



UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
Facultad de Ciencias Veterinarias
Instituto de Ciencias Clínicas Veterinarias

**Aplicación de una prueba microbiológica de detección de residuos de antibióticos
en peces usando suero sanguíneo y músculo**

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

Cristian Marcelo Aguila Galleguillos
Valdivia Chile 2000

PROFESOR PATROCINANTE:

Dra. ERIKA GESCHE R.

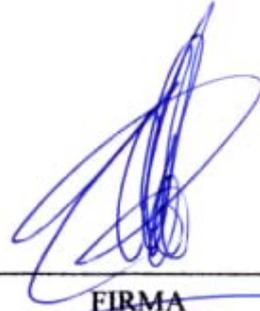


NOMBRE

FIRMA

PROFESORES CALIFICADORES:

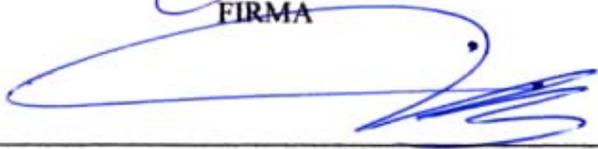
Dr. FREDERIK AHUMADA M.



NOMBRE

FIRMA

Dr. RICARDO ENRIQUEZ S.



NOMBRE

FIRMA

FECHA DE APROBACION: 13 DE ABRIL DEL 2000

AGRADEZCO PRIMERAMENTE A DIOS POR SU INFINITO AMOR, A MIS PADRES POR SU ABNEGADA PREOCUPACION Y ENTREGA Y, CON CARIÑO A PATY MORALES S.

INDICE

	<u>Página</u>
RESUMEN.....	1
SUMMARY.....	2
INTRODUCCION.....	3
MATERIAL Y METODO.....	12
RESULTADOS.....	17
DISCUSION.....	25
CONCLUSIONES.....	29
BIBLIOGRAFIA.....	30
ANEXOS.....	36

1. RESUMEN

APLICACION DE UNA PRUEBA MICROBIOLOGICA DE DETECCION DE RESIDUOS DE ANTIBIOTICOS EN PECES USANDO SUERO SANGUINEO Y MÚSCULO.

Con el propósito de probar una técnica microbiológica de detección de inhibidores bacterianos aplicados en peces y de determinar entre suero y músculo cual es la muestra más adecuada para detectarlos, se utilizó un Método Microbiológico con las cepas sensibles *B. subtilis* B.G.A y *Escherichia coli* ATCC 11303 a pH 6.0 y 8.0.

Para ello se emplearon 150 peces clínicamente sanos de la especie Salmón del Atlántico los cuales se dividieron en dos grupos de 75 peces cada uno con un peso promedio de 2.61 ± 0.40 Kg para el grupo A y 2.86 ± 0.40 Kg para el grupo B. Durante toda la fase experimental los peces fueron mantenidos en balsas jaulas en agua de mar a una temperatura que osciló alrededor de los 10 °C. A cada grupo se le administró una terapia antibiótica vía oral por medio del alimento por un lapso de 10 días. Los antibióticos administrados fueron Oxitetraciclina para el grupo A y Acido Oxolínico para el grupo B. Posteriormente se realizó un muestreo, a 5 individuos por grupo, en los días 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 y 30 post-tratamiento, tomando muestras de suero y músculo del mismo ejemplar las cuales se conservaron en congelación a -20 °C hasta su análisis.

Para el análisis de cada individuo se depositó por duplicado un trozo de músculo de 8 mm de diámetro por 2 mm de espesor, en la parte superior de las placas de Petri, que contenían el substrato de cultivo con las cepas sensibles. En la parte inferior de las mismas placas se depositaron 100 ul, por duplicado, de suero en cada uno de dos orificios practicados en el medio de cultivo.

Basándose en el tamaño de halo de inhibición de crecimiento de las cepas bacterianas provocado por cada antibacteriano se determinó que el pH más adecuado para ambos antimicrobianos es pH 6.0, Asimismo se pudo establecer que *B. subtilis* B.G.A fue más sensible que *E. coli* para detectar residuos de Oxitetraciclina y de Acido Oxolínico.

En el análisis del comportamiento de los antibacterianos en los tejidos analizados post-tratamiento, se estableció que el suero sanguíneo es más adecuado que músculo para la detección de residuos de los antibacterianos Oxitetraciclina y Acido Oxolínico.

• **Palabras claves:** Residuos – antibióticos – peces.

2. SUMMARY

ANTIBIOTIC RESIDUE DETECTION IN SERUM AND MUSCLE OF SALMONID BY MICROBIOLOGICAL METHOD

In order to prove a microbiological technique to detect bacterial inhibitors involving fish and to determine if serum or muscle is the most adequate sample to detect them, the with sensitive stumps *B. subtilis* B.G.A and *Escherichia coli* ATCC 11303 a Microbiological Method was used with pH 6.0 and 8.0.

Therefore, 150 clinically healthy *Salmo salar* fishes were tested and divided into two groups of 75 fishes each with an average weight of 2.61 ± 0.40 Kg for group A and 2.86 ± 0.40 Kg for group B. During all the experimental stage, the fishes were kept in floating cages in the sea at a temperature 10 °C. Each group was given an orally antibiotic therapy included in the food in a 10 days term. The antibiotic were Oxitetraciline for group A and Oxolinic Acid for group B. Later on, a sample of 5 individuals from each group was done, during the 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 and 30 days post treatment, taking samples of serum and muscle of the same fish which were frozen at -20 °C until analysis.

For the analysis of each individual for duplicate is placed, an 8 mm diameter and 2 mm thick piece of muscle, in the upper part de Petri plate that contain the culture substratum with the sensitive stumps. In the lower part of the same plate, 100 ul of the serum is placed in each of the two holes which are in the middle of the culture.

Taking account the size of the inhibition halo of the bacterial stumps growth caused by each antibacterial, was determined that the most adequate pH for both antimicrobic is pH 6.0. In the same way, established that the *B. subtilis* B.G.A was more sensitive than *E. coli* in order to detect Oxitetraciline and of Oxolinci Acid residue.

In the behavioural analysis of the antibacterial in the tissues analysed post treatment, was established that the blood serum is more appropriate than the muscle to detect the residues of the Oxitetraciline and Oxolinic Acid antibacterial

-
- **Keywords:** Residues – antibiotics – fish.

3. INTRODUCCION

La introducción de especies salmonídeas a Chile se remonta a principios de siglo con la importación de ovas de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y dos especies de trucha (*Salmo trutta* y *Oncorhynchus mykiss*), con el objeto de crear una piscicultura, la cual aún funciona al oeste de los Andes, Durante varios años se intentó desarrollar comercialmente el cultivo del salmón, pero sólo se logró poblar ríos y lagos del sur con truchas salmonídeas que dieron origen a la pesca deportiva para el turismo y de sustento para la población local (Achurra, 1992).

El desarrollo de la salmonicultura en Chile empezó comercialmente en la década de los 80 y basó su desarrollo en las enormes ventajas comparativas frente a los países del hemisferio norte, destacándose según Méndez y Munita (1989), Achurra (1992):

- Disponibilidad de fiordos protegidos, ríos y lagos con aguas de excelente calidad y libres de contaminación
- Bajo costo de la mano de obra.
- Personal altamente calificado.
- Excelente temperatura del agua
- Insumos disponibles.

Estas ventajas, que fueron el pilar del desarrollo de la industria en Chile, generaron una brecha en los costos de producción, que nuestro país aprovechó muy bien durante los primeros años de la década del 90 para posesionar sus productos en los mercados mundiales. Esto le otorgó a la industria nacional un liderazgo, llegando a ocupar los primeros lugares en los principales países consumidores como Japón y Estados Unidos (Samsing, 1998).

Tras el notable auge de esta actividad, los salmones y truchas cultivadas en lagos y litoral marino de la X, XI y XII regiones de Chile se han convertido en un producto de alto favoritismo internacional porque se considera que provienen de las aguas más limpias del mundo (Ezquerria, 1991).

La industria Chilena del cultivo del salmón tiene tres productos principales: El salmón del Pacífico o coho, el salmón del Atlántico o salar y la trucha. El principal destino del coho y la trucha es Japón, mientras que el salar es EE.UU (Samsing, 1998).

El valor de la producción nacional de productos pesqueros totales alcanzó a US\$ 1.873 millones en 1997, de lo cual el 40 por ciento tuvo su origen en la actividad de la salmonicultura (Achurra, 1998).

La industria salmonera con un crecimiento tan sorprendente desde los comienzos de los 80 hasta principios de los 90, registra un aumento del 10.000 por ciento en la producción de salmones. Sin embargo, el desarrollo mismo del sector y el aumento de las densidades de cultivo de salmones y truchas, más las condiciones ambientales adversas, hacen que los peces estén más expuestos a los agentes infecciosos productores de enfermedades (Mc. Cracken y col., 1976; Alvarado y col., 1988) puesto que el estrés originado por los sistemas de cultivos es un factor que disminuye la resistencia de los peces a las patologías (Jarpa, 1990; Bustos, 1991) dando origen a la presentación de ictioenfermedades (Alvarado y col., 1988).

Las patologías que afectan a los peces presentan diversas etiologías, dentro de las cuales podemos destacar las bacterianas, virales, fúngicas y parasitarias. Sin embargo, las bacterianas son las más importantes en el país representando un 43 por ciento del total (Bustos y col., 1992) perfilándose entre las más importantes en Chile: Enfermedad Bacteriana del Riñón (BKD), Septicemia Rickettsial del Salmón (SRS) y Enfermedad de la Boca Roja (ERM) (Alvarado y col., 1988; Bustos y col., 1992, Toledo y col., 1992).

Desde siempre el control de enfermedades ha sido la principal preocupación de los productores, utilizando variadas técnicas para disminuir al máximo la presencia de patologías, existiendo básicamente tres pilares fundamentales para el control, los cuales son: buenas prácticas de manejo, uso de vacunas como profilaxis y uso de compuestos antimicrobianos para el tratamiento (Austin, 1985).

El descubrimiento de los antimicrobianos y los innumerables avances logrados basándose en estas sustancias, ha revolucionado la ciencia y terapéutica médica, lo cual ha llevado a su utilización en forma intensiva, especialmente en el tratamiento de enfermedades clínicas de la especie humana (Moellering, 1978), como también distintas especies animales (Lehman, 1972; Smither, 1975; Barnes, 1979).

La utilización de medicamentos en producción animal ha alcanzado tal desarrollo, que aproximadamente el 80 por ciento de todos los animales explotados para la producción de alimentos reciben medicamentos en algún momento o en la mayor parte de su vida (Hatch, 1987).

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).

La utilización de antibacterianos en un principio cumplió una función terapéutica para controlar las patologías bacterianas, luego se sumó su uso en forma profiláctica con el objeto de disminuir la aparición de brotes de enfermedades. En los últimos años el hombre comenzó

a utilizarlos como promotores de crecimiento en los animales, logrando de esta forma una óptima conversión del alimento, mejorando la eficiencia de producción {Ziv y Sulman 1974; Cordle, 1988; García y Galleguillos, 1990}.

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 (Cercós, 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).

Los peces no son la excepción al uso de antimicrobianos y es así como hoy se usan ampliamente en la industria salmonera que al igual que en los animales de granja, obedece principalmente a tres fines, que son: profiláctico, terapéutico y promotor de crecimiento (Alvarado y col, 1988; Austin, 1988; Enríquez y col, 1990; García y Galleguillos, 1990; Dölz, 1992).

A modo de ejemplo se puede citar que Noruega, primer productor mundial de salmones, sólo en el año 1990 utilizó 37.430 kilos de antibióticos, cantidad que supera en un 1.000 por ciento a los 3.660 kilos que utilizaron en 1980 (Bravo, 1993).

El método de administración más utilizado en salmonicultura es vía oral incluido en el alimento, siendo necesario ajustar las dosis con relación al peso y consumo de los peces. Si bien es cierto que controlar la cantidad de antibacteriano administrada a los peces pareciera fácil, el inconveniente es que el medicamento debe ser palatable y tener una buena absorción intestinal. En el caso en que los peces rehusen a ingerir alimento con medicamento se puede optar por los baños con solución antibacteriana.

De acuerdo con diferentes autores (Mc Cracken y col, 1976; Austin, 1988; Jacobsen, 1989; Dölz, 1992), la clasificación de los principales antibacterianos de uso en salmonicultura son los siguientes:

- Aminoglicósidos : Estreptomina, Kanamicina
- B - Lactámicos : Penicilina G, Ampicilina
- Lincosamidas : Lincomicina, Clindamicina
- Macrólidos : Eritromicina, Espiramicina
- Quinolonas : Flumequina, Enrofloxacino, Acido Oxolínico
- Sulfonamidas : Sulfametazina, Sulmeracina, Sulfadimethoxina, Sulfadiazina
- Tetraciclinas : Oxitetraciclina
- Otros : Cloranfenicol, Furazolidona, Rifampicina

Dentro de los antibióticos más utilizados en la industria salmonera nacional, la cantidad se limita particularmente a la familia de las Tetraciclinas y Quinolonas, siendo estas últimas químicos sintéticos con actividad antimicrobiana, por lo que no caben dentro de la

definición de antibiótico y son llamados antibacterianos. La Oxitetraciclina uno de los antibióticos más representativos del grupo de las Tetraciclinas, es un antimicrobiano de amplio espectro indicado para tratar principalmente enfermedades entéricas bacterianas en truchas y salmones. El Acido Oxolínico, quinolona de primera generación, es un antibacteriano cuyo espectro de acción es más reducido y su uso esta dirigido principalmente sobre bacterias Gram negativas como *Yersinia ruckeri* y *Aeromonas salmonicida* (Barrientos, 1998).

Los antimicrobianos son de una inmensurable utilidad, sin embargo, si estos productos no son aplicados adecuadamente, pueden traer consigo múltiples consecuencias desfavorables:

- El problema de la resistencia bacteriana que se produce debido a la aplicación de dosis subterapéuticas o como promotores del crecimiento (Cercos, 1957; Roberts, 1987; Cordle, 1988). Smith (1974), por su parte, afirma que la resistencia frente a los antibióticos se ha convertido en un factor que complica el tratamiento de las enfermedades en animales y el hombre por la posibilidad de que los microorganismos resistentes albergados por los animales transfieran factores R a las bacterias de las personas. A modo de ejemplo podemos citar a las Penicilinas, Aminoglicósidos, Macrólidos y Cloranfenicol como antimicrobianos susceptibles de crear resistencia bacteriana por transferencia de plasmidios entre bacterias, para las Quinolonas en cambio la resistencia se podría generar por una mutación cromosómica que se expresa bioquímicamente por una variación de la permeabilidad celular, o bien a síntesis de una DNA girasa de menor afinidad por las Quinolonas (Neu, 1988; Stamm, 1989).

Es por ello 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).

- En segundo lugar la liberación al medio ambiente acuático de antimicrobianos posterior a su uso en terapia, permaneciendo por un tiempo en el agua (Austin, 1988; Samuelsen y col, 1992; Dölz, 1992; Bravo, 1993).

Samuelsen y col. (1992), encontraron al analizar un grupo de peces de un centro de cultivo 20 días después de haber finalizado el tratamiento con antibiótico, que presentaron menores concentraciones del antibacteriano que los peces silvestres circundantes.

- Un tercer aspecto dice relación con los riesgos para el hombre, principalmente por la ingestión del antimicrobiano a través del agua, debido a la liberación de éstos en el medio y captado luego por afluentes que llegan a las redes de distribución para consumo. También se han observado reacciones adversas para el hombre dadas principalmente por la presencia de residuos de antibióticos en el músculo de mamíferos, aves y peces consumidos (Booth y Mc Donald, 1988).

Para evitar el mal uso de los antimicrobianos 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 en los animales, y especialmente de las preparaciones farmacológicas que se usen habitualmente (Booth y Mc Donald, 1988).

La existencia en el mercado de una gran cantidad de antimicrobianos y su uso indiscriminado hace posible su utilización por personas no calificadas desconociendo los riesgos que pudieran provocar tanto en animales como en el hombre. Numerosas experiencias demuestran que estas sustancias dejan residuos que son nocivos para la salud del consumidor (Booth, 1977; Gardner, 1978; Grossklaus, 1982; Allison, 1985; Dölz, 1992).

Desde el punto de vista higiénico y tecnológico, los residuos de inhibidores se definen como sustancias que poseen gran actividad fisiológica, farmacológica y toxicológica, presentando en el alimento un efecto bacteriostático y/o bactericida cuya presencia en ellos no es deseada ni natural (Allison, 1985).

La presencia de mayor o menor cantidad de residuos de antibacterianos en los tejidos va a depender de factores tales como: duración del tratamiento, naturaleza de la droga utilizada y el tiempo que transcurra entre la última aplicación y el sacrificio del animal (Lindsay, 1984). Según Austin (1988), la eliminación de la droga de los tejidos del pez está en función de: la dosis utilizada, la temperatura del agua, tamaño y edad del pez.

Alimentos y agua consumidas que contengan residuos de antibióticos pueden producir variadas alteraciones, entre algunas, reducción de síntesis de vitaminas (Williams, 1974), alteraciones de la flora intestinal (Cercos, 1957), alergias y shock anafiláctico (Grossklaus, 1982).

Dentro de los efectos adversos específicos producidos en el hombre debido al consumo de alimentos que poseen residuos de antibacterianos, destacan alergias e hipersensibilidad y/o shock anafiláctico producidos por las penicilinas (Booth, 1977; Nouws y col, 1979). Las Tetraciclinas pueden unirse al calcio y así generar inhibición del crecimiento 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 Mc Donald, 1988; Nouws y col., 1979; Taylor, 1985; Match, 1987).

En Chile el reglamento sanitario de los 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, 1997 b). 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 los productos de exportación, especialmente en salmones, donde los países importadores exigen que los residuos de antibacterianos estén dentro de rangos aceptables o restricciones totales al empleo de productos prohibidos por las normativas europeas o por "Food and Drug Administration" (F.D.A), principal organismo

norteamericano de carácter federal que controla cuanto se refiere a ambos conceptos (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 lo metabolizan o excretan activamente. 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 resguardo 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 antibacterianos es tan escaso que prácticamente puede despreciarse (Hewitt, 1975).

La situación 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, suscrita por un representante legal de la empresa o un Médico Veterinario, en la cual se afirme que las jaulas o estanques destinadas a proceso han cumplido con los períodos de resguardo mínimo 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).

Los establecimientos que procesan peces de cultivo en Chile, deben incorporar en sus programas, dentro del esquema de las verificaciones, un análisis quincenal de cinco muestras para residuos de drogas de uso veterinario. Las muestras deben ser tomadas al ingreso de la planta y deben 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 alimentos 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 Acido Oxolínico y 0.015 ppm para Enrofloxacino (Chile, 1997 a).

A pesar de que se exija el cumplimiento de los períodos de resguardo necesarios para cada 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, rapidez y un amplio espectro antibacteriano (Nouws y col, 1979). Los métodos de detección pueden clasificarse en:

- Métodos químicos:

- Cromatografía de alta presión (HPLC) y Cromatografía en Capa Fina (Moats, 1983).
- Colorimétricos (Bishop y White, 1984).
- Fluorimétricos (Moats, 1983).

- Métodos químico - biológicos:

- Electroforesis de alto voltaje, combinada a una cepa bacteriana (Silva y Anhalt, 1980).

- Métodos enzimáticos:

- Elisa, se utiliza enzima inmuoabsorbente y es usado para detectar Penicilina en leche (Rhoner y col, 1985).
- Prueba de papaenzima, usado para detectar antibióticos B-Lactámicos en leche (Bishop y White, 1984).

- Métodos microbiológicos:

Los Métodos Microbiológicos son métodos cualitativos, es decir, sólo detectan presencia o ausencia de antimicrobianos. Sin embargo, se han preferido para análisis de rutina por ser de fácil ejecución y bajo costo. Además, sólo requieren 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 pescado (Chile, 1997 a).

El principio de detección de inhibidores de los Métodos Microbiológicos está fundamentado en las leyes de la difusión del fármaco en un medio de cultivo sólido, mezclado con una cepa bacteriana, en el cual se forma un halo de inhibición (Marten, 1964). Según Diemair y Rödder (1960) el área de inhibición se hace visible después de un periodo de incubación de la placa, lo que hace que el microorganismo crezca en toda la superficie del medio de cultivo, exceptuando aquellas zonas circundantes de la muestra donde difundió el antimicrobiano en forma radial, formándose así los halos de inhibición.

La técnica se basa en depositar las muestras de tejidos a examinar con una altura y diámetro uniformes, pues la altura de la muestra influye sobre el tamaño de halo (Bielecka y col., 1981; Andersen, 1984), sobre la superficie de un agar nutritivo que contiene una cepa microbiana sensible. La difusión de la droga desde la muestra al medio de cultivo inhibe el desarrollo bacteriano y la lectura se realiza midiendo el halo desarrollado alrededor de la muestra, considerándose positivo cuando el halo es mayor o igual a 2 mm, previa incubación de las placas a 30 °C por 20 a 24 horas (Nouws y col., 1979; Rojas 1986).

El medio de cultivo debe ajustarse a diferentes valores de pH, pues se ha demostrado que influye sustancialmente en la difusión y acción del antibiótico y por lo tanto sobre el tamaño de halo de inhibición (Bielecka y col, 1981). Se hace necesario entonces que los métodos microbiológicos utilicen por lo menos dos pH distintos del medio de cultivo para ampliar la posibilidad de detección de los inhibidores (Pichnarcik y col., 1969; Saivatzki, 1971). Los valores de pH más usados son 6.0 y 8.0 (Nouws y col., 1979), pero a pesar de ello hay antimicrobianos que no actúan en tales medios, siendo necesario utilizar pH intermedios (Saivatzki, 1971).

Entre los métodos microbiológicos utilizados para detectar la presencia de residuos de antibióticos en carne tenemos;

- Prueba de las cuatro placas, método que utiliza *Bacillus subtilis* B.G.A., *Sarcina lutea* y *E. coli* como cepas sensibles (Nouws y col, 1979).
- Prueba de Riñón con *Sarcina lutea*, método oficial de Holanda desde el 1 de enero de 1973 (Nouws, 1981).
- Prueba del *Bacillus subtilis* B.G.A, método oficial de la República Alemana (Gesche, 1986).

Siendo estos métodos de orden cualitativo, en los cuales su interpretación es sobre la base del tamaño de halo de inhibición, pueden cuantificarse, pues el diámetro de la zona de inhibición es directamente proporcional a la concentración del antibiótico (Davis y Stout, 1971). Autores como Lagner y col. (1973) expresan que la relación dosis efecto tiene una correlación positiva mayor cuando se obtienen halos de inhibición entre 2 y 6 mm.

No siempre la cuantificación es completamente segura, pues pueden existir inhibidores inespecíficos en las muestras, los cuales pueden originar un halo de mayor diámetro con lo cual se podría obtener resultados erróneos (FAO, 1969; Zavanella y Tagliabre, 1981),

Para detectar la presencia de residuos de antimicrobianos en el animal, las muestras pueden ser tomadas de cualquier tejido, sin embargo, como señala Bergsjö y col., (1979) existen algunos que poseen especial afinidad por las drogas; en orden decreciente tenemos sangre, hígado, riñón y piel. Menores niveles de actividad son exhibidos por músculo, branquias y hueso (Weber y Ridwayg, 1962). 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, siendo dificultosa su manipulación y posterior aplicación en la placa de cultivo, lo que podría resultar en valores erróneos (Rojas, 1986). Aun 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 (Trolldenier, 1980).

Existen diferentes cepas microbianas sensibles utilizadas en este método. Entre ellas *Bacillus subtilis* B.G.A, ha ofrecido excelentes resultados en la detección de residuos de

antibióticos (Nouws y col, 1979). Por ser el *B. subtilis* un aerobio esporulado una suspensión de esporas puras se puede conservar a una temperatura de refrigeración por 3 a 4 meses, sin que se altere la cantidad de microorganismos por unidad de volumen (Schaal y Wenzel, 1972; Arata, 1987), además de presentar ventajas de manejo frente a otras bacterias indicadoras (Gesche, 1992). Por otro lado Ellerbroek y col, (1997), recomiendan a *B. subtilis* B.G.A., y *E. coli* ATCC 11303 como cepas sensibles para la detección de antibacterianos en peces.

Los objetivos planteados en el presente trabajo corresponden a:

- a) Determinar el comportamiento de los antibacterianos Oxitetraciclina y Acido Oxolínico, en cuanto al pH del medio de cultivo más adecuado para la detección de residuos.
- b) Determinar la sensibilidad de las cepas bacterianas *Bacillus subtilis* B.G.A y *Escherichia coli* ATCC 11303 frente a los dos antibacterianos analizados.
- c) Relacionar los tamaños de halo de inhibición obtenidos con la aplicación de una prueba microbiológica para la detección de residuos antibióticos en peces, usando como muestras suero y músculo de pescado.
- d) Estimar la concentración de los antibacterianos en las muestras de suero.
- e) Observar el tiempo en el cual no se encuentran residuos los antimicrobianos en estudio.

Todo esto con la finalidad de aportar antecedentes metodológicos para la estandarización de detección de residuos de antibióticos en peces, a aplicar en nuestro medio, para cumplir con los objetivos trazados por **SERNAPESCA**.

4. MATERIAL Y METODO

El presente trabajo se realizó en el centro experimental, de investigación y producción de la empresa Marine Harvest Chile, ubicado a 42° 18' latitud Sur y 73° 40' longitud Oeste en el sector denominado Terao Bajo, distante a 15 Km del pueblo de Chonchi, en la isla de Chiloé. El ensayo se llevó a cabo en el mes de julio de 1999. La temperatura del agua osciló alrededor de 10 °C durante toda la fase experimental.

4.1.- DESARROLLO EXPERIMENTAL

El criterio de elección para los antimicrobianos en estudio se basó principalmente en la frecuencia de su uso en la industria salmonera y por pertenecer a diferentes familias genéricas. La dosis utilizada fue la recomendada por el fabricante y la adquisición fue facilitada por la empresa en la cual se realizó el trabajo.

Cuadro 1: Concentración, dosis, laboratorio de origen y nombre comercial de los antibióticos Oxitetraciclina y Acido Oxolínico.

Antibiótico	Oxitetraciclina	Acido Oxolínico
Nombre comercial	Terrivet 500	A. Oxolínico 20%
Laboratorio	Veterquímica	Agrovet
Dosis	75 mg/Kg.	18 mg/Kg.
Concentración	50%	20%

Se formaron dos grupos de 75 peces cada uno de la especie *Salmo salar* (Salmón del Atlántico) clínicamente sanos. Ambos grupos se trataron con una terapia medicada vía oral con los antibióticos Oxitetraciclina y Acido Oxolínico por 10 días simulando las condiciones prácticas.

El grupo A, con un peso de 2.61 ± 0.40 Kg. promedio para ser tratados con Oxitetraciclina y un grupo B, con un peso promedio de 2.86 ± 0.40 Kg. para Acido Oxolínico. Cada jaula fue identificada según el antibiótico y grupo de peces correspondiente.

4.2.- PREPARACION DEL ALIMENTO

Posterior a calcular la cantidad total de alimento necesario para la biomasa de peces, se pesó con una balanza digital y se depositó en una bandeja de plástico, se le añadió el producto antibiótico de presentación en polvo, el cual también se pesó digitalmente. Para favorecer la unión de ambos componentes se agregó un 3% de aceite de pescado a una temperatura de 45 °C aproximadamente, el cual se midió con una probeta. Luego se procedió a homogeneizar con una paleta hasta que visualmente se apreciara una óptima adhesión de ambos componentes, de esta forma se preparó el alimento para todo el tratamiento

Cuadro 2: Cantidad de alimento, cantidad de antibiótico y biomasa total de peces utilizados para los antibióticos Oxitetraciclina y Acido Oxolínico.

Antibióticos	Biomasa de peces (Kg)	Cantidad de antibiótico (g)	Cantidad de alimento (Kg)
Oxitetraciclina	193.1	289.7	15.5
Acido Oxolínico	214.5	193.1	17

Luego de preparado el alimento se obtuvo diariamente la cantidad correspondiente a cada día de tratamiento y lo restante se volvía a homogeneizar, debido a que el aceite que no es absorbido por el alimento en su totalidad va decantando con el antibiótico, evitando así la pérdida de dicho producto.

4.3.-MUESTREO

El muestreo se comenzó a realizar desde el primer día de finalizado el tratamiento hasta el día 30 (ver esquema 1). Las muestras corresponden a suero sanguíneo y músculo de 5 ejemplares tomados aleatoriamente del grupo respectivo.

Con el objetivo de comprobar ausencia de sustancias inhibitorias en los peces antes del tratamiento, se tomaron muestras a 5 individuos de los mismos peces utilizados en la formación de los grupos durante el muestreo, actuando de esta forma como controles y permitiendo familiarizarse con la técnica de obtención de sangre.

	<u>Control</u>	<u>Tra t a m i e n t o</u>	<u>P o s t - t r a t a m i e n t o</u>
Día →	0	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	1 2 3 4 5 10 15 20 30
Muestreo ↑			↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑

Esquema 1: Días de tratamiento y días de muestreo post-tratamiento.

En el proceso de toma de muestra, los 5 individuos elegidos al azar de cada grupo, fueron obtenidos de la jaula y se depositaron en un recipiente adecuado en el cual se anestesiaron y en forma individual fueron tomados para proceder a extraerles sangre, utilizando cada vez una jeringa estéril desechable. El lugar de extracción de sangre fue a 10 cm por delante del pedúnculo caudal en la línea lateral

La sangre obtenida, aproximadamente 5 ml, fue depositada en un tubo (VACUTAINER) previamente rotulado con el día de muestreo y grupo correspondiente. El tubo con la muestra fue llevado a refrigeración por 2 horas favoreciendo la retracción del coágulo y posterior liberación del suero el cual fue trasvasiado a un tubo Eppendorf rotulado y llevado a congelación a - 20 °C.

Posterior a la extracción de sangre, el pescado fue fileteado y un trozo de ambos filetes (10x10 cm) fue depositado en una bolsa plástica rotulada con el mismo N° del tubo con suero del pescado correspondiente y llevados a congelación a -20°C,

4.4.- BACTERIAS SENSIBLES

Las cepas bacterianas utilizadas fueron *Bacillus subtilis* B.G.A en concentración de 10^7 esporas por ml de suspensión y, *Escherichia coli* ATCC 11303, se usaron formas vegetativas repicadas en caldo cerebro corazón incubadas a 30 °C de temperatura por 18-24 horas previo a su uso. La metodología empleada se basó en el método microbiológico del *Bacillus subtilis* B.G.A (Gesche, 1986).

4.5.- PREPARACION DEL MEDIO DE CULTIVO

El substrato de cultivo empleado se preparó de acuerdo a la fórmula descrita por Gesche (1986) para la detección de residuos de antibióticos en carne.

Peptona carne.....	3.45 gr
Peptona caseína.....	3.45 gr
Cloruro de sodio.....	5.10 gr
Agar.....	13.00 gr
Agua destilada.....	1000.00 c.c

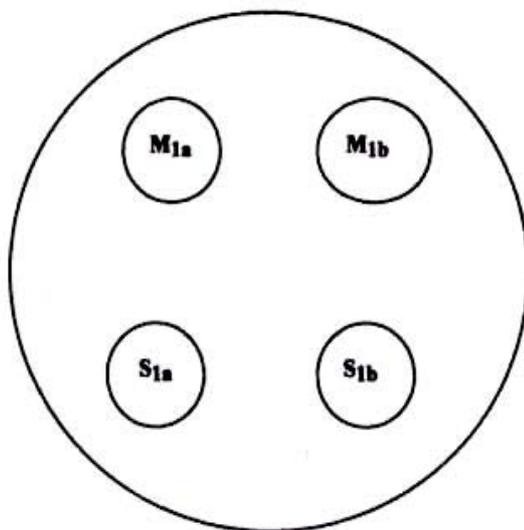
Los ingredientes fueron depositados en dos matraces para seguidamente suspenderlos en agua destilada y someterlos al calor en un horno microondas, agitando cada ciertos minutos hasta lograr su completa homogeneización. Posteriormente, aún caliente el medio de cultivo se le adicionaron KH_2PO_4 0.1 % en solución, agitando suavemente para su completa dilución. Luego se vertió el medio de ambos matraces originales, a dos matraces de menor capacidad, para a cada uno y mediante la adición de HCL o NaOH ajustar a los pH a 6.0 y 8.0.

Se procedió seguidamente a esterilizar el medio de cultivo a 120 °C por un tiempo de 15 minutos. Una vez enfriados a una temperatura aproximadamente de 45 °C se depositaron 100 ul por cien ml de cultivo de una suspensión de cada bacteria sensible a cada uno de los substratos, a pH 6.0 y 8.0, para alcanzar una concentración de 10^4 ufc/ml de cultivo. Finalmente se colocaron 12.5 ml del medio de cultivo con las respectivas bacterias a placas de Petri estériles alcanzando una altura aproximada de 2 mm por cada placa. Una vez solidificado el medio se procedió a rotular cada placa con su respectivo pH y bacteria sensible almacenándose en refrigeración hasta su posterior uso.

4.6.- APLICACION DE LAS MUESTRAS AL SUBSTRATO DE CULTIVO

En el día en que fueron analizadas las muestras, éstas se retiraron del congelador y se dejaron algunos minutos a temperatura ambiente mientras se preparó el material. Un trozo de músculo obtenido con un sacabocados de 8 mm de diámetro se cortó con un bisturí para asegurar una altura de 2 mm y se depositó en la superficie del substrato de detección por duplicado, en la parte superior de la placa.

La muestra de suero, correspondiente al mismo individuo del cual se obtuvo la muestra de músculo, se extrajo con una micropipeta en una cantidad de 100 ul y se depositó por duplicado en la parte inferior de la placa, en dos perforaciones efectuadas con un sacabocados estéril de 8 mm de diámetro.



Esquema 2: Aplicación de las muestras al substrato de cultivo.

M_{1a} = muestra músculo, **M_{1b}** = duplicado de la muestra de músculo; **S_{1a}** = muestra suero, **S_{1b}** = duplicado de muestra de suero.

Por cada ejemplar analizado se ocuparon 4 placas correspondiendo dos a *E. coli* a pH 6.0 y 8,0 y dos placas con *B. subtilis* B.G.A a pH 6.0 y 8.0 respectivamente, sumando un total de 20 placas por día de muestreo para cada antibiótico.

Luego las placas se dispusieron en una estufa de cultivo, para incubación a 30 °C por 18-24 horas. La lectura de las placas se realizó una vez cumplido el tiempo de incubación y se midieron con un pie de metro los tamaños de halo de inhibición de crecimiento, desde el borde de la muestra u orificio hasta el inicio del crecimiento bacteriano.

En la evaluación de los resultados, en forma de gráficos se representa la influencia del pH, la sensibilidad bacteriana y comportamiento de los antibióticos en los dos diferentes tejidos analizados post-tratamiento para cada uno de los antibacterianos, sobre los tamaños de halo de inhibición.

La concentración obtenida en suero, se estimó sobre la base de los datos de intercepto (a) y pendiente (b) de las curvas de calibración obtenidos por Barrientos (1998) para los antimicrobianos Oxitetraciclina y Acido Oxolínico con la cepa bacteriana *B. subtilis* B.G.A a pH 6.0 del substrato de cultivo, utilizando un rango de concentraciones en los cuales se produjeron tamaños de halo de inhibición entre 2.0 y 6.0 mm, aproximadamente.

Cuadro 3: Valores a y b de las curvas de calibración para Oxitetraciclina y Acido Oxolínico con *B. subtilis* B.G.A como cepa sensible, obtenidos por Barrientos (1998).

Antibacterianos	Valores	
	Intercepto (a)	Pendiente (b)
Oxitetraciclina	1.4296	10.5829
Acido Oxolínico	0.0046	15.8033

La fórmula utilizada para determinar la concentración mínima detectada es la siguiente; $X = (Y-a)/ b$; Siendo X = concentración detectada (ug), Y = tamaño de halo obtenido (mm), a = intercepto en el eje X, y b = pendiente.

5. RESULTADOS

En general no se presentaron problemas en la manipulación de las muestras y lectura de las placas, esto dado por una buena habilidad de crecimiento que demostraron las cepas bacterianas *B. subtilis* B.G.A y *E. coli* a los dos pH usados (6.0 y 8.0), siendo el crecimiento parejo, mostrando un aspecto de puntos blancos de similar tamaño distribuidos homogéneamente en toda la placa y dando halos de inhibición nítidos. En los anexos N° 5 y 6 se encuentran la totalidad de los datos obtenidos.

5.1.- EFECTO DEL PH DEL SUBSTRATO EN LA DETECCION DE ANTIBIOTICOS

Para representar el efecto del pH sobre el tamaño de halo de inhibición se consideró el promedio de tamaño de halo de inhibición obtenido con muestras de músculo, con *Bacillus subtilis* B.G.A como cepa sensible, de los peces tratados con Oxitetraciclina y Acido Qxolínico a pH 6.0 y 8,0 del substrato de cultivo empleado. Los datos representados por las barras de los gráficos N° 1 y 2 se encuentran en el anexo N° 1, cuadro N° 4 y 5.

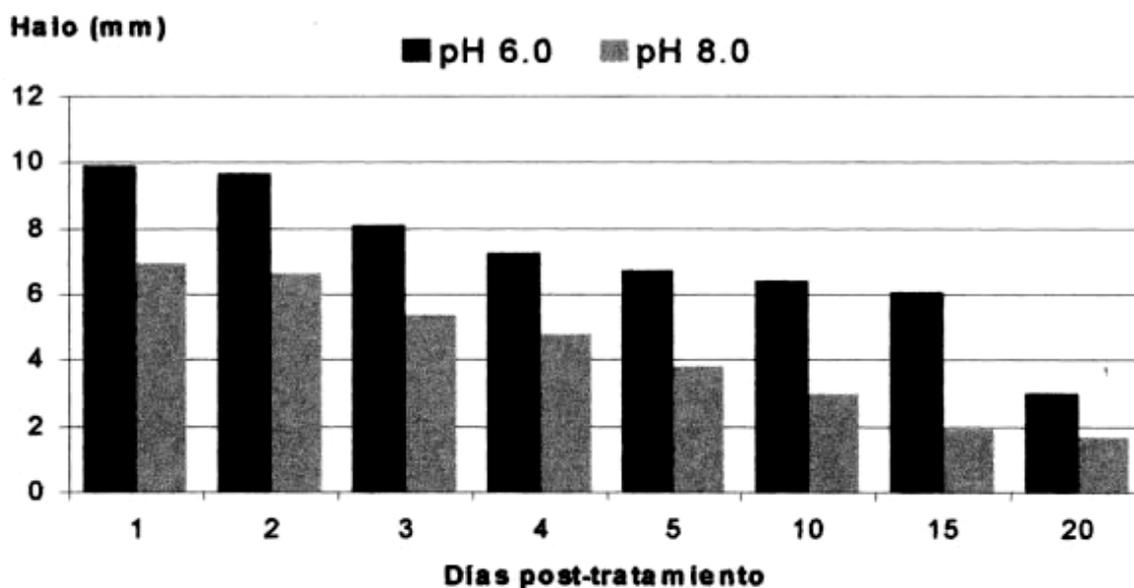


Gráfico N° 1: Efecto del pH del substrato de cultivo sobre el tamaño de halo de inhibición, producido por músculo de peces tratados con Oxitetraciclina y *B. subtilis* B.G.A como cepa sensible.

Del gráfico anterior se observa que la actividad antibacteriana para Oxitetraciclina se expresa mejor a pH 6.0 del medio de cultivo.

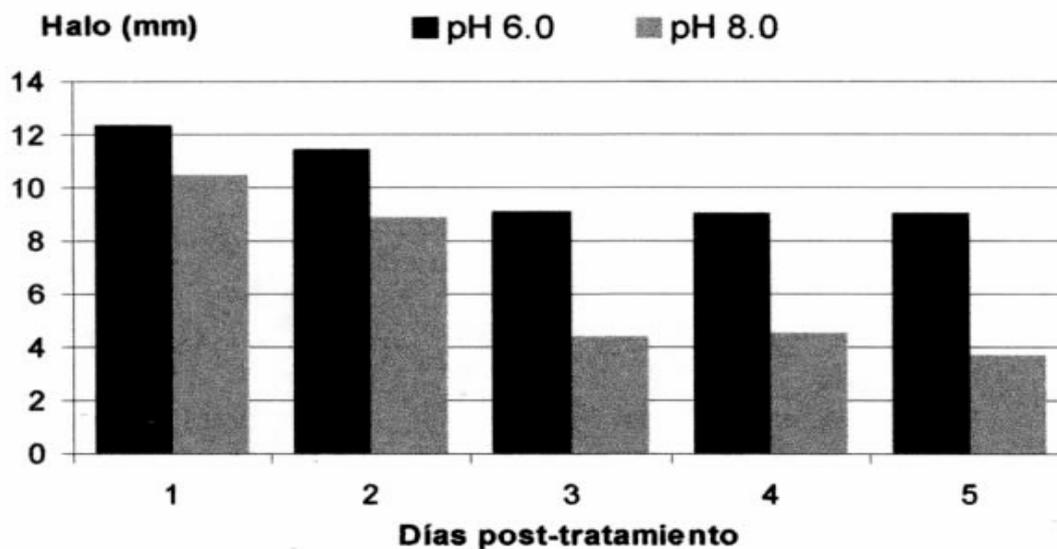


Gráfico N° 2: Efecto del pH del sustrato de cultivo sobre el tamaño de halo de inhibición, producido por músculo de peces tratados con Acido Oxolínico y *B. subtilis* B.G.A como cepa sensible

Puedo establecer entonces que la actividad antibacteriana para cada uno de los antimicrobianos analizados se expresa mejor a pH 6.0 del medio de cultivo, debido a esto todos los resultados presentados a continuación se realizaron considerando como base pH 6.0

5.2.- SENSIBILIDAD BACTERIANA

Para determinar la sensibilidad de las cepas bacterianas *B. subtilis* B.G.A y *E. coli* ATCC 11303 para la detección de residuos antibióticos de Oxitetraciclina y Acido Oxolínico, se consideran los promedios de tamaños de halo de inhibición obtenidos con muestras de músculo por cada día de muestreo para cada una de las cepas bacterianas a pH 6.0 del sustrato de cultivo. Los datos con los cuales se confeccionaron los gráficos N° 3 y 4, se encuentran en el anexo N° 2, cuadro N° 6 y 7.

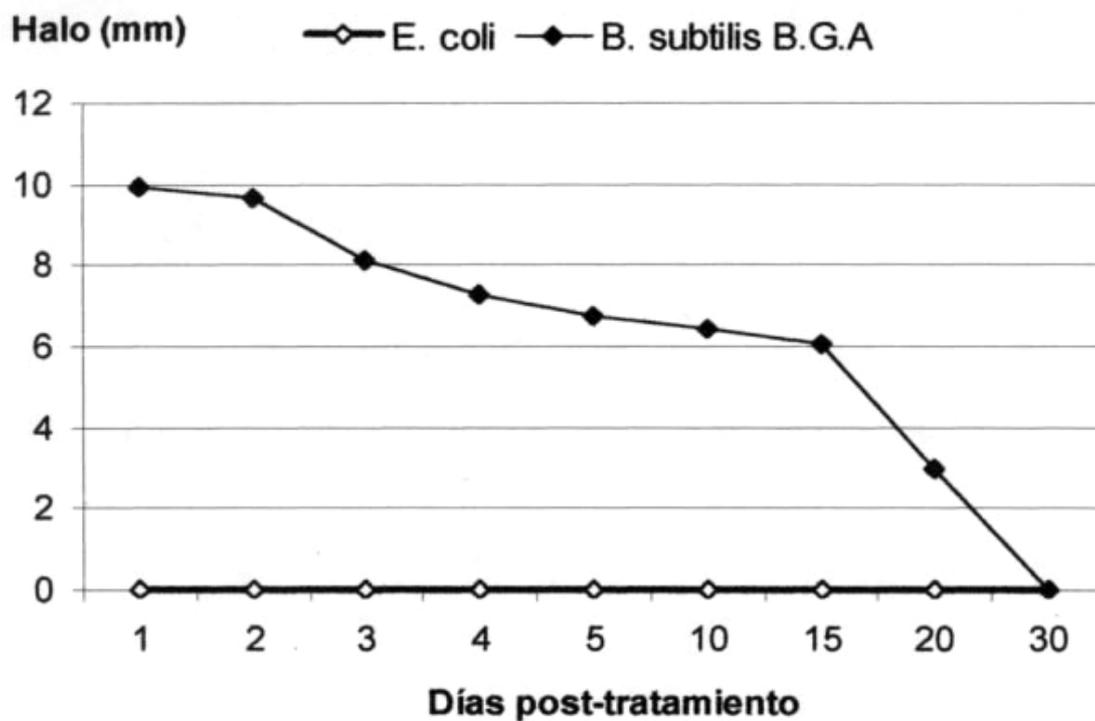


Gráfico N° 3: Tamaños de halo de inhibición producidos por músculo de peces tratados con Oxitetraciclina empleando *E. coli* y *B. subtilis* B.G.A como cepas sensibles a pH 6.0 del substrato de cultivo.

Se desprende gráfico N° 3 que *B. subtilis* B.G.A versus *E. coli* presenta halos de inhibición durante todos los días muestreados post-tratamiento.

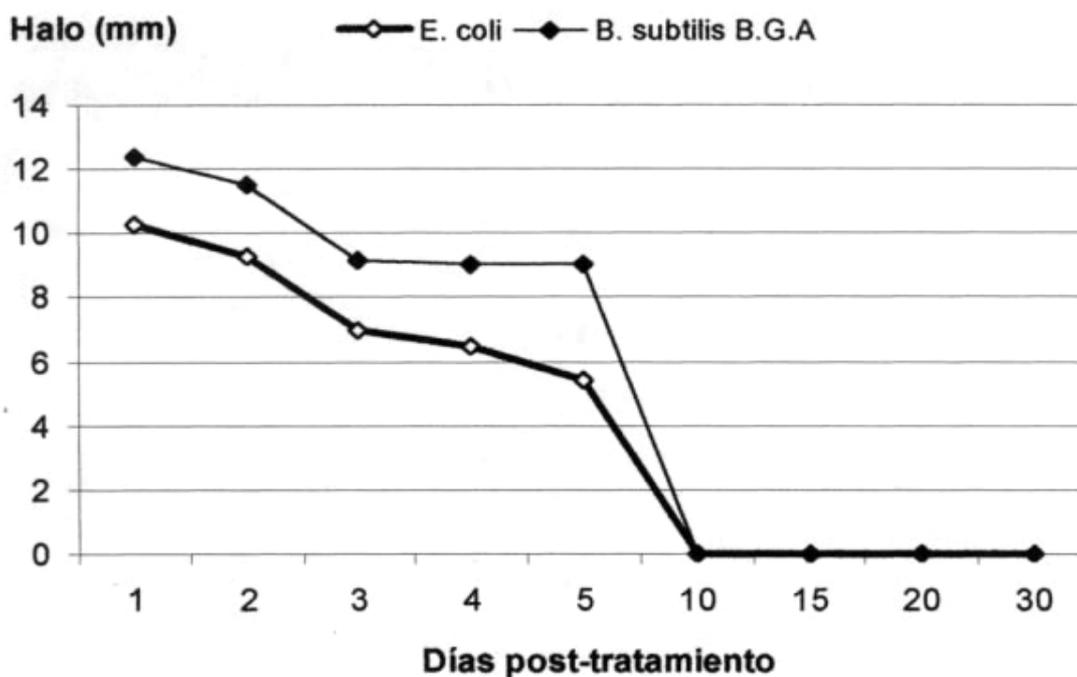


Gráfico N° 4: Tamaños de halo de inhibición producidos por músculo de peces tratados con Acido Oxolínico empleando *E. coli* y *B. subtilis* B.G.A como cepas sensibles a pH 6.0 del substrato de cultivo.

En los gráficos N° 3 y 4 se puede observar que los mayores tamaños de halo fueron obtenidos con *B. subtilis* B.G.A con los dos antibacterianos analizados durante todos los días muestreados, siendo más clara la diferencia con Oxitetraciclina que para Acido Oxolínico.

5.3.- COMPORTAMIENTO DE LOS ANTIBIOTICOS EN LOS TEJIDOS ANALIZADOS POST-TRATAMIENTO Y TIEMPO DE DEPRESION OBSERVADO.

Considerando que *B. subtilis* B.G.A presentó mayor sensibilidad que *E. coli* en la detección de antibacterianos, se utilizó por lo tanto, *B. subtilis* B.G.A como cepa sensible para evaluar la influencia del tejido.

En los gráficos N° 5 y 6, cuyos datos de origen se encuentran en el anexo N° 3, cuadro N° 8 y 9 respectivamente, se observa el comportamiento de los antibacterianos Oxitetraciclina y Acido Oxolínico con muestras de suero y músculo analizados post-tratamiento, utilizando a *B. subtilis* B.G.A como cepa sensible a pH 6.0 del medio de cultivo.

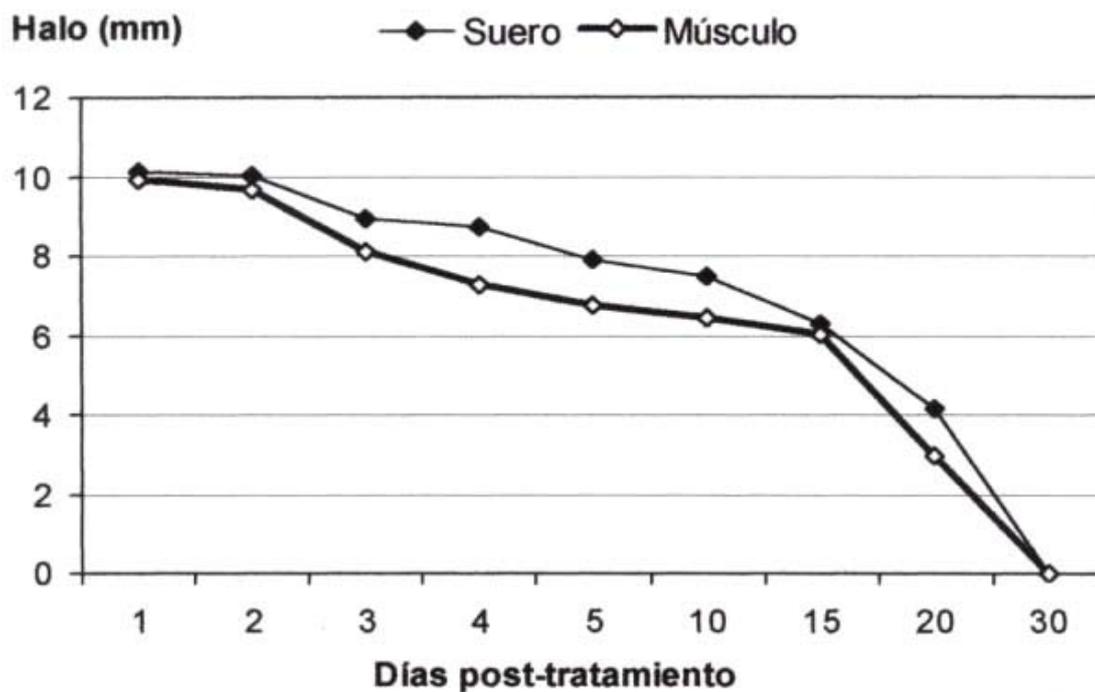


Gráfico N° 5: Tamaños de halo de inhibición producido por músculo y suero de peces tratados con Oxitetraciclina empleando *B. subtilis* B.G.A como cepa sensible en el substrato de cultivo a pH 6.0.

Se desprende del gráfico N° 5, para Oxitetraciclina, que con suero se encontraron los mayores tamaños de halo durante todos los días muestreados y la depresión se produce entre el día 21 y 30 post-tratamiento.

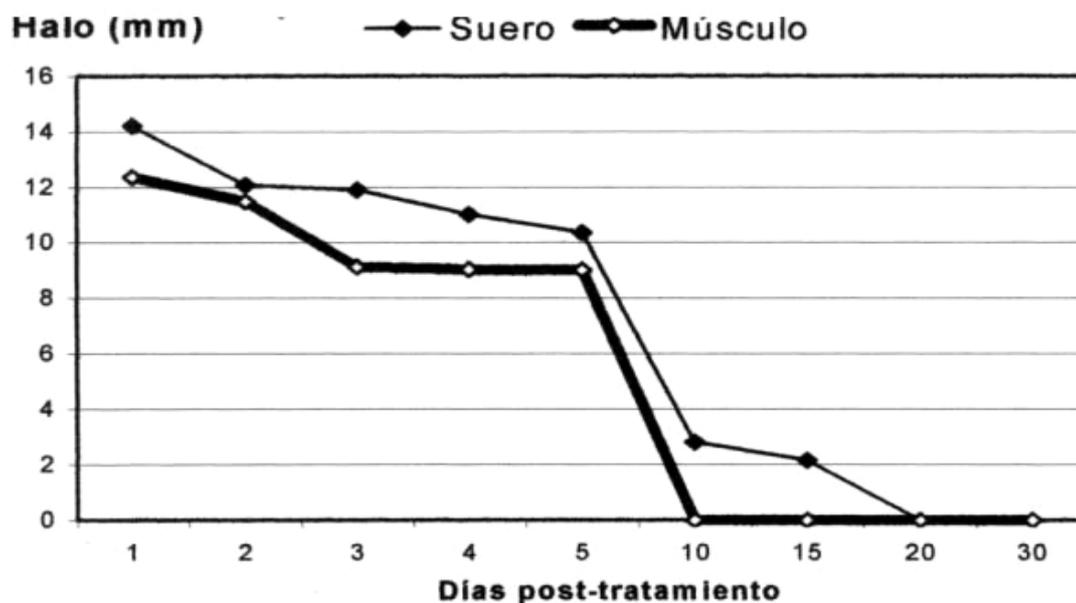


Gráfico N° 6: Tamaños de halo de inhibición producidos por músculo y suero de peces tratados con Acido Oxolínico empleando *B. subtilis* B.G.A como cepa sensible en el substrato de cultivo a pH 6.0.

Se puede deducir que para Oxitetraciclina y Acido Oxolínico con muestras de suero sanguíneo se producen los mayores tamaños de halo de inhibición, siendo con A. Oxolínico las diferencias levemente mayores y permaneciendo por más tiempo que en músculo. Como se observa en el gráfico N° 6, la depleción del Acido Oxolínico es entre el día 6 y 10 para músculo y para suero es entre el día 16 y 20 post-tratamiento.

5.4.- ESTIMACION DE LA CONCENTRACION DE LOS ANTIBACTERIANOS EN LAS MUESTRAS DE SUERO

Considerando que las muestras de suero se aplican en un volumen conocido (100 ul) y empleando los datos de intercepto (a) y pendiente (b) obtenidos por Barrientos (1998), con sustancias puras de Oxitetraciclina y Acido Oxolínico en similares condiciones del substrato de cultivo, se calculó la concentración de los antibacterianos contenidos en el suero de los peces en los diferentes días de muestreo post-tratamiento.

Los datos de origen de los gráficos N° 7 y 8, se encuentran en el anexo N° 4, cuadro N° 10 y 11.

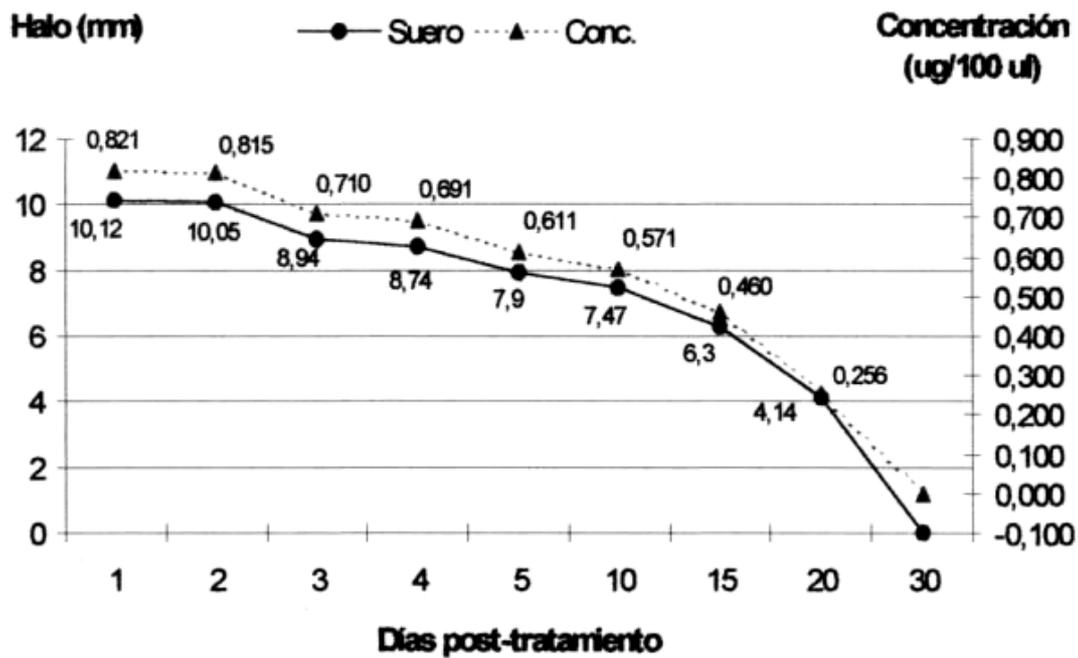


Gráfico N° 7: Tamaños de halo de inhibición y concentración estimada de Oxitetraciclina en muestras de suero.

Se observa del gráfico N° 7 que la menor concentración obtenida para Oxitetraciclina corresponde a 0.256 ug/100 ul en el día 20 post-tratamiento.

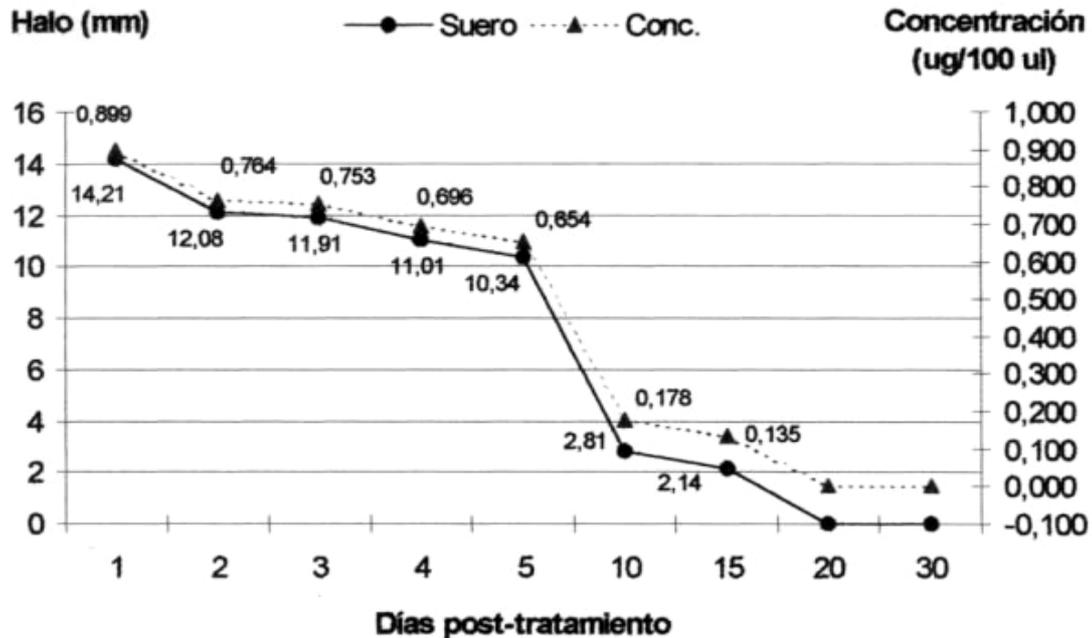


Gráfico N° 8: Tamaños de halo de inhibición y concentración estimada de Acido Oxolínico en muestras de suero.

Se observa del gráfico N° 8 que la menor concentración obtenida para Acido Oxolínico corresponde a 0.135 ug/100 ul en el día 15 post-tratamiento.

6. DISCUSION

En la ejecución del método microbiológico para la detección de residuos antibióticos se destaca la importancia del pH, el cual influye notoriamente sobre la acción inhibitoria del antibacteriano expresado como diferencias en el tamaño de halo de inhibición del crecimiento bacteriano. Como Pichnarcik y col. (1969) lo señalan, todos los antibacterianos tienen 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 menores.

Del gráfico N° 1, que señala el efecto del pH (6.0 y 8.0) del substrato de cultivo sobre los tamaños de halos de inhibición producido por Oxitetraciclina con muestras de músculo y, con *B. subtilis* B.G.A como cepa sensible, se visualiza que los mayores tamaños de halo de inhibición fueron obtenidos con pH 6.0 del substrato de cultivo, sobre el pH 8.0, en todos los días de muestreo post-tratamiento.

Para el caso del Acido Oxolínico, la actividad antibacteriana igualmente se expresa mejor a pH 6.0 del substrato de cultivo, sobre el pH 8.0, como se refleja en el gráfico N° 2, en el cual los mayores tamaños de halo de inhibición fueron obtenidos a pH 6.0, con muestras de músculo y, con *B. subtilis* B.G.A como cepa sensible.

Los datos obtenidos en la presente investigación concuerdan con algunos trabajos ya realizados en los cuales se obtiene una mejor respuesta a pH 6,0 para Oxitetraciclina (Bielecka y col, 1981; Rojas, 1986; Mayor, 1990; Ellerbroek y col., 1997) y para Acido Oxolínico (Valset y col., 1989; Pérez, 1993; Barrientos, 1998). Por otra parte, trabajos realizados por Ellerbroek y col.(1997) indican que Acido Oxolínico tiene mejor acción inhibitoria a pH 8.0, lo que no se ajusta a los resultados obtenidos.

Se puede establecer entonces, que debido a la gran gama de antimicrobianos utilizados en Medicina Veterinaria, que pueden estar presentes en productos de origen animal y por el hecho de que no todos reaccionan en un solo pH, se hace necesario que en la ejecución del Método Microbiológico de detección de residuos de antibióticos se incluya tres niveles de pH (6.0, 8.0 y 7.2) del substrato de cultivo, ya que existen otros antibacterianos como las Sulfas que se detectan mejor en un medio de cultivo a un pH 7.2 (Nouws y col, 1979; Gesche, 1986; Valset y col., 1989). para así tener una mayor posibilidad de detección de los diferentes inhibidores.

Al analizar la sensibilidad de cada una de las cepas bacterianas utilizadas, *B. subtilis* B.G.A y *E. coli* ATCC 11303, en su habilidad de detectar residuos de los antimicrobianos Oxitetraciclina y Acido Oxolínico, se consideran los promedios de tamaño de halo de inhibición obtenidos con muestras de músculo por cada día de muestreo para cada una de las cepas bacterianas a pH 6.0 del substrato de cultivo.

Con los resultados obtenidos para Oxitetraciclina en todos los días analizados post-tratamiento en el cual los mayores tamaños de halo de inhibición fueron obtenidos por *B. subtilis* B.G.A, como se muestra en el gráfico N° 3, respecto de *E. coli*, en el cual el mayor y menor tamaño de halo promedio obtenido para *B. subtilis* es de 9,91 y 2.91, y para *E. coli* no se obtuvo halo de inhibición en ninguno de los días muestreados, concuerda con otros autores como: Casanova (1983), Ramírez (1993) y Barrientos (1998) quienes opinan que *B. subtilis* B.G.A es más sensible para la detección de residuos de Oxitetraciclina. Por otro lado Ellerbroek y col (1997) opinan que *B. subtilis* B.G.A y *B. cereus* ATCC 11778 son las bacterias indicadas para la detección de residuos de este antibacteriano.

Para el caso del Acido Oxolínico, cuyos resultados se muestran en el gráfico N° 4, observamos nuevamente que con *B. subtilis* B.G.A se obtienen los mayores halos de inhibición que con *E. coli* resultados que concuerdan con Ramírez (1993) quien opina que *B. subtilis* B.G.A es la bacteria más sensible frente a este antibacteriano. Sin embargo, no coinciden con los resultados que obtuvieron Ellerbroek y col. (1997) y Barrientos (1998) quienes opinan que *E. coli* ATCC 11303 es la bacteria más sensible para la detección de residuos de Acido Oxolínico. Cabe destacar que estos autores trabajaron en el análisis de la sensibilidad de cada una de las cepas bacterianas con sustancias puras y en el presente trabajo se utilizó productos químicamente activos, pero que al ingresar a un organismo vivo la metabolización de dicho producto haya provocado cambios que los hagan interactuar de manera diferente frente a la cepa bacteriana.

Al analizar el comportamiento de los antibacterianos en cada uno de los tejidos analizados post-tratamiento, se consideró el promedio de tamaño de halo de inhibición (mm) y la desviación estándar de las cinco repeticiones por cada día de muestreo para Oxitetraciclina y Acido Oxolínico respectivamente, empleando *B. subtilis* B.G.A como cepa sensible en el substrato de cultivo a pH 6.0.

Del gráfico N° 5, se observa el comportamiento que tuvo Oxitetraciclina y se destaca que el suero sanguíneo presenta los mayores tamaños de halo de inhibición respecto del músculo, en cada uno de los días de muestreo; sin embargo las diferencias de tamaños de halo obtenidos entre suero y músculo no son marcadas, siendo para el día 1 de 0.21 mm y para el día 20 post-tratamiento de 1.17 mm.

Meredith y col. (1965) indican que el suero es el tejido más estable para detectar residuos de Oxitetraciclina, ya que mantiene uniforme los niveles de concentración. En el caso del músculo presenta variaciones debido a que Oxitetraciclina es deteriorado en un grado variable por la congelación, efecto que ocurre en menor medida en el suero.

Del gráfico N° 6, se observa el comportamiento demostrado por el Acido Oxolínico, y nuevamente suero sanguíneo parece ser la muestra de preferencia para la detección de residuos de estos inhibidores. Como se muestra en el anexo N° 3, cuadro N° 9, el mayor tamaño de halo de inhibición encontrado para suero es de 14.21 ± 1.68 y para músculo 12.36 ± 0.96 ; y el

menor tamaño de halo para suero es de 2.14 ± 0.38 y para músculo 9.01 ± 1.12 . Estos resultados concuerdan con los datos obtenidos por Pérez (1993) donde el suero presentó mayores tamaños de halo de inhibición post-tratamiento.

Con el presente trabajo se demuestra que el suero sanguíneo es la muestra de elección para determinar los niveles de residuos de los antibacterianos, posterior al tratamiento, utilizando el Método Microbiológico.

Sin duda que la muestra de tejido muscular es preferible al suero por su facilidad de obtención, incluso su depósito sobre el agar nutritivo es más simple, ya que evita practicarle a este un orificio a partir de un sacabocados.

Por otro lado hay que tener presente que este tejido es el de consumo, por lo que la presencia de residuos constituye el mayor riesgo para la población (Trolldenier, 1980). Sin embargo, al no poder cuantificar siempre en forma exacta la cantidad de muestra hace que el músculo no sea una muestra tan confiable, ya que el tamaño de la muestra afecta directamente sobre el tamaño del halo de inhibición y por ende en la concentración encontrada (Bielecka y col., 1981; Andersen, 1984).

La obtención del suero quizás es más engorrosa, sin embargo, presenta claras ventajas respecto del músculo. En primer lugar la posibilidad de incluir un mayor volumen de muestra sobre el agar nutritivo, con lo cual se podría llegar a aumentar la sensibilidad de detección. En segundo lugar, cuantificar en forma exacta la cantidad de muestra aplicada sobre el agar nutritivo lo que hace que los resultados obtenidos con este método sean más comparables que los ofrecidos por músculo. Por otra parte la pérdida de individuos que significa obtener las muestras a partir del tejido muscular, la cual se evita si se utiliza el suero como muestra, pudiendo de esta forma optar a un rápido mecanismo de control de un tratamiento antibiótico a una determinada población de peces.

A partir de los tamaños de halo de inhibición producidos por cada antibiótico es posible determinar las concentraciones en la cual fluctúan los diferentes antibacterianos, esta información más las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de los diferentes patógenos que afectan a los peces de cultivo, se tienen las herramientas para determinar si los antibacterianos que se están utilizando en salmonicultura son realmente efectivos para el tratamiento de las enfermedades.

Al observar la depleción y como se representa en el gráfico N° 5, la ausencia de residuos para Oxitetraciclina en ambos tejidos se produce entre el día 21 y 30 post-tratamiento. Según algunos autores (Salte y Liestol, 1983; Jacobsen, 1989) la eliminación de Oxitetraciclina de los tejidos es bastante lenta por lo que se recomienda un periodo 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, además, la importancia de la temperatura del agua en la tasa de eliminación de los diferentes antibacterianos.

Para el Acido Oxolínico (gráfico N° 6) el tiempo en el cual se dejan de detectar residuos para el caso del suero es en el día 20 y para músculo es el día 10 post-tratamiento. Bjöerklund y col. (1992) utilizando el método del HPLC, determinaron que la concentración de Acido Oxolínico en suero y músculo declinaron al límite de detección dentro de 10 y 15 días posterior a finalizado el tratamiento, a 16 y 10 °C respectivamente.

Resultados similares a los de Bjöerklund y col. (1992) obtuvo Ishida (1992) en el cual utilizando el método del HPLC describe una persistencia de 10 días para Acido Oxolínico al realizar un ensayo con trucha arcoiris a 16 °C; diferencia bastante significativa a la presentada por truchas en agua salada, las cuales solamente presentaron residuos detectables hasta las 72 horas de finalizado el tratamiento, confirmando así que esta droga es excretada más lentamente en peces de agua dulce que en agua salada.

A partir de los tamaños de halo de inhibición obtenidos con muestras de suero en peces tratados con Oxitetraciclina y Acido Oxolínico y, con los datos de intercepto (a) y pendiente (b) de las curvas de calibración, de los dos antibacterianos analizados, obtenidos por Barrientos (1998) para *B. subtilis* B.G.A a pH 6.0 del substrato de cultivo, se calculó la concentración (ug/100ul) del antibacteriano en suero, como se puede ver en el gráfico N° 7, en el día 20 post-tratamiento para Oxitetraciclina con suero se obtiene un halo de 4.14 mm correspondiendo a una concentración de 0,256 ug/100 ul de suero, lo cual es igual a 2.5 p.p.m.

Pero dado que se puede considerar positivo hasta un halo de 2 mm, base sobre la cual se considera inhibición positiva, corresponde a una concentración de 0.053 ug/100 ul de suero o lo que es igual a 0.5 p.p.m., situación que se dio entre el día 21 y 30. La alternativa de incluir un mayor volumen de muestra sobre el substrato de cultivo podría llegar a una mayor sensibilidad de detección a fin de alcanzar el nivel que establece la F.D.A para residuos de Oxitetraciclina que corresponde a 0.1 p.p.m en tejido comestible de salmones (Booth y Mc Donald, 1988)

Del gráfico N° 8, se observa para Acido Oxolínico que en el día 15 post-tratamiento con suero se obtiene un halo de 2.14 mm correspondiendo a una concentración de 0.135 ug/100 ul de suero. Pero dado que se considera positivo hasta un halo de 2 mm, base sobre la cual se considera inhibición positiva, corresponde a una concentración de 0.126 ug/100 ul de suero o lo que es igual a 1.2 p.p.m., situación que se dio entre el día 16 y 20.

El Método Microbiológico para detectar residuos de inhibidores, por sus características de ser un método preferentemente de orden cualitativo que concilia la sensibilidad con el costo, facilidad de aplicación y que ofrece resultados confiables, lo hacen una herramienta de elección a ser aplicada en plantas procesadoras de peces, en los cuales, la sola presencia de residuos de antimicrobianos, no importando la concentración en que se encuentre, hace obligatorio el decomiso de dichos productos, cumpliendo así con el Programa de Aseguramiento de Calidad dirigido por el Servicio Nacional de Pesca y con las normativas de los mercados de destino para residuos de productos farmacéuticos de uso veterinario.

7. CONCLUSIONES

- Oxitetraciclina y Acido Oxolínico se detectan mejor en el sustrato de cultivo a pH 6.0
- *Bacillus subtilis* B.G.A es más sensible que *E. coli* ATCC 11303 para la detección de residuos de Oxitetraciclina y de Acido Oxolínico.
- El suero sanguíneo es la muestra más adecuada que músculo para la detección de residuos de antibióticos en peces.
- El tiempo en el cual no se encuentran residuos para Oxitetraciclina en suero y músculo se produce entre los días 21 y 30 post-tratamiento. En el caso de Acido Oxolínico, para suero es entre los días 16 y 20, y para músculo entre los días 6 y 10 post-tratamiento.
- La menor concentración detectada de Oxitetraciclina en suero fue de 0.256 ug/100 ul, estimándose que con un halo de 2 mm llega a 05 p.p.m. En cambio para Acido Oxolínico fue de 0.135 ug/100 ul, estimándose que con un halo de 2 mm llega a 1.2 p.p.m..

8. BIBLIOGRAFIA

- ACHURRA, M. 1992. Mercado mundial actual. Gran impulso a la salmonicultura chilena. **Chile Pesquero** 71 21-24
- ACHURRA, M. 1998. Salmonicultura. Exportaciones. **Chile Pesquero** 30: 104
- ALLISON, J. R. D. 1985. Antibiotics residues in milk. **J. Br. Vet** 141 (1): 9-16
- ALVARADO, V.; J.W. SCHAFER; R. ENRIQUEZ y M. MONRAS 1988. Curso de post- grado. Enfermedades Bacterianas en peces y su técnica diagnósticas. Universidad Austral de Chile. Valdivia. Chile.
- ANDERSEN, J.K. 1984. Bacteriological Testing of Meat. A Statistical Analysis. **Dan Veterinaertidsskr.** 67: 6-13,
- AOAC 1995. OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS OF AOAC INTERNATIONAL. Arlington. Virginia. Volumen I. Capítulo 5: 33-36.
- AUSTIN, B. 1985. Evaluation of antimicrobial compounds for the control of Bacterial Kidney Disease in rainbow trout, *Salmo gairdnerii*, Richardson. **J. Fish. Dis.** 8: 209-220.
- AUSTIN, B. 1988, Aquaculture International Congress and Exposition Congress Proceedings. Vancouver, Brithish Columbia, Canadá.
- ARATA, I. 1987. Utilización del método del *Bacillus subtilis* B.G.A para detectar la presencia de antibacterianos en alimentos concentrados para animales. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Austral de Chile. Valdivia.
- BARRIENTOS, M. 1998. Determinación de sensibilidad de detección microbiológica de residuos de Oxitetraciclina y Quinolonas de uso común en peces. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Austral de Chile. Valdivia.
- BARNES, L. A.. 1979. The perceived hazard to human health from the use of antibiotics in animal feeds. American Veterinary Medical Association. Meeting Seattle. Washington, July23.
- BERGSJO, T; I. NAFTAD; K. INGEBRIGTSEN. 1979. The distribution of S-sulfadiazine and C-trimethoprim in rainbow trout, *Salmo gairdnrii* **Acta Vet. Scand.** 20: 25-37.

- 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.
- BJÖERKLUND, H.; A. ERIKSSON and G. BYLUND. 1992. Temperature related absorption and excretion of oxolinic acid in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture** 102: 17-27.
- BOOTH, N. H. 1977. Drug and chemical residues in the edible tissues of animals. IN: JONES, L. M. And L. E. McDONALD. Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 4^o ed., Iowa State University Ames.
- BOOTH, N. H. and L. E. McDONALD. 1988. Farmacología y terapéutica veterinaria. Editorial Acribia. Zaragoza. España.
- BRAVO, S. 1993. Uso de quimioterápicos en enfermedades de salmonídeos. **Chile Pesquero** 75: 57-59
- BUSTOS, P. 1991. Aquaveterinaria. **Aquanoticias Internacional** 3 (11): 53.
- BUSTOS, P.; A. POBLETE; J. NAVARRO y J. MONTAÑA. 1992. Estimación de pérdidas causadas por enfermedades bacterianas en cultivo de Salmonídeos en Chile. XIII Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias. Santiago. Chile.
- CASANOVA, C. 1983. 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. Salvat. Barcelona.
- 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 los alimentos. Diario oficial de la República de Chile. Santiago, martes 13 de mayo.
- CORDLE, M. K. 1988. Regulation of residues in meat and poultry products. **J. Anim. Sci.** 66: 413-433.
- DAVIS, W. and T. STOUT. 1971. Disc plate of microbiological antibiotic assay. **J. Appl. Microbiol.** 22: 659-665

- DIEMAIR, R. W y W. RÖDDER 1960. Verhalten der Antibiotika in Lebensmitteln. **I. Mitteilung Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung** 111: 265-277.
- DÖLZ, 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. Lebensmittelhygiene**. 48: 1-24.
- ENRIQUEZ, R.; J. GONZALEZ; J. W. SCHÄFER. 1990. Evaluación preliminar de Lincomicina como promotor de crecimiento de salmonídeos de crecimiento intensivo. VII Congreso de Medicina Veterinaria, Valdivia, Chile.
- EZQUERRA, E. 1991. Salmones y Truchas: La exitosa experiencia de la Acuicultura en Chile. **Chile Pesquero** 66 41-46
- FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS WORK HEALTH ORGANIZATIONS. 1969. Specification for identity and purity of some antibiotics. FAO. Nutrition Meeting, Report N° 45. Roma.
- GARCIA, C.; C. GALLEGUILLOS 1990. Estudio preliminar de los efectos del antibiótico flavomicin en la productividad de truchas arcoiris. Arch. Med. Vet. Número Extraordinario Resúmenes de trabajos del VIII Congreso de Medicina Veterinaria, Resumen N° 137. Valdivia. Chile
- GARDNER, P. 1978. Antibiotics in animals feed: the need for better epidemiologic studies. **Journal of infectious Diseases** 138: 101-104.
- GESCHE, E. 1986. Detección de residuos de antibacterianos en carne. Técnica del *Bacillus subtilis* B.G.A. **Monografías de Med. Vet.** 8: 1-5.
- GESCHE, E. 1992. Estudio comparativo de cepas bacterianas empleadas en la detección de residuos de antibióticos en los alimentos, m Congreso Latinoamericano de Microbiología e Higiene de los alimentos. 29/11-5/12. Montevideo. Uruguay.
- GROSSKLAUS, D. 1982. Inspección sanitaria de la carne de ave. Acribia, Zaragoza.
- HATCH, R. C. 1987. Residuos medicamentosos y químicos de los tejidos comestibles. Capítulo 66. En Booth, N. H. Y L. E. McDonald. 1988.
- HEWITT, W. L. 1975. Residuos medicamentosos y químicos de los tejidos comestibles. Capítulo 66. En Booth, N. H. Y L. E. McDonald. 1988.

- ISHIDA, N. 1992, Tissue levels 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 gairdnerii* Richardson, after treatment with oxolinic acid, oxytetracycline and trimetoprim. **J. Fish Dis.** 12: 29-36.
- JARPA, M. 1990. Aqua veterinaria. **Aquanoticias Internacional** 2 (6): 52-53.
- LAGNER, H. J; H. WEISS y U. TEUFEL. 1973. Die Abhängigkeit des hemmhofdurchmessers von der Antibiotikakonzentration (Dosis - Wirkungs - Funktion). Zentraltblatt für Veterinärmedizin. **Reihe B.** 20: 435-453.
- LEHMAN, R. P.. 1972. Implementation of the recommendations contained in the report to the comisioner concerning to use of antibiotics in animal feed. **J. Anim. Sci.** 35: 1340-1341.
- LINDSAY, D. 1984. Detection of residues of Therapeutic Substances in Meat Animals. **Pigs, New. Inform.** 5: 219-222
- MARTEN, G. 1964. Die mikrobiologische Antibiotikabestimmung in Futtermitteln. **Landwirtschaftliche Forschung.** 17: 277-280.
- 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.
- Mc CRACKEN, A.; J.J O'BRIEN and N. CAMPBELL. 1976. Antibiotic Residues and their Recovery from Animal Tissues. **J. Appl. Bacteriol** 41: 129-135.
- MOATS, W. A. 1983. Determination of Penicilin G, Penicilin V and Cloxacilin in Milk by Reserved-Phase High Performance Liquid Chromatografy. **J. Agric. Food. Chem.** 31: 880-883.
- MEREDITH, W. E.; H. H. WEISER and A. R. WINTER. 1965. Chlortetracycline and Oxytetracycline Residues in Poultry Tissues and Eggs. **Appl. Microbiol.** 13: 86-88.
- MOELLERING, R. C.. 1978. Medical implications of antimicrobial resistance in man. **The medical clinics of North America** 62: 15-39.
- MENDEZ, R y C. MUNITA. 1989. La salmonicultura en Chile. 1ª Ed. Editorial Ricardo Cortez. Santiago. Chile.
- 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 Rumiants. **Arch. Lebensmittelhyg**, 30 (1); 4 -8.
- NOUWS, J. F. M. 1981, Tolerances and Detection of Antimicrobial Residues in Slaughtered Animals. **Arch. Lebensmittelhyg**. 32: 103-110.
- 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 y W. GIBKE 1969. Beitrag zur Methodik des Hemmstoffnachweises in Organen und Muskulatur von Schlachttieren. **Archiv. 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.
- ROHNER, P.; M. SHALLIBAUM; J. NICOLET. 1985. Detection of Penicillin G and Benzylpenicillayl (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.
- SAIVATZKI, K. 1971. Über die Häufigkeit des Hemmstoffnachweises anlässlich der bakteriologischen Fleischuntersuchung in Rheinland-Pfalz. **Tierärztliche Umschau** 26: 603-608.
- SALTE, R. and K. LIESTOL. 1983. Drug withdrawal from farmed fish. **Acta. Vet Scand.** 24: 418-430.
- 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: 11M19.
- SAMSING, K. 1998. La salmonicultura en Chile. Pasado presente y futuro. **Aquanoticias Internacional** 44: 15.

- SCHAAL, M und S. WENZEL. 1972. Die Empfindlichkeit von Testkeimen gegenüber verschiedenen Antibiotikareinssubstanzen als Grundlage für den Nachweis von Hemmstoffen in Muskulatur und Organen mit dem allgemeinen Hemmstofftest (AH-test). **Arch. Lebhemmittlhyg.** 23: 189-194. Citado por Arata, I. 1987.
- SILVA, J; G. ANHALT. 1980, Determinación de oxitetraciclina en cobayos infectados intramuscularmente comparando algunos métodos. **Arch. Med. Vet.** 12: 79-106,
- SMITH, W. 1974. Antibiotics-resistant bacteria in animals: The danger to human health. **Brit. Vet. J.** 130: 110-119.
- SMITHER, R, 1975. Evaluation of two simple assay methods for detecting antibiotic residues in chicken and pig muscle. **J. Appl. Bacteriol.** 38: 235-243.
- 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.
- TOLEDO, M.S.; M. TRONCOSO; D.P. PORTELL y G. FIGUEROA. 1992. Reporte de un brote de Yersiniosis asociada a *Yersinia ruckeri* en salmones de cultivo. XV Congreso Chileno de Microbiología.
- TROLLDENEER, 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 Simposium WAVFH in Stockholm. Sweden.
- WILLIAMS, H. 1974. Clinical problems of preventive medicine. **Vet. J.** 130: 110-119
- WEBER, D.D and G.B. RIDWAY. 1962. The deposition of Tetraciclina drug in bones and scales of fish and its possible use marking. **Progressive Fish Culturist.** 24:150-155. Citado por Austin, B. 1988.
- ZAVAMELLA, 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. and F.G. SULMAN. 1974. Distribution of aminoglycoside antibiotics in Blood and Milk. **Res. Vet Sci.** 17: 68-74.

9. ANEXOS

9.1.- ANEXO 1

Cuadro N° 4: Resumen de promedios (n=10) de tamaños de halo de inhibición (mm), en músculo, de peces tratados con Oxitetraciclina aplicadas al substrato de cultivo a los dos pH y *B. subtilis* B.G. A como cepa sensible.

Días post- tratamiento	Músculo	
	pH 6.0	pH 8.0
1	9.91	6.94
2	9.68	6.67
3	8.10	5.37
4	7.26	4.82
5	6.74	3.83
10	6.44	2.97
15	6.05	1.93
20	2.97	1.67
30	0.00	0.00

Cuadro N° 5: Resumen de promedios (n=10) de tamaños de halo de inhibición (mm), en músculo, de peces tratados con Acido Oxolínico aplicadas al substrato de cultivo a los dos pH y *B. subtilis* B.G.A como cepa sensible.

Días post-tratamiento	Músculo	
	pH 6.0	pH 8.0
1	12.36	10.46
2	11.48	8.93
3	9.13	4.42
4	9.02	4.53
5	9.01	3.73
10	0.00	0.00
15	0.00	0.00
20	0.00	0.00
30	-	-

9.2.-ANEXO 2

Cuadro N° 6: Resumen de promedios (n=10) de tamaños de halo de inhibición (mm), en músculo, de peces tratados con Oxitetraciclina con *E. coli* y *B. subtilis* B.G. A como cepas sensibles, en los días de muestreo post-tratamiento a pH 6.0 del sustrato de cultivo.

Día post-tratamiento	<i>E. coli</i>	<i>E. subtilis</i> B.G.A
1	0.00	9.91
2	0.00	9.68
3	0.00	8.10
4	0.00	7.26
5	0.00	6.74
10	0.00	6.44
15	0.00	6.05
20	0.00	2.97
30	0.00	0.00

Cuadro N° 7: Resumen de promedios (n=10) de tamaños de halo de inhibición (mm), en músculo, de peces tratados con Acido Oxolínico con *E. coli* y *B. subtilis* B.G.A como cepas sensibles, en los días de muestreo post-tratamiento a pH 6.0 del sustrato de cultivo.

Día post-tratamiento	<i>E. coli</i>	<i>R subtilis</i> B.G.A
1	10.25	12.36
2	9.25	11.48
3	6.95	9.13
4	6.48	9.02
5	5.39	9.01
10	0.00	0.00
15	0.00	0.00
20	0.00	0.00
30	-	-

9.3.-ANEXO 3

Cuadro N° 8: Resumen de promedios (n=10) de tamaños de halos de inhibición (mm) y desviación estándar obtenidos con muestras de suero y músculo en los peces tratados con Oxitetraciclina, empleando *B. subtilis* B.G.A en el sustrato de cultivo a pH 6.0.

Día Post-tratamiento	Suero		Músculo	
	Halo (mm)	Desviación estándar	Halo (mm)	Desviación estándar
1	10.12	0.80	9.91	0.52
2	10.05	0.80	9.68	0.56
3	8.94	0.61	8.10	0.56
4	8.74	1.34	7.26	0.62
5	7.90	0.91	6.74	0.99
10	7.47	0.82	6.44	0.63
15	6.30	0.98	6.05	0.73
20	4.14	0.50	2.97	0.99
30	0.00	0.00	0.00	0.00

Cuadro N° 9: Resumen de promedios (n=10) de tamaños de halos de inhibición (mm) y desviación estándar obtenidos con muestras de suero y músculo en los peces tratados con Acido Oxolínico, empleando *B. subtilis* B.G A en el sustrato de cultivo a pH 6.0.

Día Post-tratamiento	Suero		Músculo	
	Halo (mm)	Desviación estándar	Halo (mm)	Desviación estándar
1	14.21	1.68	12.36	0.96
2	12.08	0.67	11.48	0.48
3	11.91	1.19	9.13	1.61
4	11.01	1.14	9.02	1.62
5	10.34	1.02	9.01	1.12
10	2.81	0.32	0.00	0.00
15	2.14	0.38	0.00	0.00
20	0.00	0.00	0.00	0.00
30	-	-	-	-

9.4.- ANEXO 4

Cuadro N° 10: Resumen de promedios (n=10) de tamaños de halo de inhibición y concentración del antibacteriano Oxitetraciclina en muestras de suero a pH 6.0 del sustrato de cultivo y con *B. subtilis* B.G. A como cepa sensible.

Días post-tratamiento	Tamaño de halo (mm)	Concentración (ug/100 ul)
1	10.12	0.821
2	10.05	0.815
3	8.94	0.710
4	8.74	0.691
5	7.90	0.611
10	7.47	0.571
15	6.30	0.460
20	4.14	0.256
30	0.00	0.000

Cuadro N° 11: Resumen de promedios (n=10) de tamaños de halo de inhibición y concentración del antibacteriano Acido Oxolínico en muestras de suero a pH 6.0 del sustrato de cultivo y con *B. subtilis* B.G. A como cepa sensible.

Días post-tratamiento	Tamaño de halo (mm)	Concentración (ug/100 ul)
1	14.21	0.899
2	12.08	0.764
3	11.91	0.753
4	11.01	0.696
5	10.34	0.654
10	2.81	0.178
15	2.14	0.135
20	0.00	0.000
30	-	-

Cuadro N° 16: Suero - pH 6.0 - *B. subtilis* B.G. A - con Oxitetraciclina.

Pescado N°	Días post-tratamiento								
	1	2	3	4	5	10	15	20	30
1	9.55	10.45	8	7.1	6.6	7	6.1	4.1	0
	9.56	10.75	8	7.16	8	6	6.5	4.15	0
2	10.3	11.4	9.65	9.7	8	7	7.55	3.8	0
	9	11	8.3	8.3	8	7.35	7.8	4.6	0
3	10	9.6	9	9.5	8.67	7.9	6.3	4.5	0
	9.9	9.8	9.25	9.25	8.33	8.2	4.4	3.75	0
4	12	9.3	9.1	10	6.5	8.15	5.3	5	0
	10	9	9.5	11	7	8.2	6.3	3.2	0
5	10.4	9.8	9.4	7.4	9	6.5	6.65	4.15	0
	10.5	9.43	9.2	8	8.9	8.35	6.1	4.1	0
Promedio	10.12	10.05	8.94	8.74	7.90	7.47	6.30	4.14	0.00
D.E	0.80	0.80	0.61	1.34	0.91	0.82	0.96	0.50	0.00
C.V	7.90	7.95	6.87	15.34	11.54	10.98	15.57	12.05	0.00

Cuadro N° 17: Músculo - pH 6.0 - *B. subtilis* B.G.A - con Oxitetraciclina.

Pescado N°	Días post-tratamiento								
	1	2	3	4	5	10	15	20	30
1	10.1	9.5	7	5.76	6.3	6	5.5	2.6	0
	10	10.3	7.9	7.3	6.4	6	5.8	2.6	0
2	9.5	9	8.25	7	7.83	6	7.5	1.6	0
	9	9	9	7.5	7.03	7.95	7.1	1.20	0
3	11	9.5	8.3	6.9	7.85	6	5.1	2.95	0
	9.5	9	8	7.5	8.13	7	5.5	3.2	0
4	10	10	8.5	7.5	5.57	6	6	4.2	0
	10	10.5	8.5	8	5.1	6.5	6.05	3.9	0
5	10	10	7.5	7.8	6.63	6.55	5.9	3.65	0
	10	10	8	7.3	6.53	6.35	6.0	3.75	0
Promedio	9.91	9.68	8.10	7.26	6.74	6.44	6.05	2.97	0,00
D.E	0.52	0.56	0.56	0.62	0.99	0.63	0.73	0.99	0,00
C.V	5.24	5.78	6.92	8.55	14.73	9.81	12.08	33.32	0,00

Cuadro N° 18: Suero - pH 8.0 - *B. subtilis* B.G.A - con Oxitetraciclina*

Pescado N°	Días post-tratamiento								
	1	2	3	4	5	10	15	20	30
1	0	3.3	2.2	1.85	1.85	1.5	0.9	0	0
	0	2.83	2.15	1.6	1.6	1.75	0.5	0	0
2	0	1.83	1.63	2.35	2	2.35	1.2	0	0
	0	3.47	1.53	1.8	1.8	2.45	1.02	0	0
3	3.95	0	0.85	2.2	2	2.4	1.5	0	0
	4.37	0	1.25	1.88	1.88	2.35	1.03	0	0
4	0	5.93	4.17	2.05	1.9	2.65	1	0	0
	0	5.43	2.1	1.7	1.5	2.5	1.1	0	0
5	0	1.7	3.4	1.55	1.5	0	1	0	0
	0	2.7	3.5	2.2	2	0	1	0	0
Promedio	0.83	2.72	2.28	1.92	1.80	1.80	1.03	0,00	0,00
D.E	1.76	1.98	1.08	0.27	0.20	1.01	0.25	0,00	0,00
C.V	211.15	72.72	47.33	14.20	11.07	26.24	24.23	0,00	0,00

Cuadro N° 19: Músculo - pH 8.0 - *B. subtilis* B.G.A- con Oxitetraciclina.

Pescado N°	Días post-tratamiento								
	1	2	3	4	5	10	15	20	30
1	6.95	5.13	4.5	4.3	4.3	2.25	2	2	0
	6.7	6.43	6.7	3.6	3.6	2	2	2	0
2	6.27	7.6	1.9	5.5	3	3.75	1.4	1.5	0
	6.53	7.33	1.95	4.9	4.9	3.9	1.6	1	0
3	7.3	5.9	6.47	5.5	3.5	4.35	2	2.1	0
	8.07	5.13	6.35	4.95	4.95	4.15	1.5	2.2	0
4	6.7	7.97	5.75	3.9	3.9	4.3	2	1.1	0
	7.23	8.67	5.2	4.75	3.5	4.95	2.3	2.12	0
5	7.07	5.07	8	5.35	3.5	0	2	1.15	0
	6.53	7.47	6.9	5.4	3.1	0	2.5	1.55	0
Promedio	6.94	6.67	5.37	4.82	3.83	2.97	1.93	1.67	0.00
D.E	0.52	1.32	2.05	0.68	0.69	1.81	0.34	0.47	0.00
C.V	7.46	19.73	38.18	14.15	7.92	61.12	17.79	28.01	0.00

9.6.- ANEXO 6

Tamaños de halo de inhibición en duplicado (mm) media, desviación estándar y coeficiente de variación observados en muestras de suero y músculo de peces tratados con Acido Oxolínico, con *E. coli* y *B. subtilis* B.G.A como cepas sensibles a pH 6.0 y 8.0 del substrato de cultivo.

Cuadro N° 20: Suero - pH 6.0 – *E. coli* - con Acido Oxolínico.

Pescado N°	Días post-tratamiento								
	1	2	3	4	5	10	15	20	30
1	11.4	9.2	8.9	9.05	7.5	2.6	2	0	-
	11.9	9.3	9.4	9.25	8.05	2.5	1.8	0	-
2	11.85	1.85	8.8	8	7.7	3	1.8	0	-
	11.75	11.35	9.35	8	7.4	3	1.7	0	-
3	12.9	10.5	4.45	7.05	6.15	2.75	1.4	0	-
	12.7	11.5	5.2	7.25	6.65	2.6	1.4	0	-
4	10.55	10.35	9	7.3	6.2	3.1	2.85	0	-
	10.75	10.85	10.45	7.3	6.1	3.2	2.9	0	-
5	10.7	11.8	5.75	6.1	8.45	2.4	2.4	0	-
	9.4	11.25	6.2	7.45	8	2.7	2.55	0	-
Promedio	11.39	10.70	7.75	7.68	7.22	2.79	2.08	0,00	-
D.E	1.06	0.88	2.12	0.94	0.88	0.27	0.56	0,00	-
C.V	9.32	8.24	27.32	12.26	12.4	9.80	26.92	0,00	-

Cuadro N° 21: Músculo - pH 6.0 – *E. coli* - con Acido Oxolínico

Pescado N°	Días post-tratamiento								
	1	2	3	4	5	10	15	20	30
1	9.1	10.2	8.9	7.5	4	0	0	0	-
	9.2	10.75	8.4	6.45	4.25	0	0	0	-
2	10.7	9.3	7.4	7.35	6	0	0	0	-
	10	9.15	7.4	7.25	6.75	0	0	0	-
3	10.35	9.2	7.3	6.35	2.5	0	0	0	-
	10.5	10	6.65	5.25	2.1	0	0	0	-
4	10.6	8.75	6.6	5.3	8.85	0	0	0	-
	10	8.85	7.2	5	8.05	0	0	0	-
5	11	8.05	4.5	6.4	5.85	0	0	0	-
	11	8.25	5.15	7.9	5.5	0	0	0	-
Promedio	10.25	9.25	6.95	6.48	5.39	0,00	0,00	0,00	-
D.E	0.67	0.86	1.33	1.03	2.21	0,00	0,00	0,00	-
C.V	6.57	9.24	19.15	15.89	41.01	0,00	0,00	0,00	-

Cuadro N° 22: Suero - pH 8.0 – *E. coli* - con Acido Oxolínico.

Pescado N°	Días post-tratamiento								
	1	2	3	4	5	10	15	20	30
1	9,15	11,6	7,55	7,8	7,75	2,2	1,2	0	-
	9,3	11,75	7,75	7,75	6,6	2,25	1	0	-
2	10,35	8,55	8,5	7	6,85	3,4	1,2	0	-
	9,7	7,5	7,9	7	6,8	3	1,15	0	-
3	9,9	8,5	4,6	6,25	3,25	2,3	0,6	0	-
	9,3	10,55	5,9	6,3	2,6	1,7	0,6	0	-
4	11,35	7,65	7,6	6,5	6,7	2,5	0,9	0	-
	10,55	7,85	6,5	6,15	6,55	2,3	0,7	0	-
5	11,75	9	6,5	4,65	6,8	2,8	1,2	0	-
	10,45	7,25	6,2	4,6	6,8	2,45	1,1	0	-
Promedio	10,18	9,02	6,90	6,40	6,07	2,49	0,97	0,00	-
D.E	0,88	1,69	1,17	1,10	1,70	0,47	0,25	0,00	-
C.V	8,66	18,71	16,94	17,20	27,96	19,05	25,85	0,00	-

Cuadro N° 23: Músculo - pH 8.0 - *E. coli* - con Acido Oxolínico.

Pescado N°	Días post-tratamiento								
	1	2	3	4	5	10	15	20	30
1	9,1	10,7	7,5	6,75	4	0	0	0	-
	9,05	10,85	7,55	7,6	4,2	0	0	0	-
2	9,2	8,05	7,3	7	5,3	0	0	0	-
	9,3	7,5	8	6,45	6,35	0	0	0	-
3	8,6	7,75	4	5,7	2,3	0	0	0	-
	9	8,8	3,5	6,05	2,4	0	0	0	-
4	10	6,5	5,5	5,4	4,1	0	0	0	-
	10,25	6,9	6	5,65	4,25	0	0	0	-
5	9,7	7,25	5,45	4,2	5,2	0	0	0	-
	10,2	6,85	5,9	4,3	6,3	0	0	0	-
Promedio	9,44	8,12	6,07	5,91	4,44	0,00	0,00	0,00	-
D.E	0,56	1,55	1,53	1,10	1,40	0,00	0,00	0,00	-
C.V	5,97	19,08	25,23	18,66	31,47	0,00	0,00	0,00	-

Cuadro N° 24: Suero - pH 6.0 - *B. subtilis* B.G.A - con Acido Oxolínico.

Pescado N°	Días post-tratamiento								
	1	2	3	4	5	10	15	20	30
1	14	12,55	12	11,5	10	2,85	2,6	0	-
	13,2	11,15	12,7	12,1	12	2,6	2,55	0	-
2	15,75	13,05	10,5	12	11	2,8	2	0	-
	13,9	12,75	10,8	11	11,5	2,75	1,45	0	-
3	16,5	12,65	11	8,8	9	3,4	2,35	0	-
	16,45	12,15	10,5	9,2	10,1	3,3	2,2	0	-
4	14,35	11,9	13,1	12	10,6	2,7	2,3	0	-
	14,3	12	12	11,45	10,8	2,8	1,55	0	-
5	11,65	11,2	12,5	11	9,2	2,4	2,25	0	-
	12	11,4	14	11	9,2	2,5	2,1	0	-
Promedio	14,21	12,08	11,91	11,01	10,34	2,81	2,14	0,00	-
D.E	1,68	0,67	1,19	1,14	1,02	0,32	0,38	0,00	-
C.V	11,79	5,57	10,02	10,38	9,88	11,34	17,87	0,00	-

Cuadro N° 25: Músculo - pH 6.0 - *B. subtilis* B.G. A - con Acido Oxolínico.

Pesca N°	Días post-tratamiento								
	1	2	3	4	5	10	15	20	30
1	11,75	11,25	11,05	6,45	9	0	0	0	-
	13,25	11,2	11,6	6,6	11	0	0	0	-
2	13,25	11,15	10,55	9,9	10	0	0	0	-
	12	11,8	10,55	8,6	10,3	0	0	0	-
3	13,1	12,1	8,3	8,8	8,2	0	0	0	-
	12,85	12	7,2	8,3	8,1	0	0	0	-
4	11,9	11,8	8,15	10,2	7,8	0	0	0	-
	12,85	11,8	7,75	11,6	7,7	0	0	0	-
5	10,15	11	8	10,15	9	0	0	0	-
	12,5	10,7	8,15	9,6	9	0	0	0	-
Promedio	12,36	11,48	9,13	9,02	9,01	0,00	0,00	0,00	-
DE	0,96	0,48	1,61	1,62	1,12	0,00	0,00	0,00	-
C.V	7,74	4,15	17,64	17,97	12,42	0,00	0,00	0,00	-

Cuadro N° 26: Suero - pH 8.0 - *B. subtilis* B.G. A - con Acido Oxolínico.

Pescado N°	Días post-tratamiento								
	1	2	3	4	5	10	15	20	30
1	11,8	11,05	2,1	0	0	0	0	0	-
	11,85	10,35	2,03	0	0	0	0	0	-
2	10,3	0	2,5	0	0	0	0	0	-
	10,85	0	2,09	0	0	0	0	0	-
3	11,2	7	1,9	0	0	0	0	0	-
	11,4	8	2,23	0	0	0	0	0	-
4	11,15	12,4	2,42	0	0	0	0	0	-
	10,95	11	1,88	0	0	0	0	0	-
5	10,7	9,35	2,21	0	0	0	0	0	-
	11	7	1,99	0	0	0	0	0	-
Promedio	11,12	7,62	2,14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-
D.E	0,48	4,39	0,21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-
C.V	4,29	57,66	9,68	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-

Cuadro N° 27: Músculo - pH 8.0 - *B. subtilis* B.G. A - con Acido Oxolínico.

Pescado N°	Días post-tratamiento								
	1	2	3	4	5	10	15	20	30
1	10,45	11,1	5,15	6,25	1,8	0	0	0	-
	10,55	11,75	5	5,9	2	0	0	0	-
2	10,6	6,4	4,85	5,5	4,55	0	0	0	-
	10,25	6,3	6	4,7	4,2	0	0	0	-
3	10,7	7,3	4,4	6,15	2	0	0	0	-
	10,65	8,25	4,35	6,25	2,4	0	0	0	-
4	10,25	9,4	2,85	3	5,9	0	0	0	-
	10	10	2,75	1,4	5,05	0	0	0	-
5	10,7	9,4	4	2,85	4,6	0	0	0	-
	10,45	9,4	4,8	3,3	4,8	0	0	0	-
Promedio	10,46	8,93	4,42	4,53	3,73	0,00	0,00	0,00	-
D.E	0,23	1,85	1,01	1,76	1,52	0,00	0,00	0,00	-
C.V	2,21	20,75	22,81	38,84	40,68	0,00	0,00	0,00	-