

INVESTIGACION SOBRE LA PRESENCIA DE ANTIBIOTICOS EN LA LECHE
EN LA REGION SUR DE ESPAÑA (*).

(INVESTIGATIONS OF ANTIBIOTIC RESIDUES PRESENT IN FLUID MILK IN THE
SOUTHERN REGION OF SPAIN).

por

POZO LORA, R.; A. HERRERA MARTEACHE; L. M. POLO VILLAR; R. LOPEZ GIMENEZ;
M. JODRAL VILLAREJO y J. IGLESIAS PEREZ (**) (***)).

Introducción.

El uso indiscriminado de los preparados antibióticos para el tratamiento de las mastitis y otras enfermedades del ganado provoca la aparición de dichos compuestos en la leche. Así mismo el relativo bajo precio de los preparados antimicrobianos y su simplicidad técnica lleva a muchos investigadores a aconsejar su uso como conservadores de alimentos, como estimulantes del crecimiento animal, etc. El resultado de este uso masivo se traduce en que el consumidor se pone frecuentemente en contacto con grandes cantidades o con trazas de estos compuestos, los cuales han sido adicionados voluntaria o accidentalmente a los alimentos.

La presencia de antibióticos en la leche provoca serios problemas en la industria lechera y en los servicios de la salud pública, problemas que nos han llevado a investigar la presencia de sustancias antibióticas en la leche de la región sur de España.

Revisión bibliográfica.

Peligrosidad de los residuos de antibióticos en la leche.

Las penicilinas en particular, son drogas con muy baja toxicidad (FAO/OMS, 1970). Las cefalosporinas, en cambio, son más tóxicas pero su reabsorción es escasa

* Investigación subvencionada con cargo al Fondo Nacional para el Desarrollo de la Investigación Científica. Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica. Presidencia del Gobierno.

** Sección de Bromatología. Instituto de zootecnia. C. S. I. C. Cátedra de Bromatología y Microbiología de los Alimentos. Facultad de veterinaria. Universidad de Córdoba. España.

*** Con la colaboración de la Srta. María Gloria Fernández Marín. Ayudante de investigación del C. S. I. C.

después de la administración oral (Vooge *et al.* 1965). Los aminoglúcidos con carácter antibiótico, como la estreptomina, dihidroestreptomina, neomicina y Kanamicina, tienen una toxicidad relativamente alta. Su reabsorción es limitada, pero también lo es su excreción después de una administración oral. (Mol, 1975). La administración reiterada de tetraciclinas puede provocar disturbios en la calcificación especialmente en individuos jóvenes y en tejidos embrionarios (FAO/OMS, 1970). Los polipéptidos como la bacitracina son muy tóxicos especialmente para el riñón. No obstante su reabsorción es pobre (Mol, 1975). La aptitud de los antibióticos para producir reacciones alérgicas es variable; así se observa una sensibilización frecuente a la penicilina, estreptomina y cloramfenicol (Borrie, 1962). Por el contrario, la sensibilización a las tetraciclinas es rara pero, una vez adquirida, tiene tendencia a permanecer (OMS, 1969). En 1957, Welh estima que un 10 p. 100 de la población de EE. UU. está sensibilizada por el consumo de alimentos que contienen antibióticos. Kitchen (1951) y Weinstein (1960) estiman que esta cifra es del 5 por 100.

No existen evidencias de que los antibióticos presentes en los alimentos induzcan efectos teratógenos (Mol, 1968, 1970); no obstante, un tratamiento con estreptomina u otros oligosacáridos durante la gestación puede provocar ciertas disfunciones en el octavo par craneal en fetos (Conway, 1965).

Efectos de la presencia de antibióticos sobre la transformación de la leche y la fabricación de productos lácteos.

A causa de la estabilidad térmica de numerosos antibióticos, se pueden producir, y de hecho se producen, numerosas interferencias con los procedimientos de fabricación de productos lácteos que se basan en la actividad de ciertos microorganismos.

La presencia de antibióticos en la leche crea problemas en la industria lechera, problemas que resumimos aquí:

1. Perturbación de la acidificación y la maduración en el curso de la fabricación de quesos (Ovejero y col. 1953).
2. Retraso en la producción de ácido y en la formación de aroma en la mantequilla, en el baberre, yogurt y en otros productos acidificados similares (Richards, 1958) (Tramer, 1964).
3. Inhibición del desarrollo de los fermentos introducidos en la leche (Jepsen, 1966).
4. Invalidez de los resultados de las pruebas de control de la calidad, tales como las pruebas de reductasimetría (Jacquet, 1969).

5. Reducción de la actividad inhibidora de los fermentos frente a determinadas cepas de estafilococos patógenos y enterobacterias (FIL, 1968).

Incidencia de la presencia de antibióticos en la leche.

Las concentraciones de sustancias antibióticas en la leche son muy variables dependiendo no sólo del país donde se realice la investigación, sino también del método seguido para su análisis.

En EE. UU. los resultados obtenidos oscilan entre 0'5 y el 11'6 p. 100 de muestras analizadas contaminadas (Kossikowski, 1951, 1959, 1960; Welch, 1955; Shahani, 1956; Schipper, 1957; Jester, 1959; Martin, 1959; Rosanove, 1961; Chamber y col. 1967).

En Gran Bretaña, entre el 1'5 y el 18'7 p. 100 (Storrs y col. 1951; Berridge, 1954, 1955; Panes y col. 1957; FAO/OMS, 1971; Mol, 1975).

En Canadá, Johns (1953) encontró un 7'3 p. 100 de muestras contaminadas. En Australia, Richards (1954, 1957 y 1958) encontró hasta un 28'52 p. 100 de contaminación; Naylor (1960) encuentra un 9'7 p. de muestras que contienen penicilina; sin embargo, estas cifras disminuyen posteriormente llegando a límites de 0'4 p. 100 en 1967 (Feagan, 1964).

En Italia, de un 25'8 p. 100 a un 48 p. 100 (Pisanu, 1956; D'Arca Simonetti y col. 1963; Palladino y col. 1963; Fabio y col. 1964; Campanille y Capoa, 1966).

En Francia entre el 0'31 y el 5'5 p. 100 (Morel, 1962; Lemaitre, 1963; Vasal y Auclair, 1965; FIL, 1968).

En Holanda de un 45'2 p. 100 de muestras contaminadas en 1958 se ha pasado a un 1'1 p. 100 (Mol, 1975), en 1971.

En Alemania, Kraack y Tolle (1969) citan un 2'4 p. 100 de contaminación. En Dinamarca, Mol (1975) comunica que la contaminación por sustancias antibióticas ha disminuido desde un 0'28 p. 100 en 1960 a un 0'026 p. 100 en 1970; la FIL, ofrece resultados más elevados oscilando entre el 0'6 p. 100 para 1960 y 1'2 p. 100 para 1962.

En España, Portolés (1958) analiza 53 muestras del comercio y no encuentra ninguna muestra que contenga antibióticos. Uno de nosotros (Herrera, 1974) encuentra porcentajes que oscilan entre el 3'45 p. 100 y el 15'78 p. 100, analizando 1.076 muestras de leche natural.

Los métodos de detección de antibióticos en la leche han sido revisados en otro trabajo (Herrera, 1974).

Aspectos legales que regulan la presencia de antibióticos en la leche.

Por ser los antibióticos sustancias activas que tienen determinados efectos tóxicos, se ha intentado en muchos países controlar su presencia en los alimentos destinados al consumo humano. Se admite que los aditivos no deben emplearse en los alimentos más que en cantidades lo justamente necesarias para obtener los efectos deseados; si estas sustancias se incorporan anadvertidamente deben mantenerse en el nivel más bajo posible.

Para ello la mayoría de los países publican con cierta periodicidad unos límites máximos posibles de residuos de antibióticos en la leche.

Mol (1975) revisa los aspectos legales que regulan la presencia de antibióticos en la leche y resume así la situación actual:

1. Países donde se permite la venta de leche o productos lácteos que contienen sustancias extrañas o impurezas: Holanda, Bélgica, Luxemburgo, República Federal Alemana, Francia, Italia (sólo la leche producida en el país), Inglaterra, Irlanda y Noruega.

2. Países donde se prohíbe la venta o distribución de leche que no reúne los requisitos naturales demandados por el legislador: Inglaterra, Noruega.

3. Países donde se prohíbe la venta de leche o productos lácteos que contengan productos peligrosos para la salud: Holanda, Bélgica, República Federal Alemana, Inglaterra.

4. Países donde se prohíbe expresamente la venta o productos lácteos que contengan antibióticos: Francia, Italia (sólo la leche importada) Dinamarca y EE. UU.

5. Países donde se prohíbe la venta o distribución de leche procedente de animales tratados con medicamentos capaces de ser excretados por la mama: Bélgica, Luxemburgo, República Federal Alemana, Inglaterra, Noruega, Suiza y EE. UU.

En España, el Código Alimentario Español establece la prohibición de vender o utilizar alimentos que contengan antibióticos por lo que podemos incluir a nuestro país en el apartado 4.

El Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios en su 12º Informe (1970) establece que aunque la legislación prescriba que "no se encuentren residuos" de antibióticos en los alimentos, puede haber residuos que no se detecten con los métodos de análisis utilizados. Por lo tanto, se debe indicar siempre, con la cantidad de residuo de antibiótico encontrada, el método utilizado y su límite de detección.

Material y método.

Como material patrón se ha utilizado leche de vaca, libre de antibióticos, procedente de la granja de la Facultad de veterinaria de Córdoba.

Como material problema se recogieron 1346 muestras de leche cruda de zonas de las provincias de Córdoba, Sevilla, Málaga, Granada, Cádiz, Jaén y Huelva. Todas las muestras fueron recogidas en el andén de recepción de diferentes centrales lecheras, salvo las muestras de Huelva que se obtuvieron en diferentes localidades por carecer esta provincia de central lechera.

Las muestras fueron transportadas en frigoríficos portátiles desde su origen hasta el laboratorio, analizándose el mismo día de recogida.

Las sustancias inhibitoras patrones que se han utilizado son: a) penicilina "G" sódica; b) penicilina "G" procaína; c) sulfato de estreptomina; d) sulfato de dihidroestreptomina; e) oxitetraciclina; f) clortetraciclina; g) sulfato de neomicina; h) bacitracina; i) sulfato de kanamicina. Los antibióticos a), b), c) y d) procedían de Antibióticos, S. A., e) de Chas Pfizer & Co. y Laboratorios Reunidos, y g), h), e i) de Calbiochem.

Se han utilizado los siguientes microorganismos:

- Streptococcus thermophilus.*
- Lactobacillus bulgaricus.*
- Sarcina lutea* (ATCC 9341)
- Bacillus subtilis* (ATCC 6633)
- Bacillus cereus var. mycoides* (ATCC 11778).
- Sarcina subflava* (ATCC 7468).
- Micrococcus flavus* (ATCC 10240).
- Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228).
- Staphylococcus aureus* (ATCC 6538-P).

Salvo los dos primeros, el resto de microorganismos proceden de la Colección española de Cultivos tipo, con sede en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias de Salamanca.

El *Streptococcus thermophilus* y el *Lactobacillus bulgaricus* procedían de yogurt, de venta en Córdoba.

Tratamiento previo de las muestras.

De acuerdo con un trabajo previo (Herrera, 1974), las muestras fueron sometidas a 85° C durante 15 minutos antes de su análisis, con el fin de destruir las sustancias inhibitoras propias de la leche.

Técnicas desarrolladas.

Prueba general para la detección de sustancias inhibidoras.

Se ha utilizado la prueba de reducción del azul de metileno, modificada por Frank (1965), prueba que hemos puesto a punto en nuestro laboratorio (Herrera, 1974).

Pruebas de detección específica de antibióticos.

Para la detección específica de antibióticos se ha adoptado el método de las cavidades propuesto por Jacquet y Steeg (1952), realizándose inicialmente una serie de controles con leche libre de antibióticos a la que se le adicionó el antibiótico a investigar con el fin de calcular las líneas de regresión que nos permitan cuantificar los resultados para los diferentes antibióticos.

Detección de penicilina.

Se ha utilizado la técnica seguida en un trabajo anterior (Herrera, 1974), utilizando como germen sensible la *Sarcina lutea* (ATCC 9341).

Detección de Estreptomicina.

Se emplea como germen sensible *Bacillus subtilis* (núm. 6633 de la Colección americana de cultivos tipo), según la técnica adoptada por nosotros (Herrera, 1974).

Detección de tetraciclina.

Como germen sensible se ha utilizado el *Bacillus cereus* variedad *mycoides* (núm. 11778 de la Colección americana de cultivos tipo), (Herrera, 1974).

Detección de bacitracina.

El germen utilizado ha sido la *Sarcina subflava* (núm. 7468 de la Colección americana de cultivos tipo) recomendado por la Administración de Alimentos y Drogas de EE. UU. (Grove y Randal, 1955). No obstante, en las pruebas preliminares que se han realizado con el fin de poner a punto el método se ha utilizado también el *Micrococcus flavus* (núm. 10240 de la Colección americana de cultivos tipo) germen que también es recomendado por el mismo organismo. Los resultados obtenidos con 17 tasas diferentes de bacitracina nos indican que la *Sarcina subflava* es mucho más sensible que el *Micrococcus flavus*; que mientras éste último germen detecta con seguridad la cantidad de 0'00025 mg de bacitracina por ml, la *Sarcina*

POZO LORA, R. y col.: PRESENCIA DE ANTIBIOTICOS EN LA LECHE DEL SUR DE ESPAÑA

subflava detecta cantidades inferiores a 0'0001 mg por ml. De acuerdo con la sistemática seguida en otro trabajo (Herrera, 1974), las ecuaciones obtenidas son las siguientes:

Para la *Sarcina subflava*

$$Y = 6'645384 + 1'036728 \log X$$

Para el *Micrococcus flavus*

$$Y = 4'656265 + 0'699707 \log X$$

en la que Y es el diámetro del halo en cm y X la concentración de bacitracina en mg/ml.

Detección de neomicina.

Se ha utilizado el *Staphilococcus epidermidis* (núm. 12228 de la Colección americana de cultivos tipo) recomendado por la Administración de Alimentos y Drogas de EE. UU. (Grove y Randall, 1955).

Se han estudiado 15 tasas diferentes de neomicina.

la ecuación obtenida es:

$$Y = 3'661788 + 0'491097 \log X,$$

en la que Y es el diámetro del halo en cm y X la concentración de neomicina en mg/ml.

Detección de kanamicina.

Como germen sensible se ha utilizado el *Staphilococcus aureus* (núm. 6538-P de la Colección americana de cultivos tipo) recomendado por la Farmacopea de EE. UU. (1966). El número de tasas estudiadas ha sido 17.

La ecuación de dicha línea es:

$$Y = 2'907597 + 0'431782 \log X$$

en la que Y es el diámetro del halo de inhibición y X es la concentración de kanamicina expresada en mg por ml.

Resultados y discusión.

Se han analizado un total de 1346 muestras de leche cruda procedente de siete provincias diferentes de la región sur de España.

El número de muestras por cada provincia ha sido el siguiente:

Córdoba	433	muestras analizadas
Sevilla	200	” ”
Málaga	200	” ”
Granada	150	” ”
Cádiz	200	” ”
Jaén	130	” ”
Huelva	33	” ”

Con los métodos puestos a punto por nosotros, los límites de detección son:

Prueba de reducción del azul de metileno: 0'036 equivalentes de penicilina por ml.

- Penicilina: 0'03 U. I./ml (0'0036 ppm).
- Estreptomina: 0'002 mg/ml (2 ppm).
- Tetraciclinas: 0'0002 mg/ml (0'2 ppm).
- Bacitracina: 0'0001 mg/ml (0'16 ppm).
- Neomicina: 0'00016 mg/ml (0'16 ppm).
- Kanamicina: 0'0027 mg/ml (2'7 ppm).

La prueba de reducción del azul de metileno la hemos utilizado para comprobar el grado de contaminación por sustancias inhibitoras en general que contenían las leches analizadas. En el cuadro I se expresan los porcentajes de positividad a dicha prueba. La media para la región sur de España es del 32'62 p. 100 (439 muestras positivas) y la distribución de los porcentajes por provincias nos indican que las provincias de Málaga y Sevilla tienen los porcentajes de contaminación más bajos (17 y 26 p. 100) mientras que Granada y Huelva ofrecen unos porcentajes del 44'00 y del 63'64 p. 100 respectivamente.

Los valores obtenidos son más elevados que los obtenidos en un trabajo anterior (Herrera, 1974), trabajo que estudiando 1076 muestras dió unos niveles de contaminación comprendidos entre el 3'45 y el 5'57 p. 100.

Mol (1975) cita que leches contaminadas con cantidades entre 0'003 y 0'06 U. I./ml de penicilina o su equivalente pueden afectar considerablemente a la producción tecnológica de determinados productos lácteos; igualmente cantidades superiores a 0'1 U. I./ml provocan un fallo en los procesos tecnológicos.

En el cuadro I hemos expresado también una distribución frecuencial de las muestras que dieron positiva la prueba de azul de metileno, estudiando dos valores; los inferiores a la tasa de 0'100 y los superiores a esta tasa. El 5'47 p. 100 de las muestras positivas dieron valores superiores a 0'101 "equivalentes de penicilina" por ml. La provincia de Sevilla no presentó ninguna muestra con valores más elevados de esta tasa, mientras que el 10'61 p. 100 de las muestras positivas de la provincia de Granada dieron valores superiores a 0'101 equivalentes de penicilina por ml.

Las muestras analizadas mediante esta prueba han dado resultados alarmantemente altos que probablemente se reflejarían en las factorías si en el momento de utilizar estas leches fueran destinadas a fabricar cualquier producto lácteo fermentado.

La penicilina se ha encontrado en 16 muestras de las 1346 analizadas (1'19 por 100); está ausente en las provincias de Sevilla y Huelva y se ha descubierto en el 2'66 p. 100 de las muestras de la provincia de Granada analizadas, y en el 2'31 por 100 de las muestras de Jaén (cuadro II).

La distribución frecuencial por niveles que van desde 0'04 a 0'10; 0'10 a 1.00 y > 1'00 U. I./ml se expresa en el cuadro III., observándose que aunque el nivel de contaminación en la provincia de Córdoba es bajo (1'84 p. 100 del total), un 25 p. 100 de las muestras positivas a la penicilina contenían niveles superiores a 1 U. I./ml cifras que consideramos muy elevadas.

Mol (1975) estudió la concentración de penicilina en las muestras positivas de leche de consumo en el área de Inspección de Utrech y comprobó que un 88'9 por 100 de las muestras analizadas positivas contenían cantidades de penicilina inferiores a 0'01 U. I./ml mientras que el 11'1 p. 100 lo eran superiores a este límite; estas cifras son superiores a las obtenidas por nosotros en el presente trabajo.

En la investigación realizada por nosotros anteriormente (Herrera, 1974) comprobamos que la penicilina se encontró en el 7'43 p. 100 de las muestras analizadas, porcentajes que no han sido alcanzados en esta investigación.

La estreptomycinina se ha encontrado en 15 de las 1346 muestras analizadas, lo que supone un 1'11 p. 100 de muestras positivas (cuadro II); no se ha encontrado en las muestras de la provincia de Huelva y la provincia que da un mayor porcentaje de positividad es la de Jaén (2'31 p. 100) seguida de Granada (2 p. 100).

Estudiando la distribución frecuencial de las muestras positivas (cuadro III) se comprueba como el 60 p. 100 de las muestras positivas contenían niveles comprendidos entre 0'001 y 0'01 mg/ml de estreptomycinina.

Un 13'33 del total de las muestras positivas contienen niveles superiores a 0'01 mg/ml. Este porcentaje corresponde a dos muestras de Jaén, que además de ser la provincia con más alto porcentaje de muestras positivas, es la que presenta

La distribución frecuencial por niveles que van desde 0'04 a 0'10; 0'10 a 1.00 y > 1'00 U. I./ml se expresa en el cuadro III., observándose que aunque el nivel de contaminación en la provincia de Córdoba es bajo (1'84 p. 100 del total), un 25 p. 100 de las muestras positivas a la penicilina contenían niveles superiores a 1 U. I./ml cifras que consideramos muy elevadas.

Mol (1975) estudió la concentración de penicilina en las muestras positivas de leche de consumo en el área de Inspección de Utrech y comprobó que un 88'9 por 100 de las muestras analizadas positivas contenían cantidades de penicilina inferiores a 0'01 U. I./ml mientras que el 11'1 p. 100 lo eran superiores a este límite; estas cifras son superiores a las obtenidas por nosotros en el presente trabajo.

En la investigación realizada por nosotros anteriormente (Herrera, 1974) comprobamos que la penicilina se encontró en el 7'43 p. 100 de las muestras analizadas, porcentajes que no han sido alcanzados en esta investigación.

La estreptomomicina se ha encontrado en 15 de las 1346 muestras analizadas, lo que supone un 1'11 p. 100 de muestras positivas (cuadro II); no se ha encontrado en las muestras de la provincia de Huelva y la provincia que da un mayor porcentaje de positividad es la de Jaén (2'31 p. 100) seguida de Granada (2 p. 100).

Estudiando la distribución frecuencial de las muestras positivas (cuadro III) se comprueba como el 60 p. 100 de las muestras positivas contenían niveles comprendidos entre 0'001 y 0'01 mg/ml de estreptomomicina.

Un 13'33 del total de las muestras positivas contienen niveles superiores a 0'01 mg/ml. Este porcentaje corresponde a dos muestras de Jaén, que además de ser la provincia con más alto porcentaje de muestras positivas, es la que presenta mayor nivel de contaminación. La estreptomomicina se absorbe mal, por lo que la administración oral no da lugar a que se acumulen fácilmente residuos en los tejidos, especialmente empleándose en concentraciones de 5 a 20 ppm ó 0'005 a 0'02 mg/ml (FAO/OMS, 1970). Estas dos muestras contenían niveles de estreptomomicina de 0'06 a 0'04 mg/ml, respectivamente, valores superiores a los citados en el párrafo anterior.

En nuestro trabajo anterior (Herrera, 1974) el nivel de contaminación por estreptomomicina fue del 3'72 p. 100 y todos los valores obtenidos fueron inferiores a 0'01 mg/ml.

Las tetraciclinas se han encontrado en el 1'04 p. 100 de las muestras analizadas (cuadro II), cifra muy semejante al 1'0 p. 100 que cita Mol (1975) en una inspección realizada entre 1966-1970 en el área de Utrech, y notablemente inferior a la calculada por nosotros anteriormente (4'64 p. 100) (Herrera, 1974).

No se presentó este antibiótico en las provincias de Cádiz y Huelva, siendo Granada la provincia con mayor número de muestras positivas (2 p. 100).

Todas las muestras positivas tenían cantidades de tetraciclinas inferiores a 0'1 mg/ml, estando comprendido el 21'43 p. 100 de las muestras positivas entre los niveles de 0'01 y 0'1 mg/ml (cuadro III); el 50 p. 100 de las muestras positivas de la provincia de Málaga y el 33'33 p. 100 de Granada estaban dentro de estos límites.

El contenido en bacitracina de las muestras analizadas han sido alarmantemente alto, ya que el 9'80 p. 100 de las muestras analizadas contenían dicho antibiótico (cuadro II). Este porcentaje es tan elevado debido a la gran cantidad de muestras procedentes de la provincia de Córdoba que fueron positivas (24'71 p. 100).

En el resto de las provincias los niveles de contaminación oscilan entre el 0 por 100 (Huelva) y el 4 p. 100 (Sevilla y Cádiz).

Estudiando la contaminación por bacitracina a diferentes rangos (cuadro III), observamos cómo en las muestras positivas de la provincia de Córdoba, un 2'8 por 100 contenían niveles de bacitracina comprendidos entre 0'1 y 1 mg/ml, niveles que son 100 veces superiores a los máximos detectados en la provincia de Granada, 1.000 veces superiores a las máximas de Málaga y Jaén y 10.000 veces superiores a los detectados en Sevilla y Cádiz.

Los resultados que se desprenden de la búsqueda de neomicina en las muestras estudiadas nos indican que un 1'04 p. 100 de éstas contenían dicho antibiótico a los niveles detectables por la prueba de investigación desarrollada montada por nosotros (cuadro II); la neomicina no se ha presentado en las muestras procedentes de la provincia de Huelva, está a niveles comprendidos entre el 0'23 y el 1'50 p. 100 en las demás provincias salvo en las de Jaén, donde se han encontrado en el 3'84 por 100 de las 130 muestras analizadas. Igualmente, es la provincia de Jaén la que dió las tasas más elevadas, estando el 80 p. 100 de las muestras positivas entre los rangos de 0'1 y 1 mg/ml, mientras que el resto de las muestras positivas de las demás provincias dieron niveles inferiores a 0'01 mg/ml (cuadro III).

La kanamicina solamente ha sido encontrada en dos provincias: Córdoba (0'23 por 100 del total) y Granada (2 p. 100 del total), tal y como se expresa en el cuadro II; el resto de las provincias no presentaron neomicina a los niveles identificables por las técnicas desarrolladas.

Los valores encontrados en la muestra positiva de la provincia de Córdoba y en una de la provincia de Granada son alarmantemente altos pues son valores comprendidos entre los 10 y 100 mg/ml (cuadro III).

Los antibióticos que se presentaron en las muestras positivas lo fueron, en algunas ocasiones en forma de asociaciones. Por ello, aunque hasta el momento solamente hayamos comentado la presencia y concentración de cada uno de los antibióticos, lógico es que al referirnos a los resultados finales obtenidos, dedicamos especial atención al número de muestras positivas con uno o más antibióticos.

CUADRO I. Porcentaje de muestras positivas a la prueba de reducción del azul de metileno para la detección de sustancias inhibidoras en general.

Provincias	Número de muestras analizadas	Porcentaje de muestras positivas	Distribución en rango de las muestras positivas p. 100	
			0'36 - 0'101 Eq./ml equivalentes de penicilina por ml.	0'101 Eq./ml
Córdoba	433	30'72	93'98	6'02
Sevilla	200	26	100	-
Málaga	200	17	94'12	5'88
Granada	150	44	89'39	10'61
Cádiz	200	39'50	94'94	5'06
Jaén	130	41'54	96'30	3'70
Huelva	33	63'64	95'24	4'76
Total	1346	32'62	94'53	5'47

CUADRO II. Porcentajes de muestras positivas a los diferentes antibióticos investigados.

PROVINCIA	Córdoba	Sevilla	Málaga	Granada	Cádiz	Jaén	Huelva	Total
Núm. de muestras	433	200	200	150	200	130	33	1.346
Penicilina	1'84	—	0'50	2'66	0'50	2'31	—	1'19
Estreptomicina	0'92	1'50	0'50	2	0'50	2'31	—	1'11
Tetraciclina	1'38	1	1	2	—	0'77	—	1'04
Bacitracina	24'71	4	1'5	2	4	3'07	—	9'80
Neomicina	0'23	1'50	0'50	1'33	1	3'84	—	1'04
Kanamicina	0'23	—	—	2	—	—	—	0'30

POZO LORA, R. y col.: PRESENCIA DE ANTIBIOTICOS EN LA LECHE DEL SUR DE ESPAÑA

CUADRO III. Distribución frecuencial por rangos de las muestras positivas.

	Rango	Distribución frecuencial por rangos de las muestras positivas								Total p. 100
		Córdoba p. 100	Sevilla p. 100	Málaga p. 100	Granada p. 100	Cádiz p. 100	Jaén p. 100	Huelva p. 100		
Penicilina U. I./ml	0'04-0'10	75	—	100	75	100	50	—	75	
	0'10-1'00	—	—	—	25	—	50	—	12'5	
	> 1'00	25	—	—	—	—	—	—	12'5	
Estreptomicina mg/ml	0'0001-0'001	—	66'6	—	66'6	—	—	—	26'67	
	0'001-0'01	100	33'3	100	33'3	100	33'3	—	60	
	> 0'01	—	—	—	—	—	66'6	—	13'33	
Tetraciclina mg/ml	0'0001-0'001	66'67	100	50	66'67	—	100	—	71'43	
	0'001-0'001	16'67	—	—	—	—	—	—	7'14	
	0'01-0'1	16'67	—	50	33'33	—	—	—	21'43	
Bacitracina mg/ml	0'00001-0'0001	70'09	100	66'67	33'33	100	—	—	70'68	
	0'0001-0'001	20'56	—	33'33	—	—	100	—	20'30	
	0'001-0'01	5'61	—	—	66'66	—	—	—	6'02	
	0'01-0'1	0'93	—	—	—	—	—	—	0'75	
	0'1-1	2'80	—	—	—	—	—	—	2'26	
Neomicina mg/ml	0'0001-0'001	—	—	—	50	100	—	—	21'43	
	0'001-0'01	100	66'6	100	50	—	20	—	42'86	
	0'01-0'1	—	33'33	—	—	—	80	—	35'71	
	0'1-1	—	—	—	—	—	—	—	—	
Kanamicina mg/ml	0'01-0'1	—	—	—	66'6	—	—	—	50	
	0'1-1	—	—	—	—	—	—	—	—	
	1-10	—	—	—	—	—	—	—	—	
	10-100	100	—	—	33'3	—	—	—	50	

En el cuadro IV se han agrupado los porcentajes de muestras positivas y el antibiótico o la asociación de estos que contenían. Córdoba presenta un 25'8 p. 100 de ferentes asociaciones; en la provincia de Sevilla el 5 p. 100 de las muestras analizadas presentan un solo antibiótico, mientras que el 1'5 p. 100 contienen asociaciones de dos antibióticos; en Málaga el porcentaje de muestras positivas fue del 2'5 p. 100, correspondiendo 2 muestras a antibióticos aislados y tres a asociaciones de dos antibióticos. De un 4 p. 100 de muestras positivas en la provincia de Granada, un 0'67 p. 100 contenían un sólo antibiótico (kanamicina), un 0'67 p. 100 contenía una asociación de dos (neomicina y kanamicina) y el resto contenía asociaciones de 3 o más antibióticos. Sobre un 5 p. 100 de muestras positivas en la provincia de Cádiz un 4 p. 100 contenía un antibiótico y un 1 p. 100 una asociación de dos. Igualmente en la provincia de Jaén el porcentaje de muestras que contenían un solo antibiótico fue del 6'6 p. 100 sobre un total del 8'46 p. 100.

Estudiando globalmente los resultados, sobre un total de 157 muestras positivas, 133 contenían un solo antibiótico, y el resto (24 muestras) contenían dos o más antibióticos.

Por el número de asociaciones destacan las provincias de Córdoba y Granada que presentaron asociaciones de hasta 5 antibióticos.

El porcentaje final de muestras contaminadas fue en Córdoba del 25'87 p. 100 Jaén y Sevilla con unos porcentajes de muestras positivas del 8'46 y del 6'50 por 100 siguen en importancia a Córdoba; Málaga, Granada y Cádiz tienen porcentajes del 2'5, 4 y 5 p. 100 respectivamente. No se ha evidenciado ninguna muestra positiva a los antibióticos específicos investigados en la provincia de Huelva.

Conjuntamente, de las 1346 muestras analizadas, contenían antibióticos específicos investigados el 11'66 p. 100.

El Comité mixto FAOS/OMS (1970) recomienda que cuando se empleen: penicilina, estreptomicina, tetraciclinas, bacitracina y neomicina, entre otros antibióticos, se haga de tal forma que no queden residuos que se detecten en los alimentos destinados al consumo humano. Con los métodos de análisis que se utilicen se podrá garantizar el nivel mínimo de residuos que es capaz de detectar, cantidad que cada vez será más pequeña a medida que se vayan adoptando métodos de análisis más sensibles.

Los límites detectables por los métodos puestos a punto por nosotros los hemos indicado al comienzo de la exposición de los resultados y discusión y anteriormente en los métodos de trabajo.

Los resultados encontrados por nosotros al referirse a una amplia región de España, bastante representativa del conjunto, permiten que consideremos a la leche,

CUADRO IV. Porcentajes de muestras positivas de leches de vacas procedentes de la región sur de España a cada uno de los antibióticos o sus asociaciones.

	Córdoba	Sevilla	Málaga	Granada	Cádiz	Jaén	Huelva	Total
Penicilina	0'69	-	-	-	0'50	0'77	-	0'37
Estreptomicina	0'23	0'50	-	-	0'50	0'77	-	0'30
Tetraciclina	0'23	0'50	-	-	3	0'77	-	0'22
Bacitracina	22'86	3'50	0'50	-	-	2'31	-	8'62
Neomicina	-	0'50	0'50	-	-	1'54	-	0'30
Kanamicina	-	-	-	0'67	-	-	-	0'07
E y B	0'23	-	-	-	-	-	-	0'07
P y B	0'46	-	0'50	-	-	-	-	0'22
T y B	0'23	-	0'50	-	-	-	-	0'15
E y T	-	0'50	0'50	-	-	-	-	0'15
B y N	-	0'50	-	-	1	-	-	0'22
E y N	-	0'50	-	-	-	1'54	-	0'22
N y K	-	-	-	0'67	-	-	-	0'07
ETB	0'23	-	-	-	-	-	-	0'07
PET	-	-	-	0'67	-	-	-	0'07
PTB	-	-	-	0'67	-	-	-	0'07
PBN	-	-	-	-	-	0'77	-	0'07
PTBK	0'23	-	-	-	-	-	-	0'07
PTBN	0'23	-	-	-	-	-	-	0'07
PETB	0'23	-	-	-	-	-	-	0'07
PEBN	-	-	-	0'67	-	-	-	0'07
PETBK	-	-	-	0'67	-	-	-	0'07
Total	25'87	6'50	2'5	4	5	8'46	-	11'66

Nota:

E: Estreptomicina

B: Bacitracina

T: Tetraciclina

P: Penicilina K

N: Neomicina

K: Kanamicina

por ahora, mientras no se adopten las correspondientes medidas; como alimento portador de antibióticos que puede presuponer riesgos para la salud pública, y como materia prima que puede crear dificultades en la elaboración de productos lácteos en las industrias lácteas fermentadoras.

Resumen

Se ha investigado la presencia de penicilina, estreptomina, tetraciclinas, bacitracina, neomicina y kanamicina en 1346 muestras, de leche natural, procedentes de diferentes zonas de las siguientes provincias de la región sur de España: Córdoba, Jaén, Granada, Málaga, Cádiz, Huelva y Sevilla.

Las pruebas microbiológicas han sido: a) detección de sustancias inhibidoras inespecíficas por la prueba de reducción del azul de metileno (Frank, 1965) y b) método de las cavidades de Jacquet y Steeg (1952) para la detección de las sustancias antibióticas indicadas con gérmenes sensibles. Los gérmenes sensibles utilizados han sido: para la penicilina, la *Sarcina lutea* (núm. 9341 de la Colección Americana de cultivos tipo, ATCC); para la estreptomina, el *Bacillus subtilis* (ATCC 6633); para las tetraciclinas, el *Bacillus cereus var mycoides* (ATCC 11778); para la bacitracina, la *Sarcina subflava* (ATCC 7468); para la neomicina, el *Staphylococcus epidermis* (ATCC 12228); y para la kanamicina, el *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538-P). Se han obtenido experimentalmente, para cada prueba microbiológica de detección específica de los antibióticos estudiados, las líneas de regresión y los límites mínimos detectables.

Según el Comité mixto FAO/OMS (1970) los antibióticos deben emplearse de forma que no se detecten residuos en los alimentos para consumo humano; y el Código alimentario español prohíbe la venta y utilización de alimentos con antibióticos.

El nivel de contaminación por sustancias inhibidoras inespecíficas es alarmantemente alto ya que el 32'62 p. 100 de las muestras de leche analizadas lo contenían.

La penicilina se ha detectado en el 1'19 p. 100 de las muestras, la estreptomina en el 1'11 p. 100, las tetraciclinas en el 1'04 p. 100, la bacitracina en el 9'8 p. 100, la kanamicina en el 0'30 p. 100 y la neomicina en el 1'04 p. 100.

De las 1346 muestras de leche analizadas, el 11'66 p. 100 contenían uno o más antibióticos. En la provincia de Córdoba el 25'87 p. 100 de las muestras de leche presentaron antibióticos; en leche de la provincia de Jaén, el 8'46 p. 100; en la provincia de Sevilla, el 6'50 p. 100; en Cádiz, el 5 p. 100; en Granada, el 4 p. 100; y en la provincia de Málaga, el 2'5 p. 100. No se ha encontrado ningún antibiótico identificable por los métodos empleados en la provincia de Huelva.

Los resultados obtenidos sobre contaminación por antibióticos de la leche de la región sur de España presentan riesgos para la salud pública y posible perjuicio para la industria lechera fermentadora.

Palabras clave genéricas: Antibióticos en leche; penicilina, estreptomicina, tetraciclinas, bacitracina, neomicina, kanamicina en leche; contaminantes en leche.

S u m m a r y .

The presence of Penicilin, Streptomisine, Tetraciclins, Bacitracine, Neomicine and Kanamicine has been investigated in 1.346 samples of natural mil from the following provinces in the Southern region of Spain: Córdoba, Jaén, Granada, Málaga, Cádiz, Huelva and Sevilla.

The microbiological tests perfomed were: a) detection of non specific inhibiting substances by the reduction of methylene blue test (Frank, 1965) and b) Jaquet and Stee's (1952) cavities method for the detection of antibiotic substances indicated with sensitive germs. The germs used were: *Sarcina Lutea* (Núm. 9341 of American Collection of Culture Types, ATCC), for the Penicilin; *Bacillus Subtilis* (ATCC 6633), for the Streptomisine; *Bacillus Cereus* var. *Mycoides* (ATCC; 11778), for Tetraciclins; *Sarcina Subflava* (ATCC 7468), for the Bacitracine, and *Staphilococcus Epidermis* (ATCC, 12228), for the Neomicine, and *Staphilococcus Aureus* (ATCC, 6538-P for the Kanamicine. For each microbiological test of antibiotic detection studied, the lines of regression and the minimal detectable limits were obtained experimentally.

According to the FAO/OMS mixed Committee (1970), antibiotics should be used in such away that residues can not be detected in foods for human consumption; and the Spanish Alimentary Code prohibits the sale and use of foods containing antibiotics.

The levels of contamination by no specific inhibiting substances is alarmingly high since it contained in 32'62 per 100 of the samples of milk analysed.

Penicilin was detected in 1'19 per 100 of the samples, Streptomisine in 1.11 per 100, Tetraciclins in 1.04 per 100, Bacitracine in 9.8 per 100, Kanamicine in 0.30 per 100, and Neomicine in 1.04 per 100.

Of the 1.346 milk samples analysed, 11.66 per 100 contained one or more antibiotic. In the province of Córdoba 25.87 per 100 of the milk samples contained antibiotics; in that of Jaén, 8.46 per 100; in Seville, 6.50 per 100; in Cádiz, 5 per 100; in Granada, 4 per 100, and in the province of Malaga, 2.5 per 100; no antibiotic, identificable by the methods employed, was detected in the milk of the province of Huelva.

The results obtained on antibiotic contamination in the milk of the Southern region of Spain present risks to public health and posible prejudice for the milk industry.

Index key words: Antibiotics in milk: Peniciline, Streptomisine, Tetraciclina, Bacitracina, Neomicina, Kanamicina in milk; Contaminantes in milk.

Bibliografía.

- Albright, J. L.; S. L. Tuckey and G. T. Woods, 1961.—*J. Dairy Sci.* 44: 779.
- Alesandro, A. 1963.—*Boll. Lab. Chim. Prov.* 1963: 355-365.
- Anónimo, 1975.—*Código Alimentario Español*, 2.^a ed. Madrid. B.O.E.
- Berridge, N. J. 1956.—*J. Dairy Res.* 23: 336-341.
- 1956.—*J. Dairy Res.* 23: 342-347.
- 1957.—*Dairy Inds.* 22: 1022-1023.
- Borrie, P. F. 1962.—*J. Soc. Dairy Technol.* 15: 15-32.
- Campanille, E. and R. de Capoa, 1966.—*Nuovi Annali ig. Microbiol.* 17: 512-519.
- Chamber, G. and J. McDowell, 1967.—*Apud. OMS, Comité Mixto FAO/OMS de expertos en higiene de la leche. 3^{er} Informe*, p. 72. Roma. FAO.
- Cogan, T. M. and P. F. Fox, 1970.—*J. Dairy Res.* 37: 165-171.
- Conway, N. 1965.—*Br. Medical J.* 15: 260.
- D'Arca Simonetti, A. and S. U. D'Arca, 1963.—*Nuovi Annali ig. Microbiol.* 6: 460.
- Fabio, U. and E. Preite, 1964.—*Ig. Mod.* 9: 528.
- FAO/OMS, 1970.—*Normas de identidad y pureza para los aditivos alimentarios y evolución de su toxicidad. Diversos antibióticos. Duodécimo informe.* Roma. FAO.
- Feagan, J. T. 1964.—*Austr. J. Dairy Tech.* 19: 76-80.
- Fil, 1968.—*Residus Chimiques dans le lait. Ann. Bull. FIL/IDF.* Bruxelles.
- Frank, H. 1965.—*Milch. Milchwissenschaft* 20: 361-365.

POZO LORAR. y col.: PRESENCIA DE ANTIBIOTICOS EN LA LECHE DEL SUR DE ESPAÑA

- Galesloot, Th. E. 1956.—Ned. Melk and Zuivel Tijdschr. 64: 1.
- Goded, A. 1966.—*Modernas técnicas aplicadas al análisis de leche*. 1.^a ed. Madrid. Dossat.
- Grossklaus, D. y R. Levetzow, 1966.—Berl. Münch. Tierärztl. Wschr., 79: 128. Cita-do por Lang, K.
- Grove, D. C. and W. A. Randall, 1955.—Antibiotics Monograph. núm. 2. Assay Me-thod of antibiotics, 1.^a ed. p. 12-14. New York, Medical Encyclo-pedia Inq.
- Herrera, A. 1974.—Arch. zootec. 23: 99-138.
- Intonti, R. 1952.—Ist. Sup. Sanita. Roma.
- Jacquet, J. 1969.—Econ. Med. Anim. 1: 13-37.
- Jacquet, J. and N. Riquier, 1968.—Bull. Acad. Vet. Fr. 41: 227-247.
- Jacquet, J. and L. Steeg, 1952.—C. R. Hebd. Seac. Acad. Agric. Fr. 38: 609-615.
- Jacquet, J. and L. Steeg 1953.—Annls. Falsif. Fraudes 46: 5-14.
- Jepsen, A. 1966.—Higiene de la leche. Ginebra, ed. FAO/OMS, p. 487-484.
- Jester, W. R.; W. W. Wright and H. Welch 1959.—Antibiotics Chemother. 9: 393-397.
- Johns, C. K. 1953.—Can. J. Agr. Sci. 33: 586-592.
- Kastli, P. 1963.—Am. Bul. F. I. L. parte VI.
- Kitchen, D. K.; C. R. Rein; E. W. Thomas and H. J. Spoor, 1951.—Amer. J. Sifph. 35: 578.
- Koskowski, F. V. 1960.—J. Milk food Technol. 19: 14-17.
- Kraack, J. and A. Tolle, 1969.—Archv. Lebensmittelhyg. 20: 145-149.
- Lang, K. 1967.—Milchwissenschaft 22: 230-238.
- Lemaitre, P. 1963.—C. R. Hebd. Seanc. Acad. Agric. Fr. 49: 653.
- Liska, B. J. 1960.—J. Milk and Food Techn. 23: 117.
- Marth, E. H. 1961.—J. Milk Food Technol. 24: 36-44.
- Marth, E. H. 1961.—J. Milk Food Technol. 24: 70-82.
- Marth, E. H. and B. E. Ellickson, 1959.—J. Milk Food Technol. 22: 241-249.
- Martin, P. H. 1959.—Mon. Bull. Indiana Bd. Hlth 61: 5.
- Mol, H. 1969.—Ned. Milk en Zwivitijdschr. 23: 153-162.
- Mol, H. 1975.—Tijdschr. Diergeneesk. 96: 461-469.

- Mol, H. 1975.—Antibiotics and milk. 1.ª ed. A. H. Balkema. Rotterdam.
- Mol, H. and E. C. Barker, de Hoff, 1968.—Tijdschr. Diergeneesk. 93: 584.
- Morel, D. 1962.—Enquête sur la presence d'antibiotiques dans le lait dans trois zones de production. Tesis doctoral Veterinaire. Lyon.
- Myers, R. P. R.—Res. Rev. 7: 9-36.
- Naylor, J. 1960.—Aust. J. Dairy Tech. 15: 153-160.
- Organización Mundial de la Salud, 1969.—Informe técnico núm. 430. p. 29. Ginebra. OMS.
- Organización Mundial de la Salud, 1971.—Comité Mixto FAO/OMS de expertos en higiene de la leche, 3^{er} Informe. Roma. FAO/OMS.
- Ovejero, S.; M. Diez and R. Pascual, 1953.—Le lait. 34: 22.
- Paladino, D. and I. Soana, 1963.—Rc. Ist. Sup. Sanita. 26: 370.
- Palmer, J. M. and F. Kossikowski, 1967.—J. Dairy Sci. 50: 1390-1394.
- Panes, J. J. *et al.* 1957.—J. Soc. Dairy Technol. 10: 81-83.
- Pisanu, S. 1968.—Il latte 42: 8.
- Portoles, A. 1958.—Microbiología esp. 11: 99-118.
- Richards, R. J. 1958.—Australian J. Dairy Technol. 13: 127-131.
- Rosanove, R. 1961.—Australian J. Dairy Tech. 16: 14-18.
- Shhipper, I. A. 1957.—Bim. Bull. N. D. A. C. 10: 7.
- Shahani, K. M. *et al.* 1956.—Antibiotic Chemother, 6: 544.
- Smith, H. W. 1975.—World's Poultry Sci. J. 31: 2.
- Storgards, T. 1962.—Int. Dairy Fed. a. Bull. 3: 4-24.
- Storrs, F. C. and W. Hoett-Brown, 1954.—J. Dairy Res. 21: 337-341.
- Tramer, J. 1964.—J. Soc. Dairy Tech. 17: 95-100.
- Vassal, L. and J. Auclair, 1965.—Ind. Lait. Paris 221: 253-255.
- Voogd, C. E.; M. G. P. Merstens and M. J. A. Scholten, 1965.—Ber. R. I. V. 1965: 257.
- Weinstein, I. 1959.—Antibiotics Am. 1959: 979.
- Welch, H. 1957.—Am. J. Public Hlth. 47: 701-705.
- Welch, H.; W. R. Jester and J. M. Burtom, 1965.—Antibiotics Chemother. 5: 571-573.
- Welch, H.; W. R. Jester and J. M. Burton, 1956.—Antibiotics Chemother. 6: 396-374.
- Whitehead, M. R. and G. A. Cox, 1956.—J. Appl. Bacteriol. 19: 247.