

RESIDUOS DE PENICILINA EN CARNE Y VISCERAS DE POLLO

Por Antonio Calles Enríquez

INDICE

CAPITULO I. INTRODUCCION.-CAPITULO II. ELECCION DE METODOS PARA EL ENSAYO CUANTITATIVO DE RESIDUOS DE PENICILINA EN TEJIDOS ANIMALES.-CAPITULO III. MATERIAL Y METODOS GENERALES.-CAPITULO IV. RESIDUOS DE PENICILINA G BENZATINA EN TEJIDOS DE POLLOS ALIMENTADOS CON PIENSOS ADICIONADOS DE ESTE ANTIBIOTICO.-CAPITULO V. RESIDUOS DE PENICILINA G PROCAINA EN TEJIDOS DE POLLOS INOCULADOS CON DOSIS TERAPEUTICAS DE ESTE ANTIBIOTICO.-CAPITULO VI. ESTABILIDAD DE LOS RESIDUOS DE PENICILINA G PROCAINA EN MUSCULO DE POLLO.-CAPITULO VII. INFLUENCIA DEL pH Y DEL ACIDO LACTICO DEL MUSCULO EN LA PRODUCCION DE HALOS DE INHIBICION NO ESPECIFICA DEL CRECIMIENTO DE *SARCINA LUTEA*.-CONCLUSIONES.-BIBLIOGRAFIA.

CAPITULO I

INTRODUCCION

UTILIZACION DE LA PENICILINA AÑADIDA A LOS PIENSOS Y EN TERAPEUTICA VETERINARIA

La penicilina fue descubierta por FLEMING (1929) y redescubierta durante la II Guerra Mundial por CHAIN *et al.* (1940) y por ABRAHAM *et al.* (1941). Como consecuencia del extraordinario éxito terapéutico de éste y otros antibióticos encontrados más tarde en medicina humana y veterinaria, pronto siguió el interés acerca de la posibilidad de utilizar estos agentes añadidos a los piensos como estimulantes del crecimiento animal y en la prevención colectiva de enfermedades animales.

En 1946, MOORE y col. dieron cuenta de que la estreptomycin y la sulfasuxidina, independientemente o en combinación, estimulaban el crecimiento en pollos. Sin embargo, no fue hasta 1949, en que STOKSTAD y col. descubrieron el efecto promotor del crecimiento del micelio extraído procedente de la fabricación de la clortetraciclina, cuando fueron reconocidas las implicaciones prácticas de tales observaciones. Poco después, varios investigadores demostraron que pequeñas cantidades de antibióticos mejoraban la ganancia de peso en aves (STOKSTAD y JUKES, 1950; WHITEHILL *et al.*, 1950; COUCH y ATKINSON, 1950) y en cerdos (JUKES *et al.*, 1950). Durante los últimos 25 años se han utilizado profusamente estas sustancias añadidas a los piensos con fines de mejorar el crecimiento y aumentar la eficacia de conversión de los piensos. Datos de la F. D. A. (Federal Register, 1973) indican que en 1960 la producción anual de antibióticos en los Estados Unidos era de 4,16 millones de libras, de las que 2,96 millones se utilizaron para fines terapéuticos en medicina humana y veterinaria, y 1,20 millones como aditivos a los piensos para animales; la producción se dobló en 1965; en 1970, los antibióticos utilizados en terapéutica humana y animal alcanzaban la cifra de 9,6 millones de libras y los destinados a los piensos suponían 7,3 millones. Según el informe del «Joint Committee on the Use of Antibiotics in Animal Husbandry and Veterinary Medicine» (Swann Report) (1971), se emplearon en Gran Bretaña durante 1967 iguales cantidades de antibióticos añadidos a los piensos que en terapéutica veterinaria, suponiendo aproximadamente un tercio de los utilizados en medicina humana.

Los antibióticos más utilizados como promotores del crecimiento son la penicilina, la clortetraciclina y la oxitetraciclina (OMS, 1963). Otros antibióticos menos utilizados son la bacitracina, eritromicina, oleandomicina, espiramicina, estreptomycin y tilosina. Las especies en las que el uso de los antibióticos con estos fines es más frecuente son las aves y los cerdos, si bien puede decirse que casi todas las especies se benefician de la inclusión de estas sustancias en los piensos. Es más corriente, sin embargo, utilizar los antibióticos en piensos para animales jóvenes y algunos autores recomiendan que su uso se limite a la fase inicial del crecimiento.

La penicilina se emplea como estimulante del crecimiento añadida a los piensos, bien sola o en unión de otros antibióticos o antimicrobianos. Cuando se emplea sola, los niveles varían entre 2 y 50 ppm. A veces, se utiliza a niveles más altos (hasta 200 ppm), siendo difícil en estos casos determinar si sus efectos beneficiosos se deben a un estímulo en el crecimiento o a una acción preventiva de enfermedades. Dosis mayores (de hasta 500 ppm) se añaden a los piensos para tratar colectivamente ciertas enfermedades de los animales. Existen diversas publicaciones referidas a los niveles de antibióticos cuya adición a los piensos está autorizada en los distintos países: Estados Unidos (Feed Additive Compendium, 1972), Canadá (Compendium of Medica-

ting Ingredient Brochure, 1971), Francia (Catalogue Français des Additifs Autorisés en Alimentation Animale, 1970). En España las normas sobre antibióticos añadidos a los piensos con fines nutricionales están contenidas en la Orden del Ministerio de Agricultura de 11 de noviembre de 1958 (B. O. del Estado del 1 de diciembre).

Todos los antibióticos que se utilizan como estimulantes del desarrollo tienen en común su efecto antimicrobiano. Se ha intentado explicar el mecanismo de acción de estas sustancias y se han propuesto una serie de teorías. WALLACE (1970) ha sistematizado estas teorías en un trabajo de revisión. En primer lugar, se supone un efecto metabólico de los antibióticos, aunque este efecto parece ejercerse más sobre el metabolismo de las poblaciones microbianas del tubo digestivo que sobre el de los propios tejidos del hospedador. En segundo lugar, se propone la teoría del ahorro de nutrientes, efecto que podría explicarse por diversos mecanismos: estímulo por parte de los antibióticos del crecimiento de los microorganismos que favorecen la síntesis de algunos nutrientes, por la supresión o inhibición de los microorganismos que compiten con el hospedador por determinados nutrientes críticos y por la mejor absorción de sustancias, resultado este último de una pared intestinal más fina y sana. Y, finalmente, en tercer lugar, se defiende la teoría que parece más comprobada: el efecto de los antibióticos de controlar o prevenir las enfermedades subclínicas y las inespecíficas, mejorando así el ritmo de crecimiento de los animales.

La penicilina, como otros antibióticos y quimioterápicos, se utiliza añadida a los piensos a niveles de hasta 200 ppm en la prevención de diversas enfermedades y en períodos de stress. Según el informe del «Joint Committee on the Use of Antibiotics in Animal Husbandry and Veterinary Medicine» (1971) no existe una base fisiológica ni bacteriológica firme que justifique la utilización de los antibióticos para los fines mencionados.

No está exenta tampoco de críticas la utilización de los antibióticos añadidos a los piensos a niveles terapéuticos (100-500 ppm en el caso de la penicilina) en la medicación colectiva de ciertas enfermedades y procesos. Muchos autores (MUNRO y MORRISON, 1970; BARNUM, 1973) son de la opinión de que la medicación colectiva por el pienso o el agua de bebida debe practicarse únicamente durante períodos limitados y sólo en determinadas circunstancias. Es evidente que se está haciendo un uso indiscriminado y abusivo de este tipo de medicación y que este proceder no sólo no representa beneficios, sino que es la causa de serios problemas.

La penicilina se emplea también, por supuesto, en el tratamiento de enfermedades animales por vía parenteral, bien sola o en unión de otros antibióticos. Se utilizan a este fin distintas penicilinas y en excipientes también diferentes. Las dosis utilizadas por vía intramuscular varían para mamíferos entre las 6.000 y las 20.000 UI/Kg de peso vivo. En aves, estas dosis

pueden llegar a 30-40.000. La inoculación por vía intramamaria en el tratamiento de las mastitis determina la presencia en la leche de residuos considerables de este antibiótico.

UTILIZACION DE LA PENICILINA EN LA CONSERVACION DE ALIMENTOS

Antes aún de que surgiera el interés en la utilización de los antibióticos añadidos a los piensos como estimulantes del crecimiento animal y en la prevención colectiva de enfermedades, se llevaron a cabo los primeros experimentos para estudiar el valor de estas sustancias en la conservación de alimentos.

Los ensayos de TARR (1944) de posible utilización de la penicilina en la conservación del pescado, fueron los primeros intentos de aplicación de un antibiótico a la conservación de alimentos. CURRAN y EVANS (1945) observaron una reducción considerable en el número de esporos viables de tres especies del género *Bacillus* en muestras de leche con cinco unidades Oxford de penicilina por ml. En publicaciones posteriores (CURRAN y EVANS, 1946, 1946a), estos autores señalaron que ni la penicilina ni la estreptomycinina habían mostrado un valor práctico como agentes conservadores de alimentos, ya que su actividad frente a los esporos bacterianos era muy limitada. De modo semejante, TARR y DEAS (1948) dieron cuenta de que tanto la penicilina como la estreptomycinina tenían escaso valor como conservadores del pescado fresco. Los antibióticos que se han mostrado más eficaces en la conservación de alimentos, bien solos o en unión de otro agente físico o químico, son, quizás, la clortetraciclina, la oxitetraciclina, el cloranfenicol, la nisin, la tilosina y la subtilina. La clortetraciclina y la oxitetraciclina se han utilizado frecuentemente para retrasar la alteración del pescado y de la carne de aves por inmersión del alimento en un baño de agua con el antibiótico. AYRES (1973) ha revisado el papel de los antibióticos en la conservación de alimentos. Entre nosotros, HERNÁNDEZ JIMÉNEZ (1968) revisó también este tema en un discurso de recepción en la Real Academia de Medicina de Valencia.

RIESGOS Y PROBLEMAS DERIVADOS DEL USO DE PENICILINA EN RELACION CON LA SANIDAD ANIMAL Y LA SALUD PUBLICA: REACCIONES ALERGICAS Y RESISTENCIAS BACTERIANAS

Paralelamente a la progresiva utilización de los antibióticos en terapéutica y como estimulantes del crecimiento animal, fueron surgiendo una serie de riesgos y problemas, que con el paso del tiempo parecen agravarse. La preo-

cupación por estos inconvenientes ha motivado un número considerable de publicaciones, entre las que cabe destacar el informe del «Joint Committee on the Use of Antibiotics in Animal Husbandry and Veterinary Medicine» (Swann Report) (1971), publicado por el Gobierno de Gran Bretaña, ya mencionado anteriormente, y el informe de la «F. D. A. Task Force on the Use of Antibiotics in Animal Feeds» (1972), publicado por la F. D. A. americana. Junto a estas opiniones que proceden, fundamentalmente, de organismos encargados de velar por la sanidad animal y la salud pública, no faltan otras que enfocan el problema desde la perspectiva de los beneficios económicos que reporta la utilización de los antibióticos, concluyendo, además, que los supuestos riesgos y problemas derivados del uso de los antibióticos no han sido demostrados científicamente. En este sentido, cabe citar un artículo de revisión de JUKES (1972) sobre el significado sanitario de la inclusión de antibióticos en los piensos para animales, en el que critica el informe de la F. D. A. Task Force antes citado.

La controversia sobre los riesgos derivados de la utilización de antibióticos se refiere, fundamentalmente, a su uso continuado a niveles bajos subterapéuticos añadidos a los piensos como promotores del crecimiento o en la prevención de enfermedades. En este sentido, el Swann Report (1971) recomienda que los antibióticos sean divididos en dos grupos: antibióticos para utilización añadidos a los piensos y antibióticos utilizados en terapéutica animal y humana, y que únicamente sea permitida la adición a los piensos de aquellos antibióticos que no se utilicen en terapéutica. Por su parte, el informe de la F. D. A. Task Force (1972) aconseja también una serie de restricciones y prohibiciones.

La administración de antibióticos a los animales productores de alimentos puede llevar consigo riesgos derivados de la presencia de residuos de estas sustancias en los alimentos (toxicidad directa, reacciones alérgicas, desarrollo de cepas resistentes en el intestino humano), y otros problemas al ser estos alimentos vectores de cepas de bacterias resistentes a uno o varios antibióticos.

Por lo que respecta a la penicilina, cuyos posibles efectos tóxicos carecen de significado (BOISSIER y DUMONT, 1961), los riesgos alérgicos son quizás los más llamativos, si bien tiene mucha mayor importancia desde el punto de vista de la sanidad animal y de la salud pública el desarrollo de resistencia a este antibiótico por parte de ciertas bacterias patógenas. En qué medida contribuido la administración de penicilina con fines diversos a los animales domésticos, y su presencia consiguiente en forma de residuos en los alimentos de origen animal, a crear los riesgos y problemas a que antes hemos aludido es un aspecto poco conocido al que vamos a referirnos a continuación.

La primera pregunta que surge es si los residuos de penicilina presentes en los alimentos de origen animal pueden al ser estos consumidos, sensibilizar

al consumidor frente a este antibiótico. La evidencia con que se cuenta es realmente insuficiente para justificar una contestación afirmativa. No habiéndose podido demostrar la sensibilización experimentalmente en animales de laboratorio, cuanto se sabe procede de observaciones clínicas: reacciones alérgicas en personas que nunca fueron tratadas con penicilina y que, por tanto, se sospecha que la sensibilización fue producida por la ingestión de alimentos con residuos. Por el contrario, es bien conocido que por vía cutánea dosis pequeñas de penicilina pueden comportarse como sensibilizantes (dermatosis por contacto). Es también frecuente la sensibilización a la penicilina por inhalación (SIEGEL, 1959; IDSOE *et al.*, (1968). POTOSTKI *et al.* (1962) encontraron que el 51,2 % de las personas que trabajaban en una fábrica de penicilina estaban sensibilizadas a este antibiótico.

La segunda pregunta en relación con los residuos de penicilina en alimentos y la alergia a este antibiótico es si estos residuos pueden desencadenar reacciones alérgicas en personas previamente sensibilizadas. En este caso, los datos con que se cuenta permiten una contestación afirmativa, aun cuando no se conocen las dosis precisas. GOENELLE y SZAKVARY (1966) llevaron a cabo una encuesta entre médicos franceses para conocer su opinión acerca de si los residuos de antibióticos presentes en los alimentos suponían algún riesgo de alergia para el consumidor. Un 93% de los 248 médicos consultados opinó en sentido positivo. Los encuestados señalaron los casos concretos por ellos observados y los alimentos implicados: leche, carne de aves, huevos y carne de mamíferos. Sin embargo, en la bibliografía publicada existen pocos casos comprobados de alergia producida por el consumo de alimentos con residuos de antibióticos. En Inglaterra, VICKERS *et al.* (1958) dan cuenta de dos casos típicos: el de una mujer que trabajaba en una granja y que consumía un litro diario de leche fresca en la que se puso de manifiesto la presencia de 4 unidades de penicilina por ml, y el de un hombre también granjero, en el que las manifestaciones alérgicas aparecieron después del consumo de leche procedente de una vaca que había sido tratada con penicilina. ERSKINE (1958) cita el caso de un oficial de marina que había presentado dermatitis después de una inyección de penicilina y que cuatro años después de este episodio había sufrido diversas manifestaciones alérgicas a consecuencia del consumo de leche. En una ocasión, se comprobó que la leche y el queso que consumía este paciente contenían 0,06 unidades de penicilina por ml y gr, respectivamente. En los Estados Unidos, ZIMMERMAN (1959) publicó cuatro observaciones cuyas características comunes eran las siguientes: las cuatro personas habían presentado anteriormente alguna reacción alérgica a la penicilina y esta reacción se repetía cuando consumían leche o productos lácteos: los síntomas desaparecían rápidamente después de la inyección de penicilinas. Por otra parte, los pacientes podían ingerir leche y productos lácteos sin que apareciese ningún tipo de reacción alérgica, con tal de que antes hubieran sido inoculados con

penicilinas. BORRIE y BARRET (1961) citan el caso de un sujeto sensibilizado a la penicilina; la dermatosis que presentaba desaparecía únicamente al suprimir en la dieta los productos lácteos o al añadir 0,75 ml de penicilinas por cada medio litro de leche. MUNCH - PETERSEN (1962) cita un choque alérgico grave producido por el consumo de leche con residuos de antibióticos.

De cuanto hemos indicado se deduce que la leche y los productos lácteos son los alimentos que parecen ofrecer un mayor riesgo de ocasionar fenómenos alérgicos cuando contienen residuos de penicilina.

Se desconocen, sin embargo, las dosis mínimas de este antibiótico necesarias, por vía oral, para desencadenar reacciones alérgicas en personas previamente sensibilizadas. En general, los accidentes alérgicos se deben a dosis elevadas administradas con fines terapéuticos y no a residuos ingeridos con los alimentos. SIEGEL (1959) señala que personas normales sensibilizadas localmente en un punto de la piel de forma pasiva mediante sueros procedentes de personas hipersensibles a la penicilina, conteniendo las penicilino - reagentes, presentaron reacciones locales positivas después de la administración por vía oral de una dosis de 40 unidades de penicilina G cristalina disuelta en agua. Teniendo en cuenta que con la mayoría de los alérgenos la dosis de antígeno necesaria para producir una reacción local positiva en una persona receptora normal es de 100 a 1.000 veces mayor que la necesaria para inducir una reacción clínica en el paciente alérgico que proporcionó el suero sensibilizante, y aún contando con que en el caso de la penicilina esta relación puede ser de 10.000:1, el autor cuyo trabajo comentamos estima que incluso aplicando la relación más pequeña (100:1), la administración oral de 0,4 unidades de penicilina sería suficiente para provocar reacciones alérgicas en pacientes con un alto grado de sensibilización a la penicilina. Teniendo presente la escasa cuantía de esta dosis, SIEGEL concluye que los residuos muchas veces presentes en la leche son suficientes para provocar síntomas clínicos en individuos muy sensibles a este antibiótico.

Otro aspecto no bien conocido de la alergia a la penicilina es la naturaleza del alérgeno. Se cree que el verdadero agente sensibilizante no es la propia molécula de la penicilina, sino un metabolito o un derivado (WECK y EISEN, 1960) con capacidad de combinarse con una proteína. Tal es el caso del ácido penicilénico, considerado como uno de los determinantes antigénicos más importantes de este tipo de alergia (IDSOE *et al.* 1968). Este hecho podría tener importancia, en el sentido de que la ausencia en un alimento de origen animal de penicilina microbiológicamente detectable no excluye que no pudieran estar presentes en el mismo productos de degradación del antibiótico con acción sensibilizante.

El problema más importante que ha surgido como consecuencia de la utilización masiva de antibióticos en los piensos para animales y en terapéutica, es el desarrollo de resistencia por parte de ciertas bacterias, fenómeno

que tiene lugar en el organismo animal por contacto continuado de los microorganismos con el antibiótico, ya que la posibilidad de la emergencia de cepas resistentes en el intestino humano por presencia de residuos de antibióticos procedentes de los alimentos ingeridos parece tener sólo una importancia teórica (Swann Report, 1971). Los alimentos de origen animal serían el vehículo fundamental por el que llegan al hombre estas cepas antibiótico - resistentes. Por lo que respecta a las bacterias Gram negativas, más importancia que el propio hecho de la adquisición de resistencia por contacto continuado en el intestino con el antibiótico procedente del pienso, se ha concedido en los últimos años a la transferencia de esta resistencia de unas bacterias a otras.

Es unánime la creencia de que están emergiendo un gran número de cepas de bacterias antibiótico - resistentes, si bien la evaluación cuantitativa de este fenómeno es, naturalmente, difícil. Se cree también de modo general que el tratamiento con antibióticos de las enfermedades animales y la inclusión de estas sustancias en los piensos, ha contribuido de modo fundamental a la aparición de bacterias antibiótico - resistentes, aunque, una vez más, sea difícil valorar este hecho cuantitativamente. El informe de la F. D. A. Task Force (1972) concluye que «el uso de antibióticos en los piensos especialmente a niveles subterapéuticos favorece la selección y el desarrollo de bacterias portadoras de factores R con resistencia a uno o a varios antibióticos». Pruebas realizadas «in vitro» con bacterias aisladas de procesos entéricos en animales domésticos indican que un gran número de estas cepas es resistente a los antibióticos (Swann Report, 1971). El informe de la F. D. A. Task Force (1972) señala a este respecto que «los animales que han recibido antibióticos en los piensos a niveles subterapéuticos y/o terapéuticos pueden ser reservorios de bacterias patógenas y no patógenas resistentes a los antibióticos, y que estas bacterias patógenas pueden determinar infecciones humanas».

Señala también el informe que comentamos que «ha aumentado el número de bacterias patógenas y no patógenas presentes en los animales con factores R de resistencia a varios antibióticos y que este aumento está relacionado con la utilización de los antibióticos».

Las cepas de bacterias antibiótico - resistentes serían vehiculadas al hombre, principalmente vía alimentos, en cuyo intestino podrían determinar alteraciones si se tratase de bacterias patógenas (salmonelas, *E. coli* enteropatógeno), pero aun siendo especies saprofitas podrían transferir su resistencia a bacterias patógenas presentes en el intestino humano (salmonelas, *E. coli* patógeno, shigelas). El informe de la F. D. A. Task Force (1972) concluye también que «se han encontrado en la carne y en los productos cárnicos microorganismos resistentes a los agentes antibacterianos» y que «ha aumentado en el hombre el número de bacterias antibiótico - resistentes intestinales. La posibilidad de transferencia de la resistencia a los antibióticos ha determinado que sean los miembros de la familia *Enterobacteriaceas*, entre los que se

da, las bacterias que presentan una mayor importancia en este sentido. La transferencia de resistencia a los antibióticos de unas bacterias a otras ha sido bien demostrada experimentalmente «in vitro», principalmente con salmonelas y con *E. coli*, y también, aunque de modo menos concluyente, «in vivo». La evidencia de la transferencia de resistencia «in vivo» es quizás más epidemiológica que experimental. En qué cuantía o con qué frecuencia tiene lugar este fenómeno de transferencia en condiciones naturales en el intestino animal y humano es un extremo aún no conocido. Por lo que respecta al intestino humano, tendría en este sentido máxima importancia la posibilidad de establecerse en él las cepas de procedencia animal (WILLIAMS SMITH, 1969).

Las pruebas «in vitro» se han realizado, fundamentalmente, con salmonelas, con *E. coli* patógeno y no patógeno y con shigelas, y la evidencia con que se cuenta de la transferencia de resistencia «in vivo» procede también de estos gérmenes. Por lo que respecta a las salmonelas, se teme que por el mecanismo de transferencia de resistencia, los agentes de la fiebre tifoidea y paratifoidea puedan hacerse resistentes al antibiótico de elección utilizado en el tratamiento de estas enfermedades, el cloranfenicol.

La transferencia de resistencia a los antibióticos entre *Enterobacteriaceas* fue primeramente estudiada en Japón (AKIBA *et al.*, 1960; WATANABE y FUKASAWA, 1961; WATANABE, 1963). La demostración «in vitro» de la transferencia de resistencia de *E. coli* germen saprofito y obispo a *Shigella*, género que comprende especies patógenas, estimuló la investigación en este campo. Son clásicos también los trabajos de ANDERSON en Inglaterra realizados durante los años 1964 y 1965 con *S. typhimurium* tipo fágico 29 (ANDERSON, 1968).

Además de la resistencia transferible en las *Enterobacteriaceas*, a que nos hemos referido, existe otro tipo de resistencia en bacterias Gram positivas, particularmente importante en los estafilococos. Pero la causa fundamental de esta resistencia no ha sido la inclusión de antibióticos en los piensos, sino la utilización terapéutica indiscriminada de estas sustancias: penicilina intramaria en el caso de los estafilococos.

Por lo que respecta a la penicilina, su participación en el fenómeno global de la resistencia a los antibióticos no es bien conocida. Como las penicilinas que más se utilizan añadidas a los piensos o por vía parenteral en el tratamiento de enfermedades animales (penicilina G benzatina y penicilina G procaína), no tienen efecto a dosis normales sobre los gérmenes Gram negativos, en principio no parece que tenga importancia práctica el desarrollo de resistencia transferible por parte de estos gérmenes. El uso de la ampicilina ha cambiado, sin embargo, el panorama, puesto que siendo los gérmenes Gram negativos sensibles a este antibiótico, algunos autores (ANDERSON y DATTA, 1965; ANDERSON, 1967; ANDERSON, 1968) achacan las resistencias observadas al mismo a un contacto previo en los animales de las cepas de enterobacteriaceas patógenas implicadas con diversas penicilinas, por existir resistencia cruzada entre la ampicilina y estas penicilinas.

Más importancia práctica tiene el desarrollo de resistencia a la penicilina por parte de ciertas bacterias Gram positivas, principalmente por los estafilococos. Se ha demostrado que los estafilococos responsables de muchos casos de mamitis en el ganado vacuno y de artritis en aves han desarrollado resistencia a la penicilina. El papel primordial de los estreptococos como agentes de mamitis en el ganado vacuno ha pasado a los estafilococos, ya que siendo los primeros sensibles a la penicilina y no habiendo desarrollado resistencia han sido desplazados por los segundos que se han hecho resistentes como consecuencia de la utilización de la penicilina de modo masivo e indiscriminado en el tratamiento local de las mamitis.

TECNICAS DE DETERMINACION DE RESIDUOS DE ANTIBIOTICOS EN TEJIDOS ANIMALES

Las técnicas de determinación de residuos de antibióticos en tejidos animales son diversas en cuanto a los principios en que se fundan y en cuanto a la sensibilidad que con ellas se obtiene. Teniendo en cuenta este último criterio, las técnicas pueden dividirse en dos grandes grupos: las que tienen una sensibilidad escasa, pero que son rápidas y fáciles de realizar, y las que tienen una mayor sensibilidad, pero que presentan mayores dificultades en su realización. Las primeras son cualitativas y se utilizan corrientemente en los mataderos modernos como técnicas de rutina. Las segundas son cuantitativas y, por ello, son más adecuadas para trabajos de investigación.

A) *Técnicas cualitativas de matadero.* Permiten únicamente determinar la ausencia o presencia en los tejidos o en la orina de sustancias inhibidoras del crecimiento bacteriano y tienen, por tanto, un fundamento biológico.

Unas se basan en que las sustancias inhibidoras presentes en la muestra ensayada pueden impedir el crecimiento de un germen prueba en un medio de cultivo sólido que contiene un indicador o un colorante, cuyo color varía por cambios en el pH o por reducción, debidos en ambos casos al crecimiento del microorganismo. Del cambio de color del medio se puede deducir indirectamente la presencia o ausencia de sustancias inhibidoras en la muestra. VAN SCHOTHORST y PEELEN-KNOLL (1970) utilizando como germen prueba *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* dan un límite de detectabilidad para la penicilina con esta técnica de 0,02-0,08 UI/ml de orina. El tiempo necesario para hacer la lectura de resultados es sólo de 2-3 horas.

Las técnicas biológicas de difusión en agar son muy utilizadas en el análisis sistemático de residuos de antibióticos en el matadero. Se fundan en depositar la muestra a ensayar en una placa de agar sembrada con un germen muy sensible al antibiótico. Si existen antibióticos en la muestra estos difunden en el agua e inhiben el crecimiento del germen, produciéndose así un halo

sin crecimiento, cuyo diámetro es función de la cantidad de antibiótico presente. En la determinación de residuos de penicilina, el germen más utilizado, en razón de su mayor sensibilidad, es *Sarcina lutea* Pero, como en estas pruebas de matadero se buscan todos los antibióticos que puedan estar presentes en la muestra, e incluso otras sustancias inhibidoras, el germen de ensayo puede ser *S. lutea* u otro distinto.

Existen diversas modalidades dentro de las técnicas de difusión. A veces, se utilizan pocillos horadados en el agar donde se colocan las muestras a ensayar; otras, discos de papel de filtro impregnados con la muestra y, finalmente, en otros casos, los propios tejidos se depositan en la superficie del agar. La sensibilidad de estas técnicas varía, por supuesto, según se utilicen pocillos, discos de papel o los propios tejidos. Pero, además, dentro de cada una de estas tres modalidades, la sensibilidad es distinta según una serie de factores como son germen de ensayo, cantidad de agar base y agar siembra, etc. VAN SCHOTHORST y PEELEN-KNOLL (1970) utilizando como germen de ensayo *Sarcina lutea* ATCC 9341 y discos de papel impregnados en tejido renal dan un límite de detectabilidad de 0,04-0,07 UI/ml de fluido renal.

B) *Técnicas cuantitativas.* Como ya hemos indicado anteriormente, las técnicas cuantitativas de determinación de antibióticos en tejidos animales permiten no solo establecer la presencia o ausencia de residuos, sino también medirlos cuantitativamente. Su sensibilidad es mayor que la de las técnicas cualitativas de matadero, pero como contrapartida su realización es más complicada. Las más utilizadas tienen también un fundamento biológico. Últimamente, se han utilizado una serie de técnicas físico-químicas (cromatografía, electroforesis, etc.), principalmente en la separación e identificación de antibióticos en disoluciones puras y menos en carne y vísceras animales. Estas técnicas pueden hacerse cuantitativas combinándolas con el método biológico (bioautografía).

Dentro de las técnicas biológicas, los métodos de diluciones sucesivas y turbidimétrico se utilizan mucho menos que los métodos de difusión. El método de valoración de antibióticos en fluidos y tejidos orgánicos por diluciones sucesivas se basa en comparar los resultados obtenidos en una serie, en la que ponen las diluciones apropiadas del antibiótico ensayado, con los de otra serie problema, en la que se añaden las diluciones de la muestra a valorar. Teniendo en cuenta el punto final de la inhibición del crecimiento del microorganismo prueba en ambas series, lo que se aprecia por la turbidez indicativa del crecimiento, se puede calcular la cantidad de antibiótico presente en la muestra ensayada.

El método turbidimétrico tiene un fundamento análogo. La diferencia estriba en que la apreciación del crecimiento bacteriano se hace cuantitativamente por medida fotoeléctrica.

Estos métodos tienen, según GROVE y RANDALL (1955), muchos inconve-

nientes entre los que cabe citar el amplio margen de concentración del antibiótico entre dos diluciones sucesivas, la presencia en los fluidos y tejidos orgánicos de sustancias inhibidoras del crecimiento bacteriano y el inconveniente que supone ensayar muestras cuya turbidez podría interferir con la lectura de resultados.

Estos y otros inconvenientes que presentan los métodos de diluciones sucesivas y turbidimétrico son la causa de que no sean utilizados para la determinación de residuos de antibióticos en fluidos y tejidos orgánicos.

Los métodos biológicos de difusión en agar son muy utilizados en la determinación cuantitativa de residuos no sólo en carne, sino también en otros alimentos. Ya hemos señalado anteriormente el fundamento de estos métodos. La mayor o menor sensibilidad obtenida con estos métodos depende, fundamentalmente, del modo de preparación de la muestra a ensayar. Es ya clásica la técnica de GROVE y RANDALL (1955) modificada por KRAMER *et al.* (1968), en la cual las muestras de tejidos se someten a extracción con un extractante adecuado en la proporción 1:5. En el caso de la penicilina, el extractante es un tampón fosfato de pH 6. Una parte del líquido de extracción se somete a ensayo en el interior de cilindros de acero que descansan sobre la superficie del agar sembrado con *Sarcina lutea*. Esta técnica que se describe con detalle en el Capítulo III (Material y Métodos Generales), tiene una sensibilidad de 0,0625 UI de penicilina/gr de tejido. La utilización de pocillos horadados en el agar o de discos de papel, en lugar de cilindros, tiene, entre otros, el inconveniente de disminuir la sensibilidad (véase Capítulo II, Elección de Métodos).

Las técnicas que llevan consigo la extracción primero de las muestras y su posterior concentración son, naturalmente, más sensibles. Para los residuos de penicilina en tejidos animales se han utilizado diversos extractantes. En la técnica por nosotros utilizada (PEDERSEN, 1965), el líquido extractante estaba constituido por acetona, oxalato sódico y EDTA, y la concentración se realizaba con ayuda de vacío (véase Capítulo III, Material y Métodos Generales). La sensibilidad de esta técnica es de 0,00250 UI de penicilina/gr de tejido. HANSEN *et al.* (1963) utilizaron como extractante de la penicilina acetonitrilo y LOFTSGAARD *et al.* (1968) acetonitrilo tamponado.

Como ya hemos indicado anteriormente, la aplicación de los métodos físico - químicos a la determinación de residuos de antibióticos en carnes, y en general en alimentos, es relativamente reciente. En realidad, estos métodos se han utilizado casi exclusivamente hasta ahora con otros fines. LANGNER *et al.* (1972, 1973, 1973a, 1973b, 1973c y 1973d), en un intento de hacer cualitativo y cuantitativo el «test general de inhibición» utilizado en los mataderos en la detección sistemática de residuos de antibióticos, han publicado una serie de trabajos en los que ensayan diversas modalidades de cromatografía en lámina fina y de electroforesis en la separación e identificación de mezclas de antibióticos, incluida la penicilina, en disoluciones puras. Combinadas estas técnicas

físico - químicas con el método microbiológico, estos autores obtienen resultados cuantitativos. Técnicas de separación e identificación de penicilinas por cromatografía en papel y en lámina fina han sido publicadas por diversos autores (NUSSBAUMER, 1962; WEISS *et al.*, 1967; MCGILVERAY y STRICKLAND, 1967; HELLBERG, 1968; BALDINI *et al.*, 1973; POKORNY *et al.*, 1973). BETINA (1973) ha publicado una revisión crítica sobre las aplicaciones de la bioautografía en la detección y cuantificación de antibióticos separados previamente por cromatografía en papel o en lámina fina.

Teniendo en cuenta la escasa cuantía de los residuos de antibióticos presentes normalmente en la carne y vísceras animales, es de destacar, sin embargo, la escasa sensibilidad de estas técnicas físico - químicas, comparadas con el método microbiológico.

FRECUENCIA DE LA PRESENCIA DE RESIDUOS DE ANTIBIOTICOS EN ANIMALES DE MATADERO

Existe ya una serie numerosa de trabajos sobre residuos de antibióticos en animales sacrificados en el matadero y declaradas sus carnes y despojos comestibles como aptos para el consumo, así como en animales sacrificados de urgencia y enfermos. De estos trabajos puede deducirse la magnitud del problema planteado por la presencia de residuos en estos alimentos. A continuación nos referimos a los más significativos.

KAMPELMACHER *et al.* (1962), en Holanda, investigaron la orina de 100 animales de diferentes especies sacrificados de urgencia con el fin de determinar si habían sido tratados con antibióticos. En el 27 % de las muestras, se puso de manifiesto la presencia de antibióticos. El porcentaje de positivos era mucho mayor en terneros que en vacuno mayor y que otras especies.

WUILLERET (1968) llevó a cabo en el matadero municipal de Ginebra un estudio de presencia de residuos de sustancias de acción antibiótica en tejidos de animales de varias especies, animales que presentaban alguna anomalía y que, por tanto, fueron sometidos a análisis bacteriológico en la inspección *post-mortem*. De un total de 248 animales investigados, 34 (13,7 %) fueron positivos de presencia de residuos. El porcentaje de positivos más elevado correspondió a terneros (22,8 %). Destaca en este trabajo, además, el hecho de que de los 34 animales positivos 13 (5,24 %) presentaban únicamente residuos de penicilina en sus tejidos. Los otros 21 (8,46 %) contenían otras sustancias inhibidoras asociadas o no a la penicilina.

En Hungría, TAKACS y KOVACS (1969) investigaron sustancias inhibidoras en órganos de animales de matadero sacrificados de urgencia y enfermos sometidos a examen bacteriológico. De 244 animales de varias especies estudiados, estos autores demostraron la presencia de residuos en 62 (24,6 %).

HUBER (1970) ha publicado un extenso trabajo sobre la frecuencia de residuos de antibióticos en animales de matadero sanos de distintas especies en los Estados Unidos. Las muestras ensayadas fueron orina (mamíferos) y heces (aves). El ensayo se realizó por difusión en agar sembrado con *B. subtilis* a partir de discos de papel impregnados con las muestras. La sensibilidad aproximada de esta técnica era de 0,01 UI/ml. De 1.224 cerdos estudiados, el 25 % fueron positivos de residuos y, dentro de los positivos, el 10 % contenían residuos de penicilina. El autor señala que muchos de estos casos positivos eran probablemente consecuencia de una administración por vía oral y no parenteral. En ganado vacuno adulto, de 418 animales ensayados, el 6 % eran positivos y de estos en el 2 % los residuos eran de penicilina. Los resultados en terneros dieron un porcentaje mayor de positivos: de 756 animales estudiados, fueron positivos el 16 %. Del grupo de positivos, el 7 % contenían residuos de penicilina. En corderos cebados, de 328 animales dieron positiva la prueba de la orina el 21 % y de estos en el 2 % los residuos eran destruidos por la penicilinas. En gallinas ponedoras, de 798 animales estudiados, eran positivas sus heces en un 17 %. De las muestras positivas, el 6 % contenían penicilina.

FRERES *et al.* (1971) encontraron residuos con actividad antibiótica en muestras de carne de diversas especies procedentes de carnicerías de la región de París y en muestras de animales considerados como enfermos o sospechosos en la inspección *post-mortem*. En estos últimos, el porcentaje de positivos fue del 58 % en cerdos, del 36 % en terneros y del 7 % en ganado vacuno adulto.

BETHCKE y PUSCHNER (1972) han estudiado en el laboratorio bacteriológico de los mataderos de Munich la frecuencia de la presencia de residuos de antibióticos en unos 33.000 animales de varias especies. Una parte de ellos correspondía a casos sospechosos en los que se juzgó necesario en la inspección *post-mortem* el análisis bacteriológico. En este grupo de animales, en total 20.956, el 13 % dio resultados positivos. Por especies, la cifra más alta de positivos correspondió a terneros (22 %) y la más baja a la especie ovina (3 %). Se ensayaron muestras de riñón, hígado y músculo, correspondiendo al riñón la cifra más alta de positivos. El segundo grupo de animales estudiados en total 12.325, estaba constituida por cerdos, ganado vacuno adulto y terneros. Las canales y despojos comestibles de estos animales habían sido declarados aptos para el consumo por no presentar ninguna anomalía. Se ensayaron muestras de riñón. En cerdos y vacuno mayor, los porcentajes positivos fueron muy pequeños (0,06 % y 0,2 %, respectivamente). En cambio, en terneros el porcentaje de positivos fue muy elevado (30,6 %).

WENZEL (1972) investigó la presencia de residuos de antibióticos en 2.103 animales sanos sacrificados en 11 mataderos de Alemania Federal. El porcentaje de positivos fue muy elevado en terneros (84,4 %) y pequeño en ganado vacuno adulto (1,89 %) y en cerdos (3,09 %). Los antibióticos identi-

cados en terneros fueron tetraciclinas, cloranfenicol, penicilina, bacitracina y estreptomicina.

A la vista de estos trabajos, puede concluirse que la frecuencia de la presencia de residuos de antibióticos (y entre ellos de la penicilina) en carnes y despojos comestibles de animales de matadero es realmente considerable.

En España, no conocemos ningún trabajo que aporte datos sobre este aspecto. Unicamente, hemos encontrado dos trabajos españoles sobre residuos de antibióticos en leche: uno de ellos de PORTOLES (1958), que no encontró residuos en 53 muestras, y otro, más reciente, de HERRERA MARTEACHE (1974), en el que de 753 muestras ensayadas en una primera serie encuentra residuos en 26 (3,45 %), y de 323 muestras de una segunda serie en 18 (5,57 %). La determinación fue realizada por la prueba de reducción del azul de metileno, siendo la sensibilidad de esta técnica de 0,036 «equivalentes de penicilina» por ml.

Utilizando el método de cavidades para la detección cualitativa, este autor encuentra que de las 323 muestras de la segunda serie, 51 (15,79 %) eran positivas a las pruebas de detección de penicilina, estreptomicina o tetraciclinas o bien se consideraron como positivas de presencia de sustancias inhibidoras no identificadas. De las 51 muestras positivas, 21 (41,17 %) contenían sólo penicilina (sensibilidad de la técnica 0,03 UI de penicilina/ml).

CUANTIA DE LOS RESIDUOS DE PENICILINA PRESENTES EN CARNE Y VISCERAS ANIMALES DESPUES DE LA ADMINISTRACION DE ESTE ANTIBIOTICO CON EL PIENSO Y POR VIA INTRAMUSCULAR

Nos hemos referido anteriormente a la frecuencia de la presencia real de residuos de antibióticos en carne y vísceras de animales de matadero, revisando los resultados de una serie de trabajos de «screening». Estos resultados son generalmente cualitativos, puesto que si bien señalan la presencia de residuos, no indican la cuantía de los mismos y, en muchos casos, tampoco los antibióticos presentes, ni su procedencia.

Otra dimensión de la magnitud del problema de residuos de antibióticos en alimentos puede apreciarse considerando la cuantía de los mismos en función de la dosis de antibiótico administrada y de la vía de administración. En la Tabla I, resumimos los resultados más sobresalientes de una serie de trabajos experimentales sobre residuos de penicilina en carne y vísceras animales, consecutivos a la administración de este antibiótico con el pienso a distintos niveles. Una revisión más amplia de estos trabajos puede verse en el Capítulo VI de esta tesis. Los datos de la Tabla I deben ser analizados teniendo en cuenta, de modo fundamental, la sensibilidad de la técnica de valoración utilizada por cada uno de los autores, puesto que las diferencias

TABLA I
Residuos de penicilina en músculo y vísceras animales después de su administración con el pienso

Autor	Nivel administrado en ppm	Tiempo de administración	Especie animal	Sensibilidad de la técnica ¹	Residuos en Ulgr de tejido			
					Riñón	Hígado	Músculo	Sangre
FEVRIER <i>et al.</i> (1955)	20 primero y 10 después	Admin. prolongada	Cerdos		N. D.	-	0.30	-
GORDON (1956)	Hasta 16 Mayor 16		Cerdos		N. D.	-	-	-
	5 a 20		Cerdos		N. D.	+	N. D.	+
TAYLOR (1963)	50 a 200		Cerdos		N. D.	-	-	-
	200, 400, 600	5 días	Aves	0.025 UI/0.2 ml de suero	N. D.	+	N. D.	+
COVER y LUDWIG (1957)	800, 1.000, 1.500	»	»		N. D.	N. D.	N. D.	* +
PEDERSEN (1965)	5	6 sem.	Pollos	0.0005	0.007	0.0014	+	N. D.
PILET y TOMA (1969)	200	4 sem.	Pollos	0.05	N. D.	-	-	N. D.
LOFTSGAARD <i>et al.</i> (1968)	15	3 sem.	Cerdos	0.001 a 0.0025	0.0.006	-	-	N. D.
	50	»	»		0.002-0.1	-	-	N. D.
	100	»	»		0.003-0.238	0.0.012	0.0.005	N. D.
MESERSMITH (1967)	50	98 días	Cerdos	0.025	-	-	-	N. D.
VAN SCHOTHORST (1969)	150	A las 16 horas interrupción administración.	Cerdos	0.1	-	-	-	-*
	30, 150 y 300		Terneros		-	-	-	-
BAROL'TCHIEVA (1969)	1 gr/litro agua de bebida	5 días	Pollos		N. D.	+	+	N. D.
FRERES y BORIES (1970)	50		Cerdos		N. D.	-	-	N. D.

¹ En Ulgr de tejido.
- = Ausencia de residuos.
+ = Presencia de residuos.
N. D. = No determinado.
* En suero sanguíneo.

observadas en los resultados de estos trabajos se deben, en gran medida a la diferente sensibilidad de las técnicas utilizadas.

En la Tabla II se agrupan una serie de datos obtenidos de diversos trabajos sobre residuos de penicilina en músculos, vísceras, suero y orina de animales inoculados por vía intramuscular con diferentes dosis del antibiótico, residuos presentes a distintos tiempos después de la inoculación. Una vez más, es preciso analizar estos resultados teniendo muy en cuenta la sensibilidad de la técnica de determinación utilizada por los distintos autores, así como la forma de penicilina administrada y la especie animal. En el Capítulo V, nos referimos a estos trabajos con mayor amplitud.

ESTABILIDAD DE LOS RESIDUOS DE PENICILINA PRESENTES EN LOS ALIMENTOS

Cualquiera que sea la vía de administración de los antibióticos a los animales y la cuantía de los residuos presentes en los alimentos de origen animal, desde el punto de vista de los posibles riesgos para el consumidor interesa mucho conocer lo que sucede con estos residuos durante la conservación en refrigeración y en congelación de los alimentos, así como su estabilidad frente a los tratamientos térmicos culinarios a que, generalmente, se someten estos antes de ser consumidos. En todo caso, la dosis de antibiótico ingerida con los alimentos dependerá de la cuantía de los residuos presentes inicialmente en los mismos y de su estabilidad.

La bibliografía existente sobre estabilidad de los antibióticos en los alimentos es realmente escasa. A continuación vamos a referirnos, de modo fundamental, a una serie de trabajos relativos a la inactivación de la penicilina en diferentes medios, entre ellos la carne.

Por lo que respecta a la estabilidad de la penicilina en carne refrigerada y en carne congelada, SHAKARYAN y SEVYAN (1970) encontraron residuos de este antibiótico en carne de pollo conservada entre -2º y -3ºC hasta los 110 días. A los 210 días, estos autores no detectaron residuos. Los animales habían sido inoculados por vía intramuscular y subcutánea con dosis de 50.000 y 100.000 UI/Kg de peso vivo.

SHAHANI *et al.* (1956) estudiaron la estabilidad de la penicilina K disuelta en leche, tampón fosfato de pH 6 y agua, en concentraciones de 0,13 a 1,07 UI/ml. El antibiótico fue más estable en la leche que en el tampón y en éste más que en el agua. De los resultados obtenidos por estos mismos autores y por KRIENKE y FOUTS (1950) y MUNRO y MORRISON (1970) puede concluirse que la pasteurización de la leche inactiva sólo una pequeña parte de los residuos de penicilina presentes en este alimento.

TABLA II
Residuos de penicilina en músculo, vísceras y fluidos orgánicos de animales después de su administración por vía intramuscular

Autor	Dosis (UI/Kg peso)	Tiempo post-inoc.	Especie animal	Sensibilidad de la técnica (UI/gr)	Residuos en UI/gr o ml				
					R	H	M	Suero	Orina
COVER y LUDWIG (1957)	2.500 PGP	2 horas	Pollos	0.05	-	-	N. D.	0.3	N. D.
LOFTSGAARD	5.000 PGP	»	»	»	-	-	N. D.	2.1	N. D.
et al. (1968)	12.000 PGP	24 horas	Cerdos	0.002	0.1	0.019	0.03	N. D.	N. D.
	»	4 días	»	»	-	-	-	N. D.	N. D.
	8.000 PGB	7 »	Cerdos	0.002	0.092	0.002	0.003	N. D.	N. D.
BAROUTCHIEVA (1969)	10.000 UI/ave PCS	2 días	Pollos	»	N. D.	+	-	N. D.	N. D.
SCHOTHORST (1969)	10.000*	27 horas	Terneros	0.1	-	-	-	-	N. D.
HUBER et al. (1969)	15.000*	26 »	Cerdos	0.1	+	-	-	-	N. D.
	3.900 PGP	48 horas	Cerdos	»	N. D.	N. D.	N. D.	-	+
	»	72 »	»	»	N. D.	-	-	-	+
VIDEAU (1969)	10.000 PGP	4 horas	Ratas	»	0.06	-	-	N. D.	N. D.
»	»	»	»	»	0.30	0.08	-	0.03	N. D.
	10.000 PGB	24 horas	»	0.01-0.02	-	-	-	-	-

- = Ausencia de residuos.
+ = Presencia de residuos.
N. D. = No determinado.
* Forma de penicilina no mencionada.
PGP = Penicilina G procaína.
PGB = Penicilina G benzatína.
PCS = Penicilina G sódica.

VAN SCHOTHORST (1969) estudió el efecto del calentamiento de la carne sobre la pérdida de la actividad antibacteriana de la penicilina presente en este alimento. Un tratamiento térmico de 100°C durante 12 minutos reducía los residuos de 2 a 0,25 UI/gr. Cuando el antibiótico se encontraba en solución, se obtenía un efecto similar a 60° durante 85 minutos.

PILET y TOMA (1969) dan un cuadro muy complejo de destrucción por calentamiento de la penicilina disuelta, en distintas concentraciones, en agua destilada, caldo nutritivo, leche y extracto de músculo de pollo en suero fisiológico. En líneas generales, a 100°C la inactivación fue del orden del 50 % a los 30 minutos y casi total a los 90 minutos. Los porcentajes de destrucción fueron distintos en cada uno de los medios: menores en la leche y mayores en el extracto de músculo en suero fisiológico. Dentro de cada medio, la inactivación fue distinta según la concentración del antibiótico: mayor para las concentraciones más pequeñas.

LUCASS (1971) ensayó soluciones puras de penicilina G procaína en tampón fosfato de pH 5,4 a 6,6. A 100°C, la inactivación no fue total al cabo de 120 minutos. A 65°C, tuvieron lugar pérdidas de actividad poco importantes en tiempos de 30 a 120 minutos. Además de la notable termorresistencia de este antibiótico, este autor pone de manifiesto la importancia del pH en la estabilidad frente al calor del mismo.

De los trabajos mencionados es posible deducir que no se puede confiar en la acción del frío durante la conservación de la carne, ni tampoco en la acción del calor durante los tratamientos culinarios a que se somete corrientemente este alimento, para inactivar los posibles residuos de penicilina presentes en este alimento. A esta conclusión llegan también explícitamente otros autores en relación con los residuos de antibióticos en general en los alimentos (PANTALEÓN, 1966; HUBER, 1970; BARNUM, 1973).

HALOS NO ESPECIFICOS

Las técnicas biológicas de difusión utilizadas corrientemente en la determinación de residuos de antibióticos en alimentos no son específicas, en el sentido de que los halos o zonas de inhibición del crecimiento del germen ensayado no se producen únicamente cuando en el alimento existen residuos de antibióticos, sino siempre que en el mismo haya sustancias inhibidoras del crecimiento bacteriano. Por eso, el test general de inhibición, tal como se practica de forma rutinaria, no pone de manifiesto la presencia de antibióticos sino de sustancias inhibidoras del crecimiento bacteriano, de las que las más frecuentes son, sin duda, los antibióticos. La demostración de que se trata de antibióticos y la identificación de los mismos es preciso realizarla *a posteriori*. La identificación de la penicilina con ayuda de penicilinasas es, quizá, una de las más sencillas.

Siguiendo este razonamiento, es evidente que si en los tejidos animales y en los líquidos de secreción y excreción (leche, orina) existieran sustancias naturales con poder inhibidor del crecimiento bacteriano se producirían también halos de inhibición. Del mismo modo, si los líquidos utilizados en la preparación de las muestras de alimentos para su ensayo tuvieran acción antibacteriana, se producirían por la misma razón halos o zonas de inhibición del crecimiento.

Distintos investigadores han observado la aparición de halos o zonas de inhibición del crecimiento no específicos, principalmente con extractos concentrados del músculo, entendiéndose por tales aquellos que no pueden ser atribuidos a residuos de sustancias quimioterápicas presentes en los alimentos por proceder estos de animales alimentados con piensos exentos de estas sustancias. Los halos no específicos tienen características propias que permiten diferenciarlos de los halos producidos por los antibióticos. Su diámetro suele ser mínimo y no poseen límites nítidos, sino que se trata más bien de un enrarecimiento del crecimiento mayor en la proximidad de la muestra y menor en las partes más alejadas. Además, estos halos no son estables, sino que a medida que aumenta el tiempo de incubación tienden a desaparecer por crecimiento del germen.

PEDERSEN (1965) señala las dificultades creadas por la aparición de halos no específicos de inhibición en algunos de los métodos de extracción y concentración por él ensayados, principalmente con muestras de músculo de pollo. Además del ácido láctico, causa que había sido señalada ya como probable por HANSEN *et al.* (1963), PEDERSEN enumera como posibles causas de la presentación de halos no específicos los restos de los líquidos de extracción del antibiótico, las sustancias antibacterianas naturales presentes en el suero y en los tejidos (SKARNES y WATSON, 1957) y la presencia accidental en ellos de antibióticos sintetizados por la flora intestinal.

LOFTSGAARD *et al.* (1967) ensayando técnicas de extracción de penicilina a partir de tejidos porcinos, encuentran halos no específicos principalmente con músculo a las 24 horas *post mortem* (con oxalato - EDTA - acetona como extractante). Con acetona - agua destilada como solvente - extractante, la frecuencia de presentación de halos no específicos fue mayor. Para evitar la presentación de estos halos, los autores mencionados aconsejan utilizar como solvente - extractante acetonitrilo para hígado y riñón y acetonitrilo tamponado para el músculo (por la influencia del pH del músculo en la aparición de los halos no específicos), así como resuspender los residuos de evaporación antes de su ensayo en tampón fosfato (por la influencia del pH del residuo que se ensaya en la producción de los mencionados halos).

SCHULER (1972) ha investigado en qué medida otras sustancias distintas a los antibióticos pueden inhibir al germen *Sarcina lutea* al realizar las pruebas de detección de residuos de antibióticos en carnes. Después de haber ensa-

yado especias, enzimas medicamentos y antibióticos, este autor concluye que únicamente los residuos de antibióticos y de sulfamidas presentes en la carne y en los órganos (hígado y riñón) producen zonas de inhibición del crecimiento bien marcadas, zonas que permanecen estables durante varios días. Por esta razón, la lectura de las pruebas no debe hacerse antes de las 24 horas y en caso de duda está aconsejado esperar hasta las 36 horas. El trabajo que comentamos destaca, como factor importante en la presentación de halos no específicos la sensibilidad de *Sarcina lutea* a la falta de oxígeno. Finalmente, el autor concluye que para mejorar la lectura de las pruebas y suprimir los halos dudosos se sustituya como muestra a ensayar el trocito de carne por el jugo obtenido por comprensión, concentrado en discos de guata.

LOFTSGAARD *et al.* (1968) apuntan como otra posible causa de la aparición de halos no específicos la limpieza no adecuada de material, seguida de la esterilización insuficiente del mismo.

En uno de los trabajos más recientes sobre halos de inhibición no específicos, TERPLAN *et al.* (1973) han ensayado técnicas de diálisis para diferenciar las sustancias inhibitoras difusibles (antibióticos) de las sustancias no difusibles con acción antimicrobiana. Estos autores han realizado las pruebas con antibióticos, carne y vísceras de terneros tratados con antibióticos y de controles, productos cárnicos, clara de huevo, leche y productos lácteos.

NORMAS LEGALES SOBRE LA UTILIZACION DE LA PENICILINA AÑADIDA A LOS PIENSOS Y EN TERAPEUTICA VETERINARIA Y SOBRE RESIDUOS DE ESTE ANTIBIOTICO EN LA CARNE

Los riesgos derivados de la utilización de los antibióticos añadidos a los piensos y en terapéutica veterinaria, a que nos hemos referido anteriormente, han determinado el que los organismos encargados de velar por la salud pública hayan promulgado una serie de normas legales que, en conjunto, tienden a promover la utilización correcta y controlada de estas sustancias y a asegurar que los alimentos de origen animal estén libres de ellas.

Por lo que respecta a la carne, estas normas se refieren, fundamentalmente, a la adición de antibióticos a los piensos con fines nutricionales y, en general, a niveles subterapéuticos, a su uso como agentes terapéuticos en animales y a los controles que deben establecerse en los mataderos para asegurar que la carne y los despojos comestibles calificados como aptos para el consumo están exentos de residuos que puedan determinar riesgos en el consumidor.

El aspecto más criticado por parte de las autoridades sanitarias es la adición de antibióticos a niveles subterapéuticos a los piensos para animales. Los criterios más autorizados sobre este problema, basados en los datos

científicos con que se cuenta, están recogidos en dos informes. El primero de ellos es el del «Joint Committee on the Use of Antibiotics in Animal Husbandry and Veterinary Medicine» (Swann Report) (1971) y fue elaborado en Gran Bretaña. El segundo procede de un grupo de trabajo designado por la Food and Drug Administration americana: «F. D. A. Task Force on the Use of Antibiotics in Animal Feeds» (1972). Ambos informes coinciden, en líneas generales, en que únicamente deben añadirse a los piensos para su utilización continuada como promotores del crecimiento y a niveles subterapéuticos los antibióticos que no tengan aplicación en terapéutica humana y animal y que no interfieran la acción de otros antibióticos usados con fines terapéuticos. El problema radica, sin embargo, a nuestro juicio, en que todavía no se cuenta, en la medida necesaria, con antibióticos que cumplan las condiciones señaladas y a la vez sean efectivos para los fines propuestos.

La F. D. A. americana (Federal Register, 1973) no adoptó en su totalidad las recomendaciones del grupo de trabajo antes mencionado, especialmente la que se refiere a la prohibición de la adición a los piensos a niveles subterapéuticos de una serie de antibióticos (entre ellos la penicilina) y de sulfamidas que debía tener efecto en distintas fechas, según la especie animal, de 1973. La F. D. A. consideró que no se contaba en aquel momento con datos científicos suficientes que autorizasen tal prohibición, pero que ésta sería efectiva en un tiempo máximo de dos años, a menos que la F. D. A. recibiese trabajos científicos que demostrasen de modo concluyente que los antibióticos utilizados cumplían los criterios de seguridad o inocuidad y eficacia propuestos en el informe de la F. D. A. Task Force (1972).

El uso de los antibióticos, y entre ellos de la penicilina, como agentes terapéuticos en medicina veterinaria, tanto añadidos a los piensos como por vía parenteral, también tiende a regularse, en el sentido de que se utilicen únicamente por prescripción del veterinario y bajo su supervisión (Swann Report, 1971; Federal Register, 1973). La F. D. A. no puso objeciones al uso de los antibióticos con fines terapéuticos añadidos a los piensos a niveles elevados, siempre que la medicación se administre durante un corto tiempo y por indicación del veterinario.

Los controles que deben establecerse en los mataderos para asegurar que la carne y los despojos comestibles dictaminados como aptos para el consumo estén libres de residuos que puedan significar riesgos para el consumidor son diversos. En primer lugar, las reglamentaciones de inspección de carnes de algunos países prohíben el sacrificio de animales tratados con antibióticos y obligan expresamente a guardar un período de tiempo después del tratamiento y hasta el sacrificio para que éste pueda realizarse. Este período oscila entre 4 y 6 días. Una conducta parecida se aconseja seguir con los animales que han sido alimentados con piensos adicionados de antibióticos. En segundo lugar, las reglamentaciones de inspección de carnes más modernas obligan a la

realización sistemática o en determinados casos en el matadero de las pruebas de rutina para la puesta en evidencia de residuos de antibióticos en carne y vísceras animales. En Alemania, estas pruebas han de realizarse tanto en la carne obtenida en los mataderos alemanes como en la importada (ANÓNIMO, 1974). En otros países (Dinamarca, entre ellos), es obligatoria la detección de residuos de antibióticos en todos los animales cuyas canales y vísceras sean sometidas al análisis bacteriológico (sacrificios de urgencia y de enfermos) y cuando se sospeche que el animal pudo ser tratado con estas drogas dentro de los 6 días anteriores al sacrificio (JEPSEN y PEDERSEN, 1965). En relación con las canales y vísceras sometidas a examen bacteriológico, es sabido también que la presencia de residuos de antibióticos puede influenciar los resultados de los mencionados análisis (WUILLERET, 1968; TACAKS y KOVACS, 1969).

Por otra parte, existen también normas sobre residuos de antibióticos en alimentos. Según en Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (OMS, 1970), «cuando se empleen penicilinas deberá hacerse de manera que no dejen residuos que se detecten en los alimentos destinados al consumo humano». Los niveles de residuos no detectables por la técnica que aconseja el Comité (FAO/OMS, 1969) están comprendidos entre 0,06 y 0 ppm (0,1 y 0 UI/gr, aproximadamente), residuos considerados inocuos. Un criterio más estricto mantiene la F. D. A. americana (Federal Register, 1972) que no admite ninguna tolerancia con respecto a la penicilina en carne de pollo y otras aves, de cerdo, en huevos y en leche.

JUSTIFICACION DE ESTA TESIS

En los apartados precedentes de esta introducción hemos revisado la bibliografía sobre la utilización de los antibióticos, y en particular de la penicilina, añadidos a los piensos y en terapéutica veterinaria, y sobre la presencia de residuos de estas sustancias en carne y vísceras animales. Esta revisión bibliográfica ha sido realizada desde el punto de vista de los riesgos y problemas que para la sanidad animal y la salud pública supone la utilización de los antibióticos en producción animal y en terapéutica veterinaria y bajo la óptica del higienista de los alimentos.

A la vista de todos estos datos, resulta evidente que existen una serie de problemas poco conocidos, que precisan de una más amplia investigación. Entre estos problemas, tiene considerable importancia desde el punto de vista sanitario el conocimiento de la cuantía y de la persistencia de los residuos de antibióticos en carne y vísceras animales, consecutivos a la administración de estas sustancias con el pienso a niveles distintos y por vía parenteral. Esta circunstancia, unida al hecho de la ausencia de trabajos realizados en nuestro país sobre este tema, nos estimularon a iniciar esta línea de investigación.

En la presente tesis, se aportan una serie de datos al problema del conocimiento de la cuantía y la persistencia de los residuos de penicilina en carne y vísceras de pollo, con especial referencia a su significado y repercusiones en inspección de carnes.

CAPITULO II

ELECCION DE METODOS PARA EL ENSAYO CUANTITATIVO DE RESIDUOS DE PENICILINA EN TEJIDOS ANIMALES

A) METODOS BIOLOGICOS: DIFUSION EN AGAR

Los métodos biológicos de difusión en agar son muy utilizados en la determinación cuantitativa de residuos de antibióticos en alimentos de origen animal. Las variantes que intervienen en estos métodos son el diámetro o dimensiones de las placas, la cantidad de agar base y agar siembra, su composición y su pH, el microorganismo de ensayo y la magnitud de su inóculo.

Con el fin de encontrar las condiciones óptimas para el ensayo de penicilina por estos métodos, se realizaron los experimentos iniciales. Se eligió un solo tamaño de placas de Petri de fondo plano (103×20 mm), por el fácil manejo de estas placas y porque en cada una de ellas pueden hacerse perfectamente las seis determinaciones precisas para cada muestra. Como agar base se utilizó el Antibiotic Medium 1 (DIFCO) y como agar siembra el Antibiotic Medium 4 (DIFCO), por ser medios de uso generalizado. Como microorganismo de ensayo se eligió *Sarcina lutea* ATCC 9341, por ser éste uno de los gérmenes más sensibles a la penicilina.

Después de una serie de ensayos encaminados a encontrar las cantidades de agar base y agar siembra más adecuadas, teniendo en cuenta, por un lado, el diámetro de las placas de Petri utilizadas y, por otro, las concentraciones de antibiótico esperadas en los tejidos animales, se eligieron las proporciones de 21 ml de agar base y 4,5 ml de agar siembra. Simultáneamente, se investigó la cantidad de suspensión bacteriana o inóculo ajustada (véase el capítulo siguiente) que debía añadirse al agar siembra para obtener los halos de inhibición más idóneos. Se ensayaron proporciones de 0,1 a 0,5 ml de inóculo por 100 ml de Antibiotic Medium 4, para cantidades de agar siembra a añadir por placa de 4 a 6 ml, obteniéndose los mejores resultados en función de crecimiento uniforme y halos de inhibición más definidos y nítidos con la proporción de 0,4 ml de inóculo por 100 ml de Antibiotic Medium 4, añadiendo 4,5 ml de agar siembra por placa.

Se ensayaron tres métodos de difusión:

- a) Depositando la muestra en cilindros colocados sobre la superficie del agar (método de los cilindros).
- b) Depositando la muestra en pocillos practicados en la capa de agar (método de los pocillos).
- c) Colocando discos de papel de filtro impregnados con la muestra sobre la superficie del agar y en íntimo contacto con ella (método de los discos).

Al objeto de poder evaluar la adecuación de estos métodos para la determinación cuantitativa de residuos de antibióticos en tejidos animales, y elegir el método más conveniente en razón de su mayor sensibilidad, se llevaron a cabo los experimentos que se describen a continuación.

Se prepararon seis concentraciones distintas de penicilina G potásica de potencia 1.582 UI/mg en tampón fosfato de pH 6 (véase capítulo de Material y Métodos Generales). Estas concentraciones fueron las siguientes: 0,0063, 0,0125, 0,025, 0,05, 0,1 y 0,2 UI/ml. Las placas se prepararon añadiendo el agar base y el agar siembra, este último inoculado con *Sarcina lutea* en la forma que se indica en el capítulo siguiente. Para cada uno de los tres métodos (cilindros, pocillos y discos) se utilizaron seis placas, una para cada concentración del antibiótico. En cada placa se ensayaron cuatro muestras de la correspondiente concentración del antibiótico. En la primera serie, las muestras (0,3 ml aproximadamente) se colocaron en cilindros de acero inoxidable con un diámetro externo de 8 mm ($\pm 0,1$ mm) y un diámetro interno de 6 mm ($\pm 0,1$ mm), siendo su longitud de 10 mm ($\pm 0,1$ mm). En la segunda serie, las muestras (0,09 ml aproximadamente) se colocaron en pocillos horadados en la capa de agar de un diámetro similar al diámetro interno de los cilindros. En la tercera serie, las muestras estaban constituidas por el líquido impregnado por un disco de papel de filtro (Concentration Disks, Sterile Blanks, DIFCO) introducido en la correspondiente dilución de antibiótico, eliminado por secado el exceso de líquido, y depositado sobre la superficie del agar. El diámetro de los discos era, aproximadamente, igual al de los cilindros y al de los pocillos (6 mm).

Las placas se incubaron a 32°C durante 16-18 horas, en cuyo momento se llevó a cabo la lectura de los resultados y la medida de los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento producidos, con ayuda de un calibrador.

En la Tabla III, se anotan los resultados obtenidos. La Fig. 1 muestra las tres placas correspondientes a la concentración 0,2 UI/ml (derecha) y 0,1 UI/ml (izquierda). El método de los cilindros mostró una mayor sensibilidad: ya a la concentración de 0,0125 UI/ml se observaron halos claros de inhibición y el diámetro de los halos producidos fue a ésta y a las demás concentraciones mayor que el de los halos correspondientes a los otros dos métodos. Por el método de los pocillos, los halos comenzaron a aparecer a la concentración de 0,025 UI/ml y su diámetro fue superior al diámetro de los halos producidos por el método de los discos. En realidad, el método de los discos sólo dio halos cuantitativamente medibles a la concentración más elevada (0,2 UI/ml).

Estas diferencias de sensibilidad de los métodos estudiados son debidas, principalmente, a la distinta cantidad de muestra ensayada en cada caso, a la superficie de contacto de la muestra con el agar y a la desigual forma de difusión en cada método. El método de los cilindros tiene la ventaja, además de su mayor sensibilidad, de la comodidad de su realización. Por ello, este

TABLA III
Diámetros de los halos producidos en mm por diversas concentraciones de penicilina G potásica ensayadas por el método de los cilindros, el método de los pocillos y el método de los discos

Método de ensayo	Concentraciones (UI/ml)					
	0.0063	0.0125	0.025	0.05	0.1	0.2
Cilindros	—	10.5	14.5	20.5	24.4	29.3
	—	10.0	16.0	20.4	25.3	29.3
	—	9.9	15.5	19.9	25.2	29.4
	—	9.9	14.6	20.4	24.6	29.1
Pocillos	—	—	11.0	16.0	22.6	28.1
	—	—	10.0	14.1	21.7	28.6
	—	—	±	15.0	22.5	28.0
	—	—	±	14.5	22.0	28.1
Discos	—	—	—	—	—	14.5
	—	—	—	—	—	13.1
	—	—	—	—	±	9.9
	—	—	—	—	±	12.0

— = Ausencia de halo de inhibición.

± = Ligeramente positivo, no medible.

método es el más utilizado para la determinación de residuos de antibióticos en tejidos animales. El método de los pocillos tiene el inconveniente, comparado con el método de los cilindros, que la muestra que permite ensayar es menor, por lo que también su sensibilidad es menor. Modificar la altura de la capa de agar o el diámetro de los pocillos, supondría introducir nuevas variantes. El método de los discos presenta mayores inconvenientes. El primero y más importante es la escasa cantidad de muestra que puede ensayarse. En segundo lugar, cabe citar la dificultad de impregnar los discos siempre con igual cantidad de muestra, tanto si se impregnan una sola vez como si se hacen varias impregnaciones sucesivas con secado intermedio. Y en tercer lugar, que no siempre se consigue que el contacto de los discos con la superficie del agar sea íntimo y uniforme.

Otros inconvenientes, además de los mencionados, observados por nosotros, han sido señalados por diversos investigadores. GROVE y RANDALL (1955) llaman la atención sobre el hecho de que el disco de papel de filtro puede actuar como papel cromatográfico y determinar la difusión irregular del antibiótico. GALESLOOT y HASSING (1962) señalan qué impurezas presentes en los discos utilizados pueden determinar falsas reacciones positivas y halos irregulares.

Consecuentemente con los resultados obtenidos en los experimentos que se señalan anteriormente, se eligió el método de los cilindros de difusión en placas de agar inoculadas con *Sarcina lutea* ATCC 9341 para la determinación

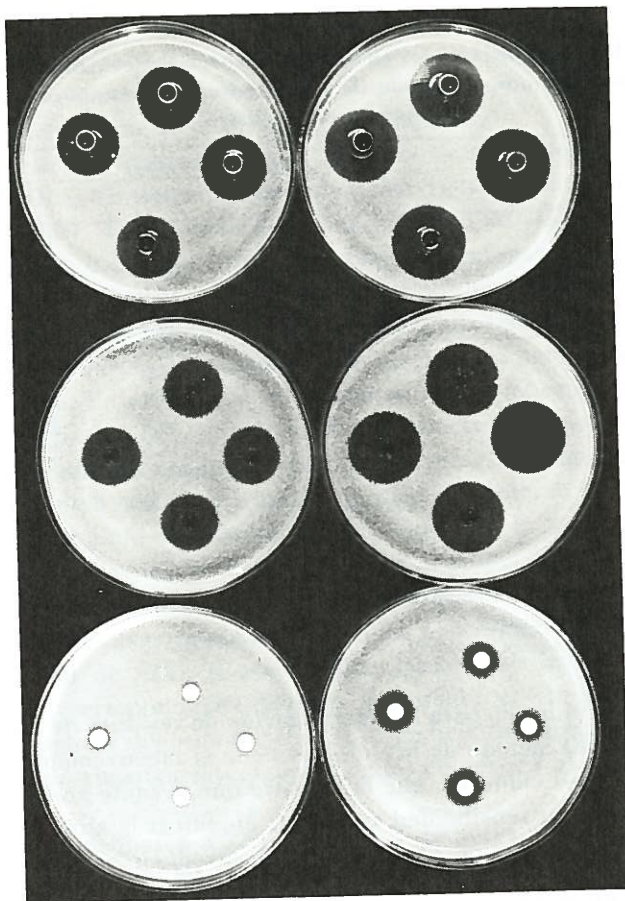


Fig. 1.—Halos de inhibición producidos por concentraciones de penicilina G potásica de 0.2 UI/ml (derecha) y 0.1 UI/ml (izquierda). (De arriba abajo: cilindros, pocillos, discos).

de residuos de antibióticos en tejidos animales, en la forma que se describe en el capítulo siguiente.

B) METODOS FISICOQUIMICOS: CROMATOGRAFIA EN LAMINA FINA

A pesar de la abundante bibliografía existente sobre penicilina en los últimos 15 años, es preciso evidenciar la escasez de procedimientos no biológicos para el análisis cualitativo y cuantitativo, aplicable a estos antibióticos. Esto es especialmente cierto en lo que se refiere a penicilina y otros antibióticos en alimentos de origen animal.

En los últimos años se han publicado una serie de trabajos preliminares tendentes a encontrar las técnicas fisicoquímicas más adecuadas para separar mezclas puras de antibióticos, identificarlos e incluso medirlos cuantitativamente con ayuda de métodos biológicos (bioautografía). Las técnicas fisicoquímicas más utilizadas han sido la cromatografía y la electroforesis en sus diversas modalidades. Es necesario decir, sin embargo, que en el momento actual no se cuenta con ningún método fisicoquímico con la suficiente sensibilidad que pueda utilizarse en la identificación y cuantificación de residuos de penicilina en tejidos animales.

Con el fin de evaluar experimentalmente estos métodos y de explorar su posible aplicación a la determinación e identificación de residuos de penicilina en músculo, hígado y riñón de pollo, se llevaron a cabo inicialmente los experimentos de cromatografía en lámina fina que se describen a continuación.

Los primeros experimentos iban dirigidos a lograr unas condiciones óptimas de separación y revelado de disoluciones de penicilina y de mezclas puras de éste con otros antibióticos. Como soporte cromatográfico se utilizó sílica gel G, fase utilizada ya por otros autores en este campo, por contar con el material necesario para esta técnica y con experiencia previa sobre la misma.

La preparación de las placas, así como la aplicación de las muestras y el desarrollo de la cromatografía, se llevaron a cabo por la técnica descrita por LÓPEZ (1972).

Para la elección de la fase móvil se emplearon las siguientes mezclas de disolventes:

- n-butanol-metanol-agua (30:25:30).
- acetona-metanol (1:1).
- n-butanol-metanol-ácido acético-agua (37,5:25:7,5:30).
- n-butanol-metanol-ácido acético-agua (37,5:25:7,5:16).

Los reactivos utilizados para el revelado de las placas fueron los siguientes:

- a) Reactivo de Roux. 10° gr de nitroprusiato de sodio en 100 ml de agua

destilada. Alcalinizar con 2 ml de NaOH. Añadir 5 ml de una solución acuosa de permanganato potásico al 3 %. Eliminación del precipitado por filtración. Conservar en frasco amarillo y diluir 1:5 en el momento de empleo.

b) Reactivo de Dragendorff. Solución I: 1,7 gr de subnitrato de bismuto en 100 ml de ácido acético al 20 %. Solución II: 40 gr de yoduro potásico en 100 ml de agua. Para el revelado mezclar 5 ml de la solución I, 5 ml de la solución II, 20 ml de ácido acético glacial y completar hasta 100 ml con agua.

c) Rodamina B. 25 mg de rodamina en 100 ml de etanol.

d) Vapores de yodo.

e) Reactivo cloroplatínico (POKORNY *et al.*, 1973). 1 ml de una solución al 0,2 % de cloruro de platino, 0,1 ml de ácido clorhídrico al 3,5 % y 20 ml de acetona. Añadir la solución de yoduro potásico en el momento de ensayo.

El experimento se llevó a cabo de la siguiente forma: muestras de penicilina G potásica y de clorhidrato de tetraciclina, conteniendo cada una 1 µg de producto activo, fueron sometidas a cromatografía analítica en lámina fina. Se utilizaron cuatro placas de sílica gel G, en las que se depositaron alícuotas de las muestras de penicilina y de clorhidrato de tetraciclina. Cada una de las cuatro placas se desarrolló con una de las fases móviles antes indicadas y fue revelada parcialmente con cada uno de los cinco reactivos. Las manchas de clorhidrato de tetraciclina se pusieron en evidencia bajo la luz ultravioleta.

Los resultados obtenidos en este experimento quedan reflejados en la Tabla IV.

Por lo que se desprende de estos resultados, la única fase móvil que presenta una buena definición es la constituida por n-butanol - metanol - ácido acético - agua en la proporción de 37,5:25:7,5:16. Sólo dos de los reactivos resultaron ser adecuados para el revelado de la penicilina G potásica: el reactivo cloroplatínico y los vapores de yodo.

Con el fin de conocer el margen mínimo de sensibilidad de estos dos reactivos para el revelado de la penicilina, se realizó el experimento siguiente: alícuotas con cantidades conocidas de penicilina G potásica (1,6, 0,8, 0,4, 0,16, 0,08, 0,04 y 0,02 UI) en agua destilada estéril, se cromatografiaron en sendas láminas finas de sílica gel G, empleando como fase móvil la mezcla de n-butanol - metanol - ácido acético - agua (37,5:25:7,5:16). Las láminas, una vez desarrolladas, se revelaron con los reactivos elegidos (cloroplatínico y vapores de yodo). El revelado de las láminas mostró:

1.º La cantidad mínima detectable por los vapores de yodo fue de 0,4 UI.

2.º El reactivo cloroplatínico revela hasta el límite de 0,04 UI, unas diez veces más sensible que el anterior.

Estos resultados se pueden apreciar en los cromatogramas de las Figuras 2 y 3.

Con estos resultados previos, se intentó aplicar este sistema de cromato-

TABLA IV
Comportamiento frente a los distintos reactivos y fases móviles de muestras de penicilina G potásica y clorhidrato de tetraciclina (1 µg) en disolución pura

Fase móvil	Rf		Visualización de la penicilina G potásica			
	Penicilina	Clorh. de tetraciclina*	R. de Roux	R. de Dragendorff	Rodamina B	Vapores de yodo
n-butanol-metanol-agua (30:25:30)	0.70	0.62	—	±	—	+
acetona-metanol (1:1)	0.00	0.00	—	±	—	+
n-butanol-metanol-ac. acético-agua (37,5:25:7,5:30)	0.76	0.74	—	±	—	+
n-butanol-metanol-ac. acético-agua (37,5:25:7,5:16)	0.85	0.46	—	±	—	+

* Las manchas de clorhidrato de tetraciclina se observaron bajo la luz ultravioleta.
— = No visualización.
± = Ligera visualización.

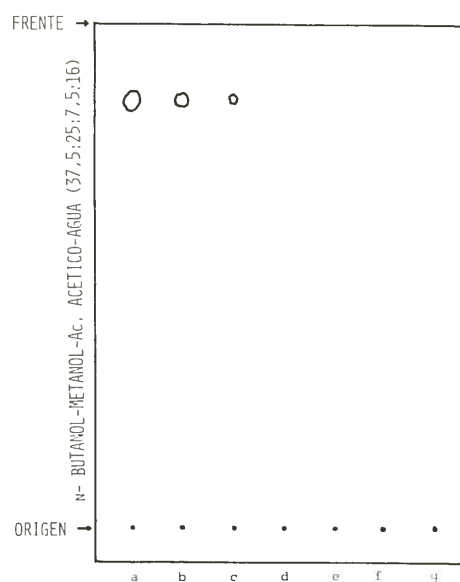


Fig. 2.—Cromatografía en lámina fina de sílica gel G de alícuotas de una disolución de penicilina G potásica con las concentraciones en UI siguientes: a = 1.6, b = 0.8, c = 0.4, d = 0.16, e = 0.08, f = 0.04 y g = 0.02.

Revelador: vapores de yodo. Rf. de las manchas: 0.85.

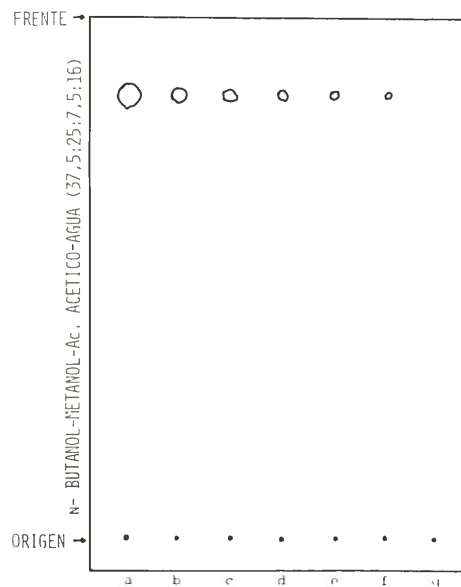


Fig. 3.—Cromatografía en lámina de sílica gel G de alícuotas de una disolución de penicilina G potásica con las concentraciones en UI siguientes: a = 1.6, b = 0.8, c = 0.4, d = 0.16, e = 0.08, f = 0.04 y g = 0.02.

Revelador: reactivo cloroplático. Rf. de las manchas = 0.85.

grafía en capa fina a la detección de residuos de penicilina G potásica en tejido muscular de pollo. A este fin, se llevaron a cabo varios experimentos. El primero de ellos tenía por objeto observar si alguna de las sustancias presentes en el extracto muscular podría interferir en la placa de cromatografía con la mancha de penicilina o si ésta no se separase del resto de las sustancias.

Muestras de músculo de pollo (10 gr) inoculado previamente por vía intramuscular con 500.000 UI de penicilina G potásica por Kg de peso se sometieron a la técnica de extracción y concentración de PEDERSEN (1965). Esta técnica se describe en el capítulo siguiente. Los residuos de los extractos obtenidos se disolvieron en 1 ml de agua destilada estéril y se centrifugaron con el fin de separar la fase lipídica que entorpecería los resultados. Una alícuota de esta suspensión (10 µl) se cromatografió en una placa de sílica gel G de 0.25 mm de espesor, utilizando como fase móvil n-butanol - metanol - ácido acético - agua (37,5:25;7,5:16). Como patrones se emplearon cantidades semejantes de una suspensión de extracto muscular exento de penicilina y 10 µl de una disolución pura de penicilina G potásica que contenía 1 µg de producto activo. Desarrollada la cromatografía, se reveló con el reactivo cloroplático

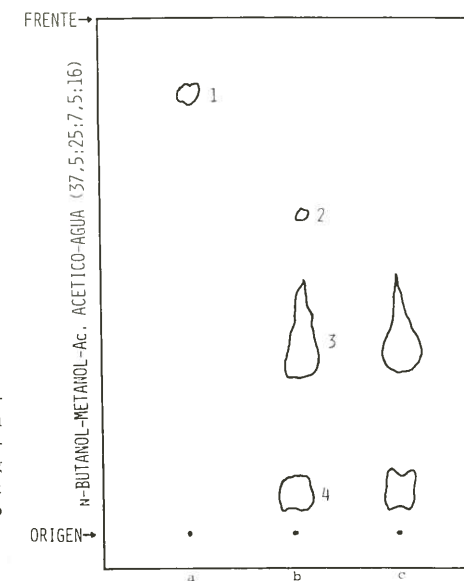


Fig. 4.—Cromatografía en lámina fina de sílica gel G de: a) una disolución pura de penicilina G potásica (1 µgr), b) 10 µlitros de una suspensión de extracto muscular de pollo inoculado por vía intramuscular con 500.000 UI/Kg de penicilina G potásica y c) 10 µlitros de una suspensión de extracto muscular de pollo exento de antibióticos.

Revelador: reactivo cloroplático. Rf.: mancha n.º 1: 0.85, mancha n.º 2: 0.61.

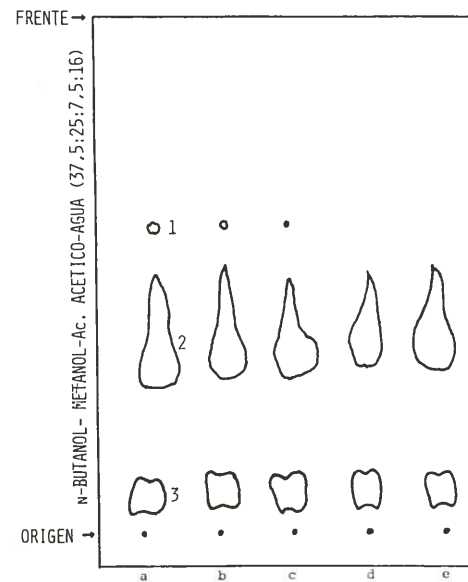
ya descrito. Una copia de una de las láminas así obtenidas se muestra en la Fig. 4. Las cuatro fracciones obtenidas que se observan en esta figura, fueron identificadas, provisionalmente, de la siguiente forma: la fracción n.º 1 como penicilina pura que corresponde a la muestra patrón cromatografiada. La mancha n.º 2 de Rf inferior a la anterior (0,61) como residuo activo de penicilina G potásica. Las restantes fracciones 3 y 4 se consideraron como componentes no penicilínicos del extracto muscular.

La confirmación de estos resultados provisionales se llevó a cabo utilizando el método biológico (descrito en el capítulo III), para lo cual se cromatografió en lámina fina preparativa una muestra de cada uno de los extractos musculares obtenidos (con y sin penicilina). Se extrajeron de la lámina cada una de las bandas correspondientes y se suspendieron en agua para eluirlos de la fase estacionaria que los contenía. Las fracciones así obtenidas, previamente concentradas a vacío, se ensayaron por el método biológico antes mencionado. Los resultados obtenidos confirmaron la identificación provisional realizada por cromatografía en lámina fina.

Una vez comprobado que existe una clara separación cromatográfica de la penicilina con respecto al resto de las sustancias normalmente presentes en los extractos musculares, se realizó una experiencia encaminada a demostrar el nivel de sensibilidad del método de cromatografía en capa fina en la detección de residuos de penicilina G potásica en los extractos de músculo de pollo. Para ello, se realizaron extracciones simultáneas de muestras (10 gr) procedentes del tejido muscular de pollos, inoculados por vía intramuscular dos horas antes del sacrificio con 1.000.000, 500.000, 100.000, 50.000 y 10.000 UI de penicilina

Fig. 5.—Cromatografía en lámina fina de sílica gel G de muestras de extractos musculares de pollos inoculados por vía intramuscular con a) 10^6 , b) 5×10^5 , c) 10^5 , d) 5×10^4 y e) 10^4 UI/Kg de penicilina G potásica.

Revelador: reactivo cloroplatínico. Rf. de la mancha n.º 1: 0,61.



G potásica por Kg de peso. Los residuos de las extracciones fueron resuspendidos en 1 ml de agua destilada estéril y centrifugados para eliminar la fase lipídica. Alícuotas de $10 \mu\text{l}$ procedentes de la fase acuosa de los diferentes extractos se cromatografiaron en lámina fina en las condiciones descritas anteriormente. El cromatograma fue revelado con el reactivo cloroplatínico, obteniéndose los resultados que aparecen en la gráfica de la Fig. 5.

Como puede apreciarse en esta figura, la cantidad mínima revelada por esta técnica fue la correspondiente a los residuos presentes en el músculo de pollo inoculado con la dosis de 100.000 UI/Kg. Experimentos llevados a cabo para valorar cuantitativamente por el método biológico la cantidad real de residuos de penicilina presentes en este músculo, dieron como resultado que esta cantidad era de 0,4 UI/gr de tejido. Como en la técnica de extracción y concentración de PEDERSEN (1965), se utilizan 10 gr de muestra y el extracto concentrado final se suspendió en 1 ml, es evidente que en este ml habría 4 UI. Ahora bien, habiendo ensayado en la prueba cromatográfica una cantidad de $10 \mu\text{l}$, en este volumen habría teóricamente 0,04 UI, cantidad ésta que es el límite de la sensibilidad de esta técnica, aplicada a muestras de tejido muscular y a disoluciones puras de penicilina (véase anteriormente).

Así pues, por lo que respecta a tejido muscular, la técnica de cromatografía en capa fina antes descrita, combinada con la extracción y concentración de las muestras, permite detectar únicamente cantidades de penicilina iguales o superiores a 0,4 UI/gr de músculo.

Esta sensibilidad es muy inferior a la obtenida con el método biológico de difusión en placas de agar (0,0025 UI/gr de tejido), por lo que en principio, no se considera adecuada para la determinación de residuos de penicilina en tejidos animales. Aún con las limitaciones de su escasa sensibilidad, la cromatografía en capa fina puede ser útil, en algunos casos, para la separación e identificación en muestras de tejidos animales de mezclas de penicilina y tetraciclinas.

MATERIAL Y METODOS GENERALES

Microorganismo prueba. Como microorganismo de ensayo se utilizó la cepa de *Sarcina lutea* ATCC 9341, suministrada por la American Type Culture Collection.

Medios de cultivo. Como agar base se utilizó el Antibiotic Medium 1 y como Agar siembra el Antibiotic Medium 4. Como inóculo del microorganismo test se empleó el caldo Antibiotic Medium 3. Todos estos medios procedían de la firma DIFCO.

La composición de los referidos medios es la siguiente (por litro):

Antibiotic Medium 1: Extracto de carne	1,5 gr
Extracto de levadura	3,0 gr
Casitona	4,0 gr
Peptona	6,0 gr
Glucosa	1,0 gr
Agar	15,0 gr
(pH 6,6, después de la esterilización).	
Antibiotic Medium 4: Extracto de carne	1,5 gr
Extracto de levadura	3,0 gr
Peptona	6,0 gr
Glucosa	1,0 gr
Agar	15,0 gr
(pH 6,6, después de la esterilización).	
Antibiotic Medium 3: Extracto de carne	1,5 gr
Extracto de levadura	1,5 gr
Peptona	5,0 gr
Glucosa	1,0 gr
Cloruro sódico	3,5 gr
Fosfato bipotásico	3,68 gr
Fosfato monopotásico	1,32 gr
(pH 7,0, después de la esterilización).	

Tampón fosfato de pH 6. Se disolvieron 8 gr de fosfato monopotásico y 2 gr de fosfato bipotásico hasta un litro con agua destilada, esterilizándose a continuación.

Tampón fosfato de pH 7. Se preparó disolviendo en agua destilada 113 gr de $\text{PO}_4\text{HNa}_2\text{H}_2\text{O}$ y 18 gr de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$, completando hasta un litro y esterilizando.

Cilindros. Se utilizaron cilindros de acero inoxidable con un diámetro externo de 8 mm (± 0.1 mm) y un diámetro interno de 6 mm (± 0.1 mm), siendo su longitud de 10 mm (± 0.1 mm).

Placas de Petri. Las placas utilizadas, de 103×20 mm, eran de vidrio neutro y fondo plano.

Limpieza y esterilización del material. Todo el material utilizado en los experimentos que se describen en esta tesis fue sometido previamente a una escrupulosa limpieza y a una esterilización adecuada, con el fin de evitar la posible presencia de sustancias inhibidoras del crecimiento bacteriano y de reducir al mínimo la contaminación. Del mismo modo y por iguales razones, todas las operaciones se realizaron con el máximo cuidado.

El material de vidrio se mantenía en remojo durante la noche en una solución detergente de Teepol, calentándose después hasta la ebullición. A continuación, el material se limpiaba escrupulosamente en la propia solución detergente, pasando luego agua de grifo primero y agua destilada después. El secado se verificaba en una estufa de aire forzado y la esterilización a 160°C durante 2-3 horas.

Los tapones de goma se limpiaban primero en una solución detergente Teepol, después se lavaban con agua de grifo abundante y finalmente con agua destilada. La esterilización se realizaba en autoclave.

Los cilindros se limpiaban según la técnica de KAVANAGH (1963), calentándolos hasta la ebullición en agua que contenía un 4 % de NaOH y un 12 % de etanol. Después se dejaban 15 minutos en este líquido caliente y luego se lavaban sucesivamente con agua corriente y con agua destilada. A continuación se hervían durante 15 minutos en agua destilada y una vez enfriados se mantenían un tiempo en etanol. Finalmente se colocaban sobre una gasa limpia para su secado. La esterilización se realizaba mediante calor seco a 160°C durante 2-3 horas.

Penicilinas valoradas. Las penicilinas utilizadas en todos los experimentos procedían de Antibióticos, S. A., León, y habían sido valoradas frente a un patrón de la Food and Drug Administration. Para su conservación en el laboratorio se mantuvieron en viales perfectamente cerrados en desecadores apropiados. Las soluciones stock se prepararon pesando cuidadosamente una pequeña cantidad de penicilina en una atmósfera con un 50 % o menos de humedad relativa y diluyéndola en tampón fosfato de pH 6 estéril. A partir de esta dilución stock se prepararon las diluciones necesarias en cada caso. Tanto las diluciones stock como las de trabajo se mantuvieron refrigeradas como máximo durante un período de dos días.

Mantenimiento y preparación del microorganismo de prueba. El germen de ensayo, *Sarcina lutea* ATCC 9341, se mantenía en tubos de agar inclinado de Antibiotic Medium 1, cerrados con tapón de rosca. Una vez sembrados los mencionados tubos, se incubaban a 32°C durante 18-20 horas, al término de

las cuales se conservaban en refrigeración, dando pases de nuevo a la cepa con un intervalo de dos semanas.

La preparación de la suspensión bacteriana se hizo, en líneas generales, según la técnica aconsejada por GROVE y RANDALL (1955), con las modificaciones de la temperatura de incubación y de la densidad de la suspensión:

- 1.º) Siembra del germen de prueba en tubo de agar inclinado de Antibiotic Medium 1.
- 2.º) Incubación a 32°C durante 18-20 horas.
- 3.º) Recogida del crecimiento bacteriano en 3 ml de caldo de Antibiotic Medium 3, con ayuda de perlas de vidrio estériles. Siembra de la suspensión bacteriana así obtenida en un frasco de Roux con 300 ml de agar Antibiotic Medium 1.
- 4.º) Incubación durante 18-20 horas a 32°C.
- 5.º) Recogida del crecimiento bacteriano con 15 ml de caldo Antibiotic Medium 3.
- 6.º) Ajuste de la suspensión bacteriana a un 10 % de transmitancia frente a un blanco de Antibiotic Medium 3. Se utilizó para ello un colorímetro «Bauch and Lomb» modelo Spectronic 20, a una $\mu = 650$ m μ . La suspensión bacteriana preparada de esta forma se conservó refrigerada como máximo durante una semana.

Preparación de las placas. Para añadir el agar base y el agar siembra, las placas de Petri, previamente esterilizadas, se colocaban sobre una superficie plana perfectamente nivelada. El agar base, previamente licuado, se vertía en las placas en la cantidad antes señalada (21 ml) con ayuda de una probeta estéril convenientemente graduada. A continuación se dejaba solidificar.

El agar siembra se mantenía líquido en un baño de agua a $47 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Se le añadía el inóculo en la proporción ya indicada (0,4 ml de inóculo por 100 ml de Antibiotic Medium 4), y se mezclaba convenientemente.

Una vez solidificada la capa de agar base, se añadía el agar siembra (4,5 ml por placa), teniendo sumo cuidado de que éste quedase uniformemente distribuido por toda la superficie. Ello se conseguía mejor calentando ligeramente la superficie del agar base con un mechero. Finalmente, se dejaba solidificar.

Una vez preparadas las placas del modo señalado, se utilizaban acto seguido.

Curva patrón. La curva patrón de valoración de penicilina se realizó, en líneas generales, según la técnica de KRAMER *et al.* (1968). Las concentraciones de penicilina* (0,0063, 0,0125, 0,025, 0,05, 0,10 y 0,20 UI/ml) se prepararon mezclando en el vaso de un homogeneizador 10 gr de tejido control (músculo de pechuga), procedente de un pollo alimentado con un pienso exento de

* Penicilina G potásica.

antibióticos, con 39 ml de tampón fosfato de pH 6 y 1 ml de una solución del antibiótico que contenía 50 veces la concentración deseada. Se llevó a cabo la homogeneización hasta conseguir una trituración adecuada del tejido. Una alícuota del homogeneizado se centrifugó a unas 2.000 r.p.m. durante 5 minutos y el sobrenadante fue la solución con la que se llenaron los cilindros. Se consideró como concentración de referencia la de 0,05 UI/ml.

En tres placas de Petri, previamente preparadas, se colocaron seis cilindros estériles en cada una, igualmente espaciados, equidistando del centro de la placa 2,8 cm, aproximadamente. Se llenaron alternativamente, con una pipeta estéril, tres cilindros de cada placa con la concentración de referencia (0,05 UI/ml) y los otros tres con la concentración de 0,0063 UI/ml. Este proceso se repitió para cada una de las restantes concentraciones estándar (0,0125, 0,025, 0,10 y 0,20 UI/ml). En total 15 placas. La concentración estándar más baja (0,0063 UI/ml) está pensada para que no se obtengan en ninguna de las tres placas halos de inhibición. La curva patrón se confeccionó con los diámetros correspondientes a los 45 halos de la concentración de referencia (15 placas) y con los de los 36 halos de las concentraciones estándar (12 placas).

Una vez llenados los cilindros, las placas se incubaron a 32°C durante 16-18 horas, en cuyo momento se realizó la lectura de resultados. El diámetro de los halos de inhibición se midió con un calibrador. En la Tabla V se dan los datos numéricos de todas las lecturas efectuadas, así como las medias y las medias corregidas. Primeramente, se calculó la media de las 45 determinaciones de la concentración de referencia (0,05 UI/ml). Esta media (19,06 mm) se llevó a la gráfica, constituyendo el denominado punto de corrección. A continuación, se calculó la media de la concentración de referencia y de la concentración estándar individualmente en cada placa de las tres que constituyen cada grupo. El valor de la media de la concentración estándar de cada placa sería correcto si la media de la concentración de referencia de la mencionada placa fuese la misma que el punto de corrección. En el caso de que esto no suceda, que es lo corriente, es preciso hacer una corrección. Así, por ejemplo, para la concentración estándar de 0,025 UI/ml, siendo el valor del punto de corrección de 19,06 y la media de la concentración de referencia en la placa número 1 de 18,73 ($\frac{18,7 + 18,5 + 19,0}{3} = 18,73$), la corrección para el mencio-

nado valor viene dada por la diferencia $19,06 - 18,73 = 0,33$. Como la media de la concentración de referencia en dicha placa es menor que el punto de corrección, esta diferencia (0,33) se suma a la media de las tres lecturas de la concentración estándar en dicha placa (si fuera mayor habría que restarla).

Siendo esta media igual a 13,20 ($\frac{13,4 + 12,6 + 13,6}{3} = 13,20$), tenemos que

TABLA V
 Datos numéricos utilizados para la confección de la curva patrón de valoración de penicilina
 (el diámetro de los halos producidos está expresado en mm. Neg. significa ausencia de halo)

Placas	Grupo 1		Grupo 2		Grupo 3		Grupo 4		Grupo 5	
	U/ml	0,05	U/ml	0,05	U/ml	0,05	U/ml	0,10	U/ml	0,20
1	Neg.	19,9	18,9	18,7	13,4	19,0	22,8	19,9	28,0	
	Neg.	18,0	17,9	18,5	12,6	19,3	22,8	19,7	28,0	
	Neg.	19,1	19,0	19,0	13,6	18,4	22,8	18,7	28,7	
2	Neg.	19,6	19,0	19,5	13,6	19,2	24,6	19,2	28,3	
	Neg.	18,7	18,4	19,3	13,0	19,9	24,5	19,0	27,5	
	Neg.	19,4	17,5	18,5	13,0	19,0	24,0	19,5	27,9	
3	Neg.	18,8	19,5	18,9	12,5	20,0	26,5	20,0	28,8	
	Neg.	19,3	19,3	19,5	13,6	19,7	24,5	18,4	28,0	
	Neg.	18,8	18,7	18,7	13,3	19,1	25,0	18,7	27,7	
Media				9,55	13,17		24,16		28,10	
Media de las 45 determinaciones de la concentración referencia (0,05 U/ml) = 19,06										
Media corregida				9,81	13,28		23,93		27,92	

13.20 + 0.33 = 13.53. que es el valor corregido de la concentración estándar en dicha placa.

Cálculos semejantes realizados en las placas números 2 y 3. dan valores corregidos de 13. 16 y 13.16. respectivamente. Luego, el valor final de la media corregida para la concentración estándar de 0.025 UI/ml es de 13.28 $\left(\frac{13.53 + 13.16 + 13.16}{3} \right) = 13.28$. Este valor es el que se lleva a la gráfica.

Los valores de las medias corregidas correspondientes a las concentraciones estándar (0.0125, 0.025, 0.10 y 0.20 UI/ml) y el valor de la media de la concentración de referencia (punto de corrección) se llevaron a un papel semilogarítmico de dos ciclos colocando las concentraciones en UI/ml en la escala logarítmica (ordenadas) y los diámetros de los halos en mm en la escala aritmética (abscisas).

El trazado de la línea recta de la gráfica de la Fig. 6 se ha realizado por inspección visual. KRAMER *et al.* (1968) dan las siguientes ecuaciones para el trazado de esta recta:

$$L = \frac{3a + 2b + c - e}{5}$$

$$H = \frac{3e + 2d + c - a}{5}$$

donde, L y H = diámetro calculado de los halos para las concentraciones más baja y más alta (0.0125 y 0.2 UI/ml), respectivamente.

c = media de las 45 determinaciones de la concentración de referencia (punto de corrección).

a, b, d, e = media de los diámetros corregidos para cada una de las cuatro concentraciones utilizadas para el trazado de la curva patrón.

Tejido control utilizado en los experimentos de la curva patrón. El tejido control utilizado en los experimentos para la confección de la curva patrón procedía de un pollo que había sido alimentado con un pienso exento de antibióticos y carecía de acción inhibidora del crecimiento de *Sarcina lutea*. La demostración de este hecho se llevó a cabo utilizando músculo del mismo animal y sometiéndolo al ensayo que se describe a continuación. A 10 gr de músculo se añadieron 40 ml de tampón fosfato de pH 6 y la mezcla se homogeneizó convenientemente. Una alícuota del homogeneizado se centrifugó a 2.000 r.p.m. durante 5 minutos y con el sobrenadante se llenaron los cilindros. Se hicieron tres placas con seis cilindros cada una. Tres de ellos se llenaron con la concentración de referencia de penicilina y los otros tres con líquido control. Las placas se incubaron durante 16-18 horas a 32°C.

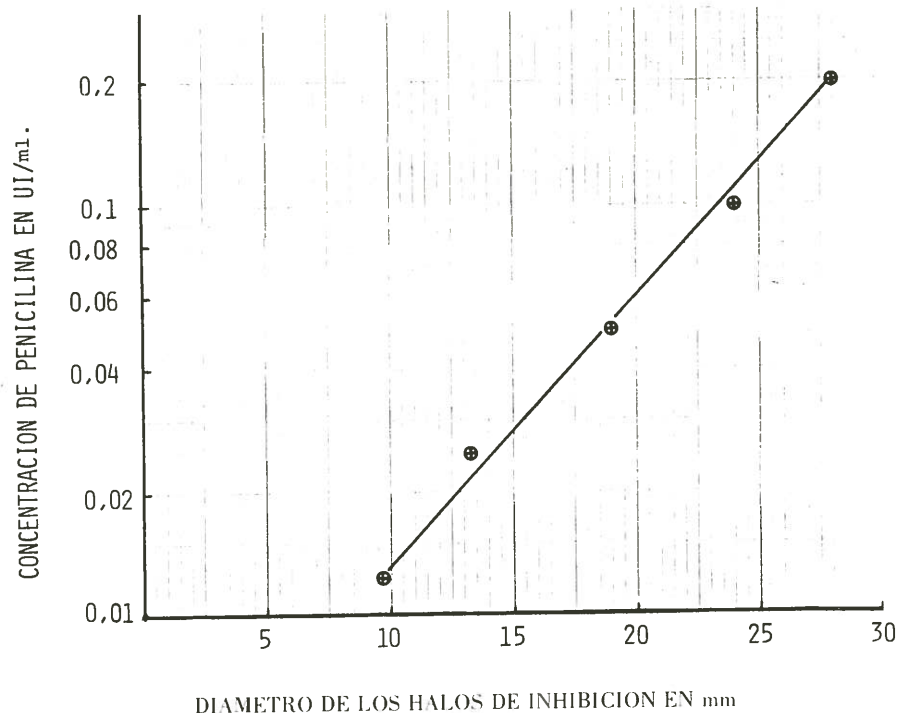


Fig. 6.-Curva patrón de valoración de penicilina. (Las concentraciones estándar utilizadas para la confección de esta curva fueron las siguientes: 0.0063, 0.0125, 0.025, 0.10 y 0.20. La concentración de referencia fue 0.05).

Como puede apreciarse en la Tabla VI, el tejido control estaba exento de sustancias de acción antimicrobiana, ya que no se produjeron halos de inhibición.

Animales de experimentación. En los experimentos que se describen en esta tesis se utilizaron pollos broiler adquiridos de una firma comercial a los 15-20 días de edad. Se mantuvieron en baterías apropiadas y se alimentaron con un pienso exento de antibióticos. La composición de este pienso corresponde a una fórmula para pollos de carne (acabado) y se da en la Tabla VII. La fórmula fue preparada y su composición calculada en las instalaciones de Antibióticos, S. A., León.

Determinación de residuos de penicilina en tejidos animales por el método de KRAMER et al. (1968).

a) *Preparación de las muestras.* Una vez sacrificado el animal, se obtenían, con sumo cuidado para evitar la contaminación, muestras de tejido (músculo, hígado, riñón). Las muestras se depositaban en placas de Petri estériles y a continuación se eliminaban el tejido conjuntivo visible, vasos, etc. Acto seguido, se pesaban 10 gr de cada muestra en el vaso de un homogenei-

TABLA VI
Ausencia de efecto antimicrobiano del tejido control utilizado en los experimentos de la curva patrón (el diámetro de los halos producidos está expresado en mm. Neg. significa ausencia de halo)

Placas	Concentración de referencia (0.05 UI/ml)	Tejido control
1	19.3	Neg.
	19.3	Neg.
	18.6	Neg.
2	19.2	Neg.
	18.4	Neg.
	18.9	Neg.
3	18.5	Neg.
	18.7	Neg.
	19.0	Neg.
Media	18.85	

TABLA VII
Fórmula del pienso empleado en la alimentación de los pollos utilizados en los experimentos realizados (exento de antibióticos)

	Composición %
Maíz	67.270
Alfalfa deshidratada	2.000
Harina de soja (45%)	24.500
Harina de pescado (60%)	3.000
Sal común	0.250
Fosfato bicálcico	1.800
Carbonato cálcico	0.700
DL - Metionina	0.030
Cebín-B-12 «100»	0.050
Cebín-NS-pollos carne	0.400

COMPOSICION CALCULADA

Proteína bruta %	19.24
Fibra bruta %	3.60
Cal. metabolizables/Kg	3.048.10
Relación calorías/proteínas	158.00
Calcio %	1.00
Fósforo	0.61
Metionina %	0.42
Cistina %	0.29

zador MSE mod. 7.700 y se añadían 40 ml de tampón fosfato de pH 6, homogeneizándose durante un minuto aproximadamente. Una alícuota del homogeneizado se centrifugaba a 2.000 r.p.m. durante 5 minutos y el sobrenadante se utilizaba como muestra a ensayar.

b) *Ensayo de las muestras.* Para el ensayo de cada muestra se empleaban tres placas. En cada placa, la muestra se depositaba, con ayuda de una pipeta estéril, en tres cilindros, alternativamente con la concentración de referencia de penicilina (0,05 UI/ml), que se ensayaba en los otros tres cilindros. La concentración de referencia de penicilina se preparaba en la forma indicada anteriormente. A continuación, las placas se incubaban durante 16-18 horas a 32°C, procediéndose después a la lectura de resultados, con medida del diámetro de los halos de inhibición producidos.

En todos los experimentos, se utilizaron como controles tejidos procedentes de animales del mismo lote, alimentados con piensos libres de antibióticos.

c) *Cálculo del contenido de residuos de las muestras.* Para calcular el contenido de residuos de las muestras, primeramente se hallaba la media de los diámetros en mm de los 9 halos de la concentración de referencia y la media de los diámetros de los 9 halos correspondientes a la muestra ensayada. Si la media de los halos de la concentración de referencia era menor que la media de los halos de la muestra, la diferencia entre ambas medias se sumaba al valor del punto de referencia de la curva patrón. Si era mayor, la diferencia se restaba del mencionado valor.

La cifra así obtenida se llevaba a la curva patrón, leyéndose la concentración del antibiótico en UI/ml. Como la preparación de las muestras de tejidos para su ensayo suponía una dilución 1:5 de los mismos, para calcular la concentración real de los residuos en los mencionados tejidos (en UI/gr), la concentración leída en la curva patrón se multiplicaba por 5.

d) *Sensibilidad del método.* La sensibilidad de este método es de 0,0625 UI de penicilina/gr de tejido.

Modificaciones introducidas. En los experimentos que se describen en esta tesis se ha utilizado el método de difusión con cilindros en placas de agar inoculadas con *Sarcina lutea* ATCC 9341 para la determinación de residuos de penicilina en tejidos animales, en la forma que ha sido detallada anteriormente en este capítulo.

En líneas generales, el procedimiento descrito sigue las instrucciones dadas por KRAMER *et al.* (1968) para la determinación de residuos de antibióticos, y en particular de penicilina, en leche, productos lácteos y tejidos animales. Sin embargo, hemos introducido algunas modificaciones. Estas modificaciones se refieren, fundamentalmente, a la cantidad de agar base y agar siembra utilizados, al ajuste de la suspensión bacteriana y a la cantidad de esta suspensión añadida a 100 ml de agar siembra. KRAMER *et al.* (1968) aconsejan utilizar cantidades de agar base de 10 ml y de agar siembra de 4 ml (para

placas de Petri de 20 × 100 mm). Nosotros hemos utilizado cantidades de 21 y 4,5 ml, respectivamente (para placas de Petri de 20 × 103 mm), debido a que con las cantidades aconsejadas por los autores mencionados se producían con las concentraciones más elevadas halos cuyo excesivo diámetro (para el tamaño de las placas utilizadas) determinaba que contactasen y aún se superpusiesen unos halos con otros.

Por lo que respecta a la preparación de la suspensión bacteriana (inóculo) y a la cantidad de esta suspensión añadida a 100 ml de agar siembra, la técnica que hemos seguido no ha sido la aconsejada por KRAMER *et al.* (1968) sino la clásica de GROVE y RANDALL (1955) aunque con dos modificaciones. Las modificaciones introducidas en esta técnica se refieren a la temperatura de incubación y al ajuste de la suspensión. Estos últimos autores aconsejan que la incubación se haga a 26°C. Nosotros hemos preferido la temperatura de 32°C porque ello permite leer antes los resultados. GROVE y RANDALL (1955) indican que la densidad de la suspensión bacteriana madre se ajuste de tal modo que cuando se diluya 1:10 se obtenga una transmitancia del 10 % a 650 mμ. La cantidad de suspensión bacteriana madre por cada 100 ml de agar siembra debe determinarse, según estos autores, experimentalmente. En nuestro caso, no hemos utilizado como inóculo la suspensión madre, sino la propia dilución ajustada al 10 % de transmitancia, fundamentalmente por dos razones: en primer lugar, porque la suspensión madre contiene agregados visibles macroscópicamente difíciles de romper y, en segundo, porque este procedimiento resulta, a nuestro juicio, más práctico. Experimentalmente se comprobó que la cantidad óptima de esta dilución ajustada a añadir por cada 100 ml de agar siembra era de 0,4 ml, y ésta ha sido la utilizada.

Determinación de residuos de penicilina en tejidos animales por el método de extracción y concentración de PEDERSEN (1965).

a) *Preparación de las muestras.* En los casos en que la concentración de residuos de penicilina esperada en los tejidos animales era muy pequeña y, por tanto, la técnica de preparación de las muestras de KRAMER *et al.* (1968) antes descrita iba a dar, en muchos casos, resultados negativos, se utilizó para la preparación de las muestras el método de extracción y concentración de PEDERSEN (1965), adaptado a nuestras condiciones de trabajo y modificado en lo que se refiere a la muestra a ensayar. Este método lleva consigo primero la extracción del antibiótico y después la evaporación de los líquidos de extracción con ayuda de vacío, lo que determina una mayor sensibilidad del mismo. A continuación se describe el método de preparación de las muestras, tal como nosotros lo hemos realizado.

Se pesaron 10 gr del tejido a ensayar en el vaso de un homogeneizador MSE mod. 7.700 y se añadieron 5 ml de una solución acuosa saturada de oxalato sódico, previamente esterilizada. Esta solución se preparaba disolviendo 40 gr de oxalato sódico en 1.100 ml de agua destilada. Colocando

previamente una camisa de hielo, se homogeneizó durante un minuto aproximadamente. Acto seguido, se añadieron al homogeneizado 5 ml de una solución tampón estéril de tetrasemina (0.4 gr de Titriplex III, MERCK, disueltos en 20 ml de solución tampón fosfato de pH 7 y completando hasta 1.000 ml con agua destilada). Se homogeneizó por segunda vez durante un minuto aproximadamente. Se añadieron, a continuación, 20 ml de acetona (MERCK) y se homogeneizó del mismo modo por tercera vez. Finalmente, se añadieron otros 30 ml de acetona, cuidando de arrastrar con ella los restos depositados sobre el vástago y las cuchillas del homogeneizador. Tapado el vaso con un tapón de goma estéril, se agitó hasta conseguir una mezcla homogénea.

El homogeneizado se mantuvo después en refrigeración durante una hora para permitir la extracción del antibiótico. Pasado este tiempo, se vertió en un tubo de centrifuga estéril de unos 100 ml de capacidad, con tapón de rosca, cuidando de recoger al máximo el contenido del vaso del homogeneizador mediante lavado de sus paredes con una pequeña cantidad de acetona. Ya recogido el homogeneizado en el tubo de centrifuga, se centrifugó en una centrifuga MSE mod. Super Minor a 3.000 r.p.m. durante 5 minutos. El sobrenadante se vertió en un matraz redondo de 250 ml de capacidad, acoplable a una cabeza múltiple de un Rotavapor Büchi mod. RE. El equipo de evaporación a vacío estaba constituido por el mencionado Rotavapor, por un aparato «Quickfit» de liofilización, por una bomba de alto vacío Edward mod. ED-35 y por dos condensadores de acetona - nieve carbónica.

El proceso de evaporación se realizó en dos fases. Primeramente se evaporó la mayor parte de la acetona haciendo girar la cabeza múltiple en un baño termostático a 35-40°C y conectando el Rotavapor a una trompa de agua. Se tenía especial cuidado en esta fase de que el líquido no hirviese de forma turbulenta y pudiese ser proyectado del matraz, regulando el vacío.

La segunda fase de evaporación se llevó a cabo acoplando el Rotavapor al aparato de liofilización y éste al sistema de vacío, hasta conseguir una desecación total. Al comienzo de esta segunda fase se tenía también especial cuidado para evitar la ebullición tumultuosa del líquido.

Una vez conseguida la desecación total, el matraz se retiraba del equipo de evaporación y se añadían al mismo dos ml de solución tampón fosfato de pH 7 esterilizada, con una pipeta también estéril. Se procuraba pasar los dos ml de solución tampón por toda la superficie interna del matraz, con el fin de arrastrar todas las partículas desecadas. Este líquido constituía la muestra que se ensayaba.

b) *Ensayo de las muestras.* El ensayo de las muestras se llevó a cabo de forma idéntica a la indicada anteriormente en el método de KRAMER *et al.* (1968), con la única variante de que antes de su incubación las placas se mantenían en refrigeración durante 1,5-2 horas, para permitir la difusión del antibiótico antes de iniciarse el crecimiento de *Sarcina lutea*.

En todos los experimentos se utilizaron también como controles tejidos procedentes de animales del mismo lote, que habían sido alimentados con piensos libres de antibióticos.

c) *Cálculo del contenido de residuos de las muestras.* El cálculo del contenido de residuos de las muestras se efectuaba de modo idéntico al indicado anteriormente en el método de KRAMER *et al.* (1968), con la modificación lógica derivada de la dilución de las muestras. En este caso, como la cantidad total de residuos presentes en 10 gr de tejido de la muestra estaban finalmente concentrados en un volumen de 2 ml y la lectura en la curva patrón viene expresada en UI/ml, los residuos en la muestra de tejido se calculaban por la fórmula siguiente:

$$\text{Residuos en UI/gr de tejido} = \frac{\text{Lectura en la curva patrón en UI/ml} \times 2}{10}$$

d) *Sensibilidad del método.* La sensibilidad de este método es de 0,00250 UI de penicilina/gr de tejido.

Modificaciones introducidas. Las modificaciones sustanciales que hemos introducido en el procedimiento de PEDERSEN (1965) de preparación de los tejidos para la determinación de residuos de penicilina, se refieren a la muestra que se ensaya. Este autor concentra el extracto de tejido hasta un volumen de, aproximadamente, un ml, al que somete a valoración. En nuestro caso, hemos concentrado hasta la desecación y los residuos los hemos resuspendido en 2 ml de solución tampón fosfato de pH 7. Esta suspensión constituía la muestra de ensayo.

Estas modificaciones fueron aconsejadas en primer lugar porque al neutralizar las muestras se reducía la posibilidad de aparición de halos no específicos, problema de considerable importancia cuando se ensayan extractos musculares. En segundo lugar, porque de este modo se simplificaba el cálculo del contenido en residuos de las muestras. Y, finalmente, por la imposibilidad de llenar convenientemente con el volumen de un ml de los tres cilindros necesarios para el ensayo de cada muestra.

CAPITULO IV

RESIDUOS DE PENICILINA G BENZATINA EN TEJIDOS DE POLLOS ALIMENTADOS CON PIENSOS ADICIONADOS DE ESTE ANTIBIOTICO

INTRODUCCION

La penicilina se utiliza corrientemente añadida a los piensos para animales con fines distintos: como estimulante del crecimiento en animales jóvenes a niveles de 2-50 ppm, en la prevención de enfermedades a niveles de 20-200 ppm y para su tratamiento a niveles de 100-500 ppm. Este antibiótico se usa de modo general como estimulante del crecimiento, bien solo o en unión de otros antibióticos o antimicrobianos, en los piensos para pollos, cerdos, terneros y corderos. El cambio en los sistemas de explotación animal ha determinado también la utilización generalizada de los procedimientos de prevención y tratamiento colectivo de enfermedades por inclusión del antibiótico en el pienso. Este uso masivo de la penicilina, como el de otros antibióticos, en producción animal, ha determinado la presencia en los alimentos de origen animal de residuos de estas sustancias, residuos que al ser ingeridos con los alimentos pueden suponer riesgos para el consumidor. Por lo que respecta a la penicilina, los riesgos alérgicos son los más espectaculares. Otro problema que lleva consigo la adición de penicilina a los piensos es el desarrollo de resistencia por parte de algunas bacterias patógenas para los animales. A la repercusión en terapéutica veterinaria que esta circunstancia supone se suma el hecho de interés epidemiológico de que, siendo alguna de estas bacterias también patógenas para el hombre, pueden determinar en él enfermedades que no responden a una terapéutica específica.

Estos riesgos han sido la causa de la preocupación por parte de los higienistas de los alimentos por conocer la cuantía de los residuos presentes en los alimentos obtenidos de los animales alimentados con estos piensos adicionados de antibióticos y su permanencia en los mismos, así como su repercusión en la salud pública. Sin embargo, por lo que respecta a la penicilina, se cuenta con pocos datos sobre la cuantía de los residuos presentes en tejidos animales. Además, los resultados de los trabajos realizados son muchas veces difícilmente comparables por la diferente sensibilidad de las técnicas utilizadas.

En el presente capítulo de esta tesis aportamos algunos datos al conocimiento de la cuantía y de la persistencia de los residuos de penicilina G benzatina en músculo, hígado y riñón de pollos alimentados con piensos adicionados de este antibiótico a niveles de 10, 50, 100 y 500 ppm. Estos

niveles son semejantes a los que se utilizan en la práctica. Se ha elegido esta forma de penicilina por ser la que con más frecuencia se añade a los piensos, en razón, fundamentalmente, de su mayor estabilidad en los mismos.

MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron pollos broiler de unos 20 días en el momento de iniciar la alimentación con el pienso antibiótico suplementado. Los animales recibieron este pienso *ad libitum* durante 21 días. El pienso utilizado correspondía a una fórmula de acabado para broilers (véase Tabla VII) y estaba exento de residuos de Antibióticos. A lotes distintos del mismo, se añadió penicilina G benzatina a niveles de 10, 50, 100 y 500 ppm*. Después de haber interrumpido la administración del pienso antibiótico suplementado, se sacrificaban tres animales de cada lote a las 0, 12, 24, 48, 72, 96, 120 y 144 horas. Inmediatamente después del sacrificio de cada animal, se tomaban muestras de los músculos de la pechuga, del hígado y del riñón. Las muestras de idénticos tejidos de los tres animales se mezclaban a partes iguales y acto seguido se llevaban al congelador. Así se obtenía la muestra de ensayo. La permanencia de las muestras en congelación nunca fue mayor de una semana. A cada uno de los tiempos señalados antes, se sacrificaba también un pollo testigo, correspondiente a un lote de animales alimentados con el mismo pienso, pero sin adición de antibiótico, y sus tejidos se trataban y ensayaban del mismo modo.

Las determinaciones cuantitativas de residuos de penicilina en tejidos de pollo se llevaron a cabo por el método biológico de difusión en placas de agar inoculadas con *Sarcina lutea* ATCC 9341, según la técnica de KRAMER *et al.* (1968), con las modificaciones señaladas en el capítulo de Material y Métodos Generales. La curva patrón utilizada para las valoraciones del antibiótico fue la representada en la Fig. 6. Tanto para la curva patrón como para todas las determinaciones analíticas, la preparación de la suspensión bacteriana se llevó a cabo siguiendo la técnica de GROVE y RANDALL (1955), con las modificaciones señaladas en el capítulo de Material y Métodos Generales.

Teniendo en cuenta que los residuos presentes en músculos y vísceras de los animales después de la administración del antibiótico en el pienso a los niveles antes indicados iban a ser muy pequeños y, por tanto, no detectables por las técnicas corrientes de extracción, se utilizó la técnica de extracción y concentración de PEDERSEN (1965), modificada del modo indicado en el capítulo de Material y Métodos Generales. Esta técnica lleva consigo la extracción de la

* Las mezclas de materias primas y la adición del antibiótico se hicieron en las instalaciones de Antibióticos, S. A., León.

penicilina presente en 10 gr de muestra y la evaporación subsiguiente del solvente por medio del vacío. La sensibilidad que hemos conseguido con esta técnica es de 0.00250 UI/gr de tejido.

RESULTADOS

En la Tabla VIII se señalan los residuos encontrados en los animales a los que se les administró un pienso adicionado de 500 ppm de penicilina G benzatina. La concentración máxima se encontró en el hígado (0.0358 UI/gr) a la hora 0 y la máxima permanencia en hígado y riñón donde hasta los 5 días se detectaron residuos, aunque no medibles cuantitativamente (inferiores a 0.00125 UI/gr). Los resultados del experimento correspondiente al nivel de 100 ppm están recogidos en la Tabla IX. También en este caso la cifra máxima de residuos (0.0044 UI/gr) se encontró en el hígado a la hora 0. La permanencia máxima del antibiótico se registró en el riñón (hasta los 4 días). La Tabla X corresponde a los resultados obtenidos con el nivel de 50 ppm. En este caso, la concentración máxima a la hora 0 no se encontró en el hígado, sino en riñón y músculo (0.0036 y 0.00336 UI/gr, respectivamente). El hígado registró la máxima permanencia (hasta los 4 días). Finalmente, en la Tabla XI se dan los datos relativos al experimento con el nivel de 10 ppm. Los residuos máximos a la hora 0 correspondieron al riñón e hígado (0.0032 y 0.0034 UI/gr, respectivamente) y hasta los 2 días se encontraron residuos en riñón.

En la Tabla XII se dan los datos conjuntos de los cuatro experimentos.

DISCUSION

Los resultados obtenidos por diversos autores en experimentos de administración de antibióticos con el pienso y análisis de residuos en los tejidos difieren significativamente en función de las diversas técnicas de valoración utilizadas y de su distinta sensibilidad. Los que emplean técnicas de escasa sensibilidad obtienen a menudo resultados negativos aún a niveles de administración de 200-300 ppm. En cambio, los que utilizan técnicas muy sensibles encuentran residuos incluso a niveles muy bajos de administración del antibiótico (5-10 ppm).

Los resultados por nosotros obtenidos, como corresponde a la técnica utilizada (sensibilidad 0.00250 UI/gr), coinciden más con los que dan los trabajos del segundo grupo.

Considerados en conjunto los experimentos cuyos resultados se indican en las Tablas VIII, IX, X, XI y XII, cabe concluir que a los niveles más altos de administración del antibiótico se encontraron residuos más elevados y perma-

TABLA VIII
Residuos de penicilina G benzatina, expresados en UI/gr de muestra, en tejidos de pollos alimentados con piensos adicionados de este antibiótico al nivel de 500 ppm.

Tejido	Tiempo en horas después de haber cesado la administración						
	0	12	24	48	72	96	120
Músculo	0.0162	0.0068	0.0044	0.00278	+	+	+
Hígado	0.0358	0.00278	+	+	+	+	+
Riñón	0.0037	0.0034	0.00278	+	+	+	+

+ Positivo, pero no medible cuantitativamente.
+ Ligeramente positivo.
- Negativo (ausencia de residuos).

TABLA IX
Residuos de penicilina G benzatina, expresados en UI/gr de muestra, en tejidos de pollos alimentados con piensos adicionado de este antibiótico al nivel de 100 ppm.

Tejido	Tiempo en horas después de haber cesado la administración						
	0	12	24	48	72	96	120
Músculo	0.00278	+	+	+	+	—	—
Hígado	0.0044	+	—	+	+	—	—
Riñón	0.00335	+	+	+	+	+	—

+ Positivo, pero no medible cuantitativamente.
+ Ligeramente positivo.
- Negativo (ausencia de residuos).

TABLA X
Residuos de penicilina G benzatina, expresados en UI/gr de muestra, en tejidos de pollos alimentados con piensos adicionado de este antibiótico al nivel de 50 ppm.

Tejido	tiempo en horas después de haber cesado la administración						
	0	12	24	48	72	96	120
Musculo	0.00336	+	+	+	—	—	—
Higado	+	+	+	+	+	+	—
Rinon	0.0036	0.0029	0.0029	+	—	—	—

+ Positivo, pero no medible cuantitativamente.
- Negativo (ausencia de residuos).

TABLA XI

Residuos de penicilina G benzatina, expresados en UI/gr de muestra, en tejidos de pollos alimentados con pienso adicionado de este antibiótico al nivel de 10 ppm.

Tejido	tiempo en horas después de haber cesado la administración							
	0	12	24	48	72	96	120	144
Músculo	+	+	+	-	-	-	-	-
Hígado	0.0034	-	-	-	-	-	-	-
Riñón	0.0032	0.0028	0.0027	+	-	-	-	-

+ = Positivo, pero no medible cuantitativamente.
- = Negativo (ausencia de residuos).

TABLA XII

Residuos de penicilina G benzatina, expresados en UI/gr de muestra, en tejidos de pollos alimentados con pienso adicionado de este antibiótico

TIEMPO EN HORAS

		0	12	24	48	72	96	120	144
500 ppm	M	0.0162	0.0068	0.0044	0.00278	+	+	±	-
	H	0.0358	0.00278	+	+	+	+	±	-
	R	0.0037	0.0034	0.00278	+	+	+	+	-
100 ppm	M	0.00278	+	+	+	±	-	-	-
	H	0.0044	+	-	±	±	-	-	-
	R	0.00335	+	+	+	+	+	-	-
50 ppm	M	0.00336	+	+	+	+	-	-	-
	H	+	+	+	+	+	+	-	-
	R	0.0036	0.0029	0.0029	+	-	-	-	-
10 ppm	M	+	+	+	-	-	-	-	-
	H	0.0034	-	-	-	-	-	-	-
	R	0.0032	0.0028	0.0027	+	-	-	-	-

M = Músculo, H = Hígado, R = Riñón.
+ = Positivo, pero no medible cuantitativamente.
± = Ligeramente positivo.
- = Negativo (ausencia de residuos).

nencias más prolongadas. La permanencia máxima se observó en el riñón, siendo el hígado el que presentó una concentración máxima. En el músculo, la permanencia del antibiótico y su concentración fueron, en términos generales, las más inferiores.

FEVRIER *et al.* (1955), administraron a cerdos de forma prolongada niveles de 20 ppm primero y 10 ppm después de penicilina, no encontrando residuos en sangre ni en hígado, aunque sí en músculos. GORDON (1956), no encontró residuos de este antibiótico en sangre, hígado y músculo de cerdos alimentados con piensos adicionados del mismo a niveles de hasta 16 ppm; cuando los niveles superaban esta cifra comenzaban a detectarse residuos. TAYLOR (1963), obtuvo iguales resultados negativos con niveles de 5 a 20 ppm y claramente positivos con niveles de 50 a 200 ppm. COVER y LUDWIG (1957) alimentaron aves durante 5 días con piensos adicionados de penicilina a niveles de 200, 400, 600, 800, 1.000 y 1.500 ppm e investigaron los residuos en suero sanguíneo. Unicamente a partir del nivel de 800 ppm los residuos fueron positivos. Estos resultados, que difieren de los obtenidos por nosotros, deben atribuirse a que la técnica de valoración utilizada por estos autores no es adecuada en razón de su falta de sensibilidad (0,025 UI/0,2 ml de suero).

PEDERSEN (1965), alimentando pollos durante seis semanas con un pienso adicionado de 5 ppm de penicilina G procaína, encontró residuos máximos en riñón e hígado, del orden de 0,007 y 0,0014 UI/gr, respectivamente, cifras comparables a las obtenidas por nosotros con el nivel de 10 ppm.

PILET y TOMA (1969) no encontraron residuos ni en hígado ni en músculo de pollos alimentados durante cuatro semanas con un pienso adicionado de 200 ppm de penicilina G sódica. Ello debe atribuirse también a la escasa sensibilidad del método utilizado por estos autores (0,05 UI/gr de tejido).

LOFTSGAARD *et al.* (1968) alimentaron cerdos durante tres semanas con piensos adicionados de 15, 50 y 100 ppm de penicilina G procaína. A los niveles de 15 y 50 ppm no encontraron residuos al tiempo 0 en músculo ni en hígado, pero sí en riñón. En este órgano, los residuos oscilaban entre 0 y 0,006 UI/gr (para el nivel de 15 ppm) y entre 0,1 y 0,002 UI/gr (para el nivel de 50 ppm). Al nivel de 100 ppm, los residuos en riñón oscilaban entre 0,238 y 0,003 UI/gr, en el músculo entre 0 y 0,005 UI/gr y en el hígado entre 0 y 0,012 UI/gr. La sensibilidad de la técnica utilizada por estos autores era de 0,001 a 0,0025 UI/gr de tejido.

MESERSMITH (1967) no encontró residuos en músculo, hígado y riñón de cerdos a los que administró con el pienso durante 98 días dosis de 50 ppm de penicilina. La sensibilidad de la técnica utilizada era de 0,025 UI/gr. VAN SCHOTHORST (1969) tampoco detectó residuos en diversos tejidos de cerdos y terneros alimentados con piensos adicionados de penicilina a niveles de 150 ppm (cerdos) y 30, 150 y 300 ppm (terneros), a las 16 horas de interrupción de la administración de los piensos antibióticosuplementados. A los niveles de 150

y 300 ppm encontró residuos (0,2-0,6 UI/ml) en la orina. La sensibilidad de la técnica era de 0,1 UI/gr. Tanto en estos experimentos de VAN SCHOTHORST como en los de MESERSMITH citados antes, los resultados negativos se deben sin duda a la insuficiente sensibilidad de las técnicas utilizadas.

BAROUTCHEVA (1969) llevó a cabo experimentos de administración continuada a pollos durante 5 días de penicilina con el agua de bebida a dosis de 1 gr/litro (= 1.000 ppm). Este autor encontró residuos en músculo e hígado hasta las 48 horas después de haber cesado la administración. FRERES y BORIES (1970) no encontraron residuos en músculo ni en hígado de cerdos alimentados con piensos adicionados de 50 ppm de penicilina.

Como ya hemos señalado anteriormente, las reacciones de tipo alérgico constituyen los efectos secundarios más comunes y espectaculares de la penicilina (IDSOE *et al.*, 1968). No es fácil discutir, sin embargo, el problema de la relación entre la cuantía de los residuos de este antibiótico presentes en los alimentos y la posibilidad de determinar en el consumidor riesgos alérgicos o de otro tipo. BARNUM (1973) señala que la hipersensibilidad a la penicilina puede alcanzar el 10 % de la población, pero que no se conoce en qué cuantía contribuyen los residuos de este antibiótico presentes en los alimentos a esta sensibilización.

GOUNELLE y SZAKVARY (1966) llevaron a cabo una encuesta entre médicos franceses sobre la importancia de los residuos de antibióticos en alimentos en la presentación de casos clínicos de alergia. Por lo que respecta a la penicilina, los citados autores recogen una serie de accidentes alérgicos asociados con el consumo de leche, carne de aves, carne de mamíferos y huevos. Diversos autores citan casos clínicos de alergia imputables al consumo de leche y, en algún caso, de productos lácteos (VICKERS, BAGRATUNI y ALEXANDER, 1958; ERSKINE, 1958; ZIMMERMAN, 1959; BORRIE y BARRETT, 1961; MUNCH - PETERSEN, 1962). Del examen de la bibliografía sobre este tema puede concluirse que la mayoría de los accidentes alérgicos producidos por la ingestión de alimentos con residuos de penicilina tuvieron lugar en personas sensibilizadas que habían tomado leche que contenía dicho antibiótico.

Se desconocen, sin embargo, las dosis mínimas de penicilina necesarias, tomadas por vía oral con los alimentos, para sensibilizar a un individuo. En general, los accidentes alérgicos se deben a dosis terapéuticas administradas por vía parenteral y no a residuos ingeridos con los alimentos. Es poco también lo que se sabe sobre la dosis desencadenante, vía alimentos, de fenómenos alérgicos en personas previamente sensibilizadas (RAYNAUD, 1969). Según SIEGEL (1959) serían suficientes 0,4 UI de penicilina tomadas por vía oral para desencadenar una reacción alérgica en personas previamente sensibilizadas. Según BERKOWITZ (1953) bastarían tres millonésimas de unidad. Es evidente la falta de datos experimentales y la necesidad de un mejor conocimiento de la

dosis de penicilina vía alimentos necesarias tanto para sensibilizar a una persona como para desencadenar una reacción anafiláctica.

La sensibilidad a la penicilina es frecuente en personas que tienen contacto profesional con este antibiótico. POTOTSKI *et al.* (1962) encontraron que el 51,2 % de las personas que trabajaban en una fábrica de penicilina estaban sensibilizadas a este antibiótico.

Aún siendo los accidentes alérgicos más espectaculares, tiene mayor importancia desde el punto de vista de la sanidad animal y de la salud pública el desarrollo de resistencia a este antibiótico por parte de ciertas bacterias patógenas, como resultado de su adición a los piensos para animales. Sin embargo, la bibliografía es también en este aspecto bastante confusa. Según la OMS (1970), como las penicilinas que más se utilizan añadidas a los piensos (penicilina G benzatina y penicilina G procaína) no tienen acción inhibitoria, o la tienen sólo a grandes dosis, sobre las bacterias intestinales Gram negativas, no es probable que su empleo no médico dé lugar al desarrollo de bacterias portadores de factores R (resistencia extracromosómica transferible). Sin embargo, otras penicilinas de amplio espectro (ampicilina, etc.) son activas frente a gérmenes Gram negativos y pueden participar en el desarrollo de este tipo de resistencia. De hecho existen trabajos que demuestran la existencia de enterobacteriaceas patógenas para animales resistentes a la ampicilina (ANDERSON y DATTA, 1965; ANDERSON, 1967; ANDERSON, 1968; BARNUM, 1973), aunque no se conoce el modo como adquirieron esta resistencia. ANDERSON y DATTA (1965) señalan que la inclusión de penicilina (benzil - penicilina) en piensos para cerdos podría haber sido la causa de que cepas de *Salmonella typhimurium* aisladas de estos animales fuesen resistentes a la ampicilina. Téngase en cuenta que existe resistencia cruzada entre las diferentes penicilinas destruidas por las penicilinasas. Cepas de bacterias de iguales características se han aislado también a partir de pacientes humanos y en algunos casos se sugiere la procedencia animal des estas cepas. (ANDERSON y DATTA, 1965; ANDERSON, 1967; ANDERSON, 1968).

Existen pocos datos sobre la importancia de la penicilina, a las dosis en que se emplea corrientemente en los piensos, en el desarrollo de resistencia por parte de las bacterias Gram positivas (entre ellas *Staphylococcus aureus*). Según un informe del Joint Committee on the Use of Antibiotics in Animal Husbandry and Veterinary Medicine (1971) la inclusión de penicilina en los piensos para aves determina la aparición de resistencia a este antibiótico en los microorganismos (estafilococos) de la piel y de las fosas nasales de estos animales, e incluso de las personas que los atienden.

Por lo que respecta a los efectos tóxicos de la penicilina, es claro que carecen de significado a los niveles en que este antibiótico suele añadirse a los piensos (BOISSIER y DUMONT, 1961).

Finalmente, queda por analizar el aspecto de las normas legales en rela-

ción con la presencia de residuos de penicilina en alimentos. Según el Comité Mixto FAO OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (OMS, 1970), «cuando se emplean penicilinas deberá hacerse de manera que no dejen residuos que se detecten en los alimentos destinados al consumo humano». Los niveles de residuos no detectables por la técnica que aconseja el Comité (FAO OMS, 1969) están comprendidos entre 0.06 y 0 ppm (0.1 y 0 UI/gr, aproximadamente), residuos considerados inocuos. La tolerancia para los residuos de penicilina en carne de pollo admitida por la F. D. A. es de cero (Federal Register, 1972). Los resultados por nosotros obtenidos quedan en todos los casos muy por debajo de la cifra máxima admitida por la OMS. El residuo más significativo encontrado fue de 0.0358 UI/gr de hígado al tiempo cero de haber cesado la administración de un pienso adicionado de 500 ppm de penicilina, con el que se había alimentado a los pollos durante 21 días.

Ya en 1969, el Joint Committee on the Use of Antibiotics in Animal Husbandry and Veterinary Medicine (1971), proponía en Gran Bretaña la utilización como aditivos a los piensos para terneros hasta los tres meses, para cerdos en crecimiento y para pollos, de antibióticos que no tuviesen aplicación terapéutica en el hombre ni en los animales, y que no interfiriesen la acción de otros antibióticos usados con fines terapéuticos por el desarrollo de cepas de bacterias resistentes a estos últimos. Como la penicilina no cumple estos requisitos, el mencionado Comité aconseja no sea utilizada añadida a los piensos con fines de favorecer el crecimiento. El informe de la F. D. A. Task Force on the Use of Antibiotics in Animal Feeds (1972) concluye que la inclusión en los piensos de agentes antibacterianos no sólo comprometen el tratamiento de ciertas enfermedades animales, sino que supone un riesgo para la salud pública. Teniendo esto en cuenta, este informe recomienda una serie de restricciones sobre los agentes antibacterianos añadidos a los piensos para animales que no cumplan una serie de condiciones relativas a la seguridad de su uso y a su eficacia. Estas restricciones se refieren a su prohibición como promotores del crecimiento y a dosis subterapéuticas. Esta prohibición comprende a la penicilina, cuyo uso queda reservado a fines terapéuticos y por prescripción del veterinario, y debería entrar en vigor en distintas fechas, según la especie animal, de 1973. Es evidente que el problema de la inclusión en los piensos de antibióticos no utilizados en terapéutica animal y humana radica, en que no se cuentan aún, en la medida necesaria, con estas sustancias. El informe de la F. D. A. Task Force (1972), antes mencionado recomienda la investigación dirigida a encontrar nuevos productos que cumplan los criterios de seguridad y eficacia propuestos.

Para reducir la cantidad de residuos de antibióticos presentes en los alimentos de origen animal, existen en algunos países normas que aconsejan la retirada del pienso antibiótico-suplementado unos días antes del sacrificio del animal. Teniendo en cuenta los resultados por nosotros obtenidos y en rela-