




UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
Facultad de Ciencias Veterinarias
Instituto de Medicina Preventiva Veterinaria

Determinación de la sensibilidad de detección microbiología de residuos
de oxitetraciclina y quinolonas de uso común en peces

Tesis de grado presentada como parte
de los requisitos para optar al grado de
LICENCIADO EN MEDICINA VETERINARIA

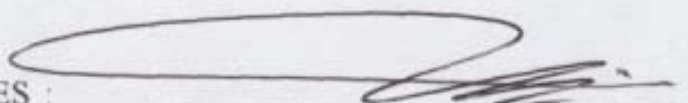
Mónica Alejandra Barrientos Hitschfeld
Valdivia Chile 1998

PROFESOR PATROCINANTE :



Dra. Erika Gesche R.

PROFESORES CALIFICADORES :



Dr. Ricardo Enriquez S.



Dr. Rafael Burgos A.

FECHA DE APROBACION : 8 de Octubre de 1998

**CON MUCHO CARIÑO
A MI FAMILIA Y A PANCHO.**

INDICE

	Pág.
1. RESUMEN.....	1
2. SUMMARY.....	2
3. INTRODUCCION.....	3
4. MATERIAL Y METODO.....	12
5. RESULTADOS.....	16
6. DISCUSION.....	19
7. CONCLUSIONES.....	24
8. BIBLIOGRAFIA.....	25
9. ANEXOS.....	31

1. RESUMEN

DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD DE DETECCION MICROBIOLOGIA DE RESIDUOS DE OXITETRACICLINA Y QUINOLONAS DE USO COMUN EN PECES.

Con el propósito de medir la sensibilidad de detección microbiológica de residuos de oxitetraciclina y quinolonas (flumequina, enrofloxacino, ácido oxolínico) en peces, se realizó un análisis frente a tres cepas sensibles (*B. subtilis* B.G.A., *B. cereus* ATCC 11778, *E. coli* ATCC 11303), con un medio de cultivo a pH 6.0 y pH 8.0.

Se determinó el pH más apropiado para la difusión de cada antibacteriano en el medio de cultivo y luego, se determinó mediante la confección de curvas de calibración, la concentración mínima detectable para cada antibacteriano antes mencionado y usando para ello cada una de las cepas sensibles.

Posteriormente, se comparó el efecto de la forma de aplicación del antibacteriano sobre la sensibilidad de detección, empleando la aplicación directa en una perforación del sustrato de cultivo, realizado con un sacabocados de 8 mm de diámetro, el empleo de un cilindro de vidrio de 8 mm de diámetro y 1 cm de largo que contenía la suspensión y la mezcla de la suspensión del antibiótico con tejido de pescado y su posterior aplicación al sustrato de cultivo en un cilindro de idénticas características al señalado anteriormente.

Basándose en el tamaño del halo de inhibición de crecimiento de las cepas sensibles, se pudo comprobar que el pH más adecuado para todos los antibacterianos fue el pH 6.0. Así como también se comprobó que *E. coli* ATCC 11303 es capaz de generar halos de inhibición de crecimiento de 2 mm con concentraciones más bajas para todos los antibacterianos excepto para el caso de oxitetraciclina donde se obtuvo con *B. subtilis* B.G.A. como cepa sensible.

En cuanto a la forma de aplicación del estándar del antibacteriano sobre la sensibilidad de detección, se demostró que la aplicación de los 100 µl de una concentración determinada directamente en el orificio realizado con sacabocados genera un halo mayor ($p < 0.05$) a las otras dos formas de aplicación usando la misma concentración.¹

¹ **Palabras claves** : Residuos, antibióticos, peces.

2. SUMMARY

DETERMINING OF THE SENSIBILITY OF MICROBIOLOGICAL DETECTION OF RESIDUES FROM OXITETRACICLINE AND QUINOLONES IN FISH.

With the purpose of measure the sensibility of microbiological detection of oxytetraciline and quinolones (flumequine, enrofloxacin, oxolinic acid) residues in fish, three different strain (*B. subtilis* B.G.A., *B. cereus* ATCC 11778 and *E. coli* ATCC 11303) with a media seeded at pH 6.0 and pH 8.0 were used.

The most suitable pH was established for the diffusion in the media seeded for each antibiotics and then, by calibration curves construction, and the minimal concentration that can be detect for each of the antibacterians mentioned above was established, using for these each of the sensitive strain.

Afterwards, the effects in form of application of antibacterian on the sensitivity of detection was compared. Direct application was used in a perforation of the media seeded a 8 mm agar cutter and a glass cilinder of 8 mm diametre and 1 cm long which had the suspension and mixture of the suspension of the antibiotic with fish tissue and its afterwards application to the media seeded in a cilinder with identics features to the one mentioned above.

Based on the size of inhibition zone of growth of sensitive strain, it was demonstrated that the most suitable pH for all the antibacterians was pH 6.0. It was also demostrated that the *E. coli* ATCC 11303 can generate inhibition zone of growth of 2 mm with lower concentration for all the antibacterian, except in the case of the oxitetraciline where *B. subtilis* B.G.A. was obtained as a sensitive strain.

Regarding the form of application of the standard antibacterian on the sensibility of detection, it was showed that the application of the 100 µl of the determinate concentration directly to the hole made with the agar cutter generates a major inhibition zone ($p < 0.05$) to the other forms of applications using the same concentration.*

* **Keywords** : Residues, antibiotics, fish.

3. INTRODUCCION

Junto con la intensificación y mayor eficiencia de la crianza de las diferentes especies animales, ha aumentado la probabilidad de que dependamos cada vez más del empleo de fármacos y productos químicos para controlar las enfermedades infecciosas y parasitarias de plantas y animales para una producción eficiente de alimentos (Booth y Mc Donald, 1988). Uno de los principales fármacos utilizados en los animales para producción de alimentos son los antibióticos y los quimioterápicos. Se definen como antibióticos las sustancias químicas producidas por microorganismos y como quimioterápicos aquellas sustancias obtenidas por síntesis química, que actúan inhibiendo el crecimiento o destruyendo bacterias u otros microorganismos (Cercos, 1957).

Los antibacterianos se consideran los fármacos más ampliamente prescritos en el mundo, presentándose cada año nuevos descubrimientos y perfeccionamientos tanto en medicina humana como en medicina veterinaria (García y Galleguillos, 1990). En la práctica veterinaria, el empleo de antibacterianos y sulfonamidas está cifrada actualmente entre el 40% y 80% del consumo de medicamentos (Trolldenier, 1980 ; Match, 1987).

El uso de antibacterianos, en un principio cumplió una función terapéutica para controlar las patologías bacterianas, posteriormente se sumó a ella el uso en forma profiláctica con el objetivo de disminuir la aparición de brotes de enfermedades (Cercos, 1957). Junto con los nuevos descubrimientos del hombre y en su búsqueda incesante para producir mayor cantidad y a un costo menor, comenzó a utilizarlos como promotores del crecimiento en los animales (Cercos, 1957). Con el uso de antibacterianos como promotores del crecimiento en forma adecuada, se logra una óptima conversión del alimento, mejorando la eficiencia de producción (Ziv y Sulman, 1974; Cordle, 1988; García y Galleguillos, 1990). El efecto promotor del crecimiento depende de diferentes factores, como la dieta y el antibiótico empleado y la frecuencia de aplicación, método de administración del antibacteriano, tipo de ración y cantidad de vitaminas en la dieta entre otras (Cercos, 1957).

Los antibacterianos se han estado usando en las explotaciones pecuarias por varias décadas. Ellos son administrados por cuatro diferentes vías: a) Inyecciones (intramuscular, intravenosa, subcutánea), b) en forma oral, c) infusión intramamaria. d) en tracto reproductivo. Todos estos usos provocan, en mayor o menor medida, contaminación con residuos antibacterianos en el organismo (Bishop y White, 1984).

Otros usos de antibacterianos son proteger plantas contra bacterias y enfermedades fúngicas y para descontaminar cascaras de huevos, además, han sido herramientas esenciales en la elucidación de funciones celulares específicas. La ingeniería genética por ejemplo, no podría ser posible hoy sin el uso de antibióticos en la selección de determinados marcadores genéticos (Lancini y Parenti, 1983).

Los peces no son la excepción al uso de antibióticos y es así como hoy se usan ampliamente en la industria salmonera y obedece principalmente a tres fines, al igual que en los animales de granja, ellos son profiláctico, terapéutico y promotor del crecimiento (Alvarado y col., 1988; Austin, 1988; Enríquez y col., 1990; García y Galleguillos, 1990; Dólz, 1992). Para la administración de antibióticos en salmonicultura se recurre a diferentes métodos, siendo básicamente 4 las posibilidades: Vía oral, baño, *flush* e inyección (Austin, 1988).

El método de administración de antibacterianos más utilizado en salmonicultura es la vía oral, donde es incluido en el alimento, siendo necesario ajustar la dosis en relación al peso y consumo de los peces. Es muy fácil con este método calcular la cantidad de antibacteriano administrada a los peces, sin embargo, el inconveniente es que el medicamento debe ser palpable y tener una buena absorción intestinal. En el caso en que los peces se rehúsen a ingerir alimento y junto con éste el fármaco, se puede optar por los baños con solución antibacteriana. En peces con alto valor económico tales como smolt y reproductores, se utiliza preferentemente la vía inyectable (Austin, 1988).

El uso de antibióticos en peces está masificado en Noruega, primer productor mundial de salmones, quién el año 1987 utilizó una cantidad cercana a las 50 toneladas de antimicrobianos para el control de enfermedades en el cultivo de salmones (Samuelsen y col., 1992).

De acuerdo a diferentes autores, (McCracken y col., 1976; Austin, 1988; Jacobsen, 1989; Dólz, 1992), la clasificación de los principales antibacterianos de uso en salmonicultura son los siguientes:

- Aminoglicósidos: Estreptomina, Kanamicina.
- β Lactámicos: Penicilina G, Ampicilina.
- Lincosamidas: Lincomicina, Clindamicina.
- Macrólidos: Eritromicina, Espiramicina.
- Quinolonas: Flumequina, Enrofloxacino, Ácido oxolínico.
- Sulfonamidas: Sulfametazina, Sulfameracina, Sulfadimethoxina, Sulfadiazina con trimetropin.
- Tetraciclinas: Oxitetraciclinas.
- Otros: Cloranfenicol, Furazolidona, Rifampicina.

Sin embargo, el número de antibacterianos empleados con mayor frecuencia en la industria salmonera es más reducido y se limita principalmente a Acido Oxolínico, Oxitetraciclina, Flumequina (Kido, 1998).^{*} La oxitetraciclina es uno de los antibióticos más representativos del grupo de las tetraciclinas y su uso es principalmente para tratar enfermedades entéricas en las diferentes especies animales y para tratar varias enfermedades bacterianas en truchas y salmónes. Las quinolonas son químicos sintéticos con actividad antimicrobiana por lo que no caben dentro de la definición de antibiótico y son llamados antibacterianos. El ácido oxolínico, es una quinolona de primera generación, su uso está dirigido al tratamiento de *Aeromonas salmonicida*, agente causante de furunculosis en Salmón del Atlántico, y contra otros patógenos como *Yersinia ruckeri*, y especies de Flavobacterias. La flumequina y el enrofloxacino pertenecen al grupo de quinolonas de segunda generación, siendo éstos antibacterianos más potentes que los de primera generación (Woodward y Shearer., 1995).

Según Austin (1988), en el tratamiento antimicrobiano en peces, para evitar residuos en el músculo consumido por el hombre, se deben considerar factores, que inciden en la eliminación de la droga, tales como: (Austin, 1988).

- 1- Temperatura del agua: importante factor de eliminación de la droga desde los tejidos. Se emplea por esto los períodos de resguardo en términos de Grados-Día.
- 2- Los diferentes tiempos en que las drogas son eliminadas desde los tejidos.
- 3- La especie, madurez, tamaño y estado de salud, afecta las tasas de eliminación.
- 4- Dosis de la droga utilizada.

Estudios de varios autores muestran que al realizar un ensayo en truchas con ácido oxolínico, detectaron que la máxima concentración se alcanzaba al 4° día de tratamiento. Sin embargo este ensayo fue realizado a 10° C, temperatura mediante la cual las tasas de absorción, concentraciones máximas y eliminación de la droga son diferentes, ya que al aumentar la temperatura del agua en 1° C aumenta en un 10% las tasas metabólicas y excretoras de los peces, por lo tanto a una mayor temperatura la absorción es más rápida, logrando antes una mayor concentración del antibiótico y por ende una tasa de eliminación más acelerada de éste (Kasuga y col., 1984; Jacobsen, 1989; Bjórklund y col., 1992). El ácido oxolínico aparentemente se excreta mucho más rápido a bajas temperaturas, recomendando un tiempo de resguardo menor para truchas que estén bajo condiciones de temperaturas más bajas. También se ha confirmado que esta droga se elimina más lentamente en peces de agua dulce que en peces de agua salada (Kasuga y col., 1984; Ishida, 1992).

Las concentraciones en el tejido muscular son más altas que las encontradas a nivel sérico durante todos los días de tratamiento. La alta concentración en tejido muscular sugiere que la absorción a nivel intestinal del ácido oxolínico es muy buena, demostrando con esto que la administración de esta droga a través del

^{*} Sr. Roberto Kido. Marine Harvest Chile S.A. Comunicación Personal

alimento, no afecta el nivel de consumo de los peces (Hustvedt y col., 1991). Pero aún así se recomienda que sean hígado o riñón las muestras a examinar ya que al estar involucrados en la eliminación del ácido oxolínico, presentan una mayor concentración por un lapso de tiempo más prolongado (Björklund y col., 1992).

La flumequina alcanza las más altas concentraciones durante todo el tratamiento debido a su pequeño peso molecular y alta solubilidad lipídica, que favorece su rápida absorción desde el tracto gastrointestinal, distribuyéndose a todos los tejidos en altas concentraciones (O'Grady y col., 1988). La flumequina es inactivada y excretada rápidamente del organismo, estimando que a los 5 días posterior al tratamiento los niveles estarían bajo los límites de detección (Chevalier y col., 1981; Sohlberg, 1990). La concentración máxima de la flumequina en músculo es 2,5 veces más alta que la encontrada en suero (Rogstad y col., 1993).

El enrofloxacinó presenta una baja biodisponibilidad en peces, la cual puede ser atribuida al bajo grado de absorción de esta droga comparado con otras especies animales. La concentración aumenta hasta el 5° día para después mantenerse relativamente estable lo que se atribuye a la asociación de un bajo grado de absorción del antibacteriano por parte del pez, junto a una disminuida tasa de eliminación del antibiótico. A los 20 días de finalizado el tratamiento con enrofloxacinó, no se encuentra actividad microbiana en hígado, músculo ni piel pero sí se encontró en hígado el día 14, por lo que se recomienda utilizar este órgano por ser el mejor tejido para determinar el período de resguardo en peces (Bowsery col., 1992).

Rogstad y col (1991) señalan que los niveles de absorción de oxitetraciclina desde el tracto gastrointestinal de los peces son bajos y los niveles más altos de concentración se obtienen recién a las 96 h de comenzado el tratamiento. La eliminación de oxitetraciclina de los tejidos es bastante lenta por lo que se recomienda un período de resguardo de 52 días para trucha arcoiris a una temperatura de 12° C, 42 días a 9° C y 62 días a 7° C, demostrando una vez más la importancia de la temperatura del agua en la tasa de eliminación de los diferentes antibacterianos (Salte y Liestol, 1983; Jacobsen, 1989).

El suero es el tejido más estable para detectar oxitetraciclina, ya que mantiene relativamente uniforme los niveles de concentración. En el caso del músculo presenta variaciones, incluso el 5° día de tratamiento, no presenta halo de inhibición, contrastando con lo encontrado en suero el mismo día. Esto se debe a que oxitetraciclina en músculo es inactivado en un grado variable por la congelación, efecto que ocurre en menor medida en el suero (Meredith y col., 1965).

La administración de oxitetraciclina al alimento, disminuye el consumo de los peces debido a la mala palatabilidad que presenta este antibiótico, lo que posteriormente podría conducir a determinar la ausencia de la droga en los tejidos

analizados ya que probablemente esta ausencia se deba a que el antibacteriano no fue consumido (Hustvedt y col., 1991; Björklund y col., 1990).

Hígado y riñón son los órganos de elección para detectar residuos de antibacterianos, pues son los órganos de excreción de las drogas, pero la dificultad está en el manejo de ellos ya que son muy friables, dificultando su manipulación y posterior aplicación en la placa de cultivo, lo que podría producir resultados erróneos (Rojas, 1986). Aún cuando el músculo no se considera una muestra con gran afinidad, es uno de los tejidos más utilizados, por ser éste el de mayor importancia comercial y de consumo de la canal de los animales (Trollidenier, 1980).

Los antibióticos son de una gran utilidad, sin embargo, si estos productos no son aplicados adecuadamente, pueden traer consigo múltiples consecuencias, una de ellas es, sin duda, el problema de la resistencia bacteriana debido a la aplicación de dosis subterapéuticas y como promotores del crecimiento (Roberts, 1987). Es por esto que la mantención de un adecuado nivel de antibacteriano, de al menos cuatro veces la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) durante la terapia, es muy importante en la disminución de la selección y sobrevivencia de microorganismos resistentes (Stamm, 1989). Penicilinas, Aminoglicósidos, Macrólidos, Cloranfenicol y otros antibacterianos pueden producir selección y desarrollo de resistencia bacteriana, por transferencia de plasmidios entre las bacterias, otras como las quinolonas podrían originarla por una mutación cromosómica en que se manifiesta bioquímicamente por una variación de la permeabilidad celular, o bien, a la síntesis de una DNA girasa de menor afinidad por las quinolonas. No obstante, también para las quinolonas se han descubierto plasmidios que codifican resistencia para ellas (Neu, 1988; Stamm, 1989).

La resistencia se ha transformado en un factor que complica el tratamiento de las enfermedades en los animales. Además existe una gran preocupación por la posibilidad de que los microorganismos resistentes albergados en los animales transfieran factor R a las bacterias del hombre, lo que complicaría el tratamiento de el con antibacterianos (Smith, 1974).

La misma importancia que tiene la resistencia de las bacterias patógenas, lo tiene la de las bacterias que componen la flora bacteriana ambiental, ya que se ha demostrado por ejemplo que el Acido Oxolínico incluido en el alimento, es excretado totalmente activo, debido a que los peces poseen un sistema excretor más primario a diferencia de los animales superiores donde estos compuestos son inactivados en el riñón. Estudios que demuestran la presencia de residuos de antibacterianos en los peces silvestres 20 días después del tratamiento antibacteriano, a través del alimento, en centros de cultivo, corroboran que los peces disminuyen su consumo al estar enfermos y el alimento que se les proporciona con el antibacteriano, es consumido en gran medida por peces silvestres que están cerca del área del centro de cultivo. Este es uno de los

grandes inconvenientes del tratamiento antibacteriano a través del alimento, ya que aunque es fácil calcular su dosis, no existe la seguridad de que sea ingerido (Samuelsen y col., 1992; Bravo, 1993).

También se han observado reacciones adversas para el hombre dado principalmente por la posibilidad de residuos de antibióticos en el músculo de mamíferos, aves y peces consumidos (Booth y Me Donald, 1988). Dentro de los efectos adversos producidos en el hombre, destacan alergias e hipersensibilidad y/o shock anafiláctico producidos por las penicilinas. Las tetraciclinas producen hipersensibilidad y además, debido a su unión con el calcio, producen inhibición del desarrollo dentario y crecimiento esquelético. Por otra parte, se han descrito casos de anemia aplásica, afección hepática granulocitopenia y neuritis óptica producidas por el cloranfenicol (Booth y Me Donald, 1988; Nouws y col., 1979; Taylor, 1985; Match, 1987). Los efectos toxicológicos y también alérgicos no son sólo producidos por sustancias activas de los fármacos, sino que, en la mayoría de los casos también por metabolitos inactivos (Engel y col., 1983).

Desde el punto de vista ecológico y de salud pública, la droga de elección para utilizar en el tratamiento de enfermedades bacterianas en peces debe satisfacer ciertos requerimientos que según Alvarado y col. (1988) corresponden a:

- 1- Un compuesto debe ser rápidamente degradado a compuestos no tóxicos.
- 2- Estos compuestos no deberían elevar la resistencia plasmidial.
- 3- Estos compuestos no deberían llevar a resistencia cruzada a otros grupos de drogas antimicrobianas.
- 4- Estos compuestos no deberían ser médicamente importantes.

En Chile, el reglamento sanitario de alimentos, en el artículo N° 132 manifiesta que no se permite la presencia, en los alimentos, de sustancias con principios terapéuticamente activos o sustancias calificadas como productos farmacéuticos (Chile, 1997b). Sin embargo, el Servicio Nacional de Salud no posee un método oficial que permita acusar la presencia de estas sustancias en los productos cárneos. Diferente es lo que ocurre en productos de exportación, especialmente en salmones, donde los países importadores exigen que los residuos de antibacterianos estén dentro de los límites aceptables o restricciones totales al empleo de productos prohibidos por las normativas europeas o por la "Food and Drug Administration" (F.D.A.), principal organismo norteamericano de carácter federal que controla alimentos y drogas (Bravo, 1993).

La concentración de residuos medicamentosos varía mucho de tejido en tejido, habiéndose observado que generalmente es mayor en los tejidos de reserva como grasa corporal, o en órganos que los metabolizan o excretan activamente. Es por esto que, bajo evaluaciones científicas, la F.D.A. ha establecido que la Oxitetraciclina es el único antibacteriano del cual se aceptan residuos, considerando un nivel de tolerancia de 0.1 ppm en tejido comestible de salmones, un tiempo de suspensión previo al sacrificio de 21 días y además prohíbe utilizar

oxitetraciclina en el tratamiento de salmones si el agua en que son cultivados, tiene una temperatura menor a 9° C (Booth y Me Donald, 1988). Si se aplican debidamente las normas de la F.D.A., el riesgo de toxicidad a partir de residuos de antibacterianos es tan escaso que prácticamente puede despreciarse (Hewitt, 1975).

En la actualidad sólo los antibióticos usados como aditivos alimenticios están sujetos a la regulación de la Comunidad Europea y pueden ser administrados sin la intervención de un Médico Veterinario. Cualquier otra aplicación está sujeta a la prescripción de éste. Muchos países tienen una legislación específica que requiere que la carne importada por la Comunidad esté libre de residuos de antibacterianos. El Consejo de Salud Pública de Holanda en 1980, propuso niveles permisibles máximos de antibacterianos en la comida con el propósito de asegurar que los residuos no sean de manera alguna dañinos para la salud del consumidor, considerando que tanto para oxitetraciclina como para quinolonas no se aceptan residuos debido a sus características toxicológicas (Engel y col., 1983).

En nuestro país, según el Programa de Aseguramiento de Calidad, dirigido por el Servicio Nacional de Pesca (Sernapesca), las empresas de cultivo de peces, deben acreditar que los niveles de residuos no superen a los tolerados en cada lote que ingrese a proceso, para lo cual deben presentar una declaración, al ingreso a planta por cada lote, en la cual se afirme que las jaulas o estanques destinadas a proceso han cumplido con los períodos de resguardo mínimos necesarios para alcanzar niveles inferiores a los límites establecidos por las normativas de los mercados de destino, para residuos de productos farmacéuticos de uso veterinario (Chile, 1997a).

A pesar de que se exija el cumplimiento de los períodos de resguardo necesarios para cada antibacteriano, la ingestión de alimento con residuos de antibacteriano podría llegar a ser tan peligroso para el hombre que se han desarrollado una gran variedad de métodos para detectar residuos de antibacterianos en alimentos de origen animal. En ellos se buscan características como alta sensibilidad, mínimo costo por análisis, fácil ejecución y rapidez y un amplio espectro antibacteriano (Nouws y col., 1979). Los métodos de detección de residuos de antibacterianos se pueden clasificar en: Métodos químicos (Moats, 1983; Bishop y White, 1984); Métodos químico-microbiológicos (Silva y Anhalt, 1980); Métodos enzimáticos (Bishop y White, 1984; Rohner y col., 1985) y métodos microbiológicos (Nouws y col., 1979; Ginn y col., 1982; Bishop y White, 1984; Allison, 1985; Gesche, 1986; Booth y Me Donald, 1988).

Los establecimientos que procesan peces de cultivo en Chile, deben incorporar en sus programas, dentro del esquema de verificaciones, el análisis quincenal de 5 muestras para residuos de drogas de uso veterinario. Las muestras deben ser tomadas al ingreso de la planta y debe estar constituidas por un trozo de músculo, en lo posible con piel, de alrededor de 50 gramos. Dicho análisis

quincenal está orientado a pesquisar residuos de quinolonas y oxitetraciclina, debiendo ser realizado por un laboratorio de verificación autorizado por Sernapesca. Para el análisis de ambos antimicrobianos se utiliza un método microbiológico que en el caso de oxitetraciclina se basa en el descrito por la F.D.A. de Estados Unidos y utiliza *Bacillus cereus* variedad mycoides ATCC 11778 y para quinolonas uno modificado del descrito por la AOAC (1995), que es un método microbiológico para residuos de antibacterianos en alimento para animales, usando *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Los métodos microbiológicos empleados deben tener una sensibilidad de al menos 0.1 ppm para oxitetraciclina y flumequina, 0.078 ppm para ácido oxolínico y 0.015 ppm para enrofloxacino. Además de éstos se realiza un análisis comprobatorio para confirmar la ausencia de quinolonas mediante un método instrumental, Cromatografía de Alta Presión (HPLC) que permite detectar niveles residuales de al menos 0.01 ppm. Adicionalmente y en forma opcional, se puede utilizar HPLC para la determinación y cuantificación de residuos específicos (Chile, 1997a).

El método microbiológico de la AOAC (1995), describe el uso de cilindros de acero sobre el agar, dentro de las placas, para en cuyo interior aplicar la solución del antibacteriano o la muestra a probar, para luego incubar por 24 horas a una temperatura adecuada y posteriormente medir los halos de inhibición del crecimiento bacteriano. Existe una lista de bacterias sensibles que se utilizan, según la AOAC, preferentemente para cada antibacteriano. Por otro lado Ellerbroek y col. (1997), recomiendan a *B. subtilis* B.G.A., *B. cereus* ATCC 11778 y *E. coli* ATCC 11303 como cepas sensibles para la detección de antibacterianos.

Todos estos métodos microbiológicos se basan en la capacidad de los residuos antibacterianos de difundir desde la muestra (trozo de tejido u órgano) hacia el medio de cultivo, provocando la inhibición de las bacterias sensibles contenidas en él, lo cual se ve a simple vista como halos alrededor de la muestra sin crecimiento de la bacteria indicadora. Siendo estos métodos de tipo cualitativo, en los cuales su interpretación es en base al tamaño del halo de inhibición, pueden cuantificarse, pues el diámetro de la zona de inhibición es directamente proporcional a la concentración del antibiótico. No siempre la detección del antibiótico es completamente segura, pues pueden existir inhibidores inespecíficos en las muestras, con lo cual se podrían obtener resultados erróneos (FAO, 1969, Zavanella y Tagliabre, 1981). Si las concentraciones de los metabolitos inactivos de las drogas antibacterianas exceden a las drogas, de origen, el uso de métodos físico-químicos podrían ser indicados en vez de métodos microbiológicos que fallan en detectar los metabolitos (Engel y col., 1983).

Los métodos microbiológicos poseen ventajas sobre otros, como son por ejemplo el bajo costo de análisis, fácil ejecución y detección de residuos bajo los niveles de tolerancia propuestos para los tejidos musculares. El método microbiológico se ha ido perfeccionando con la introducción de la utilización de diferentes niveles de pH del sustrato de cultivo y de diferentes cepas sensibles,

con lo cual se amplía el espectro de detección de antibióticos (Nouws y col., 1979; Ramírez, 1993). Estudios realizados por Bielecka y col. (1981), Rojas (1986), Mayor (1990) y Ellerbroek y col. (1997), coinciden en que la oxitetraciclina expresa mejor su acción inhibitoria a pH 6.0 al igual que las quinolonas, como fue demostrado por Vasset y col. (1989). Sin embargo, otros trabajos realizados por Ellerbroek y col. (1997) indican que tanto enrofloxacino como ácido oxolínico tienen mejor acción inhibitoria a pH 8.0.

La Cromatografía de Alta Presión (HPLC), es un método más sofisticado con el que se estudió la biodisponibilidad y residuos de ácido oxolínico por Archimbautt y col. (1988), utilizando la misma técnica Björklund y col. (1990) detectaron residuos de oxitetraciclina en peces silvestres capturados en las cercanías de centros de cultivo. A pesar de ser la Cromatografía de Alta Presión una técnica cualitativa y cuantitativa de aceptable precisión, presenta también inconvenientes como son disponer de equipos de alto costo y personal especializado, además de requerir de un método de extracción del antibiótico.

El método microbiológico, requiere sólo de material de uso corriente en un laboratorio de microbiología, prescindiendo de equipos especializados que son necesarios para las pruebas químicas (Nouws y col., 1979), motivo por el cual se está empleando de preferencia como método "screening" para la detección de residuos de antibióticos en pescados (Chile, 1997 a).

Por todo lo anteriormente mencionado, resulta de interés investigar la influencia del pH del medio de cultivo en la detección del antibiótico, la sensibilidad antibiótica de diferentes cepas bacterianas empleadas en pruebas microbiológicas para la detección de residuos de antibióticos de empleo corriente en salmonicultura, para conocer finalmente la(s) mejor(es) bacteria(s) y el pH más indicado para detectar los antibacterianos. También resulta de interés investigar cual es la forma de aplicación de la muestra al sustrato de cultivo que entregue resultados más claros y evidentes de presencia de antibióticos comparando la forma que se describe en la técnica del *Bacillus subtilis* B.G.A. y el uso de cilindros mencionados por la AOAC. Todo esto con la finalidad de aportar antecedentes para la implementación de pruebas simples de detección de residuos de antibióticos en pescados.

4. MATERIAL Y METODO

Para la determinación de sensibilidad de detección de oxitetraciclina, flumequina, enrofloxacino y ácido oxolínico, antibacterianos de uso común en salmonicultura, se confrontaron a tres cepas sensibles: *Bacillus subtilis* B.G.A., *Bacillus cereus* ATCC 11778 y *Escherichia coli* ATCC 11303, en un sustrato de cultivo a pH 6.0 y pH 8.0.

PREPARACION DEL MEDIO DE CULTIVO.

El medio de cultivo empleado se preparó en base a la siguiente fórmula, descrita para detección de antibióticos en carne (Gesche, 1986).

-Peptona de caseína.....	3.45 g.
-peptona de carne.....	3.45 g.
-Cloruro de sodio.....	5.10 g.
-Agar.....	13.00 g.
-Agua destilada.....	1000.00 cc.

Los ingredientes se depositaron en matraces, luego se suspendieron en agua destilada y se sometieron a calor en horno microondas, agitando hasta su completa disolución. Posteriormente, al medio de cultivo aún caliente, se le adicionó 0.1% de KH_2PO_4 en solución, como buffers para inmediatamente después verter en matraces de menor capacidad y ajustar a los correspondientes pH (6.0 y 8.0) mediante la adición de HCl o NaOH según el caso. Luego se procedió a esterilizar el medio de cultivo a 120° C por un tiempo de 15 minutos. Una vez enfriado a 45-50° C se depositaron 100 µl/100ml de medio de cultivo de la suspensión de cada bacteria sensible en una concentración de 10^7 esporas/ml de suspensión, alcanzando finalmente una concentración de 10^4 esporas/ml de medio de cultivo. Inmediatamente después se vertieron 12.5 ml aproximadamente de medio de cultivo con las respectivas bacterias a placas de Petri esterilizadas, con lo que se logró una altura aproximada de 2 mm por cada placa. Una vez solidificado el medio, se procedió a rotular las placas con su respectivo pH, bacteria presente y luego a almacenar en refrigeración hasta su posterior uso, dentro de un plazo de 2 días.

BACTERIAS SENSIBLES.

Las bacterias sensibles utilizadas fueron ***Bacillus subtilis* B.G.A. y *Bacillus cereus* ATCC 11778** en concentración de 10^7 esporas /ml de suspensión. Para el caso de ***Escherichia coli* ATCC 11303**, se usaron formas vegetativas, procediendo a repicar dos veces las bacterias en caldo cerebro corazón incubado a 30° C por 18-24 h previo a su uso, la concentración usada para esta bacteria es similar a las dos anteriores, haciendo recuento en placa y comparando los aspectos después de la incubación.

La metodología usada se basó en el método microbiológico del *B. subtilis* B.G.A. Gesche, 1986).

PREPARACION DE ESTANDARES DE ANTIBACTERIANOS

Cuadro N° 1: Procedencia y abreviatura usada para los antibacterianos empleados.

ANTIBACTERIANO	ABREVIATURA	PROCEDENCIA
OXITETRACICLINA	OXI	LAB. SIGMA
ENROFLOXACINO	ENR	LAB. CHILE S.A.
FLUMEQUINA	FLU	LAB. SIGMA
ACIDO OXOLINICO	OXO	LAB. SIGMA

Se pesaron 10 mg de cada antibacteriano y se suspendieron, para el caso de oxitetraciclina y enrofloxacino en 4 ml de metanol (Me OH) y 6 ml de agua destilada y para el caso de flumequina y ácido oxolínico en 10 ml de metanol (Me OH). Para lograr una buena disolución de ellos, se procedió a calentarlos a Baño María a 40° C, por el tiempo necesario que fluctuó, entre 2 y 3 h. Posteriormente se prepararon diluciones de 10, 1, 0.1, 0.01, y 0.001 µg/100µl de los distintos compuestos antibacterianos de los cuales se obtuvieron las concentraciones intermedias necesarias capaces de producir un halo de inhibición en un rango de 2 mm y 6 mm.

APLICACION DE LOS ANTIBACTERIANOS AL SUSTRATO DE CULTIVO

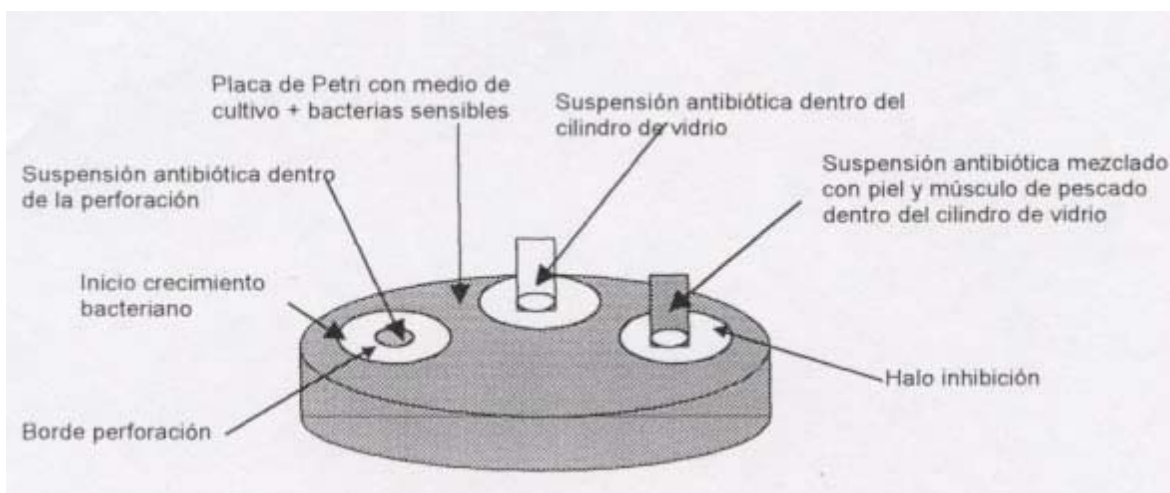
Para la aplicación del antibacteriano sobre el sustrato de cultivo se utilizaron 3 metodologías diferentes a fin de comparar como influye la forma de aplicación

sobre la formación de halos de inhibición del crecimiento. Para ello se usó de cada antibacteriano, la concentración que genera un halo de inhibición del crecimiento bacteriano de 4.5 mm en el método directo.

a) Método directo: Las placas ya preparadas, se rotularon con el inhibidor a depositar y luego se practicaron perforaciones con sacabocado estéril de 8 mm de diámetro en el medio de cultivo. Posteriormente se depositaron 100 μ l de las diluciones preparadas de los antibacterianos.

b) Método con cilindro: Se puso un tubo, de 8 mm de diámetro y 1 cm de largo, sobre la placa y en él se depositaron 100 μ l de la dilución del antibacteriano.

c) Método con mezcla: Se mezcló un trozo de piel y músculo de pescado, de 8mm de diámetro y 2 mm de espesor, con 100 μ l de dilución del antibacteriano en un tubo Eppendorff y se depositaron en un tubo, de 8 mm de diámetro y 1 cm de largo, sobre la placa.



Luego se procedió a incubar las placas en estufa de cultivo a 30° C por 18 a 24 h, previo reposo de 15 minutos a temperatura ambiente. Una vez cumplido el tiempo de incubación se retiraron las placas y se midieron con pie de metro los tamaños de los halos de inhibición de crecimiento desde el borde de la perforación o tubo hasta el inicio del crecimiento bacteriano (Gesche, 1986).

Cada ensayo se repitió 3 veces a fin de obtener un valor promedio del tamaño del halo por dilución, técnica de aplicación y cepa sensible.

EVALUACION DE LOS RESULTADOS.

Los parámetros utilizados fueron el promedio, desviación estándar y el coeficiente de variación. En formas de tablas y/o gráficos se representaron la influencia del pH, los resultados obtenidos de la sensibilidad de cada antibacteriano en relación a las cepas sensibles y a la forma de aplicación de la muestra.

Para evaluar la influencia del pH (6.0 y 8.0) sobre la sensibilidad de detección de los antibacterianos, se comparó el tamaño del halo de cada antibacteriano a igual concentración y diferente pH con cada una de las cepas sensibles. Se obtuvo un promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de las repeticiones de cada ensayo.

Utilizando diluciones de los antibacterianos que generaban un halo de inhibición del crecimiento entre 2mm y 6mm aproximadamente, se calculó la concentración mínima detectable de cada antibacteriano. Se promediaron las repeticiones de las pruebas y con éstos se calculó el coeficiente de correlación entre el tamaño de halo obtenido para cada concentración, la pendiente y la intersección al eje X. Con los datos anteriores se construyeron curvas de calibración. La fórmula usada para el cálculo de la concentración mínima detectable fue la siguiente

$$\text{concentración mínima detectable } (\mu\text{g}) = \frac{2\text{mm} - \text{Intersección al eje X}}{\text{Pendiente}}$$

5. RESULTADOS

Para representar el efecto del pH sobre el tamaño del halo de inhibición, se tomó como referencia aquellas concentraciones de sustancia pura que en uno de los dos pH diera un halo de inhibición cercano a 6 mm. En el gráfico N° 1, se observa el comportamiento obtenido por los diferentes antibacterianos usando dos pH y *Bacillus subtilis* B.G.A. como cepa sensible. Las otras dos bacterias siguieron la misma tendencia.

TABLA N° 1: Valores promedios de tamaño de halo de inhibición (mm) de tres repeticiones a pH 6.0 y pH 8.0 con sus respectivas desviaciones estándar para cada uno de los antibacterianos y usando **B subtilis B.G.A.** como cepa sensible.

ANTIBACTERIANOS	CONCENTRACION (M9/100MI)	HALO pH 6.0	Desviación estándar	HALO Ph 8.0	Desviación estándar
OXITETRACICLINA	0.40	5.8	0.141	2.8	0.167
FLUMEQUINA	0.08	5.7	0.089	*	—
ENROFLOXACINO	0.09	5.9	0.089	4.1	0.155
ACIDO OXOLINICO	0.40	6.0	0.141	2.6	0.110

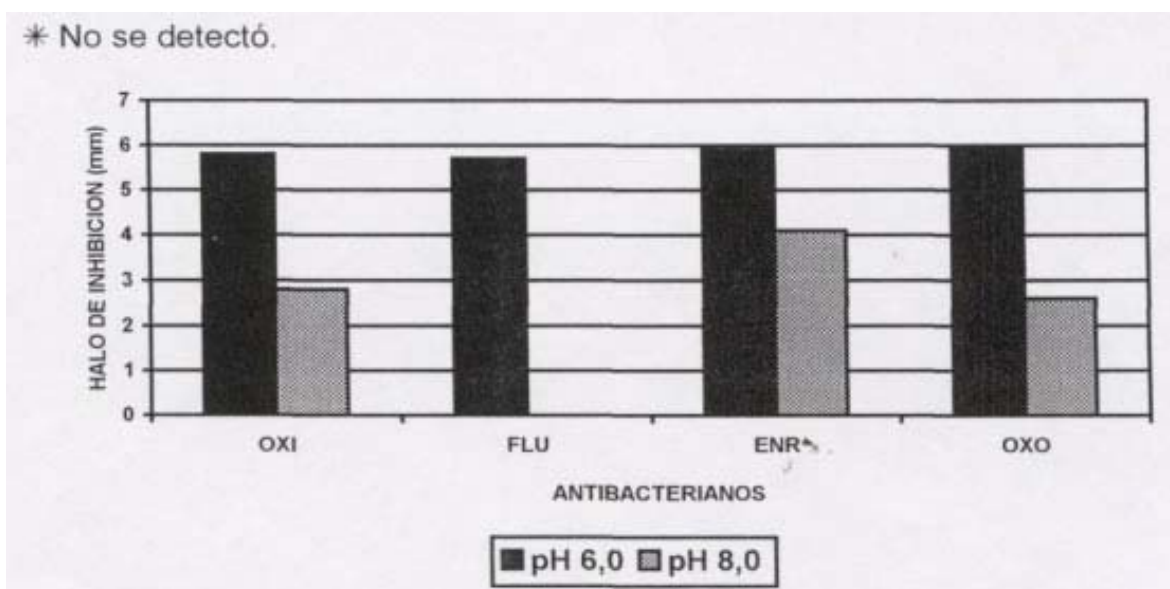


Gráfico N° 1: Efecto del pH sobre el tamaño del halo de inhibición producido por los diferentes antibacterianos.

Del gráfico anterior se puede deducir que la actividad antibacteriana de cada una de las sustancias puras analizadas, se expresa mejor con pH 6.0 del medio de cultivo. Debido a esto, todas las pruebas analizadas posteriormente, se realizaron sobre sustrato a éste pH.

Para obtener los valores de las concentraciones mínimas detectables para cada antibacteriano con cada una de las cepas sensibles, las pruebas se realizaron utilizando la forma de aplicación directa de la suspensión del antibacteriano.

Utilizando un rango de concentraciones en las cuales se produjeron tamaños de halo de inhibición entre 2mm y 6mm aproximadamente, se calculó la correlación existente entre tamaño de halo y concentración de sustancia pura para las distintas bacterias sensibles frente a los respectivos antibacterianos, se confeccionaron curvas de calibración y de ellas se sustrajeron la pendiente e intersección al eje X, para obtener con ésto los valores de las concentraciones mínimas detectables para cada antibacteriano frente a cada cepa sensible. Los datos obtenidos se encuentran en detalle en el anexo N° 2 y las curvas de calibración están graficadas en el anexo N° 3.

Cuadro N° 2: Concentración mínima detectable (μg) para cada uno de los antibacterianos frente a las bacterias sensibles.

ANTIBACTERIANOS	<i>B. subtilis</i> B.G.A.	<i>B. cereus</i> ATCC 11778	<i>E. coli</i> ATCC 11303
OXITETRACICLINA	* 0.050	0.410	0.2170
FLUMEQUINA	0.020	0.035	* 0.0008
ENROFLOXACINO	0.016	0.035	* 0.0004
ACIDO OXOLINICO	0.126	0.238	* 0.0500

* Cepa bacteriana más sensible para cada uno de los antibacterianos probados.

En el gráfico N° 2 , se compara el efecto sobre la sensibilidad de detección de la aplicación directa: del antibacteriano en el orificio realizado con un sacabocado, en un cilindro de vidrio y por último una mezcla de piel y músculo de salmón con el antibacteriano en un cilindro. Para lo anterior se utiliza *B. subtilis* B.G.A. como cepa sensible ya que con *B. cereus* ATCC 11778 y *E. coli* ATCC 11303 siguió la misma tendencia tal como se muestra en el anexo N° 3. Se tomó como referencia aquellas

concentraciones de sustancia pura suficientes para provocar un halo de inhibición de aproximadamente 4.5 mm como máximo, la prueba se realizó tres veces.

TABLA N° 2: Comparación del efecto de aplicación para cada antibacteriano sobre la sensibilidad de detección usando *B. subtilis* B.G.A. como cepa sensible. Concentración usada ($\mu\text{g}/100\mu\text{l}$), tamaño de halo (mm), Desviación estándar (D.S), coeficiente de variación (C.V %) y número de repeticiones ("n").

Antibac.	$\mu\text{g}/100\mu\text{l}$	"n"	DIRECTA			CILINDRO			MEZCLA		
			mm	D.S	C.V %	mm	D.S	C.V %	mm	D.S	C.V %
OXI	0.24	3	4.23	0.16	3.75	3.70	0.15	3.99	1.88	0.12	6.34
FLU	0.05	3	4.18	0.17	4.10	2.09	0.19	8.99	1.50	0.11	9.40
ENR	0.05	3	4.30	0.19	4.32	3.04	0.10	3.28	1.20	0.10	6.96
OXO	0.26	3	4.14	0.12	2.99	3.23	0.28	8.78	1.40	0.09	6.09

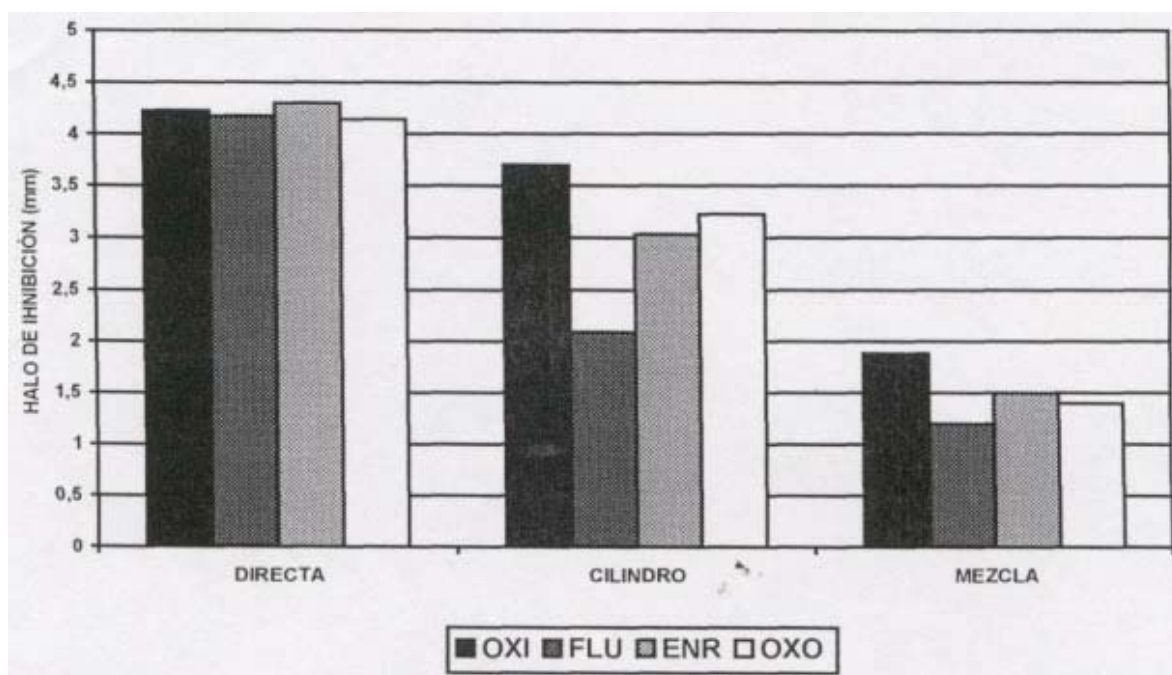


Gráfico N° 2: Comparación del efecto de la forma de aplicación de los antibacterianos en el medio de cultivo usando *B. subtilis* B.G.A. como cepa sensibles.

6. DISCUSION

Las drogas antibacterianas son ampliamente usadas en animales productores de alimento para terapia, profilaxis y como promotor de crecimiento. Desde el punto de vista de salud pública, estas aplicaciones pueden conducir a residuos inaceptables en los alimentos derivados de estos animales. Los riesgos del consumidor al ingerir alimentos que contienen residuos de drogas antibacterianas ha sido discutido por muchas autoridades en muchos países.

Para evitar el mal uso de los antibacterianos en animales que proporcionen alimento al hombre, es imprescindible que el profesional a cargo de los tratamientos y de la alimentación de dichos animales, esté familiarizado con los efectos farmacodinámicos y toxicológicos de un gran número de preparaciones farmacológicas que son útiles para el diagnóstico, prevención, control y/o tratamiento de las enfermedades de los animales, y especialmente de las preparaciones farmacológicas que use habitualmente (Booth y Mc Donald, 1988).

Los factores más importantes que se deben controlar durante la ejecución del Método Microbiológico son: la profundidad del medio de agar así como también su composición y su pH, las características del microorganismo en ensayo, la temperatura y el tiempo de incubación, la sustancia inhibitoria probada, la naturaleza de la nitidez del borde de la zona. Se debe tener en cuenta también la posibilidad de interferencia por inhibidores microbianos que aparecen en forma natural en el material de ensayo, por lo que conviene revisarlo antes de ser usado.

Del gráfico N° 1, que señala el efecto que tuvo cada uno de los antibacterianos (oxitetraciclina, flumequina, enrofloxacino y ácido oxolínico) usando una misma concentración frente a pH 6.0 y pH 8.0 del medio de cultivo y *B. subtilis* B.G.A. como cepa sensible, se desprende la importancia del pH que influye notablemente sobre la acción inhibitoria del antibacteriano, lo cual se expresa como diferencias en el tamaño del halo de inhibición del crecimiento bacteriano para una misma concentración de éste frente a los dos pH. Sin duda, el hecho de que los antibacterianos hayan sido mejor detectados en un medio de cultivo a pH 6.0 era un resultado que se esperaba ya que está corroborado que el pH tiene influencia ya sea en la actividad o la difusión del antibacteriano en el agar. Como Pichnarcik y col (1969) lo señalan, cada antibacteriano tiene un pH del medio de cultivo en el cual hay mayor posibilidad de detectarlo. Si se varía este pH adecuado, disminuye su actividad provocando halos poco nítidos, a la vez que afectaría su difusibilidad en el medio de cultivo, dando como resultado halos de inhibición más pequeños.

En el caso de flumequina, se usó una concentración de 0.08 µg/100µl y se midió en promedio 5.7 mm de halo de inhibición del crecimiento bacteriano en el medio de cultivo a pH 6.0 y en pH 8.0 no se detectó la presencia de dicha concentración. En el caso de oxitetraciclina y ácido oxolínico también se aprecia fácilmente una diferencia, oxitetraciclina con una concentración de 0.4 µg/100µl formó un halo de 5.8 mm en el medio de cultivo a pH 6.0 mientras que a pH 8.0 sólo 2.8 mm, algo similar ocurrió con ácido oxolínico donde con una concentración de 0.4 µg/100µl en un medio de cultivo a pH 6.0 generó un halo de 6.0 mm en cambio a pH 8.0, 2.6 mm. Diferencia menos marcada que los anteriores antibacterianos resultó al probar enrofloxacino, donde en el medio de cultivo a pH 6.0 el halo formado midió 5.9 mm y a pH 8.0, 4.1 mm. Finalmente se deduce que el pH 6.0 es el más favorable para la detección de oxitetraciclina, flumequina, enrofloxacino y ácido oxolínico.

De los resultados obtenidos, el dato que mejor pone de manifiesto la importancia del pH del medio de cultivo en que se realizan las pruebas para la detección de residuos de antibacterianos, es el caso de la flumequina en la cual probando una misma concentración, a pH 6.0 generó un halo de 5.7 mm y a pH 8.0 no se detectó (Tabla N° 1), lo que quiere decir que si se considera la concentración mínima detectable para ese antibacteriano en un medio de cultivo a pH 6.0, sería imposible detectarlo a pH 8.0 y se caería en el irremediable error de diagnosticar falsamente negativa una muestra a residuos de antibacterianos por la simple razón de no haberla analizado con un pH adecuado para la detección de éste. Por otra parte el mismo error se cometería con oxitetraciclina, enrofloxacino y ácido oxolínico ya que al afectar notablemente el pH del medio de cultivo la acción inhibitoria del antibacteriano, se haría menos sensible el método microbiológico a la detección de residuos de ellos.

Los datos obtenidos en la presente investigación concuerdan con trabajos ya realizados que opinan que la oxitetraciclina obtiene una mejor respuesta a pH 6.0 (Bielecka y col., 1981; Rojas, 1986; Mayor, 1990; Pérez, 1993; Apablaza, 1996; Ellerbroek y col., 1997)). Para el caso de flumequina, enrofloxacino y ácido oxolínico también hay trabajos que concuerda con que el pH 6.0 es el más adecuado para su detección, como son las experiencias realizadas por Valsset y col (1989), Pérez (1993) y Apablaza (1996). Sin embargo, otros trabajos realizados por Ellerbroek y col. (1997) indican que enrofloxacino tienen mejor acción inhibitoria a pH 8.0, lo que no se ajusta a los resultados obtenidos. La diferencia encontrada en cuanto al pH del medio de cultivo para detectar enrofloxacino se debe probablemente a que éste antibacteriano es una sustancia anfotérica ya que posee dos grupos ionizables, uno de pka 6 y otro de pka 8.8, por lo que puede actuar tanto como ácido o como base.

Por otro lado, trabajos realizados por Nouws y col. (1979) y Mayor (1990), indican que existen antibacterianos como la eritromicina y espiramicina que se detectan mejor usando pH 8.0 en el medio de cultivo, así como también hay otros como las sulfas que según Nouws y col. (1979), Gesche (1986) y Valsset y col. (1989) se detectan mejor en un medio de cultivo a pH 7.2.

Se puede concluir entonces, que cada antibacteriano posee un pH más favorable para su acción inhibitoria y de ésto se desprende la importancia de incluir en el Método Microbiológico el uso de tres niveles de pH (6.0, 7.2 y 8.0) del medio de cultivo.

En cuanto a las bacterias sensibles utilizadas en la presente investigación, *B. subtilis* B.G.A. y *B. cereus* ATCC 11778 presentan una ventaja frente a *E. coli* 11303 y es que debido a que las primeras nombradas son aerobias esporuladas se usaron suspensión de esporas puras, conociendo su exacta concentración y se conservaron a temperatura de refrigeración mientras duró el estudio (aproximadamente 3 meses), sin que se altere la calidad ni la cantidad de los microorganismos por unidad de volumen. En cambio con *E. coli* 11303 se usaron formas vegetativas las cuales se debieron repicar en caldo cerebro-corazón incubando a 30° C por 18 a 24 h tres veces antes de ser utilizados y se debió preparar para cada ensayo una nueva suspensión.

Por otro lado, las tres bacterias tuvieron aspectos muy similares, los que fueron coeficientes de correlación muy parejos, la mayoría alrededor de un 99% con un rango entre 97.2% y 99.7% (anexo N° 2). Lo mismo ocurrió con las desviaciones estándar con un rango 0.0 y 0.89 y coeficientes de variación con un rango entre 0.0 y 8.83, donde todos coincidieron en ser bastante pequeños (anexo N° 2).

Ellerbroek y col. (1997) opinan que *B. cereus* ATCC 11778 es la bacteria indicada para la detección de residuos de oxitetraciclina, *B. subtilis* B.G.A. lo es para la de flumequina y *E. coli* ATCC 11303 para el caso de enrofloxacino y ácido oxolínico. Sin embargo, en cuanto a la habilidad para detectar residuos antibacterianos en el presente estudio resultó que la concentración más baja de oxitetraciclina fue captada por *B. subtilis* B.G.A. (0.05 µg), lo que coincide con los resultados obtenidos por Casanova (1984) quien detectó 0.05 µg de este antibacteriano en tejido animal usando esta misma cepa sensible y con los resultados obtenidos por Ramírez (1993) donde oxitetraciclina obtuvo una concentración mínima menor con *B. subtilis* B.G.A. que con *B. cereus* ATCC 11778 y *E. coli* ATCC 11303. Por otro lado, las quinolonas se detectaron en una menor concentración por *E. coli* ATCC 11303, captando 0.0008 µg de flumequina, 0.0004 µg para enrofloxacino y 0.05 µg para ácido oxolínico, seguida por *B. subtilis* B.G.A. quien detectó 0.02 µg de flumequina, 0.016 µg de enrofloxacino y 0.126 µg de ácido oxolínico. Por último la bacteria menos sensible fue *B. cereus* ATCC 11778 detectando 0.035 µg de flumequina y enrofloxacino y 0.238 µg de ácido oxolínico (cuadro N° 2).

Trabajos realizados por Ramírez (1993) coinciden en que *E. coli* ATCC 11303 es la bacteria más sensible frente a flumequina seguida por *B. subtilis* B.G.A., pero no coinciden en el caso de ácido oxolínico en que sus resultados dicen que *B. subtilis* B.G.A. es más sensible que *E. coli* ATCC 11303 frente a este antibacteriano. Los resultados de este autor concluyen al igual que la presente investigación en que *B. cereus* ATCC 11778 es menos sensible para la detección de flumequina y ácido

oxolínico pero opina que *E. coli* ATCC 11303 es la bacteria menos sensible para la detección de residuos de oxitetraciclina, lo que no se ajusta a los resultados obtenidos donde *B. cereus* ATCC 11778 fue la menos sensible frente a éste .

Considerando los diferentes resultados obtenidos para cada antibacteriano usando las diferentes bacterias sensibles como se muestra en el cuadro N° 2, se puede afirmar que los microorganismos usados en el Método Microbiológico tienen grados variables de sensibilidad hacia las diferentes familias de antibacterianos.

Analizando el gráfico N° 2 se puede observar que la forma de aplicación del antibacteriano al sustrato de cultivo influye sobre la capacidad inhibitoria de ellos. La aplicación directa del antibacteriano demostró ser la mejor forma de aplicación, esto se pudo deber a que al aplicar la muestra directamente, ésta tuvo contacto inmediato con el sustrato de cultivo, lo que no ocurría con las otras dos formas en la que tenían el cilindro como una especie de barrera entre la muestra y el medio de cultivo. Hussein (1988), probó el efecto del volumen de solución por cilindro en la estimación de la potencia de los antibacterianos en las pruebas de difusión encontrando que no habían efectos significativos en la estimación de potencia.

Cuando la cantidad de muestra necesaria para alcanzar los límites de sensibilidad exigidos para los métodos microbiológicos, es un volumen considerable, se podrían utilizar los cilindros ya que por su forma y capacidad pueden contener una mayor cantidad de muestra que la perforación hecha con el sacabocado, el inconveniente sería que al disminuir de alguna manera la sensibilidad de la prueba generando halos más pequeños, se debe adaptar el método a la sensibilidad exigida. La sensibilidad de las bacterias para detectar residuos de antibacterianos podría verse mejorada como lo describen Balbi y Hartman (1984) mediante la adición de pequeñas cantidades de antibacterianos al medio de cultivo así como también el uso de discos precargados que ha sido usado en el análisis de rutina de leche cruda.

Según Nakazawa (1995), aún cuando la incidencia de los residuos de antibacterianos en los alimentos de origen animal permanece baja y los riesgos de salud humana, asociados a estos residuos son pequeños en comparación a otros problemas de seguridad del alimento, la atención pública se ha enfocado en el asunto de los residuos. Hoy está en trámites de ser aprobado un proyecto de Fundación Chile para el análisis de éstos.

Se espera en general que los test rápidos, como lo es el Método Microbiológico, entreguen un primer alcance no costoso y confiable para el ensayo de muestras, que satisfagan las demandas de test cualitativos y a veces semicuantitativos, ya que la zona de inhibición es directamente proporcional con la concentración del antibacteriano. El fin de esto es determinar si un producto alimenticio debería liberarse a la cadena de alimento o quedar retenido dependiendo de los resultados. Considerando estas características que hacen ventajoso el Método Microbiológico, es una excelente herramienta para ser usado a nivel de plantas

faenadoras ya que la sola presencia de residuos de antibacterianos, no importando la concentración en que se encuentre, hace obligatorio su decomiso. Diferente es cuando se aceptan límites máximos residuales ya que entonces se necesita conocer el contenido exacto de inhibidores que contenga la muestra, lo que se logra con el Método cuantitativo como el HPLC. Por otra parte, el Método Microbiológico es bastante subjetivo lo que se nota por las diferencias que existen entre una repetición y otra, que a pesar de ser pequeñas, cuando se exige un mínimo de sensibilidad de la muestra o tener que cumplir con un límite máximo residual, podría llegar a no cumplirse debido a estas diferencias.

Nakazawa (1995) también afirma que, es necesario el establecimiento de estándares internacionales que aseguren la protección del alimento humano, y la armonización del comercio internacional de productos animales. Estudios de la evaluación de la seguridad de las drogas deben continuarse con respecto a aspectos farmacológicos, toxicológicos y químicos. En particular, los efectos de los antibacterianos residuales en los alimentos de los consumidores por ejemplo: reacciones alérgicas o la inducción de bacterias resistentes deben ser investigadas.

7. CONCLUSIONES

- El medio de cultivo a pH 6.0 es más adecuado que el de pH 8.0 para la difusión en el medio de cultivo de oxitetraciclina, flumequina, enrofloxacino y ácido oxolínico y su posterior detección.
- La bacteria más sensible para la detección de oxitetraciclina fue *B. subtilis* B.G.A. y para el caso de enrofloxacino, flumequina y ácido oxolínico, *E. coli* ATCC 11303.
- La aplicación directa de la suspensión del antibacteriano realizado con sacabocado en el medio de cultivo es más adecuada que incluir en el método el uso de cilindros de vidrio para la detección de residuos de antibacterianos.

8. BIBLIOGRAFIA

- ALLISON, J. R. D. 1985. Antibiotics residues in milk. Br. Vet. J. 141 (1) : 9 - 16 .
- ALVARADO, V.; J. W. SCHÄFER; R. ENRIQUEZ; M. MONRAS. 1988. Curso de postgrado, Enfermedades de peces y sus técnicas diagnósticas. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Austral de Chile. Valdivia.
- AOAC.1995.OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS OF AOAC INTERNATIONAL. Arlington. Virginia. Volumen I . Capitulo 5 : 33 - 36.
- APABLAZA, D. 1996. Caracterización de seis antibacterianos por electroforesis de alto voltaje/bioautografía, evaluados por densitometría. Seminario de titulación. Facultad de Ciencias. Universidad Austral de Chile. Valdivia.
- ARCHIMBAUT, P.; G. AMBROGGI; S. NICOLAS. 1988. Oxolinic Acid in the trout: Bioavailability and the Tissue Residues. Ann. Rech. Vet. 19 (1) : 39 - 43.
- AUSTIN, B. 1988. Aquaculture International Congress and Exposition Congress Proceedings. Vancouver. Canada.
- BALBI, G.M AND P. A. HARTMAN. 1984. Highly Sensitive Paper- Disc Assays for Detecting Penicillin in Milk. Journal of Protection. Vol. 48 N° 1: 16-20.
- BIELECKA, M. ; J.D. BALDOCK ; A. W. KOTULA. 1981. Determination of antibiotic in meat using Bacillus stearothermophilus spores. J. Food Prot. 44 : 194 - 200.
- BISHOP, J. R.;C.H. WHITE.1984. Antibiotics Residues Detection in Milk - a review. J. Food. Prot. 47 : 647 - 652.
- BJORKLUND, H.; J. BONDESTAM; G. BYLUND. 1990. Residues of Oxitetraciline in Wild Fish and Sediment From Fish Farms. Aquaculture 86 (4) : 359 - 367.
- BJORKLUND, H.; A. ERIKSSON; G. BYLUND 1992. Temperature Related absorption and excretion of oxolinic acid in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture 102 : 17-27.
- BOOTH, N. H. ; L.E. McDONALD. 1988. Farmacología y terapéutica Veterinaria. Editorial Acribia. Zaragoza. España.

- BOWSER, P. R.; G. A. WOOSTER; J. ST LEGER; J. G. BABISH. 1992. Pharmacokinetics of enrofloxacin in fingerling rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). J. Vet. Pharmacol. Therap. 15 : 62 - 71.
- BRAVO, S. 1993. Uso de quimioterápicos en enfermedades de salmonídeos. Chile Pesquero 75 : 57 - 59.
- CASANOVA, C. 1984. Evaluación de la técnica del B. subtilis B.G.A. para detección de antibióticos y sulfonamidas en carne. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Austral de Chile. Valdivia.
- CERCOS, A. 1957. Los antibióticos y sus aplicaciones agropecuarias. Ed. Salvat. Barcelona. España.
- CHEVALIER, R.; J. P. GERARD; C. MICHEL. 1981. Distribution et cinétique tissulaire de la flumequine chez la truite arctique (*Salmo gairdneri*, Richardson). Recherche de résidues. Rev. Med. Vet. 12 : 831 - 837. Citado por Sohlberg, S. y col. 1990.
- CHILE. 1997 a. MINISTERIO DE ECONOMIA FOMENTO Y RECONSTRUCCION. Sistema de control de residuos en peces de exportación. Servicio Nacional de Pesca. ORD. SP. N° 959/97. Valparaíso.
- CHILE. 1997 b. MINISTERIO DE SALUD. Reglamento sanitario de alimentos. Diario oficial de la República de Chile. Santiago, martes 13 de mayo.
- COROLE, M. K. 1988. Regulation of residues in meat and poultry products. J. Anim. Sci. 66:413-433.
- DOLZ, H. 1992. Consideraciones sobre el empleo de la quimioterapia antibacteriana en salmonicultura. Actualidad Farmacéutica 49 (2): 7 - 9.
- ELLERBROEK, L; C. SCHWARZ; G. HILDEBRANDT; E.WEISE; E. BERNOTH; H. PLUTA; G. ARNDT. 1997. Zur mikrobiologischen Erfassung von Rückständen antimikrobiell wirksamer Stoffe beim Fisch. Arch. für Lebensmittelhygiene 48 : 1 -24.
- ENGEL, H. W. B.; F. M. VAN LEUSDEN; J. F. M. NOUWS. 1983. Evaluation of the european community's four-plate method for the detection of residues of antimicrobial drugs in slaughtered animal. Antimicrobial and agriculture. Proc. 4 th Int. Symp. on Antibiotics in Agriculture: Benefits and Malefits. Anchor Brendon Ltd. Tiptree, Essex.
- ENRIQUEZ, R. ; J. GONZALEZ; J. W. SCHAFER. 1990. Evaluación preliminar de Lincomicina como promotor de crecimiento en salmonídeos de crecimiento intensivo. VIII Congreso de Medicina Veterinaria. Valdivia. Chile

- FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANITATION OF THE UNITED NATIONS WOLD HEALTH ORGANITATIONS. 1969. Specification for identily and purity of some antibiotics. FAO. Nutrition Meating, Report N° 45. Roma.
- GARCIA, C.; C. GALLEGUILLOS. 1990. Estudio preliminar de los efectos del antibiótico flavomicin en la productividad de trucha arcoiris. Arch. Med. Vet. Número Extraordinario Resúmenes de trabajos del VIII Congreso de Medicina Veterinaria. Resumen N° 137. Valdivia. Chile.
- GESCHE, E. 1986. Detección de residuos de antibacterianos en carne. Técnica del Badilus subtilis B.G.A. Monografías de Med. Vet. 8 : 1 - 5.
- GINN, R. E. ; R. CASE; V. S. PACKARD; S. TANINI. 1982. Cuantitative Assay of Betalactam Residues in raw milk using a Disk Assay Method. J. Food Prot. 45 . 571 - 573.
- HATCH, R. C. 1987. Residuos medicamentosos y químicos de los tejidos comestibles. Capitulo 66. En Booth, N. H. y L. E. McDonald. 1988.
- HEWITT, W. L. 1975. Residuos medicamentosos y químicos de los tejidos comestibles. Capitulo 66. En Booth, N. H. y L. E. McDonald. 1988.
- HUSSEIN, S. RAGHEB. 1988. Effect of Volume of Solution per Cylinder on Estimation of Antibiotic Potency in Diffusion Assay. Purdue University, Departament of Biochemistry, West Lafayette, In 47907. Citado por J. Assoc. off. Anal. Chem. Vol. 71. N° 5.
- HUSTVEDT, S. O.; T. STOREBAKKEN; R. SALTE. 1991. Does oral administration of oxolinic acid or oxytetracycline affect feed intake of rainbow trout. Aquaculture 92 : 109-113.
- ISHIDA, N. 1992. Tissue levéis of oxolinic acid after oral or intravascular administration to freshwater and seawater rainbow trout. Aquaculture 102: 9 -15.
- JACOBSEN,M.D. 1989. Withdrawal times of freshwater rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, after treatment with oxolinic acid, oxytetracycline and trimetoprim. J. Fish. Dis. 12 : 29 - 36.
- KASUGA, Y.; A. SUGITANI; F. YAMADA; M. ARAI; S. MORIKAWA. 1984. Oxolinic acid residues in tissues of cultured rainbow trout and ayu fish. J. Food Hyg. Soc. Japan. 25 (6): 512 - 516. Citado por Ishida, N. 1992

- LANCINI, G. ; F. PARENTI. 1983. Antibiotics and integrated view. 1° ed. California, M.P. Starr.
- MAYOR, M. 1990. Evaluación de una técnica de extracción de antibiótico a partir de tejido muscular de ave contaminado artificialmente. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Austral de Chile. Valdivia.
- McCRACKEN, A.; J.J. O' BRIEN; N. CAMPBELL. 1976. Antibiotics residues and their Recovery from Animal Tissues. J. Appl. Bacteriol. 41 : 129-135.
- MEREDITH, W. E. ; H. H. WEISER ; A. R. WINTER. 1965. Chlortetracycline and oxytetracycline residues in Poultry Tissues and Eggs. Appl. Bacteriol. 13 : 86-88.
- MOATS, W. A. 1983. Determination of Penicillin G, Penicillin V and Cloxacilin in Milk by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography. J. Agric. Food. Chem. 31 : 880 - 883.
- NAKAZAWA, H.1995. Overview of Antibiotics Used For Agriculture and Residual Analysis in Japan. Department of analytical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Science, Hoshi University, Ebara 2-4-41, Shinagawa-Ku, Tokyo 146 Japan. Citado por AOAC.1995. Chemical Analysis For Antibiotics Used in Agriculture. capitulo 2: 31 - 46.
- NEU, H. C 1988. Bacterial resistance to fluoroquinolones. Res. Inf. Dis. 10 : 557 - 563.
- NOUWS, J. F. M.; M. SCHOTHORST; G. ZIV. 1979. A critical evaluation of Several Microbiological Test Method for Residues of Antimicrobial Drugs in Ruminants. Arch. Lebensmittelhyg. 30 (1) : 4 - 8.
- O' GRADY, P. ; M. MOLONEY; R. SMITH. 1988. Bath administration of the quinolone antibiotic flumequine to brown trout *Salmo trutta* and Atlantic salmon *S. salar*. Dis. Aquat. Org. 4 : 27 - 33.
- PEREZ, A. 1993. Detección microbiológica de inhibidores bacterianos en peces tratados experimentalmente con cuatro antibacterianos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Austral de Chile. Valdivia.
- PICHNARCIK, J.; S. WENZEL; W. GIBKE. 1969. Beitrag zur Methodik des Hemmstoffnachweises in Organen und Muskulatur von Schlachttieren. Archiv. Für Lebensmittelhygiene, 20 : 272 - 279.

- RAMIREZ, M. 1993. Sensibilidad de detección microbiológica y de residuos de antibacterianos de uso común en Salmonicultura. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Austral de Chile. Valdivia.
- ROBERTS, M. 1987. Therapeutics failures with Antimicrobial drug treatment J. Am. Med. Vet. Ass. 185: 1150-1154.
- ROGSTAD, A.; V. HORMAZABAL; O. F. ELLINGSEN; K. E. RASMUSSEN. 1991. Pharmacokinetics study of oxytetracycline in fish. Absorption, distribution and accumulation in rainbow trout in freshwater. Aquaculture 96 : 219 - 226.
- ROGSTAD, A.; O. F. ELLINGSEN; C. SYVERTSEN. 1993. Pharmacokinetics and bioavailability of flumequine and oxolinic acid after various routes of administration to Atlantic salmon in seawater. Aquaculture 110 : 207 - 220.
- ROHNER, P., M. SHALLIMAUM; J. NICOLET. 1985. Detection of Penicillin G and Benzylpenicilly (BPO) Derivates in cow Milk and Serum by means of an ELISA. J. Food. Prot. 48 : 59 - 62.
- ROJAS, E. 1986. Detección de Residuos de Antibióticos en Pollos Tratados Experimentalmente. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Austral de Chile. Valdivia.
- SAMUELSEN, O. B. ; B. T. LUNESTAD; B. HUSSEVAG; T. HOLLELAND; A. ERVIK. 1992. Residues of oxolinic acid in wild fauna following medication in fish farm. Dis. Aquat. Org. 12: 111-119.
- SALTE, R.; K. LIESTOL. 1983. Drug withdrawal from farmed fish. Acta. Vet. Scand. 24 : 418 - 430. Citado por Jacobsen. 1989.
- SCHMIDT-HEBBEL, H. 1981. Avances en ciencias y tecnologías de los alimentos. Alfabet Impresores. Santiago. Chile.
- SILVA, J.; ANHALT. 1980. Determinación de oxitetraciclina en cobayos infectados intramuscularmente comparando algunos métodos. Arch. Med. Vet. 12 : 79 -106.
- SMITH, H. W. 1974. Residuos medicamentosos y químicos de los tejidos comestibles. Capítulo 66. En Booth, N. H. y L. E. McDonald. 1988.
- SOHLBERG, S.; K. CZERWINNSKA; K. RASMUSSEN; N. E. SOELI. 1990. Plasma concentrations of flumequine after intraarterial and oral administration to rainbow trout *Salmo gairdneri* exposed to low water temperatures. Aquaculture 84 (3-4) : 355-361.

- STAMM, J. M. 1989 In Vitro Resistance by Fish Pathogens to Aquacultural Antibacterials, Including the Quinolones Difloxacin (A-56619) and Sarafloxacin (A-56620). J. Aq. Animal. Health. 1 : 135 -141.
- TAYLOR, S. L. 1985. Food allergies and Sensitivities. Food Technol. 39 : 65-71.
- TROLLDENIER, H 1980. Antibióticos en Medicina Veterinaria. Editorial Acribia. Zaragoza. España.
- VALSET, G. 1989. Routine microbiological method for detection of antibiotic or chemotherapeutics in fish. X Symposium WAVFH in Stockolm. Sweden.
- WOODWARD, K.; G. SHEARER. 1995. Antibiotic Used in Animal Production in the European Union-Regulation and Current Methods for Residue Detection. Citado por AOAC. Chemical Analysis For Antibiotics Used in Agriculture. capitulo 3: 47 - 75.
- ZAVANELLA, M.; S. TAGLIABRE. 1981. Non-Specific Responses in the Inhibitor Test: Lysozyme. Ach. Vet. Ital. 32 : 159 -161. Citado por Rojas, G. 1986.
- ZIV G.; F. G. SULMAN. 1974. Distribution of aminoglicoside Antibiotics in Blood and Milk. Res. Vet. Sci. 17:68-74.

ANEXO N° 1

TABLA N° 3: Valores promedios de tamaños de halo (mm) usando *B. subtilis* B.G.A. frente a cada concentración ($\mu\text{g}/100\mu\text{l}$) de oxitetraciclina utilizadas para la confección de las curvas de calibración, con sus respectivas desviaciones estándar y coeficientes de variación (%), con un medio de cultivo a pH 6.0.

OXITETRACICLINA (<i>B. SUBTILIS</i> B. G. A.)			
Concentración $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$	Tamaño de halo mm	Desviación estándar	Coefficiente de variación %
0.40	5.53	0.12	2.18
0.35	5.17	0.11	2.15
0.30	4.69	0.11	2.32
0.25	4.11	0.10	2.49
0.20	3.63	0.05	1.38
0.10	2.38	0.18	7.73

TABLA N° 4: Valores promedios de tamaños de halo (mm) usando *B. subtilis* B.G.A. frente a cada concentración ($\mu\text{g}/100\mu\text{l}$) de flumequina utilizadas para la confección de las curvas de calibración, con sus respectivas desviaciones estándar y coeficientes de variación (%), con un medio de cultivo a pH 6.0.

FLUMEQUINA (<i>B. SUBTILIS</i> B. G. A.)			
Concentración $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$	Tamaño de halo mm	Desviación estándar	Coefficiente de variación %
0.09	6.12	0.17	2.82
0.08	5.68	0.10	1.73
0.07	5.20	0.11	2.11
0.06	4.65	0.10	2.26
0.05	4.13	0.15	3.64
0.04	3.00	0.06	2.11
0.03	2.25	0.18	7.83

TABLA N° 5: Valores promedios de tamaños de halo (mm) usando *B. subtilis* **B.G.A.** frente a cada concentración ($\mu\text{g}/100\mu\text{l}$) de enrofloxacinó utilizadas para la confección de las curvas de calibración, con sus respectivas desviaciones estándar y coeficientes de variación (%), con un medio de cultivo a pH 6.0.

ENROFLOXACINO (<i>B. SUBTILIS</i> B. G. A.)			
Concentración $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$	Tamaño de halo mm	Desviación estándar	Coficiente de variación %
0.10	6.45	0.20	3.06
0.09	6.17	0.14	2.22
0.08	5.44	0.18	3.39
0.07	5.10	0.09	1.76
0.06	4.72	0.10	2.08
0.05	4.21	0.08	1.87
0.04	3.27	0.16	5.00
0.03	2.40	0.08	3.40

TABLA N° 6: Valores promedios de tamaños de halo (mm) usando *B. subtilis* **B.G.A.** frente a cada concentración ($\mu\text{g}/100\mu\text{l}$) de ácido oxolínico utilizadas para la confección de las curvas de calibración, con sus respectivas desviaciones estándar y coeficientes de variación (%), con un medio de cultivo a pH 6.0.

ACIDO OXOLÍNICO (<i>B. SUBTILIS</i> B. G. A.)			
Concentración $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$	Tamaño de halo mm	Desviación estándar	Coficiente de variación %
0.50	8.26	0.32	3.89
0.45	6.92	0.13	1.88
0.40	6.18	0.08	1.35
0.35	5.54	0.09	1.61
0.30	4.60	0.14	3.07
0.25	3.88	0.15	3.87
0.15	2.58	0.11	4.25

TABLA N° 7: Valores promedios de tamaños de halo (mm) usando *B. cereus* ATCC 11778 frente a cada concentración ($\mu\text{g}/100\mu\text{l}$) de oxitetraciclina utilizadas para la confección de las curvas de calibración, con sus respectivas desviaciones estándar y coeficientes de variación (%), con un medio de cultivo a pH 6.0.

OXITETRACICLINA (<i>B. CEREUS</i> ATCC 11778)			
Concentración $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$	Tamaño de halo mm	Desviación estándar	Coefficiente de variación %
1.00	4.14	0.13	3.21
0.90	3.73	0.11	2.87
0.80	3.28	0.07	2.13
0.70	2.99	0.02	0.55
0.60	2.75	0.10	3.81
0.50	2.30	0.10	4.37

TABLA N° 8: Valores promedios de tamaños de halo (mm) usando *B. Cereus* ATCC 11778 frente a cada concentración ($\mu\text{g}/100\mu\text{l}$) de flumequina utilizadas para la confección de las curvas de calibración, con sus respectivas desviaciones estándar y coeficientes de variación (%), con un medio de cultivo a pH 6.0.

FLUMEQUINA (<i>B. CEREUS</i> ATCC 11778)			
Concentración $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$	Tamaño de halo mm	Desviación estándar	Coefficiente de variación %
0.20	6.05	0.14	2.28
0.09	4.05	0.06	1.09
0.08	3.20	0.06	1.98
0.07	2.85	0.06	1.92
0.06	2.45	0.06	2.24
0.05	2.07	0.52	2.50

TABLA N° 9: Valores promedios de tamaños de halo (mm) usando *B. cereus* ATCC 11778 frente a cada concentración ($\mu\text{g}/100\mu\text{l}$) de enrofloxacinó utilizadas para la confección de las curvas de calibración, con sus respectivas desviaciones estándar y coeficientes de variación (%), con un medio de cultivo a pH 6.0.

ENROFLOXACINO (<i>B. CEREUS</i> ATCC 11778)			
Concentración $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$	Tamaño de halo mm	Desviación estándar	Coficiente de variación %
0.20	5.95	0.14	2.32
0.15	4.57	0.15	3.25
0.10	3.66	0.05	1.38
0.09	3.27	0.06	1.73
0.08	3.03	0.05	1.70
0.07	2.82	0.07	2.66
0.06	2.67	0.10	3.87
0.05	2.28	0.12	5.12

TABLA N° 10: Valores promedios de tamaños de halo (mm) usando *B. cereus* ATCC 11778 frente a cada concentración ($\mu\text{g}/100\mu\text{l}$) de ácido oxolínico utilizadas para la confección de las curvas de calibración, con sus respectivas desviaciones estándar y coeficientes de variación (%), con un medio de cultivo a pH 6.0.

ACIDO OXOLÍNICO (<i>B. CEREUS</i> ATCC 11778)			
Concentración $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$	Tamaño de halo mm	Desviación estándar	Coficiente de variación %
0.80	6.50	0.19	2.92
0.70	5.60	0.24	4.23
0.60	4.98	0.08	1.51
0.50	4.30	0.06	1.47
0.40	3.03	0.05	1.70
0.30	2.57	0.05	2.01

TABLA N° 11: Valores promedios de tamaños de halo (mm) usando *E. coli* ATCC 11303 frente a cada concentración ($\mu\text{g}/100\mu\text{l}$) de oxitetraciclina utilizadas para la confección de las curvas de calibración, con sus respectivas desviaciones estándar y coeficientes de variación (%), con un medio de cultivo a pH 6.0.

OXITETRACICLINA (<i>E. COLI</i> ATCC 11303)			
Concentración $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$	Tamaño de halo mm	Desviación estándar	Coficiente de variación %
1.00	5.90	0.09	1.52
0.90	5.40	0.09	1.66
0.80	4.80	0.09	1.89
0.70	4.03	0.05	1.28
0.60	3.63	0.05	1.42
0.50	3.40	0.00	0.00
0.40	2.93	0.05	1.76
0.30	2.50	0.00	0.00
0.20	1.96	0.05	2.63

TABLA N° 12: Valores promedios de tamaños de halo (mm) usando *E. coli* ATCC 11303 frente a cada concentración ($\mu\text{g}/100\mu\text{l}$) de flumequina utilizadas para la confección de las curvas de calibración, con sus respectivas desviaciones estándar y coeficientes de variación (%), con un medio de cultivo a pH 6.0.

FLUMEQUINA (<i>E. COLI</i> ATCC 11303)			
Concentración $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$	Tamaño de halo mm	Desviación estándar	Coficiente de variación %
0.35	6.90	0.09	1.30
0.30	5.90	0.05	0.87
0.20	5.00	0.89	1.79
0.15	4.30	0.09	2.08
0.10	3.66	0.08	2.22
0.05	2.26	0.10	4.56

TABLA N° 13: Valores promedios de tamaños de halo (mm) usando *E. coli* ATCC 11303 frente a cada concentración ($\mu\text{g}/100\mu\text{l}$) de enrofloxacinó utilizadas para la confección de las curvas de calibración, con sus respectivas desviaciones estándar y coeficientes de variación (%), con un medio de cultivo a pH 6.0.

ENROFLOXACINO (<i>E. COLI</i> ATCC 11303)			
Concentración $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$	Tamaño de halo mm	Desviación estándar	Coficiente de variación %
0.0300	7.87	0.55	6.95
0.0250	6.98	0.48	6.86
0.0200	5.88	0.26	4.36
0.0090	4.10	0.32	7.87
0.0080	3.60	0.20	5.56
0.0070	3.33	0.29	8.83
0.0060	3.00	0.13	4.22
0.0055	2.77	0.19	6.73

TABLA N° 14: Valores promedios de tamaños de halo (mm) usando *E. coli* ATCC 11303 frente a cada concentración ($\mu\text{g}/100\mu\text{l}$) de ácido oxolínico utilizadas para la confección de las curvas de calibración, con sus respectivas desviaciones estándar y coeficientes de variación (%), con un medio de cultivo a pH 6.0.

ACIDO OXOLINICO (<i>E. COLI</i> ATCC 11303)			
Concentración $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$	Tamaño de halo mm	Desviación estándar	Coficiente de variación %
0.100	6.10	0.09	1.47
0.095	5.56	0.12	2.18
0.090	5.10	0.09	1.75
0.085	4.60	0.09	1.94
0.080	4.08	0.12	2.86
0.075	3.70	0.13	3.42
0.070	3.38	0.08	2.23
0.065	3.08	0.08	2.44
0.060	2.75	0.11	3.81
0.055	2.50	0.09	3.58

ANEXO N° 3

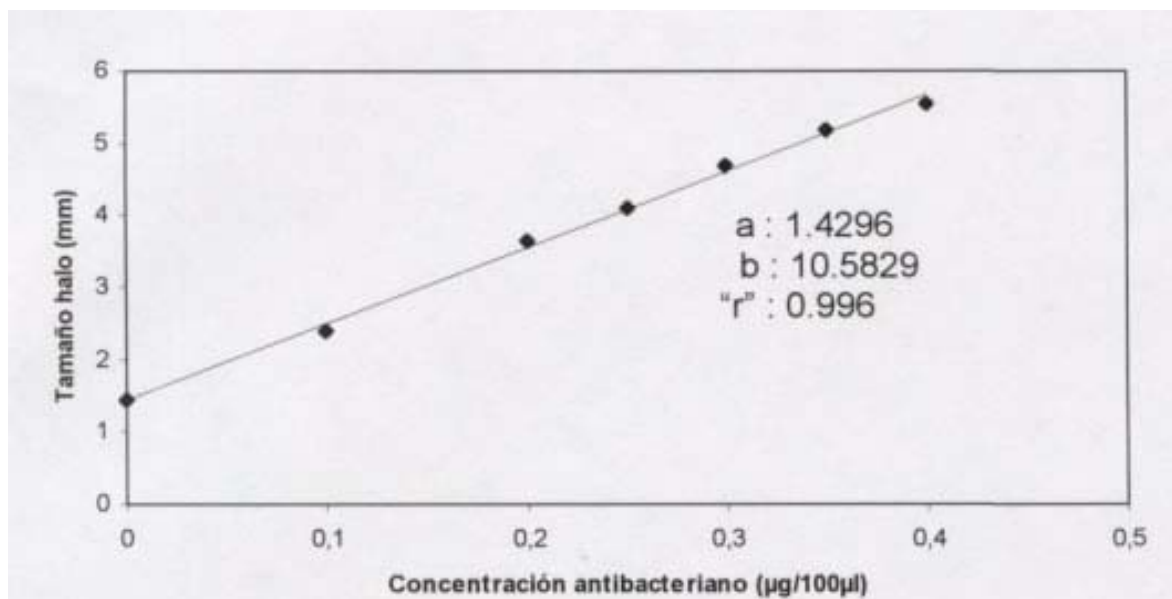


Gráfico N° 3: Curva de calibración de oxitetraciclina usando *B. subtilis* B.G.A. como cepa sensible.

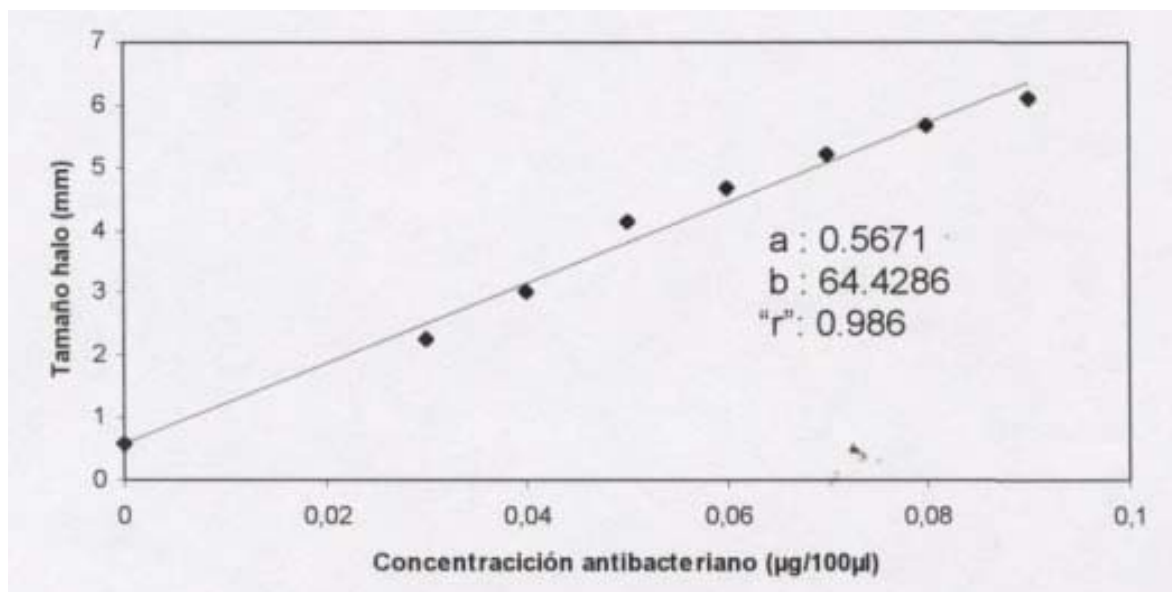


Gráfico N° 4: Curva de calibración de flumequina usando *B. subtilis* B.G.A. como cepa sensible.

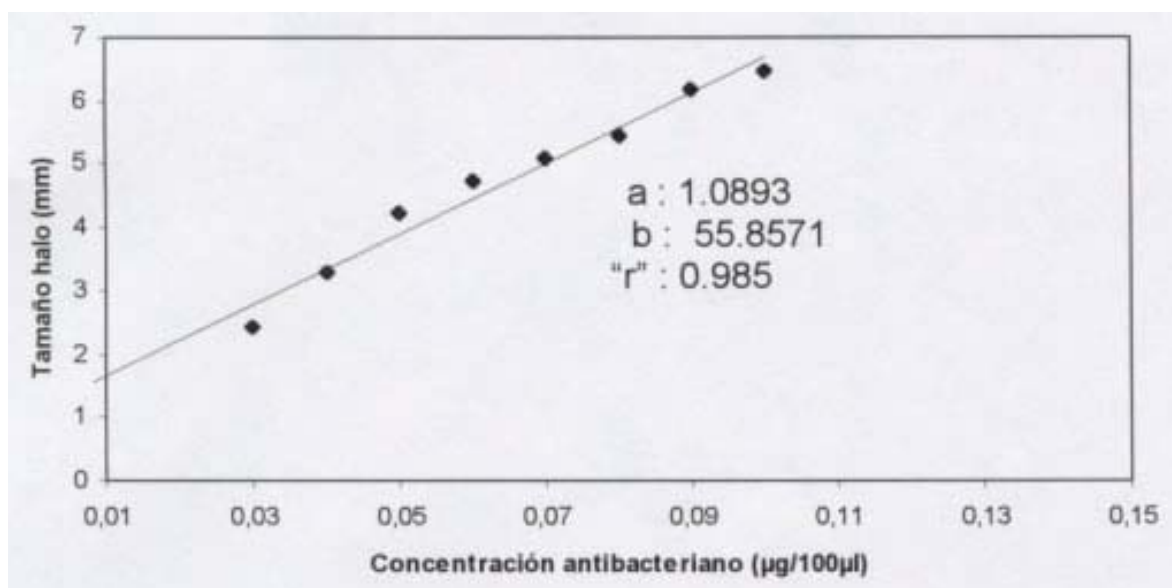


Gráfico N° 5: Curva de calibración de enrofloxacinó usando *B. subtilis* B.G.A. como cepa sensible.

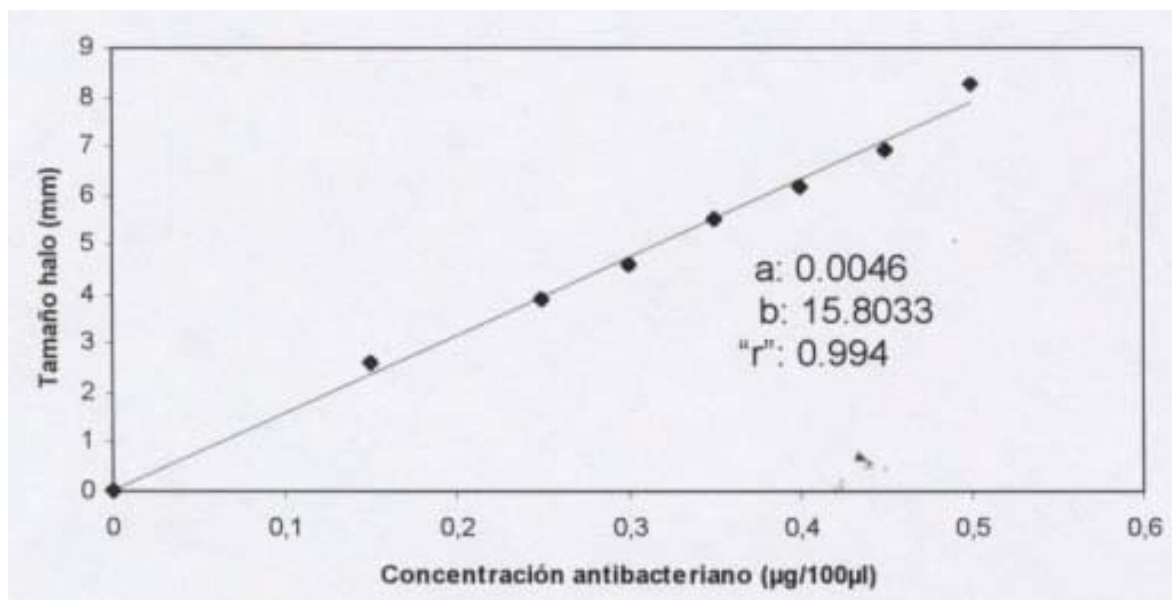


Gráfico N° 6: Curva de calibración de ácido oxolínico usando *B. subtilis* B.G.A. como cepa sensible.

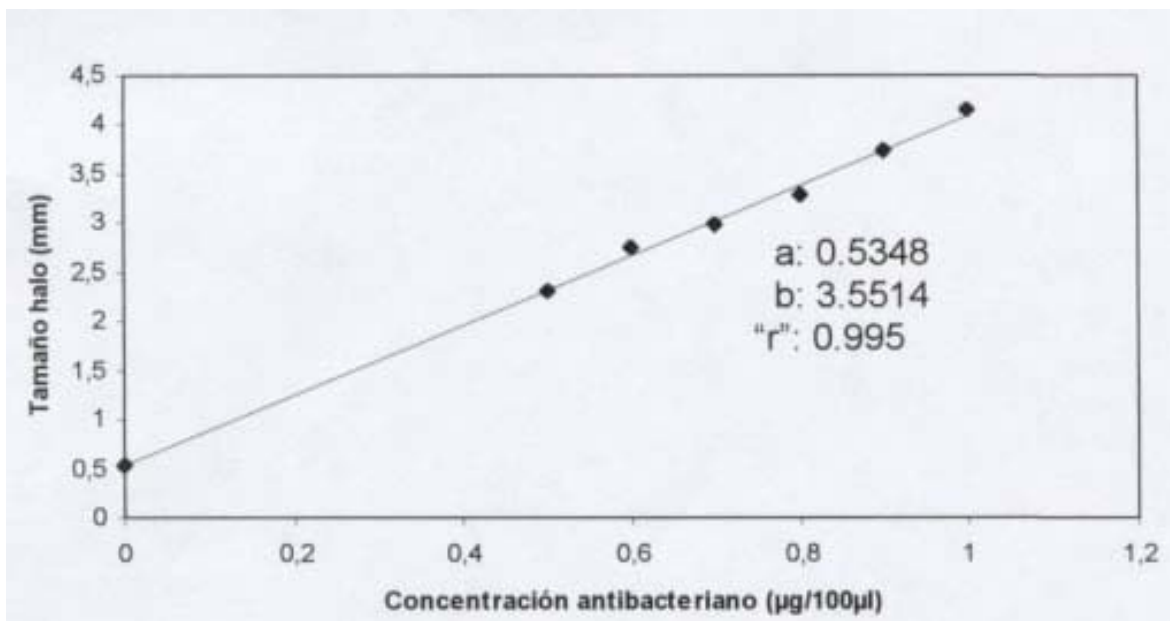


Gráfico N° 7: Curva de calibración de oxitetraciclina usando *B. cereus* ATCC 11778 como cepa sensible.

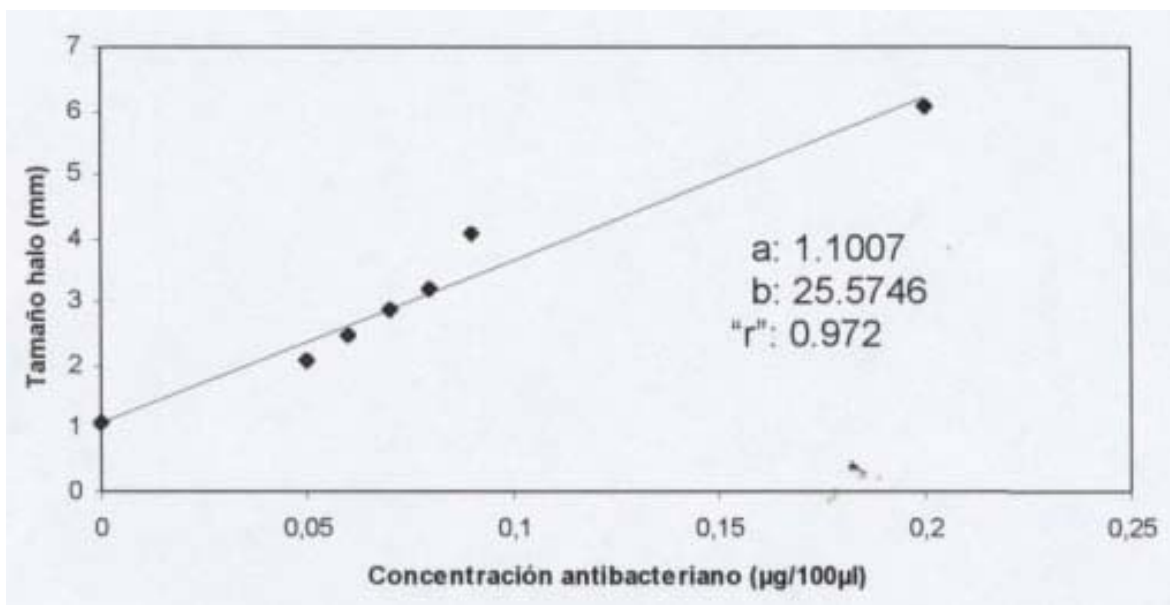


Gráfico N° 8: Curva de calibración de flumequina usando *B. cereos* ATCC 11778 como cepa sensible.

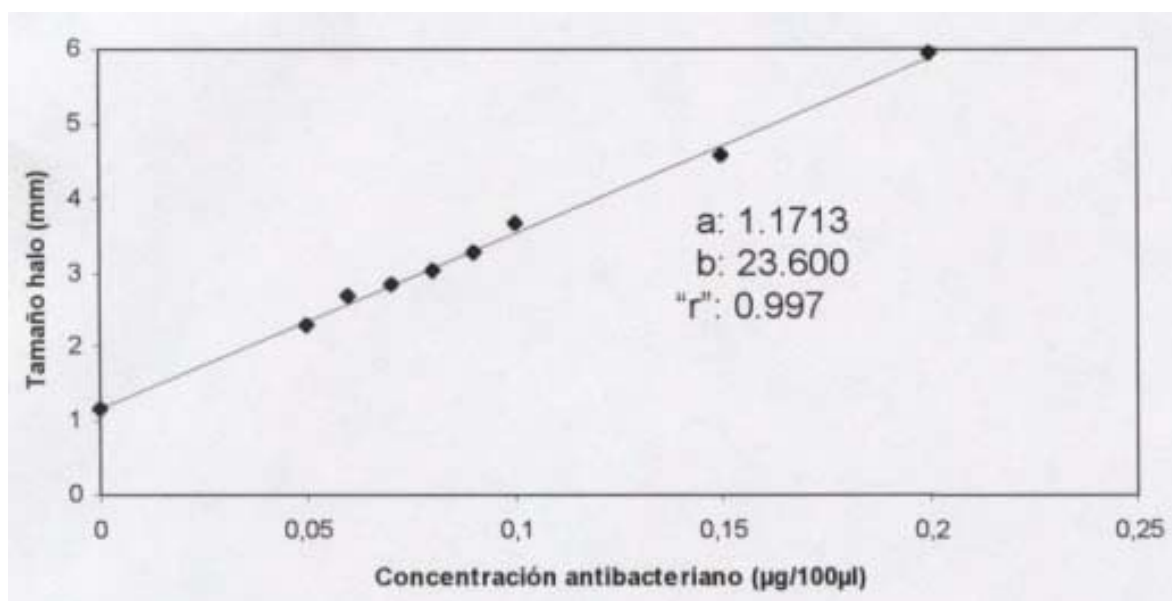


Gráfico N° 9: Curva de calibración de enrofloxacinó usando *B. cereus* ATCC 11778 como cepa sensible.

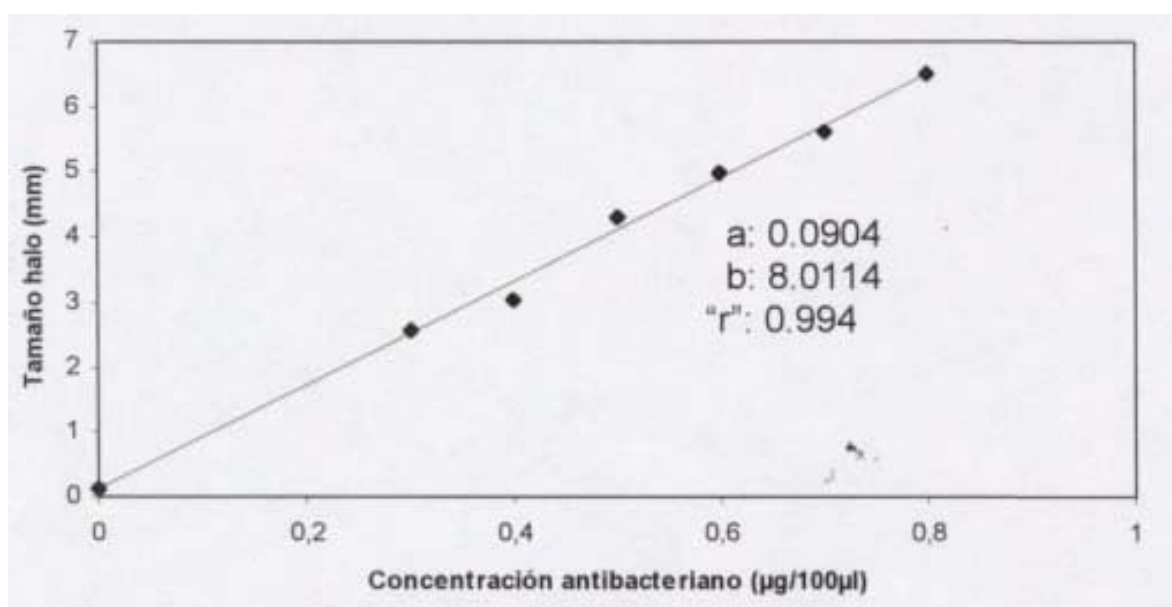


Gráfico N° 10: Curva de calibración de ácido oxolínico usando *B. cereus* ATCC 11778 como cepa sensible.

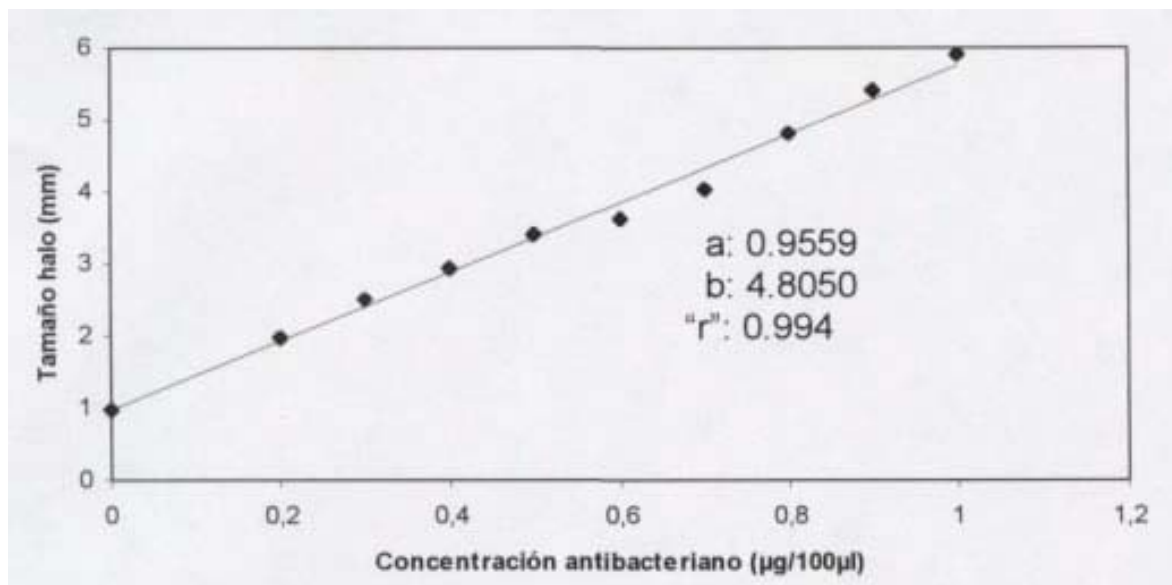


Gráfico N° 11: Curva de calibración de oxitetraciclina usando *E. coli* ATCC 11303 como cepa sensible.

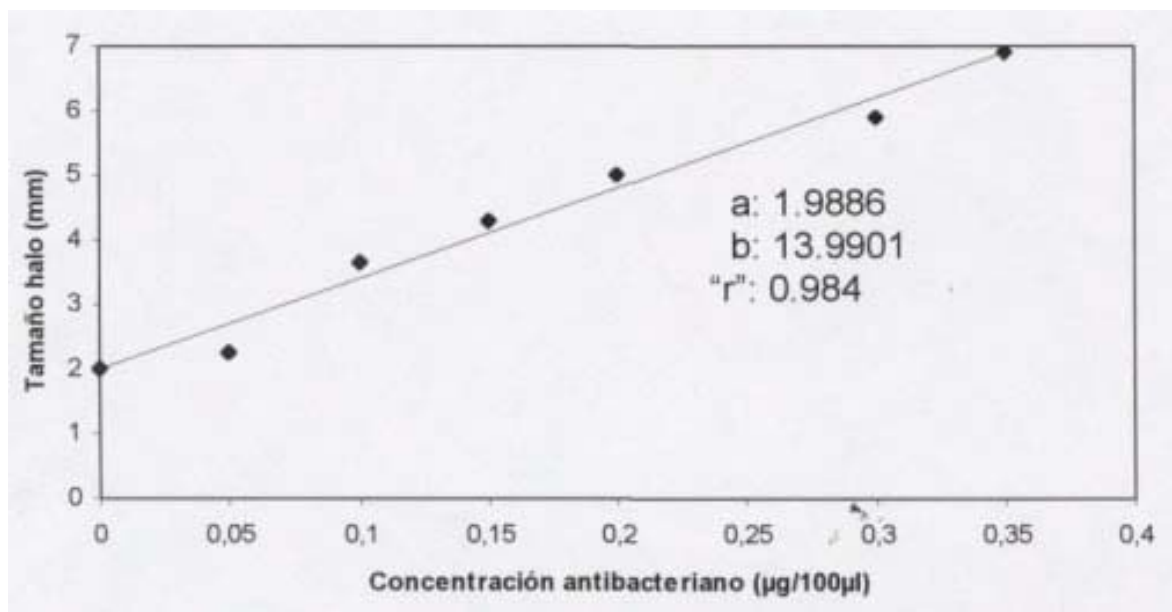


Gráfico N° 12: Curva de calibración de flumequina usando *E. coli* ATCC 11303 como cepa sensible.

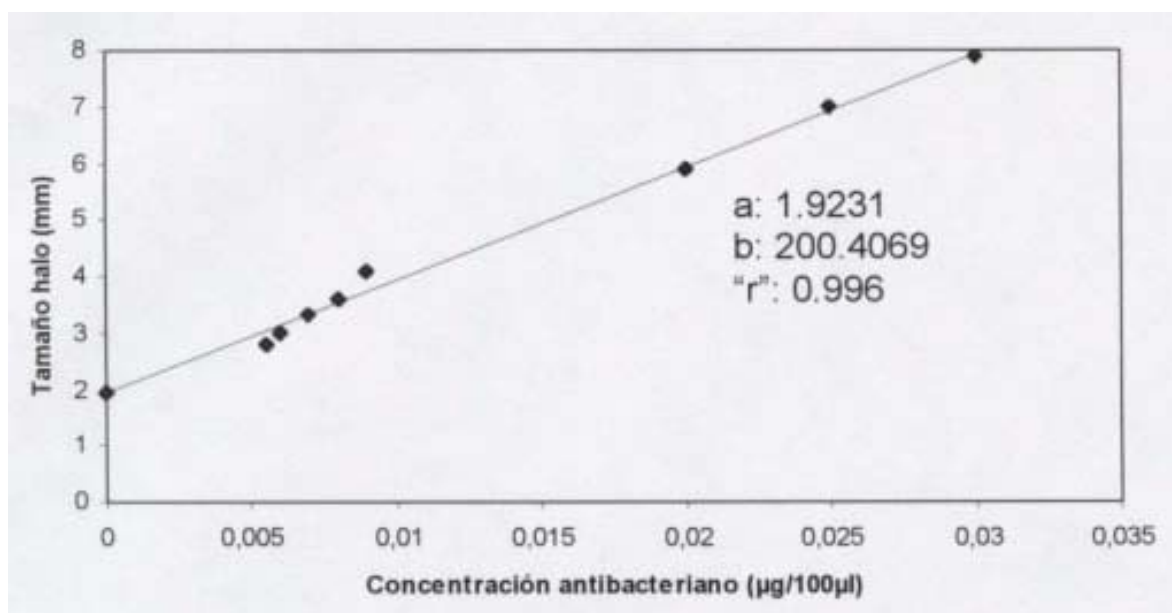


Gráfico N° 13: Curva de calibración de enrofloxacinó usando *E. coli* ATCC 11303 como cepa sensible.

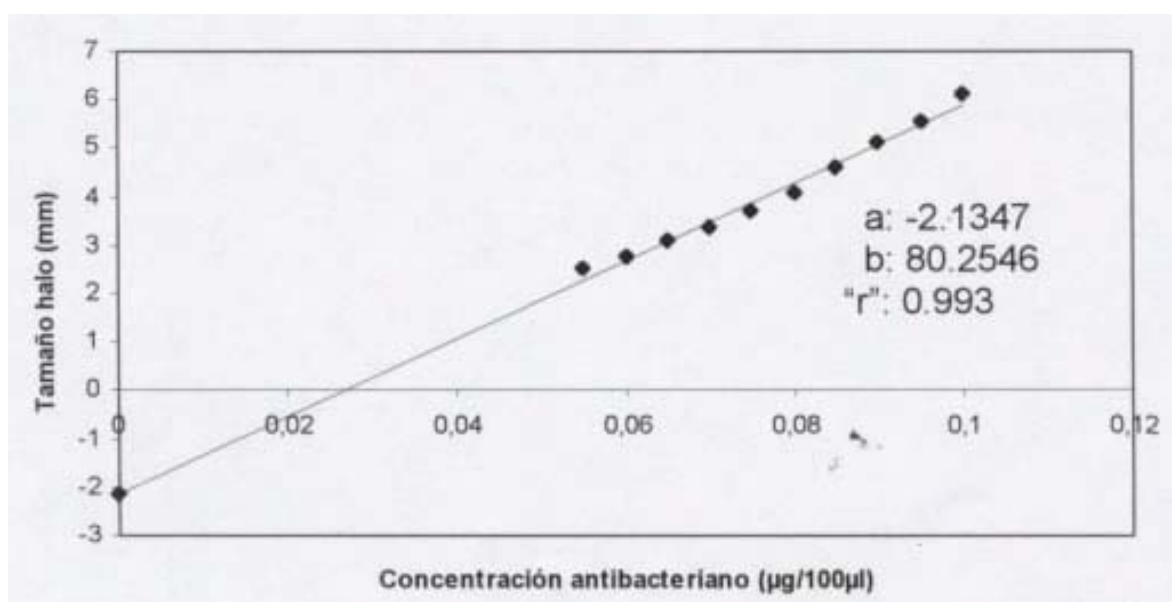


Gráfico N° 14: Curva de calibración de ácido oxolínico usando *E. coli* ATCC 11303 como cepa sensible.

ANEXO N° 4

TABLA N° 15: Comparación del efecto de aplicación para cada antibacteriano sobre la sensibilidad de detección usando *B. cereus* ATCC 11778 como cepa sensible. Concentración usada ($\mu\text{g}/100\mu\text{l}$), tamaño de halo (mm), Desviación estándar (D.S), y coeficiente de variación (C.V %), número de repeticiones de la prueba ("n"). El efecto fue probado con cada una de las cepas sensibles.

Antibiótico	$\mu\text{g}/100\mu\text{l}$	"n"	DIRECTA			CILINDRO			MEZCLA		
			mm	D.S	c.v %	mm	D.S	c.v %	mm	D.S	c.v %
OXI	0.98	3	4.24	0.19	4.43	3.29	0.17	5.26	2.00	0.10	4.77
FLU	0.12	3	4.00	0.09	2.13	2.16	0.15	6.97	1.10	0.08	6.71
ENR	0.12	3	4.23	0.08	1.84	2.23	0.19	8.40	1.33	0.07	5.84
OXO	0.50	3	4.45	0.23	5.20	2.85	0.10	3.51	2.03	0.07	3.20

TABLA N° 16: Comparación del efecto de aplicación para cada antibacteriano sobre la sensibilidad de detección usando *E. coli* ATCC 11303 como cepa sensible. Concentración usada ($\mu\text{g}/100\mu\text{l}$), tamaño de halo (mm), Desviación estándar (D.S), y coeficiente de variación (C.V %), número de repeticiones de la prueba ("n"). El efecto fue probado con cada una de las cepas sensibles.

Antibióticos	$\mu\text{g}/100\mu\text{l}$	"n"	DIRECTA			CILINDRO			MEZCLA		
			mm	D.S	c.v %	mm	D.S	c.v %	mm	D.S	c.v %
OXI	0.65	3	4.25	0.25	5.81	2.97	0.09	2.99	2.08	0.09	4.50
FLU	0.15	3	4.23	0.15	3.51	2.78	0.15	5.35	2.10	0.09	4.06
ENR	0.01	3	4.08	0.10	2.52	2.42	0.11	4.61	1.85	0.13	7.10
OXO	0.08	3	4.22	0.13	3.01	2.93	0.08	2.65	2.62	0.07	2.74