ESTUDIO DE LA APTITUD DE GEOBACILLUS STEAROTHERMOPHILUS PARA DETECTAR LA PRESENCIA DE RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS Y OTRAS SUSTANCIAS ANTIMICROBIANAS *IN VIVO*

Serrano[1], M. J., Mitjana[1], O., Bonastre[1], C., Laborda[1], A., Abilleira[2], E., Falceto[1], M. V., Condón[1], S., Pagán[1], R.
1. Instituto Agroalimentario de Aragón - IA2 (Universidad de Zaragoza – CITA).
2. Laboratorio de Salud Pública del Gobierno Vasco (LSPGV)
mjserran@unizar.es

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, una de las principales preocupaciones en materia de sanidad es el incremento de resistencias a antibióticos detectado en los últimos años (O´Neill, 2014). Al tratarse de un proceso de selección natural, resulta difícil de erradicar, pero un control adecuado del uso de antibióticos favorecería una reducción efectiva del proceso. Este, control sería especialmente efectivo en el sector veterinario al tratarse de uno de los principales usuarios de estas sustancias (ECDC, 2017). En esta línea, son numerosos los métodos biológicos desarrollados para la detección de residuos antibióticos en carne, como el test Explorer 2.0, comercializado por la empresa Zeulab S.A. Estos métodos evitan el paso de residuos antibióticos a la cadena alimentaria, pero no evitan pérdidas económicas ligadas a multas y decomiso de canales. La solución pasa por adaptar estos test para su realización *in vivo*, que es el objetivo de este estudio.

MATERIAL Y MÉTODOS

Inicialmente, se elaboró un banco de muestras a partir de cerdos (n=50) no tratados y tratados vía intramuscular con oxitetraciclina (ALAMYCIN L.A 300), sulfametoxipiridazina (SULFAMETOX®) y amoxicilina (AMOXOIL RETARD®). Los animales fueron sacrificados en distintos días del periodo de supresión, siendo el plan experimental aprobado por la Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza. El banco de muestras se elaboró a partir de dos réplicas independientes. Las muestras obtenidas fueron preparadas para su análisis con el test Explorer 2.0, basado en la inhibición del crecimiento de *Geobacillus stearothermophilus* en presencia de sustancias antimicrobianas. El crecimiento se monitoriza a través de los cambios de pH asociados a la metabolización de los nutrientes, que dependen a su vez del ritmo de crecimiento y se evidencian por un cambio en la coloración del medio de crecimiento debido a la presencia de púrpura de bromocresol, el cual vira de amarillo a púrpura entre pH 5.2 y 6.8. El test se lee en un incubador que registra los cambios de color, de forma que comparando las curvas correspondientes a animales no tratados y tratados se puede valorar el efecto inhibitorio de la muestra. Paralelamente, estas muestras se enviaron al LSPGV para ser cuantificadas por cromatografía líquida (UPLC-MSMS).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis cromatográfico de muestras de músculo obtenidas de distintas partes de animales tratados con oxitetraciclina, sulfametoxipiridazina y amoxicilina muestra que no existen diferencias estadísticamente significativas entre la concentración de las sustancias antimicrobianas detectadas en lomo, paleta o jamón (Figura 1).

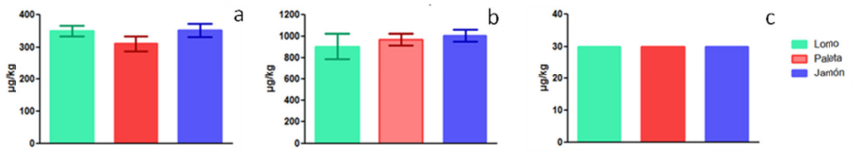


Figura 1. *Concentración de sulfametoxipiridazina (2º día supresión) (a); oxitetraciclina (4 º día supresión) (b); amoxicilina (3er día supresión) (c) en los tres grupos musculares analizados.*

La monitorización del pH que realiza el test Explorer 2.0 permitió evidenciar diferencias en la velocidad de acidificación asociadas al crecimiento de *G. stearothermophilus*, no sólo en

músculo sino también en sangre y orina de cerdo, tanto en el caso de animales no tratados (Figura 2a) como en el de animales tratados (Figura 2b), lo que refleja la aptitud del microorganismo para ser utilizado en la detección de sustancias antimicrobianas en diferentes matrices (Nagel et al., 2012; Berruga et al., 2016).

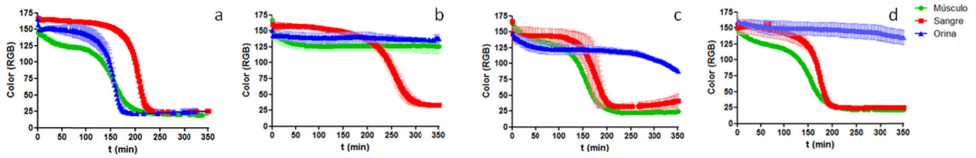


Figura 2. *Curvas de acidificación obtenidas tras la aplicación del test Explorer 2.0 en las tres matrices biológicas estudiadas (músculo, sangre, orina) correspondientes a la media y desviación estándar de dos cerdos blancos no tratados (Fig. 2a) y cerdos tratados con sulfametoxipiridazina (Fig. 2b), oxitetraciclina (Fig. 2c) y amoxicilina (Fig. 2d).*

Las Figuras 2b, 2c y 2d muestran cómo, para cada medicamento, los cambios de pH asociados al crecimiento de *G. stearothermophilus* en presencia de las diferentes matrices biológicas testadas pusieron de manifiesto una distribución heterogénea entre matrices, presumiblemente ligada a la farmacocinética propia derivada de la metabolización y eliminación del medicamento (Chiesa et al., 2017). Por ejemplo, mientras que en caso de la sulfametoxipiridazina (Figura 2b), las muestras de orina y músculo no permitieron el crecimiento de *G. stearothermophilus* y las de sangre sí, en el caso de los otros dos antibióticos únicamente la orina lo impidió.
La Tabla 1 muestra el primer resultado negativo detectado por el test biológico para cada sustancia antimicrobiana en cada matriz biológica, siendo similar en músculo y sangre, lo que indica que la sangre podría ser una matriz adecuada para desarrollar ensayos *in vivo*. Por su parte, en el caso de la orina, la inhibición en el crecimiento del microorganismo podría estar ligada al pH y complejidad de la matriz.

Tabla 1. *Tiempo (días) tras la administración del medicamento necesario para obtener el primer resultado negativo en función de las sustancias antimicrobiana y de la matriz testada.*

	Músculo (test)		Sangre (test)		Orina (test)	
	Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2
Oxitetraciclina	13	13	13	13	20*	20*
Sulfametoxipiridazina	5	4	5	5	5*	5*
Amoxicilina	4	4	4	4	4*	4*

** No se ha obtenido un resultado negativo en las condiciones experimentales testadas, siendo ese valor correspondiente al día en que se ha obtenido el último positivo.*

Si se comparan los resultados obtenidos en sangre por el test biológico y cromatografía (Figura 3), se observa cómo la sensibilidad a oxitetraciclina y sulfametoxipiridazina fue similar. Sin embargo, el microorganismo mostró una sensibilidad mayor que la técnica cromatográfica a la hora de detectar la presencia de amoxicilina en sangre, por lo que se requieren nuevos estudios que permitan adaptar el funcionamiento del test para adecuar la detección de este antibiótico a los LMRs establecidos por la legislación.

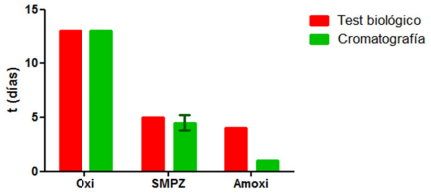


Figura 3. *Tiempo (días) necesario para obtener la primera muestra negativa en sangre por el test Explorer 2.0 y cromatografía, tomando como referencia los LMRs (Reg. 37/2010/CE).*

Los datos correspondientes a la cuantificación cromatográfica en sangre permitieron calcular el ritmo de eliminación del antibiótico, que siguió una cinética exponencial en todos los casos (Figura 4) (Gehring et al., 2004; Hernández et al., 2005). Sin embargo, el ritmo de eliminación fue diferente para cada antibiótico, siendo la amoxicilina el antibiótico con un mayor ritmo de eliminación, seguido por sulfametoxipiridazina y oxitetraciclina. A pesar de estas diferencias, si se comparan los resultados del test biológico en músculo con el periodo de supresión establecido por las casas comerciales para cada medicamento (Figura 5), se observa cómo una adecuada administración respetando los tiempos de espera sería sinónimo de un uso seguro del antibiótico o sustancia antimicrobiana.

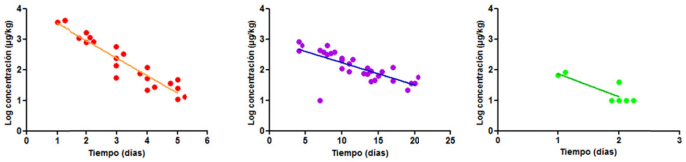


Figura 4. *Eliminación de sulfametoxipiridazina (a), oxitetracilina (b), amoxicilina (c) de la sangre de animales tratados, cuantificado por* UPLC-MSMS*.*

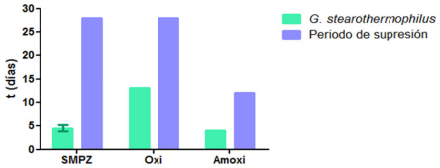


Figura 5. *Tiempo (días) necesario para obtener la primera muestra negativa en músculo utilizando el test Explorer 2.0, en comparación con los tiempos de supresión establecidos.*

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Berruga, M. I. 2016. Small Rum. Res. 142: 38-43. • Chiesa, L. M. 2017. Food Chem. 235: 111-118. • ECDC. 2017. ESAC-Net surveillance data. • Gehring, R. 2004. J. Food Prot. 67: 555-560. • Hernandez, E. 2005. Vet. J. 170: 237-242. • Nagel, O. G. 2012. Small Rum. Res. 102: 26-31. • O'Neill, J. 2014. Rev. Antimicrob. Resist. 20: 1-16.

Agradecimientos: El proyecto ha sido cofinanciado al 65% por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) a través del Programa Interreg V-A España-Francia-Andorra (POCTEFA 2014-2020).

TITLE: STUDY OF THE APTITUDE OF *GEOBACILLUS STEAROTHERMOPHILUS* TO DETECT THE PRESENCE OF ANTIBIOTIC AND ANTIMICROBIAL RESIDUES *IN VIVO*.

ABSTRACT: The current increase on antimicrobial resistance is linked to a misuse of antibiotics and antimicrobial substances. As it is a natural selection process, it can´t be completely eradicated, but the implementation of control systems at animal production levels would prevent the entering of antibiotics in the food chain. Biological based control methods are widely spread. These are *post mortem* tests, so their adaptation to live animals would substantially avoid economic losses. This study, carried out on 50 piglets untreated and treated with oxytetracycline, sulfamethoxypiridazine and amoxicillin, showed that besides muscle, the test works with urine and blood. The antibiotic concentration was comparable between muscle groups (loin, sirloin and ham), but not between biological matrixes, identifying small inter-individual variability. Among the matrixes studied, blood showed a similar antibiotic sensitivity to muscle when the test based on *G. stearothermophilus* growth was used. The chromatographic quantification of the antibiotic concentration revealed a different removal rhythm that always followed an exponential kinetic. When comparing the biological test results and the withdrawal periods given for each antibiotic, it was noticed that an appropriate administration is a synonym of a safe use of the antimicrobial substance.

Keywords*:* antibiotics, meat, biological test, *in vivo*.