

EVALUACION DEL METODO MICROBIOLÓGICO DE DISCO EN PLACA PARA LA DETERMINACION DE RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS EN HUEVO. ^a

José Efraín García Mexicano ^b

José de Jesús Sánchez Paez ^b

Francisco Velázquez Quezada ^c

Clorinda Sarabia Bueno ^b

Diódoro Batalla Campero ^c

RESUMEN

Se empleó un método microbiológico de disco en placa con medio de cultivo PM-1 (Difco, código 1800), esporas de *Bacillus stearothermophilus* e incubación a 55 C durante 4 h \pm 0.5 h. Se establecieron los límites de detección, las curvas estándar y las ecuaciones de regresión con huevos libres de antibióticos, contaminados experimentalmente con seis concentraciones por cada antibiótico, cada dilución doble de la anterior. Se contaminó huevo libre de antibióticos con cantidades conocidas de cada antibiótico y se determinó cuantitativamente frente al estándar correspondiente. El porcentaje de recuperación fue del 88 al 100%. Se efectuó una encuesta entre diez productores con muestras al azar de 10 huevos por cada uno. El 60% de los huevos ensayados estaba contaminado con antibióticos.

Téc. Pec. Méx. Vol. 30 No. 2 (1992)

El huevo reviste gran importancia como alimento básico para el mexicano, razón por la que abordamos este trabajo, tendiente a encausar una producción de huevo libre de residuos de antibióticos.

La abundante cantidad de antibióticos que existen actualmente, así como su uso indiscriminado han hecho aumentar los problemas de salud pública^{16,17,18}, esto es válido para el huevo y son numerosos los trabajos que hacen hincapié en ello^{3,6,12,16,17,18,19}. La presencia de residuos de antibióticos en el huevo puede ocasionar trastornos que van desde la resistencia bacteriana a los antibióticos, alergia, ototoxicidad, neurotoxicidad, anemia aplásica, lesiones neuronales e incluso la

muerte^{6,7,10,13,15,19,20}

La neomicina se emplea como aditivo en alimentos suplementados para aves (70-140 g/t) o en combinación con oxitetraciclina; la estreptomina en alimentos suplementados, para mejorar la eficiencia alimenticia, incrementar la ganancia de peso, combatir enfermedades bacterianas y mejorar la eficiencia en la producción de huevo. Con fines semejantes se emplean penicilina, estreptomina, eritromicina, cloranfenicol y otros^{3,4,7,12,16,17,18}. Durante mucho tiempo la agencia de USA Food and Drug Administration (FDA) no recomendó un método microbiológico para la determinación de algunos antibióticos en huevo, como estreptomina y neomicina, cuyos microorganismos de prueba son *Bacillus subtilis* y *Bacillus stearothermophilus* respectivamente, microorganismos que son inhibidos por la lisozima que contiene el huevo^{8,9}. Posteriormente la FDA recomendó la inactivación de la lisozima por calentamiento a 85 C

a Recibido para su publicación el 28 de octubre de 1991.

b Universidad Veracruzana, Veracruz, Ver.

c CENID-Microbiología, INIFAP-SARH, Km 15.5 Carr. Méx. Toluca, Palo Alto, D.F. 05110, Cuajimalpa.

para efectuar la localización de antibióticos en huevo.

El método microbiológico de disco en placa, con medio PM-I (Difco), esporas de *Bacillus stearothermophilus*, con incubación a 55 C durante 4 h, puede ser muy eficaz para detectar residuos de antibióticos en huevo, si se inactiva la lisozoma del huevo por calentamiento a 85 C durante diez min, se efectúa una extracción del antibiótico presente con solución de fosfatos, amortiguadora de pH y se eliminan partículas en suspensión del extracto por centrifugación.

Los objetivos de este trabajo fueron valorar la utilidad práctica de la técnica en estudio, para demostrar la presencia de residuos de los antibióticos penicilina, tetraciclina, eritromicina, estreptomycin, neomicina y cloranfenicol en huevo. Demostrar la presencia o ausencia de residuos de antibióticos en huevo obtenido en muestras de granjas productoras o del mercado.

El método que se utilizó se ajustó al siguiente esquema: medio de cultivo especial para ensayo de penicilina (PM-I, Difco), esporas de *Bacillus stearothermophilus*, incubación a 55 C durante 4 h \pm 0.5 h, para detectar residuos de penicilina, estreptomycin, neomicina, tetraciclina, eritromicina y cloranfenicol en huevo. Para control se emplearon antibióticos estándar de referencia, oficiales en México, del laboratorio Nacional de Salud*. El método fue evaluado en 1982 para determinación rápida de penicilina en leche²¹. Para aplicarlo a la determinación de residuos de antibióticos en huevo, se establecieron las curvas estándar compensadas para cada uno de los seis antibióticos en estudio. Estas curvas de seis puntos dan lugar a un método sencillo que hace una prueba completa con dos cajas petri, con cuatro concentraciones estándar del antibiótico y dos de la muestra en cada caja, según quedó demostrado por Brady y Katz¹.

Se emplearon también medio agar tripticaséina, agar nutritivo con manganeso para

esporulación; medio para antibióticos No 4, para cuenta de esporas, soluciones de fosfatos amortiguadoras de pH 4.5, 6.0 y 8.0; solución salina estéril al 0.9%, discos, discos de papel filtro S. & S. de 13 mm de diámetro y cajas petri desechables de 100 x 10 mm.

Después de obtener un cultivo de *B. stearothermophilus* con 80% de esporas, de cosecharlas y determinar su concentración por cuenta de esporas en medio No. 4, se ajustó la concentración a 4×10^5 UFC/ml, de los cuales se agregó 1 ml por cada 100 ml de medio a 50 C. Se sirvió 10 ml en cada caja petri. Estas cajas se conservaron en refrigeración en bolsas de plástico hasta por dos semanas.

Para el desarrollo de este trabajo, se dividió en cuatro experimentos: No. 1.- Preparación y confirmación de huevo libre de antibióticos (H.L.A.). No. 2.- Contaminación experimental de H.L.A. con antibióticos, para establecer curvas estándar. No. 3.- Valoración del contenido en residuos de cada antibiótico, en las diversas concentraciones que forman una curva estándar. No. 4.- Ensayo de huevos muestra, para determinar la presencia o la ausencia de contaminación por residuos de antibióticos, en huevo del mercado.

Los pasos que se siguieron en cada experimento fueron:

Experimento No. 1.- H.L.A.

A.- Preparación y muestreo: En una granja se separaron diez pollitas a las que no se les aplicó antibióticos desde dos semanas antes de iniciar la postura; de los huevos producidos se colectaron 60, al azar.

B.- Confirmación de que el huevo es H.L.A. Se efectuó el ensayo de cada huevo con la técnica microbiológica de disco en placa. todos fueron H.L.A. Se formaron seis lotes de diez H.L.A. cada uno, para establecer seis curvas estándar.

C.- Procedimiento: Se empleó la técnica microbiológica de disco en placa, con

* Lab. Nac. de Salud, Calz. de Tlalpan 4492, C.P. 14050.

m, medio PM-I, de pH 7.8, con 4×10^5 UFC/100 ml. de medio (medio inóculo). Se pesó en tubos con tapón de rosca 2 g de H.L.A., se agregó 4 g de solución amortiguadora de fosfatos, de pH 6.0, para una dilución final de 1:3; se homogeneizó. Se calentó a 85 C durante 10 min, para inactivar la lisozima; se dejó enfriar a temperatura ambiente. se centrifugó a 3000 rpm para retirar del sobrenadante partículas que podrían entorpecer la difusión en el medio. Se impregnaron dos discos de papel filtro de 13 mm de diámetro con cada sobrenadante, se colocaron en caja petri con medio inóculo 4 discos, colocando los dos iguales diametralmente opuestos y marcando su identificación. Al centro de una placa se colocó un disco con control negativo y en otra placa uno con control positivo, se incubó a 55 C durante $4 \text{ h} \pm 0.5 \text{ h}$.

D.- Lectura de resultados.- Después del tiempo de incubación, el medio viró de violeta a amarillo, excepto en los discos con control positivo, donde el color permaneció violeta. El diámetro de la zona de inhibición violeta expresado en mm, es proporcional a la concentración del antibiótico en $\mu\text{g/g}$. Todos los huevos ensayados fueron negativos a la presencia de residuos de antibióticos, por lo que se confirmaron como H.L.A.

Experimento No. 2.- Contaminación de seis lotes de diez H.L.A. cada uno. De cada lote de diez H.L.A. confirmados, se pesaron seis alícuotas y cada una se contaminó con una de las seis concentraciones que forman la curva estándar de seis puntos, de cada antibiótico. Las concentraciones de cada curva estándar se muestran en el cuadro No. 1.

Experimento No. 3.- Valoración del contenido de residuos de cada antibiótico en cada curva estándar. A cada alícuota de huevo contaminado se le agregó dos veces su peso de solución amortiguadora de fosfatos y se siguió el procedimiento descrito en C. Se colocaron los seis discos de papel filtro de cada curva estándar en una caja petri con medio inóculo, se efectuaron diez repe-

ticiones para integrar la curva estándar.

Después de la incubación, todas las zonas con papel filtro impregnado muestran inhibición del desarrollo de la bacteria: Conservan el color violeta en halos de diámetro variable. Los resultados se muestran en el cuadro No. 1. Los porcentajes de recuperación varían entre 88% y 100%.

Experimento No. 4.- Ensayo de huevos-muestra. Se colectaron al azar diez huevos de la producción de cada uno de diez productores. se homogeneizó cada huevo para ser ensayado individualmente por la misma técnica y por el mismo procedimiento que para el ensayo de los H.L.A. Después de centrifugar el sobrenadante diluido 1:3, se tomó una alícuota y se diluyó 1:2; para una dilución final de 1:6; en una caja petri se colocaron los discos impregnados con las diluciones 1:3 y 1:6 de la muestra; en la misma caja se colocaron también dos discos con las dos concentraciones centrales y dos discos con las concentraciones de los extremos de la curva estándar del antibiótico en ensayo; se efectuó la prueba por duplicado. El resultado se muestra en el cuadro No. 2. De los diez lotes de huevos-muestra ensayados, cinco fueron positivos, tres negativos, un lote tuvo cuatro positivos y seis negativos; otro lote tuvo seis positivos y cuatro negativos, lo que representa el 60% de huevos contaminados con antibióticos. El porcentaje es alto, aunque el muestreo no ha sido representativo de la zona muestreada. Los índices de recuperación de los antibióticos contaminados experimentalmente son aceptables; varían entre 88% para cloranfenicol, 94% para estreptomina, 94.4% para tetraciclina, 94.5% para penicilina, 94.8% para eritromicina y 100% para neomicina.

Es muy importante que los productores observen la precaución de no comercializar la producción de las aves que hayan sido tratadas con antibióticos, ya sea como promotores del crecimiento, promotores de la producción de huevo o como tratamiento de enfermedades bacterianas, hasta que haya transcurrido el tiempo conveniente pa-

CUADRO 1. EXPERIMENTO No. 3.- ZONAS DE INHIBICION DE LAS CONCENTRACIONES DE ANTIBIOTICOS EN LAS CURVAS ESTANDAR, EN MM. VALORES MINIMO, MAXIMO Y MEDIO, CORRESPONDIENTES A DIEZ REPETICIONES.

Antib y concentr. PGB, UI/g HLA	MIN	MAX	MEDIO	Antib y concentr. SNEOM μ g/g HLA	MIN	MAX	MEDIO
0.0003	16.0	17.0	16.3	0.25	19.0	20.0	19.7
0.0006	19.0	20.0	19.4	0.62	21.0	22.0	21.2
0.0013	22.0	23.0	22.8	1.00	22.0	23.0	22.9
0.0025	24.0	26.0	25.2	4.00	24.0	26.0	24.4
0.0050	27.0	28.8	27.7	5.00	26.0	27.0	26.2
0.0100	30.0	31.0	30.8	6.00	27.0	28.0	27.2
Antib y concentr. CTETRA μ g/g HLA	MIN	MAX	MEDIO	Antib y concentr. ERIB, μ g/g HLA	MIN	MAX	MEDIO
0.05	14.0	14.5	14.2	0.10	19.0	20.0	19.7
0.10	14.0	15.0	14.8	0.25	20.0	21.0	20.5
0.20	16.0	17.0	16.3	0.40	22.0	23.0	22.5
0.40	17.5	18.5	18.1	1.60	23.0	25.0	24.0
0.80	20.0	21.0	20.2	4.00	25.5	26.0	25.8
1.60	22.5	23.0	22.8	6.40	26.0	28.0	27.5
Antib y concentr. CLORAN, μ g/g HLA	MIN	MAX	MEDIO	Antib y concentr. STREP, μ g/g HLA	MIN	MAX	MEDIO
10.0	15.0	16.0	15.6	0.20	15.0	16.0	15.2
15.0	16.0	17.6	16.9	0.30	16.0	16.5	16.1
20.0	17.0	18.5	17.9	0.40	16.0	18.0	17.1
40.0	18.5	19.5	19.0	0.80	18.0	18.0	18.0
60.0	20.0	21.0	20.5	1.00	18.0	19.0	18.5
80.0	22.0	23.0	22.4	1.20	19.0	20.0	19.7

CUADRO No.2

EXPERIMENTO No. 4.- RESULTADO DEL ENSAYO POR DUPLICADO DE DIEZ LOTES DE DIEZ HUEVOS CADA UNO, COLECADOS AL AZAR EN DIEZ GRANJAS PRODUCTORAS DE HUEVO.

LOTES										D
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
+	+	-	+/-	-	-	+	+	+	+/-	
+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	1
+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	2
+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	1
+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	2
+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	1
+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	2
+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	1
+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	2
+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	1
+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	2
+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	1
+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	2
+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	1
+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	2
+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	1
+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	2
+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	1
+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	2

(+) POSITIVOS A RESIDUOS DE ANTIBIOTICOS, DETECTABLES POR LA TECNICA ENSAYADA.
 (-) NEGATIVOS A RESIDUOS DE ANTIBIOTICOS.
 (D) DILUCIONES: 1.- 1:3
 2.- 1:6

ra su eliminación. El tiempo de eliminación varía entre 1 y 30 días según el antibiótico, la vía de administración y de la cantidad administrada^{7,12,17,18}. Los índices de recuperación de los antibióticos ensayados mostraron que la técnica es confiable por su sensibilidad. Debido a que detecta por igual a los seis antibióticos, la prueba no es específica.

Por las dos características anteriores la

prueba es muy útil para una encuesta local, regional o estatal, para comprobar si en esas zonas se produce huevo libre de antibióticos.

SUMMARY

A microbiological disk on plate method was developed which uses PM-I medium (Difco, code 1800), *Bacillus stearothermophilus* spores, and incubation at 55 C 4 h ± 0.5 h to detect antibiotic residues of

penicillin, tetracycline, streptomycin, neomycin, erythromycin and chloramphenicol in eggs. The detection limits, the standard curves and the regression equations were performed with eggs free of antibiotics experimentally inoculated with six different concentrations of each antibiotic; each dilution was twice the one before. Each amount of antibiotic used was quantitatively assayed, against its reference standard, the recuperation index was greater than 85%. A study in ten farms was realized. Ten eggs from each one were assayed and the results showed that 60% were contaminated with antibiotic residues.

LITERATURA CITADA

1. BRADY, S.M. and KATZ, E.S. 1987. Simplified plate diffusion system for microbiological assays of antibiotic, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 70: 641.
2. CODE OF FEDERAL REGULATIONS, 1972. 21, Food and Drugs, 130 to 146. *Government printing office. Washington, D.C.* 239-255 p.
3. DIETER, A. and SOMOGYI, A. 1985. Trace analysis of Chloramphenicol residues in eggs, milk and meat: comparison of gas chromatography and radioimmunoassay. *J.A.A.C.* 68:984.
4. DEVORAK, M., SEVCIK, B. and LIEBICHOVA, L. 1980. Concentration of Chloramphenicol in blood, organs and eggs of poultry after the administration of chronicin solutions and usum vet. *Vet. Med. (Praha)*, 25:81.
5. FAO/OMS, 1976. El aporte de la veterinaria a la Salud Pública. Serie de informes técnicos, No. 573. Roma.
6. GOMEZ S, J. MOSQUEDA T, A. OCAMPO C, L. 1987. *Terapéutica aviar, Mendoza e Hijos ed., México, D.F.,* 63-97 p.
7. GOODMAN, L., GILMAN A., 1982. Bases farmacológicas de terapéutica, *Ed. Hispano-americana*, 5ta. ed. México.
8. INGLIS, M.J. and KATZ, E.S., 1978. Determination of streptomycin residues in eggs and stability of residues after cooking. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 61(5) 1098.
9. KATZ, E.S. and LEVINE, R.P. 1978. Determination neomycine residues in eggs and stability of residues after cooking. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 61(5) 1103.
10. KNOPP, G. KRERCKMAN, B. CONICHAUC, G. 1984. A method for the verification of chloramphenicol residues in animal tissues and with pressure liquid chromatography with radioimmunologic assay., *Z. Lebensm Unters Forsch.* 184: 390.
11. LITTER, M. 1980. *Manual de farmacología. Ed. ATENEO, Buenos Aires, 6ta. ed.* 1591-1617 p.
12. LOWENBERG, E.M. TODHUNTER, E.N. WILSON, D.E. 1970. *Los alimentos y el hombre., Ed. LIMUSA, México, D.F.* 88-90 p.
13. MEYERS, H.F. HAWETS, F. GOLFIEN, A. 1982. *Farmacología clínica, E. Manual Moderno, 5a ed. México, D.F.*
14. PEREZ D, M. 1982. Residuos de Fármacos y sus efectos en la Salud Pública, Memorias del Curso de Mastitis Bovina, División de Estudios de Postgraduados, *F.M.V.Z., UNAM México, D.F.* 67 p.
15. PETZ, M. 1984. Residues in eggs after treatment of laying hens with chloramphenicol and furazolidone. *Arhn fuer Libensmitlehygiene.* 35:51.
16. PETZ, M. 1987. Thin layer chromatographic determination of erythromycin and other macrolides antibiotics in Livestock Products, *J.A.A.C.* 70:691.
17. SERRANO V, L. 1980. Antibióticos en avicultura, *Técnica Avipecuaria* 1(2): 29.
18. SERRANO V, L. 1980. Antibióticos en avicultura, *Técnica Avipecuaria* 1(4): 26.
19. SUMANO L. OCAMPO C.L. 1986. *Farmacología Veterinaria. Ed. Mc. Graw Hill. México, D.F.* 154-400 p.
20. VELAZQUEZ Q, F. PEREZ D, M. y GONZALEZ S, R. 1980. Investigación de residuos de antibióticos en leche pasteurizada que se consume en el Area Metropolitana del D.F., *Salud Pública de México, XXII:* 91.
21. VELAZQUEZ Q, F. PEREZ D, M. 1982. Evaluación del Método rápido para la determinación de residuos de antibióticos en leche. *VIII Congreso Nacional de Buiatría, Veracruz, Ver.* 110 p.