

EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS Y QUIMIOTERAPÉUTICOS EN LECHE EN JALISCO, MÉXICO

Elizabeth Noa-Lima, M. Noa, Delia G. González, Patricia Landeros y Waldina Reyes

*Departamento de Salud Pública. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA),
Universidad de Guadalajara, Jalisco, México*

RESUMEN: Se determinó la frecuencia de aparición de antimicrobianos en leche cruda y pasteurizada del estado de Jalisco durante un año, combinando la prueba del Yogurt como método de selección, seguido del método grupo específico Twin Sensor® para b- lactámicos y tetraciclinas, simultáneamente con la detección de sulfonamidas, nitrofuranos y cloranfenicol por HPLC de fase reversa. Se analizaron mensualmente 10 centros de acopio y el total (12 marcas) de leche pasteurizada comercializada en el estado de Jalisco. De 264 muestras analizadas mediante la prueba del yogurt, 26 resultaron positivas a la presencia de antimicrobianos, equivalente a 9.8 % de contaminación total. En leche pasteurizada se hallaron 20 muestras positivas (13.8%), mientras que en leche cruda el porcentaje fue inferior (5%). La mayor frecuencia de contaminación se presentó en el mes de agosto con 27.3%. De las 20 muestras de leche pasteurizada analizadas, seis contenían b-lactámicos y dos tetraciclinas, mientras que en leche cruda se detectaron 3 muestras positivas a b-lactámicos y 3 a tetraciclinas. El 77% de las muestras detectadas positivas contenía al menos una sulfonamida, siendo la sulfamerazina la más frecuente. Se detectaron niveles de sulfonamidas por encima del LMR en leche cruda como en pasteurizada. No se encontraron muestras positivas a nitrofuranos ni cloranfenicol. Se puede concluir que existe un problema de contaminación con antimicrobianos en la leche consumida en el estado de Jalisco, que viola la Norma vigente.

(Palabras clave: leche; antimicrobianos; b-lactámicos; tetraciclinas; sulfonamidas; nitrofuranos; cloranfenicol)

EVALUATION OF THE PRESENCE OF ANTIMICROBIAL RESIDUES IN MILK IN THE STATE OF JALISCO, MEXICO

ABSTRACT: The objective of this work was to determine the frequency of detection of some of the most frequently antimicrobials in raw and pasteurized milk in Jalisco, Mexico in one year. To this aim, a combination of the yogurt inhibition test as screening method was conducted simultaneously with the confirmation of the positive samples using Twin Sensor for b-lactam and tetracycline antibiotics and High Pressure Liquid Chromatography for sulfonamides, nitrofurans and chloramphenicol. From 264 tested samples, 26 (9.8%) gave positive results to the presence of antimicrobials. The largest percentage corresponded to pasteurized milk, with 20 (13.8 %) positive samples. In raw milk, the positive rate was lower (5%). August showed the overall highest percentage of contamination (27.3 %). From the 20 pasteurized milk samples analyzed, 6 contained b- lactam antibiotics, while only 2 of them were positive to tetracycline. Three raw milk samples were positive to b-lactam and other 3 to tetracycline residues. The 77 % of the positive samples to yogurt test contained at least 1 sulfonamide, identifying sulfamerazine as the most frequent. Both raw and pasteurized milk showed samples above the MRLs for sulfonamides. There were no positive samples to nitrofurans or chloramphenicol. It can be concluded that there is a problem with antimicrobial residues in milk for human consumption in the state of Jalisco, which violates the established Regulations concerning raw milk destined to human consumption.

(Key words: milk; antimicrobials; b-lactam; tetracyclines; sulfonamides; nitrofurans; chloramphenico)

INTRODUCCION

Se ha demostrado que después de la administración de cualquier tratamiento veterinario, los residuos del medicamento aparecen en los productos comestibles obtenidos de los animales tratados. Los residuos de antimicrobianos en los alimentos, especialmente antibióticos, producen numerosos problemas en el humano, siendo el de mayor importancia la aparición de resistencia múltiple en bacterias patógenas al ser sometidas a bajas concentraciones sub-terapéuticas, lo cual representa un peligro potencial para la salud del consumidor y además, para la industria láctea, ya que los cultivos iniciadores empleados en la producción de derivados lácteos fermentados, tales como queso y yogurt, son extremadamente sensibles a bajas concentraciones de antibióticos en la leche (1,2).

La calidad de un producto, cualquiera que sea su naturaleza, está dada por disposiciones legales en sanidad y composición y la aceptación del consumidor (3). Para el caso de la leche, la Normatividad Mexicana vigente referida a leche de vaca, ya sea cruda o pasteurizada establece que la misma debe ser negativa a la presencia de inhibidores microbianos (4,5), sin embargo, estudios realizados anteriormente en el estado de Jalisco, el mayor productor de leche a nivel nacional en México, demostraron la presencia de antimicrobianos en leche cruda destinada a la industria procesadora (6).

El presente trabajo tuvo como objetivo determinar la frecuencia de detección de residuos de antimicrobianos más utilizados, específicamente β -lactámicos, tetraciclinas, sulfonamidas, nitrofuranos y cloranfenicol, en la leche cruda y pasteurizada comercializada en el estado de Jalisco durante un año, mediante una combinación de un método de selección, confirmación de grupo específico y Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se obtuvieron muestras de leche a partir de 10 centros de Acopio y de 12 marcas de leche pasteurizada entera comercializadas en la zona metropolitana de Guadalajara y en 3 de los municipios de mayor producción del estado de Jalisco. El muestreo se realizó durante 12 meses, entre junio de 2007 y mayo de 2008, para un número total de 264 muestras. Las muestras colectadas se analizaron dentro de las 24 horas posteriores a su recolección.

Se realizó previamente como método de selección la Prueba de Inhibición del yogurt, descrito en la Norma Mexicana vigente (7) para la determinación de

inhibidores microbianos en leche, con el objetivo de descartar muestras positivas de negativas. Las muestras detectadas como positivas se analizaron posteriormente de acuerdo al método correspondiente para la determinación de grupo específico, mediante el juego de reactivos Twin Sensor® para antibióticos β -lactámicos y tetraciclinas, y simultáneamente para detectar sulfonamidas, nitrofuranos y cloranfenicol en las muestras positivas mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC), siguiendo las recomendaciones de la Comisión del *Codex Alimentarius* para residuos de Medicamentos Veterinarios en Alimentos (8) para la realización de estudios de monitoreo. La metodología propuesta en este trabajo para la determinación de antimicrobianos en leche se ilustra en la Figura 1.

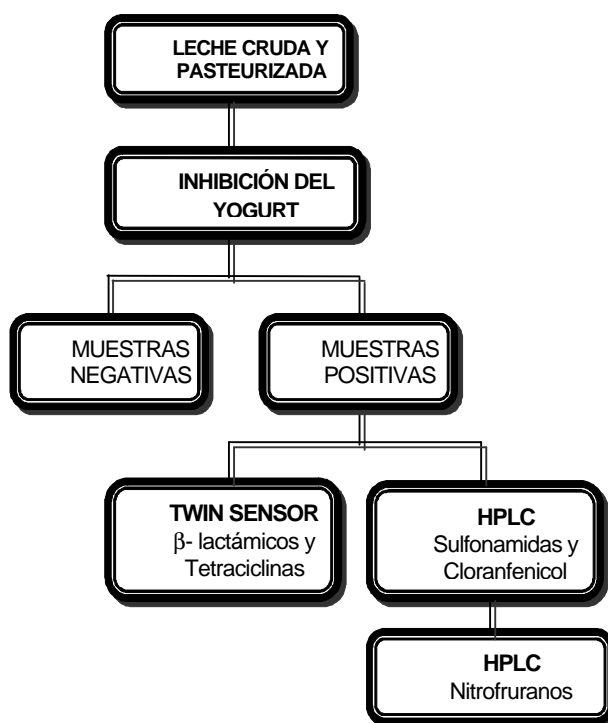


FIGURA 1. Metodología propuesta para la determinación de antimicrobianos en leche./ *Methodology proposed for the determination of antimicrobials in milk.*

Prueba de inhibición del yogurt

Norma Mexicana (7)

Se colocaron en tubos de ensayo estériles 10 mL de muestra, se calentaron e inocularon por duplicado con un cultivo de la mezcla de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* (3:1) recién preparado. Se determinó la acidez previa de las mues-

tras y un control (leche libre de sustancias inhibidoras cultivada con los mismos microorganismos) mediante titulación utilizando hidróxido de sodio 0.1 M y fenolftaleína como indicador. Se realizó la incubación de la muestra y el control a 45°C por 2 h y posteriormente se tituló nuevamente para determinar el incremento de la acidez. El incremento de la acidez en la muestra fue comparado con el del control. Se consideraron positivas las sustancias antibióticas e inhibidoras aquellas muestras en que el incremento de la acidez fue menor a la mitad del incremento de acidez desarrollada en el control (7).

Twin Sensor®

Las muestras positivas a la prueba del yogurt se analizaron y añadieron 200 mL de las muestras de leche a cada pocillo del juego de reactivos conteniendo los anticuerpos coloreados. Se homogenizó hasta obtener un color uniforme, se colocó el pocillo en un bloque de calentamiento a una temperatura de 50°C \pm 3°C para la primera incubación durante un periodo de tres minutos. Una vez finalizada la primera incubación se introdujo la tira indicadora dentro del pocillo que contiene la muestra de leche y se incubó por segunda vez a la misma temperatura por otros tres minutos. Una vez terminada la segunda incubación se interpretó el resultado a partir de la intensidad del color de cada línea. La interpretación de los resultados se realiza mediante comparación de la intensidad del color desarrollado por las líneas de prueba con respecto a la línea control, mediante interpretación visual (9).

Análisis cromatográfico

Este método se basa en la extracción selectiva de los residuos de antimicrobianos presentes en la leche con una mezcla cloroformo- acetona (v/v). El extracto se evapora hasta sequedad a presión reducida y se redisuelve en buffer fosfato de potasio 0.1 M, desgrasándose por partición con hexano. La fase acuosa (buffer) conteniendo los residuos de sulfonamidas y nitrofuranos y cloranfenicol se filtró por membrana Millipore de 0,45 μ m y se inyectó al cromatógrafo de líquidos de alta resolución con detección UV- visible y columna de fase reversa (C18), siguiendo el procedimiento analítico descrito en AOAC (10), bajo las condiciones cromatográficas modificadas por Pérez *et al.* (11) para la determinación de sulfonamidas, nitrofuranos y cloranfenicol.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De manera general, mediante la prueba de inhibición del yogurt empleada como método cualitativo se

detectaron 26 (9.8%) muestras positivas de un total de 264 analizadas; de ellas 20 fueron de leche pasteurizada con un total de 144 muestras, y 6 de leche cruda en las 120 muestras recibidas en todo el periodo de muestreo. Estos resultados son similares a los publicados en Corea por Chung *et al.* (12), quien reportó 21 muestras positivas de 269 analizadas mediante un método microbiológico.

Al relacionar la estacionalidad con la frecuencia de contaminación para cada tipo de leche observamos un incremento en el uso de antimicrobianos en la época de lluvias, comprendida entre los meses de junio a septiembre, alcanzándose un nivel máximo en el mes de agosto con 6 muestras positivas (27.3%), esta tendencia puede explicarse teniendo en cuenta que en climas subtropicales el calor proporciona las condiciones ideales para la proliferación de microorganismos patógenos y aumenta el nivel de estrés en los animales, lo que a menudo desencadena en un incremento de las células somáticas y mastitis con respecto al nivel de las mismas durante otras estaciones del año (13). Este comportamiento es consistente con resultados obtenidos en los Estados Unidos al correlacionar la incidencia de casos de mastitis en vacas lecheras con la época del año (14).

En el caso de leches crudas, de las 6 muestras detectadas como positivas mediante la prueba del yogurt, tres fueron positivas a β -lactámicos e igual número de muestras se reportó contaminada por tetraciclinas, presentándose una contaminación cruzada por ambos antimicrobianos en una de las muestras, reportándose en cada caso un valor de 1.6% del total de muestras analizadas. El número de muestras positivas detectadas se concentra fundamentalmente en los meses de verano de lluvias más intensas, es decir entre julio y septiembre, meses en los que factores como la temperatura y la humedad provocan un incremento en los casos de mastitis y por consiguiente se incrementa el uso de antimicrobianos para su control. Este comportamiento se observa de igual manera en leches pasteurizadas donde de 20 muestras analizadas, seis mostraron contaminación con β -lactámicos mientras que solo dos de ellas resultaron positivas a tetraciclinas. Esto podría explicarse teniendo en cuenta que las tetraciclinas presentes en alimentos de origen animal no son estables térmicamente (15), además los tratamientos térmicos empleados para reducir la presencia de estos antimicrobianos son más efectivos en el caso de las tetraciclinas que en β -lactámicos (16).

En el caso específico de la leche, los resultados obtenidos por Zorraquino *et al.* (17) muestran que la pasteurización (60°C/ 30 min) produce una leve

inactivación sobre los β -lactámicos (6-20%), efecto que es mayor en las tetraciclinas (18-31%), por lo que su detección en leche pasteurizada indica que no fue demasiado drástico dicho tratamiento o que las concentraciones de los mismos eran muy elevadas en la leche cruda. Debe tenerse en cuenta que el Límite Máximo de Residuos establecido por el CODEX Alimentarius para bencilpenicilina (Penicilina G) en leche es sólo de 4 mg/kg (18), que coincide con el límite de detección de la prueba del yogurt y es fácilmente detectado por el Twin Sensor®.(9)

Se detectaron residuos de al menos una sulfonamida en el 7.5% del total de muestras analizadas. En el monitoreo de residuos de antimicrobianos en leche pasteurizada realizado por Gutiérrez *et al.* (19) se encontraron en la Ciudad de México niveles alarmantes de sulfonamidas en leche, con valores por encima de un 40% de contaminación en cada caso; este ha sido hasta la fecha el único trabajo de monitoreo de sulfonamidas reportado en México. No obstante, aunque nuestros resultados muestran valores muy inferiores, la presencia de estos antimicrobianos en la leche fluida indica la falta de un programa eficiente de control de residuos de antimicrobianos que pueda reflejar la problemática actual referente a la calidad de la leche en el país.

La sulfonamida con más alta frecuencia de contaminación fue sulfamerazina, lo que se corresponde con resultados obtenidos por Gutiérrez *et al.* (19) y Chung *et al.* (12). Se detectaron 7 muestras con niveles de sulfonamidas por encima de los valores de LMR establecidos por el *Codex Alimentarius* para la leche (18). Las muestras con niveles violatorios de estos residuos se concentran entre los meses de junio a noviembre. Estos valores podrían ser el resultado de no respetar los periodos de espera luego de un tratamiento veterinario o el uso de dosis mayores a la recomendada (19).

En ninguna de las muestras analizadas se detectaron nitrofuranos. En México los nitrofuranos son recomendados sólo para el tratamiento de mastitis en vacas secas (20). Nuestros resultados por tanto muestran que estos antimicrobianos al parecer son utilizados de forma correcta, o bien su uso es escaso. También podría suponerse que los residuos de nitrofuranos, si estuvieran presentes se encuentran por debajo del límite de detección del método utilizado (4, 8 y 13 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ para nitrofurazona, furazolidona y furaltona respectivamente). El cloranfenicol tampoco fue detectado en ninguna de las muestras analizadas, puesto que su uso está prohibido en animales destinados al consumo humano (21).

REFERENCIAS

1. Cogan MT. Susceptibility of Cheese and Yoghurt Starter Bacteria to Antibiotics. *Applied Microbiology*. 1972;23(5):960-965.
2. Schiffmann AP. Methodological and legal problems relating to the detection of inhibitory substances in milk. Thesis Thierarztliche Hochschule 1992; Hannover, Germany.
3. Ruvalcaba S, Noa M, Pérez G. Ciencia de la Leche. Libro de texto. Universidad de Guadalajara, México. 2009.
4. NMX-F-700-COFOCALEC-2004. Norma Mexicana. Sistema Producto Leche. Alimento Lácteo. Leche Cruda De Vaca. Especificaciones Físicoquímicas, Sanitarias Y Métodos De Prueba. Organismo Nacional De Normalización Del COFOCALEC.
5. NOM-184-SSA1-2002. Productos y servicios. Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado. Especificaciones sanitarias, publicada en el **Diario Oficial de la Federación** el 23 de octubre de 2002.
6. Noa M, Ruvalcaba S, Morales H: Frecuencia de residuos de antibióticos en leche cruda en Jalisco. *Agrociencia* 2009. Próxima aparición.
7. NMX-F-719-COFOCALEC-2008. Norma Mexicana. Sistema Producto Leche. Alimentos. Lácteos. Proyecto de Norma Mexicana para Métodos de prueba para la determinación de antibióticos en leche.
8. CODEX Alimentarius ALINORM 97/31a. Comisión del CODEX Alimentarius. Programa Conjunto FAO/OMS Sobre Normas Alimentarias. Comisión del Codex Alimentarius. 22º Período De Sesiones, Ginebra 1997.
9. Twinsensor BT (β -lactam+Tetracycline detection). www.twinsensor.com. Consultado 5/12/2008.
10. AOAC. Handbook Of Official Analytical Methods Of Analysis. Association Of Official Analytical Chemists. Official Analytical Method. 2005; 993.32
11. Pérez N, Gutiérrez R, Noa M, Díaz G, Luna H, Escobar I, et al. Liquid Chromatographic determination of multiple sulfonamides,

- nitrofurans, and chloramphenicol residues in pasteurized milk. *J AOAC International*. 2002;85(1):20-24.
12. Chung HH, Jung L, Yun-Hee C. Analysis of sulfonamide and quinolone antibiotic residues in Korean milk using microbial assays and high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*. 2008. Volume 113, Issue 1, 1 March 2009; Pages 297-301
 13. Yamaki M, Berruga MI, Althaus RL, Molina MP, Molina A. Occurrence of antibiotic residues in milk from manchega ewe dairy farms. *J Dairy Science*. 2004;87:3132-3137.
 14. Philpot N, Nickerson S. Ganando la lucha contra la mastitis. Ed. Westfalia-Surge, Inc: USA., 2000; p 31.
 15. Rose MD, Bygrave J, Farrington WHH, Shearer G. The effect of cooking on veterinary drug residues in food: 4. Oxitetracycline. *Food Additives and Contaminants*. 1996;13:275-286.
 16. Kühne M, Köne U, Wenzel S. Tetracycline residues in meat and Contaminants 2001;18(7):593-600.
 17. Zorraquino MA, Roca M, Fernández N, Molina MP, Althaus R. Heat inactivation of beta-lactam antibiotics in milk. *Journal of Food Protection*. 2008;71(6):1193-8.
 18. Codex Alimentarius. Normas Alimentarias FAO/OMS: Residuos de Medicamentos Veterinarios en alimentos. Límites Máximos de Residuos. http://www.codexalimentarius.net/mrls/servlet/VetDrugServlet?Substances=305&Items=0&Tissues=6&out_style=by+substance&Domain=VetDrugMRLs&Language=espanol&query_form=%2Ffaostat%2Fvetdrugs%2Fvetd_q-e.htm. Consultado 03/12/2008 21:45h.
 19. Gutiérrez R, Noa M, Díaz G, Vega S, González M, Prado G. Determination of the presence of 10 Antimicrobial Residues In Mexican Pasteurized Milk. *Interciencia* 2005; 30(5): 291- 294.
 20. Directorio de Medicina Veterinaria, Nutrición y Zootecnia. Mercadeo Estadístico SC. México, D.F. 2005.
 21. Diario Oficial de la Federación. ACUERDO por el que se establece la clasificación y prescripción de los productos farmacéuticos veterinarios por el nivel de riesgo de sus ingredientes activos. Publicado en el Diario Oficial de la Federación el 12 de Julio de 2004. Estados Unidos Mexicanos. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.

(Recibido 15-11-2008; Aceptado 27-12-2008)