. Ciudad de México, México: Ed. Limusa. 157 pp. 1977.
- [7] DISERENS, J.M.; BECK, A.; SAVOY-PERROUD, M.C.; HESCHEN, W.; SUHREN, G. Detection of Antibiotic Residues in Liquid Whey and Demineralized Whey Powders. **FIL/IDF Bull.** 369: 35-43. 2001.
- [8] ELLERBROEK, L.; SCHWARZ, C.; HILDEBRANDT, G.; WEISE, E.; BERNOTH, E.M.; PLUTA, H.J.; ARNDT, G. Zur mikrobiologischen Erfassung von Rückständen antimikrobiell wirksamer Stoffe beim Fisch. **Arch. Lebensmittel** 48: 1-24. 1997.
- [9] FEDERACIÓN INTERNACIONAL DE LECHERÍA/INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Detection and Confirmation of Inhibitors in Milk and Milk Products. **FIL/IDF Bull.** 258 pp. 1991.
- [10] GESCHE, E. Detección de residuos de antibióticos en carne. Técnica del Bacillus subtilis B.G.A. Chile. **Monogr. Med. Vet.** 8: 1-5. 1986.
- [11] GESCHE, E.; RAMÍREZ, M. Sensibilidad de Detección Microbiológica de Residuos de Antibacterianos de Uso en Salmonicultura. **Acta Microbiol.** 6: 137-143. 1995.
- [12] GESCHE, E.; VEGA, M.; SAEZ, R.; MAYOR, M. Influencia del pH del medio de cultivo en la detección microbiológica de residuos de antibióticos. **Fleischw** 1: 10-16. 1991.
- [13] HONKANEN-BUZALSKI, T.; SUHREN, G. Residues of Antimicrobial Agents in Milk and Their Significance to Public Health and Milk Processing. **FIL/IDF Bull.** 345: 11-12. 1999.
- [14] INSTITUTO NACIONAL DE NORMALIZACIÓN. CHILE. *Leche-Determinación de Penicilina y Antibióticos lactámicos - Método A - Método del discofiltro*. NCh N°1764. Of98. 7 pp. 1998.
- [15] JUMBE, N.; LOUIE, A.; LEARY, R.; LIU, W.; DEZIEL, M.R.; TAM, V.H.; COL, Y. Application of a mathematical model to prevent in vivo amplification of antibiotic-resistant bacterial population during therapy. **The J. of Clin. Invest.** 112: 275-285. 2003.
- [16] KANG, J.H.; JIN, J.H.; KONDO, F. False-Positive Outcome and Drug Residue in Milk Samples Over Withdrawal Times. **J. of Dairy Sci.** 88: 908-913. 2005.
- [17] KANG, J.-H.; KONDO, F. Occurrence of False-Positive Results of Inhibitor on Milk Samples Using the Delvotest SP Assay. **J. of Food Prot.** 64: 1211-1215. 2001.
- [18] KRUIZE, J. *Residuos Antibióticos y Calidad de Leche*. Consejo Regional Llanquihue, Chile. 71-84 pp. 1995.
- [19] LOWY, F.D. Antimicrobial resistance: the example of Staphylococcus aureus. **The J. of Clin. Invest.** 111: 1265-1273, 2003.
- [20] MARTÍNEZ, J.L.; MARTÍNEZ, L.A. *Antibióticos y Quimioterápicos Antimicrobianos*. Concepción, Chile: Escuela de Medicina, Universidad de Concepción. 243 pp. 1999.
- [21] MINISTERIO DE SALUD. CHILE. *Reglamento Sanitario de los Alimentos. Diario Oficial de la República de Chile. Decreto N° 977*. 164 pp. 1997.
- [22] MITCHELL, J.M.; GRIFFITHS, M.W.; McEWEN, S.A.; McNAB, W.B.; YEE, J. Antimicrobial Drug Residues in Milk and Meat: Causes, Concerns, Prevalence, Regulations, Tests, and Test Performance. **J. of Food Prot.** 61: 742-756. 1998.
- [23] MOLINA, M.P.; ALTHAUS, R.L.; BALASCH, S.; TORRES, A.; PERIS, C.; FERNANDEZ, N. Evaluation of Screening test for Detection of Antimicrobial residues in Ewe Milk. **J. of Dairy Sci.** 86: 1947-1952. 2003.
- [24] NOUWS, J.; VAN EGMOND, H.; SMULDERS, I.; LOEFFEN, G.; SCHOUTEN, J.; STEGEMAN, H. A microbiological assay system for assessment of raw milk exceeding EU maximum residue levels. **Intern. Dairy J.** 9: 85-90. 1999.
- [25] RUIZ, J. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. **J. of Antimicrob. Chemoth.** 51: 1109-1117. 2003.
- [26] RUSHING, J.E.; WESEN, D.P. Preventing Antibiotic Residues In Milk. Department of Food Science and Animal Science. North Carolina State University. www.ces.ncsu.edu/depts/foodsci/ext/pubs/antibioticresidues.html 1999.
- [27] SAMARZIJA, D.; ANTUNAC, N. The importance of antibiotic residues presence detection in milk. **Mljekarstvo** 52: 61-73. 2002.
- [28] SAN MARTÍN, B. Evaluación de la Técnica Microbiológica con Bacillus subtilis BGA para la Identificación de Residuos de Antimicrobianos en Leche Bovina. **Avances en Cien. Vet.** 11: 43-48. 1996.
- [29] SAWANT, A.A.; SORDILLO, L.M.; JAYARAO, B.M.A. Survey on Antibiotic Usage in Dairy Herds in Pennsylvania. **J. of Dairy Sci.** 88: 2991-2999. 2005.
- [30] SCHREIDER, E. *La Biometría*. Buenos Aires, Argentina: Ed. Universitaria de Buenos Aires. 63 pp. 1962.

- [31] SILVA, M. (Editor General). *Vademecum Veterinario: Manual de Productos Veterinarios*: Comunicaciones y Ediciones Ltda. 356 pp. 1998.
- [32] SUHREN, G. *Possibilities and Limitations of Microbiological Inhibitor Test*. Symposium on Residues of Antimicrobial Drugs and Other Inhibitors in Milk: Kiel, Alemania. 159-171 pp. 1995.
- [33] SUSZKIW, J. New Mastitis Treatment May Offer Alternative to Antibiotics. **Agric. Res.** 54:20. 2006.
- [34] VON BAER, H.; VIAL, F. *Calidad higiénica de la leche cruda. II Jornadas Médico Veterinarias*. Universidad Austral de Chile: Valdivia, Chile. 39-50 pp. 1976.
- [35] YAMAKI, M.; BERRUGA, M.I.; ALTHAUS, R.L.; MOLINA, M.P.; MOLINA, A. Occurrence of Antibiotic Residues in Milk from Manchega Ewe Dairy Farms. **J. of Dairy Sci.** 87: 3132-3137, 2004.
- [36] ZURICH, L. *Residuos de Medicamentos en la Leche. Impacto en la salud humana y animal*. Consejo Regional Osorno, Chile: Colegio Médico Veterinario de Chile A.G. 104-121 pp. 1995.