

# Desarrollo de una técnica para la detección *in vitro* de la presencia de antibióticos en muestras de hígado de res, cerdo y pollo

Development of an *in vitro* antibiotics detection technique in samples of beef liver, pork and chicken

Rebeca Monroy-Torres<sup>1,2\*</sup>, Benigno Linares- Segovia<sup>1</sup>, Xochitl Sofía Ramírez-Gómez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad de Guanajuato. División de Ciencias de la Salud. Departamento de Medicina y Nutrición. Laboratorio de Nutrición Ambiental y Seguridad Alimentaria. Torre de Laboratorio del Departamento de Medicina y Nutrición de la División de Ciencias de la Salud, 4° Piso, Blvd. Puente del Milenio 1001; Fraccionamiento del Predio de San Carlos, León, Guanajuato, México, C.P. 37670.

<sup>2</sup>Observatorio Universitario de Seguridad Alimentaria y Nutricional del Estado de Guanajuato, Blvd. Insurgentes Norte no. 102, col. Chapingo, Cortazar, Guanajuato, México, C.P. 37296.

\*Autor para correspondencia: rmonroy79@gmail.com

Fecha de recepción: 12 de julio de 2014 / Fecha de aceptación: 22 de mayo de 2015

## RESUMEN

El descubrimiento de los antibióticos ha permitido salvar la vida de millones de personas, sin embargo, su efectividad ha ido disminuyendo a la par que los microorganismos van desarrollando resistencia debido a su exposición constante durante su aplicación en el crecimiento de animales de abasto, por lo que se hace necesario contar con técnicas de detección oportuna de su presencia en alimentos. Se realizó un estudio preliminar, de corte transversal, en muestras de hígado de res, cerdo y pollo para establecer la viabilidad de determinar la presencia de

antibióticos mediante la inhibición del crecimiento de una cepa de *Escherichia coli* ATCC25922, utilizando el método de Kirby-Bauer. Se inocularon 15 cajas Petri conteniendo agar Mueller Hinton (cinco para cada muestra de hígado: res, cerdo y pollo), con la cepa *E. Coli* sensible a antibióticos. En cada caja de agar se colocaron porciones de hígado de 5 mm a 10 mm de diámetro, con una distancia de 1 cm a 5 cm entre muestras. Las cajas se incubaron a 35 °C por 24 h y se evaluó la formación de halos de inhibición. Se encontró que sólo una de las 15 muestras de hígado analizadas, correspondiente a hígado de res,

presentó un halo de inhibición mayor a 30 mm. Los resultados obtenidos indican la viabilidad de usar esta técnica para la detección de la presencia de antibióticos en productos cárnicos.

## PALABRAS CLAVE:

Antibióticos, *Escherichia coli*, hígado, efecto inhibitorio.

## ABSTRACT

The discovery of antibiotics has enabled scientist to save millions of lives. However, their effectiveness has been declining at the same time that microorganisms are developing resistance due to the continuous application of

antibiotics during the rearing of farmed animals' production. It is therefore necessary to develop techniques for the early detection of antibiotics presence in food. A cross-sectional and preliminary study was conducted to establish the feasibility to determine the presence of antibiotics in samples of beef, pork and chicken livers by inhibiting the *Escherichia coli* ATCC25922 strain growth employing the Kirby-Bauer method. Fifteen Petri plates (five for each liver sample: beef, pork and poultry) containing the Mueller Hinton agar were inoculated with an antibiotic sensitive *E. coli* ATCC25922 strain. In each agar plate a portion of liver of 5 mm of diameter was placed 1 cm away from each inoculum. The plates were incubated at 35 °C for 24 h and the presence of inhibition halos were evaluated. It was found that only one of the fifteen liver samples analyzed, corresponding to a beef liver, showed an inhibition halo higher than 30 mm. The obtained results indicate that the use of this technique adequate to detect the presence of antibiotics in meat products.

#### KEYWORDS:

Antibiotics, *Escherichia coli*, liver, inhibitory effect.

#### INTRODUCCIÓN

Desde su introducción comercial, en la década de 1940, los antibióticos se han vuelto esenciales en la medicina moderna para tratar enfermedades infecciosas con prontitud y eficacia, disminuyendo los índices de morbimortalidad, salvando millones de vidas. Sin embargo, su uso indiscriminado y sin control adecuado, ha propiciado que algunas cepas bacterianas causantes de infección en el ser humano y los animales

desarrollen resistencia a los antibióticos, poniendo en riesgo la salud de las personas (McManus, 1999; Witte, 1999). Se estima que anualmente, en los Estados Unidos, por lo menos 2 millones de personas se infectan con bacterias resistentes a los antibióticos, y que mueren más de 23 000 personas como resultado directo de esas infecciones, lo que significa una alta tasa de mortalidad (Medina y col., 2008; Centers for Disease, Control and Prevention, 2013). Las infecciones resistentes a los antibióticos pueden ocurrir en cualquier lugar con una alta prevalencia para población general. Sin embargo, las muertes relacionadas con la resistencia a los antibióticos ocurren principalmente en hospitales, clínicas y casas hogar para adultos mayores (Gorbach, 2001; D'Costa, 2011; Balkhair, 2014).

La producción animal constituye la segunda causa en el uso intensivo de antibióticos y con ello la promoción de su resistencia, después de los hospitales (Martínez, 2010). Los antibióticos se emplean como agentes antimicrobianos y promotores de crecimiento, especialmente en cerdos y aves de corral. Se utilizan para el tratamiento de infecciones de forma individual o colectiva, como tratamientos profilácticos y metafilácticos para prevenir la propagación de infecciones de animales enfermos a sanos en una misma unidad de producción, ya que la producción industrial de ganado mantiene a un gran número de animales en espacios comparativamente pequeños y los brotes de infecciones pueden propagarse con facilidad (JECFA, 2000). También se emplean para promover el crecimiento en dosis más bajas que para tratar

enfermedades. Se considera que esta exposición prolongada a bajas dosis de antibióticos genera mayor resistencia que su uso en el tratamiento o la prevención de infecciones (McManus, 1999; Gorbach, 2001). Se estima que existen dos factores principales que generan la resistencia a los antibióticos: los genes transferibles de resistencia y la presión selectiva sobre su uso. Entre los antibióticos más comúnmente utilizados y agregados en el alimento de los animales, destacan: las penicilinas, tetraciclinas, cefalosporinas, fluoroquinolonas, avoparcina y virginiamicina (JECFA, 2000).

Existen estudios que demuestran que el empleo de oxitetraciclina en la alimentación de pollos favorece el desarrollo de microorganismos resistentes a tetraciclina. También se demostró la transferencia de cepas de *Escherichia coli* resistente a la tetraciclina de los pollos al personal de la granja. Otras cepas aisladas que han desarrollado resistencia a antibióticos incluyen a *Shigella* y *Campylobacter* sp. (Witte, 1999; Martínez, 2010). Se ha reportado que un 20 % de las muestras de carne obtenida de supermercados estaba contaminada con salmonella, y 84 % de estos aislamientos fueron resistentes al menos a un antimicrobiano (Witte, 1999). En general, la incidencia de cepas resistentes a fluoroquinolonas se ha incrementado con la introducción del uso terapéutico de estos antibióticos en la alimentación animal (Witte, 1999). Si bien, la resistencia de los microorganismos patógenos a los antibióticos va en aumento por el uso en la alimentación de los animales de abasto,

también se ve influenciada por las malas prácticas clínicas en su uso por parte del ser humano, principalmente por la falta de apego al tratamiento, debido al abandono de la terapia al manifestarse efectos adversos, el costo del medicamento, o el olvido al usarlos, entre otras, que llevan a la creación de cepas resistentes y la transmisión de genes de resistencia (JECFA, 2000).

El estudio de la sensibilidad bacteriana en humanos a los antibióticos es una de las funciones más importantes de los laboratorios de microbiología clínica. El propósito es dirigir la terapéutica una vez que el germen es conocido para su correcto tratamiento, vigilar la aparición de nuevos mecanismos de resistencia y detectar la diseminación epidémica de una cepa, tanto a nivel hospitalario como comunitario (Cantón y col., 2000). Estos métodos pueden clasificarse en métodos cuantitativos y cualitativos. Los métodos cuantitativos son aquellos procedimientos que permiten determinar la concentración inhibitoria mínima y la concentración bactericida mínima. Los métodos cualitativos, permiten establecer si un microorganismo patógeno presenta resistencia a diferentes antibióticos, usualmente sin buscar establecer dosis inhibitorias mínimas; el más frecuentemente usado es el método de Kirby-Bauer, también denominado antibiograma, y que consiste en la difusión en placa de una cepa aislada de un paciente colocando discos que contienen diferentes antibióticos en la superficie, y observando si se presentan halos de inhibición. Esta técnica ha sido aprobada por el National Committee for Clinical Laboratory Standards

(NCCLS) y se desarrolló como un estándar para datos clínicos y de laboratorio (Cantón y col., 2000; Ferraro, 2000).

En México existen dos normas oficiales para la detección de antibióticos, la NOM-004-ZOO-1994 y la NOM-032-ZOO-1996. La norma oficial mexicana NOM-004-ZOO-1994, establece las bases para la detección y el control de residuos tóxicos, incluyendo los antibióticos, en tejidos alimenticios primarios de origen animal y es aplicable a la carne, grasa, hígado y riñón de bovinos, equinos, porcinos y ovinos, provenientes de establecimientos de sacrificio ubicados en el país o de una planta aprobada por la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos, cuando éstos sean de importación. Los métodos de detección descritos en esta norma son cromatográficos. Por otra parte, la norma NOM-032-ZOO-1996, para la determinación de antibióticos en hígado, músculo y riñón de bovinos, ovinos, equinos, porcinos, aves, caprinos y cérvidos por la prueba de torunda y el bioensayo, se basa en el principio del antibiograma y describe un método para hacer estimaciones cuantitativas de resistencia a antibióticos. Esta prueba se encuentra en desuso por ser costosa, debido a la cantidad de material requerido en los bioensayos y el tiempo necesario para la detección. Actualmente se mantiene como referencia la NOM-004-ZOO-1994, que también señala la posibilidad de usar la prueba de torunda y el bioensayo para detección de antibióticos.

El hígado es el órgano encargado del metabolismo de la mayoría de las sustancias tóxicas, en este

órgano se concentran altos niveles de antibióticos y de sus residuos. En México, es frecuente el consumo de hígado por parte de la población, por ser económico y accesible. Además de que en México se tienen hábitos alimenticios que permiten aprovechar todos los tejidos de los animales, incluyendo la masa muscular, las vísceras, la sangre y parte del tejido óseo (Medina, 2008). El objetivo del presente trabajo fue desarrollar una técnica que permita detectar la presencia de antibióticos *in vitro*, en muestras de hígado de res, cerdo y pollo, mediante la modificación del método convencional de sensibilidad por difusión en placa Kirby-Bauer, al reemplazar el uso de sensibilizadores por muestras de tejido de hígado y evaluando la presencia de un halo inhibitorio en el crecimiento de la cepa *Escherichia coli* ATCC25922, caracterizada por su sensibilidad a antibióticos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Obtención de la muestra

Se obtuvieron 5 muestras de hígado de res, 5 muestras de hígado de cerdo y 5 muestras de hígado de pollo provenientes de diferentes carnicerías ubicadas en la ciudad de León, Guanajuato, México, seleccionadas al azar por simple disponibilidad y acceso a ellas. Las muestras adquiridas se introdujeron en hieleras cerradas, las cuales contenían bolsas con gel refrigerante, que fueron previamente congeladas, lo que permitió mantener las muestras a menos de 4 °C durante el transporte al laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Guanajuato, en León, Guanajuato, México, en un periodo no mayor de 3 h, en

horario matutino. Las muestras se refrigeraron hasta su análisis en un plazo no mayor a 24 h.

### Presencia de antibióticos en muestras de hígado

Se utilizó una modificación del método de sensibilidad por difusión en placa Kirby-Bauer. Siguiendo los procedimientos del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), y el procedimiento descrito por Ferraro (2000), se preparó un inóculo con la cepa control de *Escherichia coli* ATCC25922, caracterizada por su alta susceptibilidad antimicrobiana, tomando una asada de 5 µg, la cuál se suspendió en 5 mL de solución salina estéril, ajustando visualmente a una turbidez de 0.5 de Mc Farlan; se procedió a inocular la cepa con hisopo estéril en una caja de Petri, conteniendo medio de Mueller Hinton, ajustado a pH de 7.2 a 7.4 (de acuerdo a instrucciones del fabricante). Utilizando un sacabocado, se tomaron 5 mm de diámetro de los diferentes hígados de res, pollo y cerdo, y se colocaron en cajas con agar Mueller Hinton de 150 mm de

diámetro; se incubaron a 35 °C por 24 h para su posterior medición de los halos de inhibición.

### Análisis estadístico

Los resultados se analizaron con medidas de tendencia central y porcentajes.

## RESULTADOS Y DISCUSION

La cepa de *Escherichia coli* ATCC25922 creció en todas las cajas Petri inoculadas, excepto en una muestra de hígado de res, en la que se presentó un halo de inhibición mayor a 30 mm (Tabla 1), que puede ser un marcador de una probable presencia de algún tipo de antibiótico en la muestra. Esto representa el 20 % de prevalencia de antibióticos en las muestras de hígado de res y el 6.7 % para el total de muestras analizadas. Adicional a esta prueba confirmatoria, se observó la presencia de espacios vacíos, separados de los halos, sin crecimiento, como se muestra en la Figura 1. El resto de las muestras no presentaron halos de inhibición (Figura 1 y 2).

En México, como en cualquier otro país, el empleo indiscrimi-

nado de antibióticos para apoyar el crecimiento de los animales de abasto y con ello la rentabilidad productiva, conlleva riesgos para la salud, al favorecer el crecimiento de organismos resistentes a antibióticos. El principal mecanismo de transferencia de la resistencia a los antibióticos es por uso no terapéutico, que representa una compleja vía de transmisión, ya que los consumidores estarán expuestos a bacterias resistentes a través del consumo de productos de origen animal (Bonnie, 2011; Chang y col., 2015). Estas sustancias pueden concentrarse principalmente en órganos como son el hígado y el riñón. En este estudio piloto, sólo se observó la presencia de un halo de inhibición en una de las 15 muestras analizadas, lo cual podría ser señal de poca presencia de antibióticos. Aunque también podría ser resultado de una limitación en la metodología desarrollada, ya que las muestras de hígado se colocaron en crudo, enjuagadas en solución salina, de forma directa en el medio nutritivo, y no se estableció si existía la presencia de otros microorganismos resistentes a antibióticos, sin embargo, las características visuales de las colonias que crecieron en los medios no sugieren la presencia de otro tipo de microorganismos, diferentes a la cepa de estudio *Escherichia coli* ATCC25922. El halo de inhibición encontrado en una muestra de hígado de res podría estar siendo causado por la presencia de antibióticos u otros residuos con efecto bactericida (Gorbach, 2001; López-Meza y col., 2015).

La concentración de un antibiótico, expresada en una zona de inhibición mediante el método de cultivo en placa, no puede ser calculada con precisión, por lo que

**Tabla 1**

Resultados de la prueba de sensibilidad a antibióticos por el método difusión en placa (Kirby-Bauer) en muestras de hígado de res, cerdo y pollo.

Table 1. Results of the antibiotic sensitivity test using the Kirby-Bauer disc diffusion method in the beef, pork and poultry liver samples.

Tipo de muestra	Con halo de inhibición N	Sin halo de inhibición N	Total	Muestras con antibióticos
Hígado de res	1	4	5	20 %
Hígado de cerdo	0	5	5	0 %
Hígado de pollo	0	5	5	0 %
<b>Total</b>	<b>1</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>6.7 %</b>

### Figura 1

Muestra de hígado de res con halo de inhibición.  
Figure 1. Sample of liver beef with inhibition halo.



### Figura 2

Ejemplo de muestra de pollo en placa sin halos de inhibición.  
Figure 2. Example of poultry livers sample without inhibition halos.



requiere ser confirmada y cuantificada con un posterior análisis químico (Medina y col., 2008); por lo que será necesario mejorar y adaptar este método de análisis propuesto, de manera que se pueda observar inhibición bacteriana aún en muestras contaminadas. Esto pudiera requerir algún método de esterilización de los productos por técnicas que no utilicen autoclave, para evitar la destrucción del antibiótico.

La presencia de antibióticos, en productos de origen animal, incrementa el riesgo de desarrollar microorganismos resistentes a antibióticos, particularmente en México, porque no existen suficientes estudios dirigidos hacia la detección de antibióticos en alimentos. Sin embargo, la determinación de la sensibilidad a antimicrobianos no implica sólo realizar un conjunto de técnicas y medir los resultados. Es necesario saber interpretar los mismos y darles el significado que realmente tienen (Cantón y col., 2000).

Los resultados preliminares obtenidos en el presente estudio señalan la importancia de formular estrategias para evaluar sistemáticamente la presencia de antibióticos en alimentos, como uno de los factores determinantes de prevención en el desarrollo de cepas microbianas con resistencia a antibióticos, así como para mantener y actualizar la regulación para el uso de estas sustancias en animales (CAC/RCP, 2005). Por ello, es relevante contar con herramientas que permitan establecer la presencia de antibióticos en alimentos, lo cual en el presente estudio se realiza a través de un modelo *in*

*vitro*, del cual ya se cuenta con estudios piloto.

## CONCLUSIONES

La técnica desarrollada en el presente estudio demostró ser adecuada para detectar la presencia de antibiótico en muestras de hígado, mediante la inhibición *in*

*vitro* del crecimiento de la cepa de *Escherichia coli* ATCC25922, sensible a antibióticos. Es necesario mejorar la técnica desarrollada para establecer su nivel de sensibilidad y descartar la presencia de falsos positivos debido a la contaminación de las muestras por cepas resistentes a antibióticos.■

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Alejandro Macias, jefe del Laboratorio de Microbiología Clínica del Departamento de Medicina y Nutrición de la Universidad de Guanajuato en su momento, por sus aportaciones y críticas, así como por permitir realizar el estudio en dicho laboratorio.

### REFERENCIAS

- Balkhair, A., Al-Farsi, Y. M., Al-Muharrmi, Z., Al-Rashdi, R., Al-Jabri, M., Neilson, F., Al-Adawi, S. S., El-Beeli, M., and Al-Adawi, S. (2014). Epidemiology of Multi-Drug Resistant Organisms in a Teaching Hospital in Oman: A One-Year Hospital-Based Study. *The Scientific World Journal*. 14: 1-6.
- Bonnie, M. and Stuart, B. (2011). Food animals and antimicrobials: impacts on human health. *Clinical Microbiology Reviews*. 4: 718-733.
- Cantón, R., García, J. E., Gómez, L., Martínez, L., Rodríguez, C., Vila, J. y García, J. A. (2000). Procedimientos en microbiología clínica. *Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos en recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. En J. J. Picazo (Ed.). [En línea]. Disponible en: <http://www.seimc.org>. Fecha de consulta: 20 de junio de 2014.
- CAC/RCP, Código de Prácticas para Reducir al Mínimo y Contener la Resistencia a los Antimicrobianos (2005). Código de prácticas para reducir mínimo y contener la resistencia a los antimicrobianos. [En línea]. Disponible en: [http://www.codexalimentarius.net/download/standards/10213/CXP\\_061e.pdf](http://www.codexalimentarius.net/download/standards/10213/CXP_061e.pdf). Fecha de consulta: 15 de marzo de 2014.
- Centers for Disease, Control and Prevention. (2013). *Antibiotic Resistance Trends*. [En línea]. Disponible en: <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>. Fecha de consulta: 30 de septiembre de 2014.
- Chang, Q., Wang, W., Regev-Yochay, G., Lipsitch, M., and Hanage, W. (2015). Antibiotics in agriculture and the risk to human health: how worried should we be? *Evolutionary Applications*. 8: 240-247.
- D'Costa, V. M., King, C. E., Kalan, L., Morar, M., Sung, W. W., Schwarz, C., Froese, D., Zazula, G., Calmels, F., Debruyne, R., Golding, G. B., Poinar, H. N., and Wright, G. D. (2011). Antibiotic resistance is ancient. *Nature*. 477: 457-461.
- Ferraro, M. J. (2000). National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, 36.
- Gorbach, S. (2001). Antimicrobial use in animal feed- Time to stop. New England. *Journal of Medicine*. 345: 1202-1203.
- JECFA Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (2000). Evaluation of certain veterinary drug residues in food, WHO. *Technical Report Series*. 893(1): 21-54.
- López-Meza, J. E., Ochoa-Zarzosa, A., Barboza-Corona, J. E., and Bideshi, D. (2015). Antimicrobial Peptides: Current and Potential Applications in Biomedical Therapies. *BioMed Research International*. [En línea]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/367243>. Fecha de consulta: 29 de abril de 2015.
- Martínez, A., Cruz, M., Veranes, O., Carballo, M. E., Salgado, I. Olivares, S., Lázaro, L., y Rodríguez, D. (2010). Resistencia a antibióticos y a metales pesados en bacterias aisladas del río Almedares. *Revista CENIC de Ciencias Biológicas*. 41: 1-10.
- McManus, P. S. (1999). Uso de antibióticos en el control de enfermedades de las plantas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiológicas*. 19: 199-218.
- Medina, M. S., Gonzalez, D. G., y Ramírez, A. (2008). Detección de residuos antimicrobianos en tejidos comestibles y tetraciclina en hueso de cerdo. *Revista de Salud Animal*. 30(2): 110-115.
- NOM-004-ZOO-1994 (1994). Norma Oficial Mexicana. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos, Control de residuos tóxicos en carne, grasa, hígado y riñón de bovinos, equinos, porcinos y ovinos. [En línea]. Disponible en: [http://www2.sag.gob.cl/Pecuaria/establecimientos\\_habilitados\\_exportar/normativa/mexico/NOM-004-ZOO-1994\\_control\\_residuos\\_carne\\_otros.pdf](http://www2.sag.gob.cl/Pecuaria/establecimientos_habilitados_exportar/normativa/mexico/NOM-004-ZOO-1994_control_residuos_carne_otros.pdf). Fecha de consulta: 20 de julio de 2014.
- NOM-032-ZOO-1996 (1996). Norma Oficial Mexicana. Determinación de antibióticos en hígado, músculo y riñón de bovinos, ovinos, equinos, porcinos, aves, caprinos y cérvidos por la prueba de torunda y por bioensayo. [En línea]. Disponible en: <http://legismex.mty.itesm.mx/normas/zoo/zoo032.pdf>. Fecha de consulta: 21 de noviembre de 2014.
- Witte, W. (1999). Uso de antibióticos en la producción animal y desarrollo de la resistencia en las infecciones humanas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiológicas*. 19: 83-86.