

DETECCION DE RESIDUOS DE AGENTES ANTIMICROBIANOS EN LECHE DE GANADO BOVINO

Rafael Monge*, Ma. Laura Arias*, Ricardo Ellner*

Key Words: Agentes Antimicrobianos, leche, ganado bovino.

RESUMEN:

*Se estudió durante el primer semestre de 1992, un total de 200 muestras de leche de ganado bovino. De éstas, un 25% correspondió a leche fluida pasteurizada vendida comercialmente, un 25% a leche fluida no pasteurizada expendida por vendedores ambulantes. Un 25% constituyeron muestras de la leche en polvo de uso institucional y un 25% a muestras de este tipo de leche comercializada en supermercados. Los sitios de muestreo se ubicaron en la provincia de San José, Costa Rica y fueron seleccionados aleatoriamente. La prueba utilizada para la determinación de la presencia de residuos de agentes antimicrobianos en la leche fue la inhibición de *Bacillus stearothermophilus* var *calidolactis* (ATCC 10149). Los resultados muestran que un 9% y un 2% de la leche cruda y pasteurizada respectivamente presentan residuos de sustancias inhibitorias. Asimismo, indican la ausencia de este tipo de contaminación en la leche en polvo. Se comparan los resultados obtenidos en este estudio con los hallados por otros investigadores nacionales en 1987. Del mismo modo, se discute la legislación que sobre este tema existe en el país. (Rev. Cost. Cienc. Méd. 1991; 13(3-4): 1-6).*

*Sección de Microbiología de Alimentos, Facultad de Microbiología. Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

INTRODUCCION

Los agentes antimicrobianos o sustancias inhibitorias son compuestos químicos usados para el tratamiento de enfermedades infecciosas (1). El uso de éstos, específicamente los antibióticos betalactámicos y las sulfonamidas, ha facilitado la intensificación de la producción lechera, debido a la reducción de las pérdidas ocasionadas por enfermedades infecciosas de la glándula mamaria (2, 3).

No obstante, el inadecuado manejo clínico de la mastitis resulta en la contaminación de la leche con residuos de sustancias inhibitorias (3-5), lo cual representa un serio problema tanto para la salud pública como para la industria lactológica.

En el área de salud pública, la presencia de estos residuos en la leche se ha asociado con el incremento de la resistencia de las bacterias hacia los agentes microbianos (6), al desarrollo de asma (3), dermatitis (7) y en muy raras ocasiones se ha ligado con la ocurrencia de choque anafiláctico (5), el cual se presume representa un riesgo solo para aquellos individuos hipersensibles (8).

La Organización Mundial de la Salud (O.M.S.), con el fin de prevenir tales manifestaciones clínicas y en pro de la seguridad alimentaria, ha establecido que la concentración máxima permisible de penicilina G en leche de consumo humano, debe ser de 0,006 ug/ml (0,01 IU/ml) (9), concentración 0,002 ug/ml mayor que la permitida por la Comunidad Europea (10). A nivel de la industria lactológica, la contaminación de la leche con residuos de sustancias inhibitorias constituyen serias pérdidas económicas (3), dado que

concentraciones de penicilina G de tan solo 0,05 UI/ml de leche, tienen un marcado efecto de inhibición sobre los cultivos iniciadores (11,12).

Ante la importancia social y económica que representa la presencia de residuos de agentes antimicrobianos en la leche, se ha generado durante los últimos años un acelerado desarrollo de pruebas cada vez más rápidas y sensibles para la detección de los mismos (13), siendo en la actualidad el nivel mínimo detectable para penicilina sódica y penicilina G de 0,002 y 0,006 UI/ml respectivamente, así como de 0,01 ug/ml para sulfonamidas (14).

El objetivo de este estudio fue determinar la presencia de residuos de agentes antimicrobianos en leche fluida pasteurizada y no pasteurizada, así como en leche en polvo que se distribuye en San José - Costa Rica.

MATERIALES Y METODOS

Para la ejecución del estudio, se analizaron 50 muestras de la leche fluida pasteurizada expendida por las principales cooperativas de leche del país, así como 50 muestras de la leche no pasteurizada vendida por lecheros ambulantes en diferentes áreas geográficas de la capital.

Además, se contemplaron dentro de la investigación 50 muestras de la leche en polvo distribuidas por los Centros de Educación y Nutrición (CEN) y 50 muestras de este tipo de leche expendida comercialmente.

Las muestras fueron recolectadas en 10 supermercados, 10 CEN y 10 comunidades de la provincia de San José, durante el primer semestre de 1992. Todos los sitios de muestreo fueron seleccionados aleatoriamente y en cada uno de ellos se tomó 5 muestras del producto a estudiar.

Para la detección de los residuos de agentes antimicrobianos se siguieron los lineamientos establecidos por la International Dairy Federation (1986) (14), para la realización de la prueba de inhibición de *Bacillus stearothermophilus* Var. calidolactis

(ATCC 10149) - (13,14). Las pruebas positivas fueron montadas por duplicado, utilizando el mismo método con el fin de corroborar la presencia de los residuos de agentes antimicrobianos.

RESULTADOS Y DISCUSION

Por su considerable aporte de calcio, fósforo y proteína de alta biodigestibilidad (15), la leche constituye un alimento importante en el balance dietético de todo individuo, aun cuando la cantidad recomendada para consumo, varíe marcadamente en los diferentes grupos etanos (16).

Paradójicamente, a la vez que este alimento constituye una excelente fuente de nutrimentos, puede también representar un mecanismo que favorece el desarrollo de urticarias (17), otras alergias (16), alteraciones de la flora bacteriana intestinal (17), y otros problemas de salud asociados a la contaminación con residuos de agentes antimicrobianos. Esto cobra importancia, si se considera que estos contaminantes, son resistentes a los procesos de pasteurización ordinaria (72°C/15 seg.), al tratamiento UHT (Ultra High Temperature; 135°C/1 seg.) y a la congelación profunda (-15°C a -30°C) (5, 14, 18).

En la mayoría de los países desarrollados, la legislación en torno a este tema, es altamente específica y dinámica, a tal grado que los niveles mínimos permitidos de residuos de sustancias inhibitorias en la leche, se ajustan conforme la sensibilidad de los métodos de detección se incrementa (6). Para Irlanda, el máximo nivel tolerable de penicilina es de 0,007 UI/ml (19), en Nueva Zelanda 0,003 UI/ml (20), en Estados Unidos de América 0,01 UI/ml (3) y en Suecia 0,006 UI/ml (21) siendo en cualesquiera de estos países, penalizada las muestras con concentraciones mayores o iguales a las estipuladas. Esto ha permitido que la incidencia de muestras positivas en esos lugares sea inferior al 0,5% (9, 19, 21).

En Costa Rica, no existe legislación específica sobre este tema, lo cual se refleja

en los resultados obtenidos en este estudio (Cuadro 1), pues en el 2% de las muestras de leche pasteurizada y en el 9% de las no pasteurizada se evidenció la presencia de estos contaminantes, ya fueran residuos de penicilina en concentraciones mayores o iguales a 0,006 UI/ml o de sulfas en concentraciones entre 0,1-1,0 ug/ml. (Cabe señalar que, al no existir en el país los reactivos necesarios, fue imposible dilucidar cuál de los dos agentes estaban presentes en la leche o si ambos estaban a la vez contaminando el alimento.)

El problema de la contaminación de la leche con residuos de sustancias inhibitorias, ha mejorado considerablemente en nuestro país, con respecto al panorama de 1987 (Cuadro 1), año en el cual se detectó en más del 60% de las muestras estudiadas de leche cruda y pasteurizada contaminación con penicilina en concentraciones superiores al 0,01 UI/ml (22).

La marcada reducción, ocurrida entre 1987 y 1992 en el porcentaje de muestras positivas en la leche pasteurizada, puede obedecer a la determinación sistemática de residuos de sustancias inhibitorias, que han estado llevando a cabo desde hace 3 años las empresas cooperativas nacionales dedicadas a la industrialización de este alimento (23). Esta evaluación ha permitido a tales compañías asegurar su producción, dado que la presencia de estos contaminantes, puede representar cuantiosas pérdidas económicas en la elaboración de yogurt, natilla y otros derivados lácteos, a raíz de la inhibición de los estreptococos lácteos y lactobacilos (3, 24).

A pesar de lo anterior, el problema aún persiste, principalmente con la leche no pasteurizada, pues en algunas áreas geográficas de San José, Heredia y Cartago, más del 25% de muestras analizadas, presentan residuos de los agentes mencionados, así como en más del 17% de las muestras recolectadas en Alajuela (23), lo cual adquiere mayor importancia si se considera que cerca de un 30% de la leche que se comercializa en el país no es pasteurizada (25).

Ante la ausencia de una regulación específica para la solución de este problema, la iniciativa tomada por la empresa privada para asegurar sus intereses, se manifiesta como una mejora en la calidad sanitaria de la leche que reciben los consumidores.

No obstante, es deber de los organismos gubernamentales encargados de la seguridad alimentaria, desarrollar sistemas que controlen la incidencia de este tipo de contaminación en la leche y a la vez definir esquemas de penalización. De esta manera podría proyectarse en el país un cambio como el ocurrido en Irlanda en el período comprendido entre 1981 y 1984, en donde la incidencia de pruebas positivas disminuyó de un 10% a menos del 0,1% (19).

Para lograr tal cometido, el primer paso que los entes estatales deberían realizar, es la corrección del artículo 1 del decreto No. 18862 publicado en la Gaceta No. 59, en el cual se establece que la leche no debe tener antibióticos. Esto debido a que resulta poco lógico, exigir la ausencia de tales sustancias, cuando a la fecha no existe ningún método de detección de las mismas que evidencia su ausencia.

La prueba más sensible para la determinación de antibióticos Beta-Lactámicos y sulfonamidas es el Charm Test y detecta una concentración mínima de 0,002 UI/ml y 0,01 ug/ml de esos antimicrobianos respectivamente (14). (Cuadro 2).

Asimismo, es necesario modificar el término antibiótico, ya que se está dejando por fuera la regulación de otras drogas antimicrobianas que no son antibióticos por definición (1), como ocurre con las sulfonamidas.

Las entidades públicas a cargo del control de alimentos, podrían considerar la prueba de inhibición del *Bacillus stearothermophilus*, como prueba oficial para la detección de residuos de agentes microbianos en la leche, considerando que es altamente sensible (detecta 0,006 UI de penicilina/ml de leche), rápida y de costo relativamente bajo, si se toma en cuenta que un gran número de muestras (noventa y seis) pueden ser analizadas por cada set.

Asimismo, esta prueba permite realizar la diferenciación de los antibióticos B-lactámicos de las sulfonamidas cuando se dispone de la penicilinas y el ácido p-amino-benzoico, requeridos para este propósito (14).

Además, esta es una de las pruebas de mayor uso para la detección de este tipo de contaminación en países desarrollados, dado que otras pruebas de inhibición bacteriana son menos sensibles y las "pruebas rápidas" como inhibición de enzimas y pruebas radioactivas, entre otras, requieren de equipo costoso y operaciones complejas (13).

De esta manera, podría penalizarse en el país a los productores de leche, cuyas muestras contengan una concentración de penicilina mayor o igual a 0,006 UI/ml (0,01 UI/ml).

Es importante señalar que la concentración de penicilina se considera como base para la recomendación anotada anteriormente, dado que la mayoría de los métodos de detección, tienen una mayor sensibilidad para este antibiótico que para cualquier otro agente antimicrobiano (Cuadro 2). Por consiguiente, al no evidenciarse la presencia de penicilina en la leche, se contempla indirectamente la ausencia de las otras sustancias inhibitorias.

ABSTRACT

*Two hundred bovine milk samples were analyzed in order to detect the presence of antimicrobial residues. The samples were randomly obtained in San José, Costa Rica, (25% were fluid pasteurized milk sold commercially, 25% were fluid but non-pasteurized milk sold by street hankers, 25% were powdered milk samples distributed by a public institution, and the remaining 25% were powdered milk samples obtained in local supermarkets). Residual antimicrobial agents were tested by the inhibition of *Bacillus stearothermophilus* var *calidolactis* (ATCC 10143). The results showed a 3% and 2% contamination in ran and pasteurized milk, respectively, with an absence of contamination in powdered milk. These results are compared with prior reports, and the legislation related to this issue is discussed.*

BIBLIOGRAFIA

1. Pelczar M. *Microbiology*, 5ed. New York, U.S.A., Mc Graw Hill Book Company, 1986:510-511.
2. Bishop J., Boduine A., O'Dell G., Vansen J. Quantitative assay for antibiotics used

CUADRO No. 1
PORCENTAJE DE MUESTRAS POSITIVAS POR RESIDUOS DE AGENTES
ANTIMICROBIANOS, SEGUN TIPO DE LECHE.
1987, 1992

Tipo de Leche	Año	
	1987(1)	1992
Pasteurizada	88%	2%
No Pasteurizada	64,5%	9%
En polvo (comercial)	DND	0%
En polvo (institucional)	DND	0%

DND: DATO NO DISPONIBLE

(1) Referencia 22.

CUADRO No. 2
CONCENTRACIONES DETECTABLES (UG/ml) DE VARIOS AGENTES
ANTIMICROBIANOS SEGUN PRUEBAS DE DETECCION

Agente Antimicrobiano	Prueba de detección			
	Delvo Test-Sp	Prueba de disco	Yogurt Test	Charm Test
Penicilina*	0,006	0,006	0,002	0,002
Ampicilina	0,005	0,005	N. D.	N. D.
Coxacilina	0,035	0,035	0,50	N. D.
Nafcilina	0,011	0,011	N. D.	N. D.
Tetraciclina Kcl	0,40	0,40	N. D.	N. D.
Cloranfenicol	0,50	15,00	2,00	0,20
Estreptomicina	N. D.	N. D.	1,00	0,03
Dihidroestreptomicina	15,00	13,00	N. D.	0,10
Neomicina	13,00	22,00	10,00	N. D.
Bacitrocina*	0,14	0,14	0,04	N. D.
Eritromicina	2,25	2,25	0,10	0,01
Sulfonamidas	0,1-1,0	0,1-1.0	N. D.	0,01

* UI/ml
ND: No detectable
Fuente: Referencia 10,14

- Commonly in treatment of bovine infections. *J. Dairy Sci* 1985; 68:3031-3036.
3. Jones G., Seymour E. Cowside antibiotic residue testing. *J. Dairy Sci* 1988; 71:1691-1699.
4. Black W., Mackay A., Doig P., Claxton M. A study of drug residue in milk, following intrauterine infusion of antibacterial drug in lacting cows. *Ganad Vet. J.* 1979; 20:354-357.
5. Vautier H., Postigo C. Mastitis bovina y residuos de antibióticos en la leche, riesgos para la salud pública. *Revista Mundial de Zootecnia* 1986; 60:111-112.
6. Werner E. Tropical aspects of the use of antibiotics in cattle. *Monatshefte fuer Veterinaermedizin* 1986; 41:685-690.
7. Organización Mundial de la Salud. Normas para el examen de los productos lácteos. Washington D.C., USA:OMS, 1963:1-137.
8. Frappaolo P. Current research and regulatory status on antibiotics in animal feeds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1984; 185:28-30.
9. Booth J. Intramammary antibiotics preparations and their with holding times. *Vet. Rec.* 1986; 118:34-35.
10. Carlsson A., Bjorck L. Charm test II for confirmation of inhibitory substances detected by different microbial assay in hard milk. *J. Food. Prot.* 1991; 54:32-36.
11. Albright V., Tuckey S., Woods G. Antibiotics in milk; A Review. *J. Dairy Sci.* 1961; 44:770-807.
12. Dopfer, Lait L. La recherche d'antibiotiques associés dans le lait. *J. Dairy Sci.* 1957; 40:94-96.
13. Hands A. Assay of inhibitory substances. *J. Soc. Dairy Technol* 1989; 42:92 -93.
14. International Dairy Federation. Detection of inhibitors. *Annual Sessions in the*

Haque: Report of Group E47 E-D0C244 1986: 3-166.

15. Revilla A. *Tecnología de la leche*. San José, Costa Rica: IICA, 1985: 14-30.
16. Zeman F. *Clinical Nutrition and Dietetics*. Lexington, USA: The Collamore Press, 1983:652-653.
17. Amiraslonova L. Excretion of antibiotics in human milk. *Akusherstvo i ginekologiya* 1984; 9:10-13.
18. Carlsson A., Bjorck L. The effect of some indigenous antibacterial factors in milk on growth of *Bacillus Stearothermophilus* Var. *Calidolactis*. *Milchwissenschaft* 1987, 42: 282-283.
19. Eagan J., Meaney W. The persistence of detectable residues of penicillin and cloxacillin in normal and mastetic quarters following intramammary infusion. *Vet. Rec.* 1985; 116:436-438.
20. Hill B., Small J. Antibiotic residue release at the beginning of lactation following dry cow therapy. *N Z Vet. J.* 1985; 33:105-107.
21. Carlson A, Bjorck. Detection of antibiotic residues in herd and tanker milk: A study of the Charm test II. *Milchwissenschaft* 1989; 44:7-10.
22. Arias M., Antillón F., Cubillo Z. Residuos de penicilina en leche bovina en Costa Rica. *Rev. Cost. Cienc. Med.* 1988; 9:125-129.
23. Calderon J. *Determinación de residuos de sustancias inhibitorias en leche bovina no pasteurizada*. Tesis, Universidad Nacional. Campus Omar Dengo: Heredia, 1992.
24. Katznelson H., Hoode. Influence of penicillin and others antibiotics on latic streptococci in startes cultures used in cheddar cheesemaking. *J. Dairy Sci.* 1949:40:961-968.
25. Quijano E. Elaboración de queso blanco como prevención a la contaminación por el cólera. En: Centro de Investigaciones en Tecnología de Alimentos *Resumen de las charlas presentadas. Curso corto 9-11 oct. 1991*. (Cita, Universidad de Costa Rica): 9-11.