

MODIFICACIONES BACTERIOLÓGICAS DE LA LECHE POR LA ACCIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS

Drs. JUAN CABEZAS y JOSE GILARDINO
 Instituto de Microbiología e Inmunología. Prof. Hugo Vaccaro.
 Universidad de Chile. Santiago.

INTRODUCCIÓN

Ha llamado la atención en algunos países extranjeros, de modo particular en EE. UU. y Canadá, que la leche proveniente de animales tratados con algún antibiótico, presenta modificaciones variables de naturaleza físico-química y bacteriológica y que también los diversos productos obtenidos de ella, difieren en calidad con respecto a aquellos provenientes de leches naturales, normales.

Estas alteraciones provocadas por los antibióticos repercuten modificando considerablemente los valores obtenidos en algunas pruebas catalogadas como índices apreciativos de la calidad sanitaria de la leche, en forma especial sobre el Recuento Microbiano, sobre la Prueba de la Reductasa y sobre la Acidez.

El Reglamento Sanitario de la Leche y Productos Lácteos¹ que se encuentra en vigencia en nuestro país por Decreto-Ley del 12 de Agosto de 1942, al referirse a la leche destinada a pasteurización en su Artículo N° 33, manifiesta lo siguiente:

“1°) La leche deberá ser refrigerada inmediatamente después de la ordeña a una temperatura no superior a 6°C y será expendida a la Planta en buenas condiciones higiénicas, no debiendo transcurrir un tiempo mayor a 6 horas entre la recolección y la recepción en la Planta.

2°) Deberá ser limpia.

3°) Su Acidez no excederá de 21 cc. de una solución de Hidróxido de Sodio n/10% (21° Dornic).

4°) Prueba de catalasa hasta 30 cc. de oxígeno desprendido por ciento.

5°) Reductasa no inferior a 2 horas.

6°) Su número de gérmenes no será superior a 1.000.000 por cc.”

Las Plantas Pasteurizadoras para abastecer normalmente a la población están imposibilitadas de cumplir la totalidad de esta Reglamentación debido a diversas causas, por ejemplo: la relativa distancia entre los centros productores y los industrializadores, complicada por la carencia en su mayoría de medios de transportes

con condiciones higiénicas necesarias, lecherías inadecuadas y con personal de deficiente instrucción sanitaria respecto a su desempeño, etc.

En la Planta Pasteurizadora, la leche en el momento de su recepción, previo estudio de sus caracteres organolépticos, es sometida a la Prueba de la Acidez Total en forma rápida. Las leches cuya Acidez excede el límite máximo estipulado por la Planta para la Pasteurización (21° Dornic), recibe un castigo de un 30% en su valor. Además regularmente se cotiza su tenor graso, la impureza aparente y pruebas para investigar el aguado. Las pruebas bacteriológicas se llevan a cabo tomando a cada hora una muestra del estanque receptor y se la somete al Recuento Microbiano en Placa. La Prueba de la Reductasa se efectúa en una muestra de leche de cada productor. Estos dos últimos análisis no se toman en cuenta en la cotización diaria de la leche y los resultados obtenidos sólo tienen un valor relativo de apreciación en cuanto a la calidad higiénica del producto. Por consiguiente, es principalmente la determinación de la Acidez la que determina el destino de la leche en esta industria: con menos de 21° Dornic se pasteuriza y con una Acidez superior a este límite pasa a ser elaborada para subproductos, previo un castigo de un 30% en su valor.

Interesa así a los productores de leche, abastecedores de las Plantas, que el producto llegue a ellas con un grado de Acidez inferior al límite fijado².

Desde el advenimiento de los antibióticos se han ensayado algunos de ellos en forma experimental con el objeto de investigar hasta qué punto pueden provocar variaciones en las pruebas citadas y así la literatura extranjera cuenta con algunos trabajos al respecto:

Schofield³, demuestra que en vacas con mastitis tratadas con penicilina por infusión intramamaria, el antibiótico se elimina por la leche.

Welsh, Langer, Burkhart y Schroeder⁴, comprueban igual fenómeno si la penici-

lina es inyectada por vía parenteral, dependiendo la concentración del antibiótico en la leche, de la dosis total administrada y del periodo de frecuencia de las dosis empleadas.

Johns y Katznelson⁵, analizan la influencia de la penicilina sobre la Prueba de la Reductasa con azul de metileno en la leche cruda y demuestran que, con concentraciones de 0,083 a 833 Us. de penicilina por cc. de leche, se retarda la reducción del colorante.

Doan⁶, comprueba experimentalmente que existe inhibición parcial del desarrollo de ácido láctico por adición de 0,05 U. de penicilina por cc. de leche. Además afirma que este antibiótico, al ser administrado a vacas con mastitis, se elimina por la leche a dosis apreciables, hasta 24 horas después de concluido el tratamiento.

Foley y Byrne⁷, determinan el efecto de la penicilina sobre la leche cruda de vaca, adicionando el antibiótico en concentración de 3 Us. por cc. de leche. Manteniendo esta leche a 7°C, no aprecian efecto alguno, en cambio, si la leche era conservada a 27°C, se observó inhibición de la flora Gram positiva durante un lapso de 24 horas.

Calbert⁸, comprueba que diversos antibióticos, tales como penicilina, estreptomycinina y clortetraciclina, al ser inyectados a vacas, difunden a la leche y determinan inhibición de algunos de sus gérmenes. Estos hechos fueron confirmados por Bell, Flora, Reaves y Holdaway⁹.

Gilcreas y Stewart¹⁰, estudian el efecto de este antibiótico sobre el Recuento Microbiano en Placa de la leche cruda y observan que, con concentraciones de 5 a 50 Us. de penicilina por cc. de leche, mantenida entre 5 a 10°C por 24 horas, se produce una disminución de este índice.

Vallejos¹¹, en Argentina, demuestra experimentalmente que 0,1 U. de penicilina por cc. de leche, paraliza la acción de la flora acidificante, pero respeta al grupo de los gérmenes coliformes. La leche proveniente de los animales tratados con penicilina por infusión intramamaria, reduce tardíamente el azul de metileno. Además, comprobó que los cómputos microbianos por el método de Breed y en Placa son bajos y es característico el desarrollo de flora penicilino-resistente. Observó este investigador que la penicilina presente

en la leche resistía al proceso de pasteurización a 63-65°C durante 30 minutos, sucediendo lo mismo con el método rápido.

En el XVIII Congreso de Lechería celebrado en Francia en 1951, al tratarse el tema "Problemas Sanitarios de la Leche", el técnico Jean Pien¹² señaló que la leche con penicilina, crea en el hombre, particularmente en los niños, una resistencia a ella. Reconoce que la pasteurización es incapaz de destruir el efecto del antibiótico, puesto que la penicilina en la leche resiste más de 120°C. Jean Pien concluye manifestando que es absolutamente necesario ejercer una acción para impedir el abuso del empleo de este antibiótico en el tratamiento de las mastitis y para prohibir el uso en la alimentación humana de leche o de derivados provenientes de animales tratados con penicilina.

Jacquet¹², por su parte, declara en dicho Congreso que el peligro es el mismo con estreptomycinina y confirma lo expresado anteriormente.

Hemos considerado que el desarrollo del presente trabajo está justificado: a) porque la Prueba de la Reductasa, el Recuento Microbiano en Placa y la Acidez Total de la Leche, son índices utilizados en las plantas para apreciar la calidad higiénica del producto; b) por la escasa producción y bajo rendimiento de leche en nuestro país; c) por lo inadecuado de los medios de transportes para el producto; d) por la frecuencia de la mastitis bovina y de otras infecciones tratables con antibióticos. Todos estos factores crean condiciones especiales para que la leche contenga antibióticos, ya sea en forma ignorada cuando proviene de animales tratados, o bien, en forma intencionada, para impedir que la Acidez sobrepase el límite fijado por las Plantas para catalogar su calidad.

Dado que no disponemos hasta el momento de un procedimiento que sea de aplicación rápida y segura que permita la identificación de un determinado antibiótico en la leche en el momento de su recepción por la Planta, ha permitido que se elaboren en la pasteurización, leches que contienen antibióticos que para los efectos reglamentarios simulan las características de una leche fresca, normal.

Si bien es cierto que es de gran importancia este problema en su aspecto bro-

matológico-sanitario, no es menos importante en sus proyecciones hacia la Medicina y en particular en Pediatría. El consumo habitual de leches con antibióticos crea el serio y grave problema de las sensibilizaciones y de las resistencias de los gérmenes a ellos.

NUESTRO TRABAJO

El presente estudio se efectuó en muestras de leche cruda de una misma procedencia. Cada muestra representaba una mezcla de leches provenientes de varios animales. De cada muestra de leche fresca, se determinaron el Recuento Microbiano en Placa, la Prueba de la Reductasa con Azul de Metileno y la Acidez. Al resto se agregaron por separados penicilina, cuyas concentraciones fluctuaron entre 0,5 a 5 Us. por cc., estreptomycin entre 1 y 50 gammas por cc. y clortetraciclina (aureomicina) entre 0,5 y 20 gammas por cc. Las muestras controles y las tratadas con antibióticos fueron dejadas a la temperatura ambiente del laboratorio con un promedio de 15°C, para estudiar el tiempo que dura la acción antibiótica.

Un grupo de muestras se controló a las 3 horas, otro a las 6 y así sucesivamente a las 12, 24, 48 y 72 horas; al cabo de estos tiempos de contacto con los antibióticos, se realizaron nuevamente los tres índices citados.

ASPECTOS TÉCNICOS

1. *Recuento Microbiano en Placa.* Se realizó de acuerdo al descrito en "Standard Methods for the Examination of Dairy Products"¹³⁻¹⁴.

2. *Prueba de la Reductasa con Azul de Metileno.* Para efectuar esta Prueba se siguió la técnica preconizada por Barthel-Jensen¹⁴.

3. *Determinación de la Acidez.* Se realizó mediante titulación con Hidróxido de Sodio n/10, tal como se practica en la Central de Leche Chile S. A.

RESULTADOS

Lectura a las 3 y 6 horas.

1. *Leche Control.* No revela modificaciones de los índices estudiados comparativamente a los de la leche recién extraída.

2. *Leche adicionada de penicilina o estreptomycin.* Tampoco se manifiestan variaciones en los valores de las tres pruebas.

3. *Leche con clortetraciclina.* Solamente se prolonga levemente el tiempo de Reductasa en relación con la leche control.

Lectura a las 12 horas.

1. *Leche Control.* Aumenta el Recuento Microbiano en aproximadamente 8 veces. Se acorta el Tiempo de Reductasa a menos de la mitad de su valor primitivo y la Acidez asciende alrededor de 6°.

2. *Leche con penicilina.* El efecto mayor se observó con 3 Us. por cc. Con esta concentración y en relación con la leche fresca el Recuento Microbiano duplica su valor, la Prueba de la Reductasa se mantiene igual y la Acidez experimenta un ligero ascenso (de 0,04°).

3. *Leche con estreptomycin.* (Concentración óptima: 30 gammas por cc.). El Recuento Microbiano no alcanza a duplicar su valor primitivo. La Reductasa disminuye en 1 hora y la Acidez aumenta levemente.

4. *Leche con clortetraciclina.* (Concentración óptima: 10 gammas por cc.). El Recuento Microbiano aumenta levemente. Ligero acortamiento de la Prueba de la Reductasa. La Acidez no se modifica en relación con la de la leche fresca.

Lectura a las 24 horas.

1. *Leche Control.* El Recuento Microbiano y la Acidez aumentan considerablemente. El tiempo de Reductasa muy breve.

2. *Leche con penicilina.* Si bien los tres índices mejoran en relación a la leche control, no se aproximan a los valores obtenidos en la leche recién extraída.

3. *Leche con estreptomycin.* Con este antibiótico se obtuvieron resultados similares a los antes descritos para la penicilina.

4. *Leche con clortetraciclina.* (El efecto óptimo se obtuvo con 10 gammas por cc.). El Recuento Microbiano duplica su valor con respecto al de la leche fresca. El tiempo de Reductasa se acorta ligeramente con respecto al del control, mientras que la Acidez aún persiste igual a la de la leche fresca.

Lectura a las 48 horas.

El Recuento Microbiano y la Prueba de la Reductasa en este lapso ya carecen de valor. Sólo nos referiremos a la Acidez.

1. *Leche Control.* La Acidez triplica su valor. Hay coagulación en el 68% de las muestras.

2. *Leche con penicilina.* Con 1 U. por cc. se impide la coagulación en el 100% de las muestras.

3. *Leche con estreptomocina.* 30 gammas por cc. impidieron la coagulación en el 100% de las muestras.

4. *Leche con clortetraciclina.* Con 2,5 gammas por cc. se logra impedir la coagulación en un 100% de las muestras.

Lectura a las 72 horas.

1. *Leche Control.* Coagulación en todas las muestras.

2. *Leche con penicilina.* 2 Us. por cc. evitan la coagulación en el 100% de las muestras.

3. *Leche con estreptomocina.* Los resultados obtenidos en cuanto a coagulación son inferiores a los obtenidos con penicilina.

4. *Leche con clortetraciclina.* 2,5 gammas por cc. impiden la coagulación en todas las muestras.

RESUMEN

En este trabajo se estudian las modificaciones que experimenta la leche de vaca por la acción de los antibióticos.

En las leches conservadas como controles y en aquellas adicionadas de antibióticos (penicilina, estreptomocina y clortetraciclina), no se modifican los índices estudiados (Recuento Microbiano en Placa, Prueba de la Reductasa y Acidez) hasta las 6 horas de observación comparativamente con la leche recién extraída.

A partir de las 12 horas, la leche control experimenta modificaciones en los tres índices que la hacen no apta para la pasteurización de acuerdo a las normas sanitarias vigentes.

En cambio, las leches adicionadas de antibióticos y conservadas durante este lapso, pueden aparentar ser de buena calidad y pasar a pasteurización según la Reductasa y Acidez, aun cuando el Re-

cuento Microbiano aumenta ligeramente sobre el límite reglamentario.

Las leches adicionadas de antibióticos hasta las 24 horas de contacto mantienen aún características similares a aquellas que tenían las leches de 12 horas y por lo tanto también pasarían a pasteurización.

A las 48 horas, aun cuando la penicilina y estreptomocina no son capaces de modificar favorablemente los índices como para que la leche cumpla con la reglamentación, la clortetraciclina permite mantener la Acidez y la Reductasa prácticamente dentro de los límites tolerados. El Recuento Microbiano aumenta considerablemente, pero como el índice que determina el destino de la leche es la Acidez, esta leche también puede eludir el control de la Planta y ser así pasteurizada.

Las concentraciones óptimas de los antibióticos que permitieron obtener los resultados precedentes fueron: penicilina: 3 Us. por cc.; estreptomocina: 30 gammas por cc. y clortetraciclina: 10 gammas por cc.

SUMMARY

BACTERIOLOGICAL CHANGES OF COW MILK FOR THE ACTION OF ANTIBIOTICS.

In this paper, a study is made on the changes experimented by cow milk for the action of antibiotics.

There were no modification on the index studied (number of viable bacteria in a Petri dish, methylene-blue reduction and acidity tests) in milk used as control from those added of antibiotics (penicillin, streptomycin and chlortetracycline).

It has been found that after 12 hours, milk used as control showed a change in the three index, which make it no apt for pasteurization, according to the present sanitary reglamentation.

On the other hand, milk with antibiotics after 12 hours, may apparently be of good quality and suitable for pasteurization, if we consider methylene-blue reduction and acidity tests, although the number of viable bacteria is slightly over the reglamentary level.

Milk containing antibiotics during 24 hours maintains similar characteristics and would, therefore, pass to pasteurization.

Although penicillin and streptomycin cannot modify the index for doing milk acceptable to reglamentation up to 48 hours, chlortetracycline allow to maintain acidity and methylene-blue reduction tests practically within the tolerated limits. The number of viable bacteria increase considerably, but since acidity test is which decides its acceptance, milk under these conditions can escape to control and become pasteurized.

The optimal concentration of antibiotics wich allowed these results were; penicillin: 3 Us per ml.; streptomycin 30 gammas per ml. and chlortetracycline 10 gammas per ml.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.—Reglamento Sanitario de la Leche y Productos Lácteos. Ley 4869, Decreto 1213, 12 de Agosto de 1942. Santiago de Chile.
- 2.—Comunicación personal del señor Werner Mohn, Jefe del Laboratorio Bacteriológica de la Central de Leche Chile S. A.
- 3.—SCHOFIELD, F. W. — "Penicillin in the treatment of bovine mastitis". Can. J. Comp. Med. 10:63, 1946.
- 4.—WELSH, M.; LANGER, P. H.; BURKHART, R. y SCHROEDER CH., R. — "Penicillin blood and milk concentrations in the normal cow following parenteral administration". Science. 108:185, 1948.
- 5.—JOHNS, C. K. y KATZNELSON, H. — "Penicillin and dye reduction tests for milk quality". J. of Milk and Food Technol. 12:133, 1949.
- 6.—DOAN, F. J. — "Antibiotic in Milk". Milk Dealer. 1:102, 1950.
- 7.—FOLEY, E. J. y BYRNE, J. V. — "Penicillin as an adjunct to the preservation of quality of raw and pasteurized milk". — J. of Milk and Food Technol. 3: 170, 1950.
- 8.—CALBERT, H. E. — "The problem of antibiotics in Milk". J. Milk and Food Technol. 14:61, 1951.
- 9.—BELL, W. B.; FLORA, C. C.; REAVES, P. y HOLDAWAY, C. W. — "Aureomycin concentration in milk following intramammary infusion and its effects of starter activity". J. of Dairy Science. 34:675, 1951.
- 10.—GILCREAS, F. W. y STEWART, I. — "The effect of antibiotics on some characteristics of milk". Am. Rpt. N. Y. State Assoc. Milk Sanit. 37, 1951.
- 11.—VALLEJOS L., C. — "La penicilina en la leche de consumo público y de industria". La Industria Lechera. Oct., 509, 1952.
- 12.—Citado en la "Industria Lechera". Enero, 39, 1952.
- 13.—"Standard methods for the examination of dairy products". Am. Publ. Health Assoc. 8ª Ed. 1942.
- 14.—"Standard methods for the examination of dairy products". Am. Publ. Health Assoc. 9ª Ed. 1948.
- 15.—Comunicaciones personales de los Jefes Técnicos del Laboratorio de Bromatología de la Municipalidad de Santiago, Chile.
- 16.—WILKOWSKA, H. H. y KRIENKE, W. A. — "Influence of penicillin on the lactic acid production of certain lactobacilli". J. of Dairy Science, Oct., 1:030, 1951.
- 17.—HARVEY, W. y HILL, H. — "Milk production and control". 378, 1946.
- 18.—ROBERTSON, A. H. — "Laboratory procedures in sanitary milk control". Am. J. Publ. Health. 36:1245, 1946.
- 19.—JOHNS, C. K. — "Tests for milk quality". Canad. Publ. Health J. 32:169, 1941.
- 20.—KELSER, R. A. y SCHOENING, H. W. — "Manual of veterinary bacteriology". 725, 1948.
- 21.—DORNER, W.; DERMONT, P. y CHAVANNES, D. "Microbiologie laitiere". 1945.
- 22.—ROCHAIX, A. y TAPERNOUX, A. — "Le lait et ses dérivés". 2ª Ed. 1948.
- 23.—THIEULIN, G. y VUILLAUME, R. — "Elements pratiques d'analyses et d'inspection du lait". 2ª Ed. 1947.
- 24.—SHANANI, K. M.; GOULD, I. A.; WEISER, H. H. y SLATTER, W. L. — "Observations on antibiotics in a market milk supply and the effect of certain antibiotics on the keeping quality of milk". Antibiotics and Chemotherapy. 6:544, 1956.
- 25.—WELSH, H.; JESTER, W. y BURTON, J. — "Antibiotics in fluid market milk". Antibiotics and Chemotherapy. 6:369, 1956.
- 26.—CABEZAS, J. y GILARDINO, J. — "Importancia médico-sanitaria de la acción de los antibióticos en la leche". XII Reunión Anual de la Sociedad de Nutrición, Bromatología y Toxicología. Nov. 1956; Santiago, Chile.