

# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS  
DIVISION DE CIENCIAS VETERINARIAS



## "DETECCION DE RESIDUOS DE ANTIMICROBIANOS EN TEJIDOS DE BOVINOS Y CERDOS POR EL METODO DE TRIPLACA"

---

TESIS PROFESIONAL  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
MEDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA  
P R E S E N T A  
JAVIER GUERRERO GODOY  
DIRECTOR DE TESIS  
M. EN C. DELIA GUILLERMINA GONZALEZ AGUILAR  
A S E S O R  
MVZ. BEATRIZ TERESA ROSAS BARBOSA  
ZAPOPAN, JAL., MAYO DE 1997.

---

**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**

**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS  
BIOLOGICAS Y AGROPECUARIAS**

**DIVISION CIENCIAS VETERINARIAS**

**" Detección de residuos de antimicrobianos en tejidos de bovinos y  
cerdos por el método de triplaca"**

**TESIS PROFESIONAL**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
MEDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA**

**PRESENTA:**

**Javier Guerrero Godoy**

**DIRECTOR DE TESIS: M. en C. Delia Guillermina González Aguilar**

**ASESOR: MVZ. Beatriz Teresa Rosas Barbosa.**

**Zapopan, Jal., Mayo de 1997.**

**DEDICATORIAS**

DEDICO LA REALIZACION DE ESTE ESTUDIO EN MEMORIA A :

MI MADRE : ESPERANZA GODOY GOMEZ.

A MI PADRE : ALBERTO GUERRERO NUÑO.

POR QUE SUPIERON GUIARME POR EL CAMINO DEL ESTUDIO Y EL TRABAJO HACIENDO DE MI UN HOMBRE DE PROVECHO Y NOBLES IDEALES.

A MIS HERMANOS : HUMBERTO

RAMONA

MARIA

APOLONIO

PETRA

ALBERTO

SOLEDAD

JUAN

MARIANO

LIBRADO

POR SUS CONSEJOS, COMPRENSION Y AYUDA INCONDICIONAL.

GRACIAS...

**AGRADECIMIENTOS**

AGRADEZCO A DIOS :

POR HABERME PERMITIDO LA EXISTENCIA DURANTE MI FORMACION.

A MI ALMA MATER Y AMI FACULTAD :

POR PERMITIRME APRENDER CONOCIMIENTOS DE MEDICINA VETERINARIA.

A. H. COMISION DE TESIS :

POR HABER PERMITIDO TERMINAR LA META QUE ANHELA UN PASANTE.

A MIS RESPETABLES Y DISTINGUIDOS DIRECTOR Y ASESOR DE TESIS :

M.C. DELIA GUILLERMINA GONZALEZ AGUILAR.

M.V.Z. BEATRIZ TERESA ROSAS BARBOSA.

QUE APORTARON DESINTERESADAMENTE SU TIEMPO Y CONOCIMIENTOS PARA LA REALIZACION DE MI TRABAJO DE INVESTIGACION.

A MI HONORABLE JURADO :

M.V.Z. JORGE GALINDO GARCIA.

M.V.Z. MARIO REAL NAVARRO.

M.V.Z. CARLOS PACHECO REAL.

AL DEPTO. DE SALUD PUBLICA DEL C.U.C.B.A.

DR. M.V.Z. AGUSTIN RAMIREZ ALVAREZ.

M.C. RICARDO ALANIS.

M.C. ANGELICA LUIS JUAN MORALES.

POR SU VALIOSA COLABORACION:

A MIS AMIGOS :

M.V.Z. ALFREDO GUERRERO VIRGEN.

M.V.Z. MARIA DEL SOCORRO ROMERO GONZALEZ.

M.V.Z. PEDRO GARCIA DAVALOS.

M.V.Z. JAVIER DELGADO REYES.

POR SU AMISTAD Y COMPAÑERISMO DURANTE LA CARRERA PROFESIONAL.

A MIS COMPAÑEROS DE GENERACION XXXV

A MIS MAESTROS POR COMPARTIR SU CONOCIMIENTOS PARA MI FORMACION

M.V.Z. EDUARDO NEVAREZ SALAS

POR SU VALIOSA COLABORACION.

## CONTENIDO

	Página
RESUMEN .....	v
INTRODUCCIÓN .....	1
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	6
JUSTIFICACIÓN .....	7
HIPÓTESIS .....	8
OBJETIVOS .....	9
MATERIAL Y MÉTODO .....	10
RESULTADOS .....	17
DISCUSIÓN .....	25
CONCLUSIONES .....	28
LITERATURA CITADA .....	29

## RESUMEN

La presencia de residuos antimicrobianos en alimentos de origen animal pueden implicar riesgos para la salud del consumidor.

El área metropolitana de Guadalajara, Jal., es abastecida de carne procedente de varios rastros. El objetivo de este trabajo fue investigar la frecuencia de inhibidores microbianos en carne de animales sacrificados en el rastro de Tlaquepaque, Jal., recolectándose de junio a agosto de 1994, muestras de músculo, riñón e hígado de bovinos y porcinos. Las muestras fueron analizadas por el método microbiológico de las tres placas con trimetoprima.

De 108 bovinos estudiados 42 (38.9%) fueron positivos a la presencia de inhibidores microbianos, 45 (41.7%) negativos y 21 (19.4%) dudosos. En riñón el 24.1% de las muestras fueron positivas, 64.8% negativas y 11.1% dudosas. En músculo se encontraron 24.1% de muestras positivas, 57.4% negativas y 18.5% dudosas. 10 (9.3%) bovinos fueron positivos por ambos tejidos.

De 110 cerdos estudiados 68 (61.8%) fueron positivos, 30 (27.3%) negativos y 12 (10.9%) dudosos. En riñón se detectaron 51.8% de muestras positivas, 38.2% negativas y 10% dudosas. En músculo 26.4% muestras fueron positivas, 69.1% negativas y 4.5% dudosas. 18 (16.4%) cerdos fueron positivos por ambos tejidos.

En las muestras de hígado de bovinos se encontró que el 75% fueron positivos, 14.8% negativas y 10% dudosas. En hígado de cerdos el 89.9% de muestras fueron positivas, 10% negativas y el 9.1% dudosas.

Los resultados obtenidos hacen suponer que el envío al rastro de animales con residuos de antimicrobianos es frecuente.

## INTRODUCCIÓN

En la producción pecuaria se emplea una gran variedad de procedimientos con el fin de proporcionar alimentos en cantidad suficiente y de calidad óptima para el consumidor. Dentro de éstas prácticas, se encuentra el uso de antimicrobianos, los cuales son empleados en los animales con fines terapéuticos, profilácticos y de promoción de crecimiento. Tan solo en Estados Unidos, los antibacterianos junto con los antihelmínticos, representan alrededor del 70% de los medicamentos usados por veterinarios <sup>49</sup>.

El empleo de medicamentos y otros compuestos químicos, puede ocasionar que éstas sustancias o sus metabolitos se depositen en células, órganos o tejidos animales recibiendo el nombre de residuos <sup>9</sup>.

La presencia de residuos en alimentos de origen animal puede interferir en la elaboración de productos lácteos y cárnicos fermentados <sup>25,33</sup> pero, también implica riesgos toxicológicos, microbiológicos e inmunopatológicos para el consumidor <sup>9,48</sup>.

Dentro de los efectos tóxicos por antimicrobianos, se ha identificado que la anemia aplásica, una discráxia sanguínea la cual por lo general es fatal en individuos susceptibles, ha sido asociada con exposiciones a concentraciones muy bajas de cloramfenicol <sup>20,21,47</sup>, como las que pudieran persistir como residuos en tejidos comestibles de animales tratados con cloramfenicol, es por este motivo por lo que no se permite la presencia de residuos de cloramfenicol en alimentos ni su uso en animales destinados para consumo humano <sup>47</sup>.

En estudios de toxicidad crónica, realizados en ratones y ratas, que consumieron alimento con cantidades graduales de sulfametazina durante 24 meses, desarrollaron (relacionado con la dosis de antimicrobiano consumido) adenomas en células foliculares de la glándula tiroides <sup>4,12,22</sup>. Aunque la sulfametazina por si misma no es carcinogénica, causa un incremento en las concentraciones de la hormona estimulante de la tiroides, dicho aumento se cree que es la causa de los tumores encontrados en los estudios arriba mencionados <sup>3</sup>.

El riesgo microbiológico se relaciona con la capacidad de los residuos antimicrobianos para perturbar la flora intestinal del consumidor, pues esto podría inducir: a) una modificación en la ecología bacteriana, b) un debilitamiento en el efecto de barrera a nivel intestinal, c) mayor vulnerabilidad del consumidor a bacterias patógenas <sup>8</sup>.

Actualmente se están desarrollando métodos para la evaluación del riesgo microbiológico por residuos antimicrobianos <sup>8,10</sup>. En un estudio realizado en humanos que consumieron 2 mg de oxitetraciclina/día durante 7 días, se encontró un incremento estadísticamente significativo ( $P = 0.05$ ) en la proporción de enterobacterias resistentes <sup>12</sup>. También, ha sido reportado que combinaciones de antimicrobianos, a las concentraciones señaladas por la FDA como niveles permitidos en carnes, mostraron una tendencia a la selección de resistencia en una cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 9144 <sup>1</sup>.

Las penicilinas, tetraciclinas, sulfonamidas, aminoglucósidos como la estreptomina y neomicina así como la nitrofurantoina, son sustancias que se conoce pueden producir reacciones alérgicas <sup>13,14</sup>. Se calcula que alrededor del 10 % de la población humana es alérgica a la penicilina <sup>13</sup> y que entre el 0.3 y el 7.8%, es hipersensible a la bacitracina <sup>34</sup>.

Si bien se considera que la alergia ocasionada por residuos antimicrobianos es rara <sup>13</sup>, estos residuos pueden evocar reacciones inmunológicas en personas previamente sensibilizadas <sup>14,54</sup>.

Booth y McDonald <sup>9</sup> mencionan el caso de alergia en un carnicero que comió carne picada con un alto contenido de penicilina, al parecer, procedente del lugar donde se aplicó una inyección intramuscular al animal 3 días antes de su sacrificio. Kanny y cols. <sup>24</sup>, reportan que una mujer alérgica a penicilina, experimentó 2 shock anafilácticos después de ingerir carne de cerdo y de res, siendo muy plausible la hipótesis de que la anafilaxis inducida por el alimento, estuvo relacionada a la presencia de residuos de penicilina en la carne.

Existen reportes que muestran que los procedimientos ordinarios de cocción y almacenamiento en frío no inactivan los residuos antimicrobianos <sup>35,38,42</sup>.



Además del riesgo que representa para el consumidor, la presencia de residuos tiene repercusiones en el mercado internacional de productos de origen animal ya que los productos que tienen concentraciones de residuos por arriba de los límites máximos permitidos en un país importador, son rechazados <sup>17,18</sup>. Cordle en 1989 <sup>12</sup> menciona que, al tener dudas respecto a la seguridad en cuanto al riesgo para el consumidor por la presencia de sulfonamidas en carne, Japón amenazó a Estados Unidos con suspender sus importaciones de carne de cerdo en 1988.

Con el fin de lograr un equilibrio entre la utilización de fármacos, con las ventajas que representan y la necesidad de reducir los riesgos que implican los residuos de medicamentos en los alimentos que consume el hombre, se han hecho estudios para determinar a que concentración el consumo de una sustancia o su metabolito no representa un riesgo para la salud del consumidor <sup>9,37</sup> y cuánto tiempo debe transcurrir para que se llegue a esta concentración después de la última aplicación del medicamento <sup>33,39</sup>. Esto ha permitido establecer tiempos de suspensión o retiro del medicamento previos al sacrificio de los animales, límites máximos permitidos de sustancias <sup>9,13,28,43</sup>, el desarrollo de métodos de detección de los residuos <sup>37</sup> y la implantación de programas de control de residuos (USDA).

Para la identificación de residuos se emplean métodos microbiológicos, fisicoquímicos y serológicos <sup>1,36</sup>.

Aunque carecen de especificidad <sup>31</sup>, los métodos de tamizaje microbiológico, permiten detectar un amplio rango de grupos de antimicrobianos en corto tiempo (24 horas) y comparado con otros métodos, a un costo bajo <sup>28</sup>, sus ventajas los hacen ideales para implementarse como pruebas de tamizaje a nivel de rastro, pues ayuda a que los tiempos de retención de canales sospechosas de contener residuos, sean breves <sup>32</sup>. En Estados Unidos y Bélgica, la detección de sustancias inhibitorias en riñón mediante pruebas de tamizaje tiene por consecuencia que la canal sea retenida y se realice un análisis para la identificación y cuantificación del inhibidor presente <sup>11,28</sup>. Lo anterior se debe a que la falta de especificidad de los métodos microbiológicos de tamizaje hace necesaria la confirmación de los resultados mediante la identificación de los inhibidores presentes antes de declarar una canal como no apta para el consumo humano <sup>31</sup>. Por otra parte, en Canadá, si el riñón es positivo pero el músculo es negativo a la prueba microbiológica de tamizaje, el riñón y el hígado se decomisan pero la canal es aprobada para el consumo <sup>32</sup>.

Las pruebas tamiz para residuos antimicrobianos varían de un país a otro <sup>26</sup>, de una especie a otra e incluso, dentro de una misma especie variarán según sea la edad al sacrificio <sup>19</sup>. Así pues, mientras que en Europa la prueba de difusión en agar empleando 4 placas (EEC four-plate method) es la reconocida para la detección de residuos de antibióticos <sup>26</sup>, en Alemania se han utilizado para este fin, los métodos de dos placas (pH6 y pH8, empleado de 1974 - 1986)<sup>37</sup> y tres placas (Hemmstoffe in muskulatur und Niere - Dreinplattentest mit TMP: Método de inhibidores en músculo y riñón -Prueba de las tres placas con trimetoprima)<sup>2</sup>, el cual es el método oficial vigente en ese país y, en Bélgica se ha usado durante 5 años la prueba de tamizaje microbiológico de una placa <sup>26</sup>. En Estados Unidos y Canadá se utiliza el Swab Test on Premises (STOP) como método de tamizaje en bovinos adultos a nivel de rastros, en tanto que el Calf Antibiotic and Sulfa Test (CAST) es utilizado en éstos países para determinar la presencia de residuos en becerros <sup>19,28</sup> y, en Estados Unidos, el Sulfa on Site (SOS) es utilizado para detectar residuos de sulfonamidas en orina de cerdos <sup>19</sup>.

Para poder establecer la magnitud del problema de residuos en un lugar, es necesario conocer con que frecuencia y en que especie destinada a consumo humano se observan concentraciones de residuos arriba de los límites máximos permitidos, esta actividad es conocida como monitoreo <sup>52</sup>.

Las pruebas de monitoreo en planta utilizando como prueba de tamizaje el STOP, indicaron que en Estados Unidos, la frecuencia en 1989, de bovinos positivos a la prueba fue del 2.9% y del 1.2% en cerdos <sup>51</sup>. En un estudio de 2 años en un rastro de Canadá, el porcentaje de bovinos positivos al STOP fue del 2.5% <sup>32</sup>. En Alemania, empleando el método de las tres placas, las frecuencias reportadas de residuos antimicrobianos durante 1988 en bovinos y cerdos fue de 0.0038% y 0.0029% respectivamente <sup>16</sup>. Utilizando también el método de las tres placas, Zamora y Yabut <sup>55</sup> en Filipinas encontraron una frecuencia del 12% de muestras positivas a residuos antimicrobianos procedentes de carne de cerdo recolectada en 6 expendios. Lara y Lara y cols. <sup>29</sup> utilizando el método de cilindro en placa, reportan un 44% de muestras con residuos de antibióticos en carne de cerdo procedente del rastro municipal de Mérida, Yucatán.

Mediante espectrofotometría, Sánchez Rodríguez y cols.<sup>42</sup> detectaron sulfonamidas en carne y vísceras de bovinos sacrificados en rastros de la zona metropolitana del Distrito Federal, encontrando un 20% de muestras positivas en músculo, 70% en hígado y 30% en riñón. Sánchez Chávez<sup>41</sup>, empleando la prueba de las dos placas (pH 6 y pH 8), reporta un 12.7% de bovinos positivos en el rastro municipal de Guadalajara, Jal. Bayardo Uribe y Pelayo Ramírez<sup>5</sup>, empleando el método de 4 placas (pH 6, pH 7.5, pH 7.5 adicionado de trimetoprima y pH 8) encontraron una frecuencia del 3.2% de residuos de antimicrobianos en músculo de cerdos sacrificados en el rastro municipal de Guadalajara.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

En nuestro país además de la carne, las vísceras de los animales son consumidas habitualmente, por lo que es necesario establecer la frecuencia de residuos en esos productos.

El área metropolitana de Guadalajara, que comprende los municipios de Guadalajara, Tlaquepaque, Zapopan, y Tonalá, es abastecida de carne de animales sacrificados en rastros ubicados en esos municipios. Al carecer de información sobre la frecuencia de residuos en la carne que se consume en esta área se hace necesario determinar la situación de residuos en nuestro medio, y establecer los métodos de análisis apropiados para determinar la presencia de estos en la carne y vísceras de los animales de abasto, contribuyendo así a controlar y asegurar la inocuidad de estos productos.

## JUSTIFICACIÓN

Si bien ya se han hecho trabajos para detectar residuos de inhibidores microbianos en bovinos y cerdos sacrificados en el rastro municipal de Guadalajara (tesis bovinos y tesis cerdos), se desconoce la situación presente en otros rastros del área metropolitana de Guadalajara. El presente trabajo aportará información sobre la frecuencia de residuos en animales sacrificados en el rastro de Tlaquepaque Jal, con lo que contribuirá a la determinación de la frecuencia de residuos en carne y vísceras que se consumen en el área metropolitana de Guadalajara.

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS  
BIBLIOTECA CENTRAL

## HIPÓTESIS

En México la escasa vigilancia y control sanitario del uso de antimicrobianos en animales proveedores de alimento, favorecen su uso indiscriminado y de este modo en los alimentos de origen animal destinados al consumo humano es de esperarse una elevada frecuencia de productos contaminados con residuos de antimicrobianos.

## OBJETIVOS

### GENERAL

Determinar la frecuencia de inhibidores microbianos en carne y vísceras de bovinos y porcinos sacrificados en el rastro de Tlaquepaque, Jal.

### PARTICULARES

- 1.- Determinar la frecuencia de inhibidores microbianos en músculo, riñón e hígado de bovinos sacrificados en el rastro de Tlaquepaque, Jal.
- 2.- Determinar la frecuencia de inhibidores microbianos en músculo, riñón e hígado de cerdos sacrificados en el rastro de Tlaquepaque, Jal.

## MATERIAL Y MÉTODO

La recolección y análisis de las muestras se hicieron, salvo algunas modificaciones que se indican, conforme a la prueba para inhibidores en músculo y riñón (prueba de las tres placas con trimetoprima) <sup>2</sup>, la cual es el procedimiento oficial de rutina en Alemania, para la detección de inhibidores microbianos en carne. Un diagrama del proceso seguido se presenta en la figura 1.

### MUESTREO Y RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Se colectaron asépticamente muestras (cubos de 3 cm de lado)\* de músculo, riñón e hígado de 108 bovinos y 110 cerdos sacrificados en el rastro municipal de Tlaquepaque, Jal, durante los meses de junio a agosto de 1994. En este período los animales muestreados se seleccionaron de una población de 2,160 bovinos (108) y 2,220 cerdos (110). Las muestras se tomaron inmediatamente después de la evisceración de los animales. Los músculos de donde se tomaron las muestras estuvo condicionada a la factibilidad de recolección al momento de la toma de muestra, en los bovinos las muestras se obtuvieron del esternocéfálico, diafragma y elevador del ano. En los cerdos las muestras de músculo se tomaron de los pectorales y del semimembranoso.

El número de animales a muestrear se determinó utilizando la fórmula:

TAMAÑO DE MUESTRA PARA ESTIMAR PROPORCIONES PARA  
POBLACIÓN FINITA CON ERROR DE MAGNITUD <sup>30</sup>.

$$n = \frac{pqN}{\frac{B^2}{Z^2}(N-1) + pq} \quad n=108.17$$

n= Tamaño de muestra. p= proporción aproximada del fenómeno en estudio en la población de referencia. q = proporción de la población que no presenta el fenómeno en estudio. N= Tamaño de la población. B= Error de magnitud. Z= Valor de z crítica correspondiente al nivel de error aceptado.

Se consideró una población de 2200 animales, una frecuencia aproximada de 40%, un error de magnitud de 0.09 y un nivel de error aceptado de 5%.

\* El procedimiento alemán indica cubos de 6 cm de lado.



Se tomaron muestras de uno de cada 20 animales sacrificados.

La selección de los animales se realizó mediante un muestreo sistemático empleando la fórmula:

SELECCIÓN DE LAS UNIDADES DE OBSERVACIÓN  
PARA MUESTREO SISTEMÁTICO <sup>30</sup>

$$K = \frac{N}{n} = \frac{2200}{108} = 20.3$$

K = Constante. N = Tamaño de la población. n = Tamaño de muestra.

Aunque se intentó establecer la procedencia de los animales muestreados, esto no fue posible.

Los tejidos, debidamente identificados, se transportaron por separado en bolsas de polietileno, y se mantuvieron en refrigeración (5°C). Las muestras al llegar al laboratorio se congelaron durante 2 horas a -10 °C para facilitar su manejo y conservación del tejido y del posible residuo antimicrobiano y se procedió a su análisis. Las muestras se analizaron dentro de las 6 horas posteriores a su recolección.

#### ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

El análisis de los tejidos se realizó en el Departamento de Salud Pública de la División de Ciencias Veterinarias del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara.

De cada una de las muestras colectadas, con un sacabocados estéril, se cortaron porciones cilíndricas de 8 mm de diámetro y 2 mm de alto. En las muestras de riñón, las porciones analizadas fueron tomadas de la médula renal. Las porciones fueron colocadas en cajas Petri con agar nutritivo ajustado a pH 6, pH 7.2 y pH 8 inoculados con esporas *Bacillus subtilis* ATCC 6633\* a una concentración de 10 000 esporas por ml. Al medio ajustado a pH 7.2, se adicionó además trimetoprima (0.05 microgramos /ml).

\* La cepa recomendada en el procedimiento alemán es el *Bacillus subtilis* BGA, como no se contaba con esa cepa, se optó por el *B. subtilis* ATCC 6633 pues es utilizada en otras pruebas tamiz, Bogaerts <sup>7</sup> menciona su empleo para la detección de sulfonamidas en tejidos y luego de observar que presentaba halos de inhibición en los discos control, similares a los reportados para *B. subtilis* BGA.

En cada placa con muestras, se colocó un disco de papel filtro (Whatman 4) de 6 mm de diámetro con:

- 0.01 U.I. de Penicilina en el medio ajustado a pH 6.0
- 0.5 mcg de Sulfadiazina en el medio ajustado a pH 7.2
- 0.5 mcg de Estreptomicina en el medio ajustado a pH 8.0

Las muestras se incubaron a 35 °C \* durante 18 a 24 h.

Terminado el tiempo de incubación se verificó que los discos control con antimicrobianos presentaran halos de inhibición de 5 a 10 mm \*\*, procediéndose luego a medir los halos de inhibición observados en las muestras. El halo de inhibición se midió del borde del tejido al límite de la inhibición. Cuando las zonas de inhibición fueron menores de 1 mm la muestra se consideró negativa, las muestras con zonas de inhibición entre 1 y 2 mm se consideraron con resultado dudoso y aquellas que presentaron halos de inhibición de 2 o mas milímetros se reportaron como positivas a la prueba de inhibidores <sup>2</sup>.

La Prueba de inhibidores en músculo y riñón o prueba de las tres placas con trimetoprima es una prueba de tamizaje que emplea un procedimiento microbiológico para mostrar la actividad antibacteriana de una sustancia presente en músculo y/o riñón <sup>2</sup>. Esta prueba se basa en que al colocar una muestra de tejido que contenga un inhibidor, sobre un medio nutritivo sólido que contiene una concentración conocida de células bacterianas, el inhibidor se difundirá en el medio de cultivo y formará un halo de inhibición alrededor del tejido. El tamaño de la zona de inhibición es una medida del efecto inhibitorio <sup>2</sup>.

---

\*\* El procedimiento alemán recomienda 30 °C. La incubación se hizo a 35 °C. por que a esta temperatura, con la cepa utilizada, se obtiene un crecimiento mas denso y uniforme <sup>32</sup>.

\* Los halos promedio observados en éste trabajo fueron Penicilina: 7 mm, Estreptomicina: 8 mm, Sulfametazina: 10 mm.

De acuerdo con Ebrecht <sup>15</sup>, La prueba de las tres placas permite detectar desde:

- 0.001 mcg/ml de Penicilina
- 0.0075 mcg/ml de Ampicilina
- 0.0015 mcg/ml de Tetraciclina
- 0.04 mcg/ml de Aminoglucósidos
- 0.06 mcg/ml de Tilosina

Por ser un agente sinérgico de las sulfonamidas, la adición de Trimetoprima al medio permite aumentar hasta en 100 veces, la sensibilidad del microorganismo para la detección de sulfonamidas, permitiendo detectar desde 0.024 mcg/ml de Sulfonamidas en tejidos <sup>15</sup>.

La composición, preparación e inoculación del medio de cultivo <sup>2</sup> se detallan a continuación.

#### a) Medio Nutritivo

Peptona carne.....	3.45 g
Peptona caseína.....	3.45 g
Cloruro de sodio.....	5.1 g
Agar.....	13.0 g
Agua destilada.....	1000.0 ml

El medio se prepara en 3 matraces para ajustar a los distintos pH requeridos: pH 6, 7.2 y 8. Se recomienda preparar volúmenes de 500 ml para facilitar su manejo cuando se adiciona la suspensión de esporas de *B. subtilis*. Los ingredientes se mezclan con el agua destilada y se agrega 0.1% de fosfato de potasio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ). El medio se calienta para obtener una adecuada disolución de los ingredientes, posteriormente se ajusta el pH a 6, 7.2 ó 8. Para ajustar el pH del medio se utiliza ácido clorhídrico (HCl) o hidróxido de sodio (NaOH). El medio se esteriliza en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

El pH de los medios se debe verificar y de ser necesario, se ajusta nuevamente después de la esterilización, en tal caso, se tomaran las medidas necesarias para evitar la contaminación del medio.

Cuando la temperatura del medio ya esterilizado desciende a 50 °C, se le agregan y mezclan muy bien, 0.5 ml de la suspensión de *B. subtilis* a 500 ml. de medio, obteniendo una concentración en el medio de 10 000 esporas por ml.

Al medio ajustado a pH 7.2, además de la suspensión de esporas se le adicionan 0.5 ml (25 microgramos) de solución de uso de Trimetoprima. De esta forma se obtiene una concentración de Trimetoprima de 0.05 microgramos /ml.

Los medios se vierten en cajas Petri. El grosor del medio ya solidificado deberá de ser de 2 mm (este grosor se obtiene adicionando 15 ml de medio en cajas de Petri de 9 cm de diámetro). Una vez solidificado el medio, se mantiene en refrigeración (3 - 5 °C) hasta el momento de su utilización. Las cajas Petri con el medio preparado, deberán ser utilizadas en el transcurso de los 2 días posteriores a su elaboración.

## **b) Solución de Trimetoprima**

### **1. Solución Madre.**

Se colocan 10 mg de Trimetoprima en 10 ml de etanol, esta solución se calienta a 50 °C para favorecer la completa disolución de la Trimetoprima. Esta solución se mantiene estable durante 14 días en un ambiente frío y oscuro <sup>2</sup>.

### **2. Solución de uso.**

Esta solución contiene 50 microgramos de Trimetoprima por mililitro. Dependiendo de la cantidad de muestras que se procesen, es el volumen de solución a preparar. Considerando que la solución madre tiene una concentración de 1000 microgramos por mililitro, se pueden preparar volúmenes de 200 ml, y 100 ml. adicionando 10 ml de solución madre a 190 ml de agua destilada, o bien, 5 ml de solución madre a 95 ml de agua destilada <sup>2</sup>. Otra opción es medir en matraz volumétrico 0.5 ml de solución madre y completar con 9.5 ml de agua destilada <sup>2</sup>.

La solución se puede mantener en refrigeración por un máximo de 14 días <sup>2</sup>.

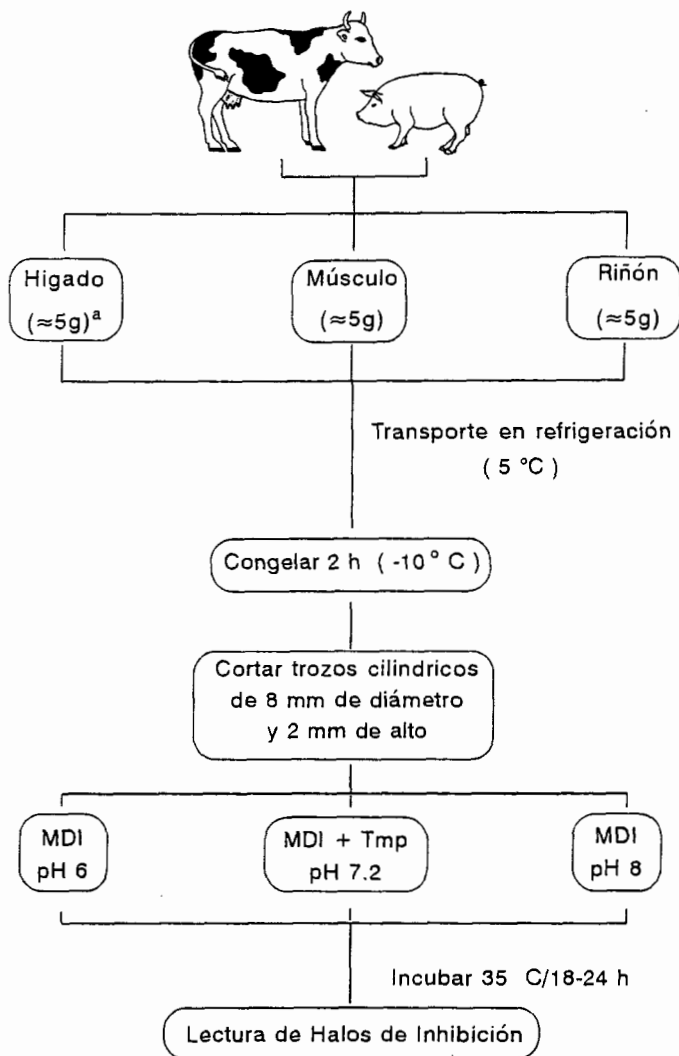
**c) Suspensión de esporas\***

El *Bacillus subtilis* se siembra en 3 tubos con Medio No. 1 para Antibióticos y se incuba a 32 - 35 °C durante 24 h. Transcurrido el tiempo de incubación se lava el crecimiento de la superficie de los tubos con 3 ml de Solución Salina Fisiológica (SSF) estéril y se pasa el líquido a una botella de Roux conteniendo 200 ml de Medio No. 1 para Antibióticos. La suspensión de microorganismos se distribuye sobre la superficie del medio utilizando perlas de vidrio estériles. Se incuba a 32 -35 °C durante 5 días. Se lava el crecimiento de la superficie del agar con 50 ml de SSF estéril, esta suspensión se centrifuga a 3 000 rpm durante 10 minutos y posteriormente se decanta el líquido sobrenadante. El sedimento se resuspende en 50 - 70 ml de SSF estéril y se calienta a 70 °C durante 30 minutos y después se conserva en refrigeración. La densidad de la suspensión obtenida deberá ser de  $10^7$  esporas por ml, la cual se determina mediante la técnica de vaciado en placa.

---

\* Procedimiento empleado en el Institut für Veterinärmedizin (Robert-Von-Ostertag-Institut) des Bundesgesundheitsamtes 1,000- Berlin 33. (1979).

Fig. 1 Detección de Inhibidores Microbianos por el Método de las Tres Placas con Trimetoprima (Método Oficial Alemán)



<sup>a</sup> Tomar cubos de 3 cm de lado. MDI = Medio para Detección de Inhibidores. Tmp = Trimetoprima

## RESULTADOS

Se consideró positivo un animal cuando el resultado de la prueba de inhibidores fue positivo en músculo y/o riñón, negativo cuando la prueba fue negativa por los dos tejidos y dudoso cuando el resultado de la prueba fue dudosa en ambos tejidos o dudoso en un tejido y negativo en el otro. Los resultados del hígado se describen en un apartado especial.

### BOVINOS

De los 108 bovinos estudiados, 42 (38.9%) fueron positivos, 45 (41.7%) negativos y 21 (19.4%) dudosos. Por sexo, de los 58 machos estudiados, 28 (48.3%) fueron positivos mientras que de las 50 hembras estudiadas, 14 (28.0%) fueron positivas (figura 2). En el riñón se detectaron 26 (24.1%) muestras positivas, 70 (64.8%) negativas y 12 (11.1%) dudosas. En músculo se encontraron 26 (24.1%) muestras positivas, 62 (57.4%) negativas y 20 (18.5%) dudosas. 10 (9.3%) muestras fueron positivas por ambos tejidos (cuadro 1 y 2). Con base en sus características físicas, 52 de los bovinos muestreados, fueron cebuínos, 49 Holsteín, y 7 pertenecieron a otras razas. El 40.4% (21 animales) de los cebuínos fueron positivos a la prueba de inhibidores microbianos, de los positivos, 18 eran machos, en tanto que en ganado Holsteín 19 animales (38.8%) fueron positivos y de éstos 12 eran hembras.

Los medios con mayor número de muestras positivas fueron el ajustado a pH 7.2 y pH 6, con 27 y 23 muestras positivas respectivamente. Dieciocho (42.8%) de las muestras fueron positivas simultáneamente a más de un pH (cuadro 1).

El tamaño de las zonas de inhibición en muestras positivas osciló entre 3 y 10 mm, predominando los halos de 4, 5 y 6 mm (figura 3).

## CERDOS

De los 110 cerdos muestreados, 68 (61.8%) fueron positivos, 30 (27.3%) negativos y 12 (10.9%) fueron dudosos. Por sexo, de los 39 machos estudiados, 26 (66.6%) fueron positivos mientras que de las 71 hembras estudiadas, 42 (59.1%) fueron positivas (figura 2). En el riñón se detectaron 57 (51.8%) muestras positivas, 42 negativas (38.2%) y 11 (10 %) dudosas. En músculo se encontraron 29 (26.4%) muestras positivas, 76 (69.1%) negativas y 5 (4.5%) dudosas. 18 muestras (16.4%) fueron positivas por ambos tejidos (cuadros 1 y 2).

Los medios con mayor número de muestras positivas fueron el ajustado a pH 7.2 y pH 6 con 52 y 23 muestras positivas respectivamente. Cuarenta y dos (61.7%) de las muestras fueron positivas solamente en pH 7.2 (cuadro 1).

El tamaño de las zonas de inhibición en muestras positivas osciló entre 3 y 10 mm, predominando los halos de 5, 6 y 8 mm (figura 4).

## HÍGADO

El hígado presentó frecuencias similares en las 2 especies. En cerdos, 89 (80.9%) muestras fueron positivas, 11 (10%) negativas y 10 (9.1%) dudosas. En bovinos, 81 (75%) muestras fueron positivas, 16 (14.8%) negativas y 11 (10.2%) dudosas (cuadro 2).

En hígado de cerdo los medios con mayor número de muestras positivas fueron el ajustado a pH 7.2 y pH 6, mientras que en bovinos fueron los de pH 7.2 y el ajustado a pH 8 (fig. 5).

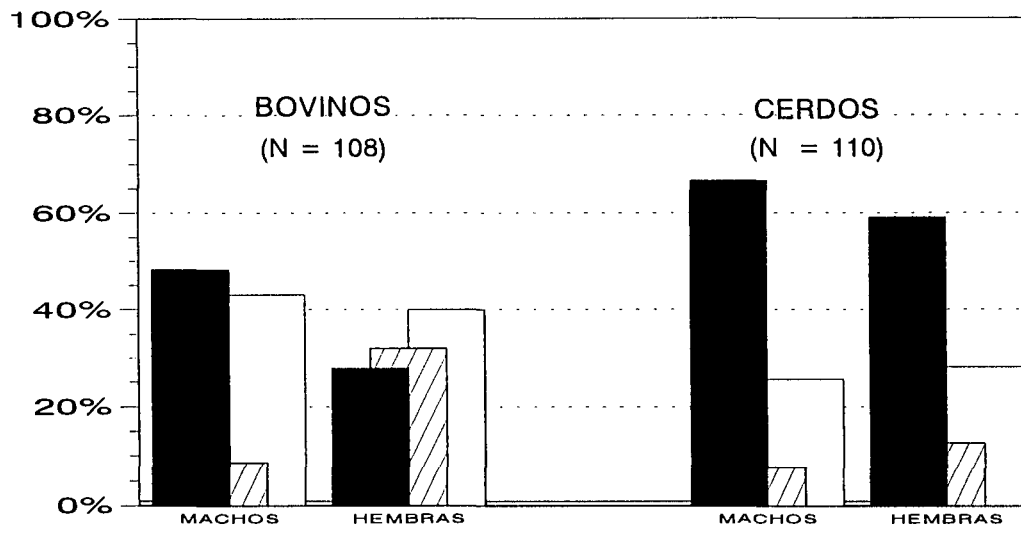
Se observaron halos de inhibición entre 3 y 15 mm predominando en hígado de cerdo los de 7, 6 y 5 mm, en tanto que en hígado de bovino, predominaron, en ese orden, los halos de 5, 4, 7 y 3 mm (figura 5).



Al haberse tomado 3 diferentes tejidos de cada animal muestreado y teniendo 3 posibles resultados a la prueba de inhibidores, se observaron 20 combinaciones de resultados, 12 de ellas fueron comunes a las 2 especies (cuadro 2). En bovinos, hubo 17 combinaciones, predominando la combinación Músculo negativo, Riñón negativo, Hígado positivo, (M-R-H+) y Músculo positivo, Riñón negativo, Hígado positivo (M+R-H+). (cuadro 2). En cerdos se encontraron 15 combinaciones predominando las combinaciones: Músculo negativo, Riñón positivo, Hígado positivo, (M-R+H+) y Músculo negativo, Riñón negativo, Hígado positivo, (M-R-H+) en ambos sexos. (cuadro 2).

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS  
BIBLIOTECA CENTRAL

Fig 2. Comportamiento a la prueba de inhibidores, por especie y sexo, de animales sacrificados en el Rastro Municipal de Tlaquepaque, Jal.



■ POSITIVO	28	14	26	42
▨ DUDOSO	5	16	3	9
□ NEGATIVO	25	20	10	20
TOTAL	58	50	39	71

**Cuadro 1. pH de los medios en que se detectaron muestras positivas procedentes de animales sacrificados en el Rastro Municipal de Tlaquepaque, Jal.**

	ÓRGANO	pH							TOTAL
		6	7.2	8	6 - 7.2	6 - 8	7.2 - 8	6 - 7.2 - 8	
B O V I N O S	Músculo	3	8	1	0	0	2	2	16
	Riñón	4	3	1	2	3	1	2	16
	Músculo y Riñón	3	1	0	2 <sup>ab</sup>	0	2 <sup>c</sup>	2 <sup>de</sup>	10
	TOTAL	10	12	2	4	3	5	6	42
C E R D O S	Músculo	5	4	0	2	1	0	0	11
	Riñón	7	28	1	0	1	1	1	39
	Músculo y Riñón	2	10	0	3 <sup>afg</sup>	0	1 <sup>c</sup>	2 <sup>hi</sup>	18
	TOTAL	14	42	1	5	1	2	3	68
<b>TOTAL</b>		<b>24</b>	<b>54</b>	<b>3</b>	<b>9</b>	<b>4</b>	<b>7</b>	<b>9</b>	<b>110</b>

a = Músculo positivo en pH 6 y Riñón positivo en pH 7.2

b = Músculo positivo en pH 6 y Riñón positivo en pH 6 y 7.2

c = Músculo positivo en pH 7.2 y Riñón positivo en pH 7.2 y 8

d = Músculo positivo en pH 6 y Riñón positivo en pH 7.2 y 8

e = Músculo positivo en pH 6 y Riñón positivo a pH 6,7.2 y 8

f = Músculo positivo a pH 7.2 y Riñón positivo a pH 6 y 7.2

g = Músculo positivo a pH 6 y 7.2. Riñón positivo a pH 7.2

h = Músculo positivo a pH 6 y 8. Riñón positivo a pH 7.2

i = Músculo positivo a pH 6 y 7.2. Riñón positivo a pH 6,7.2 y 8

Fig 3. Halos de inhibición observados en órganos de bovinos sacrificados en el Rastro Municipal de Tlaquepaque, Jal.

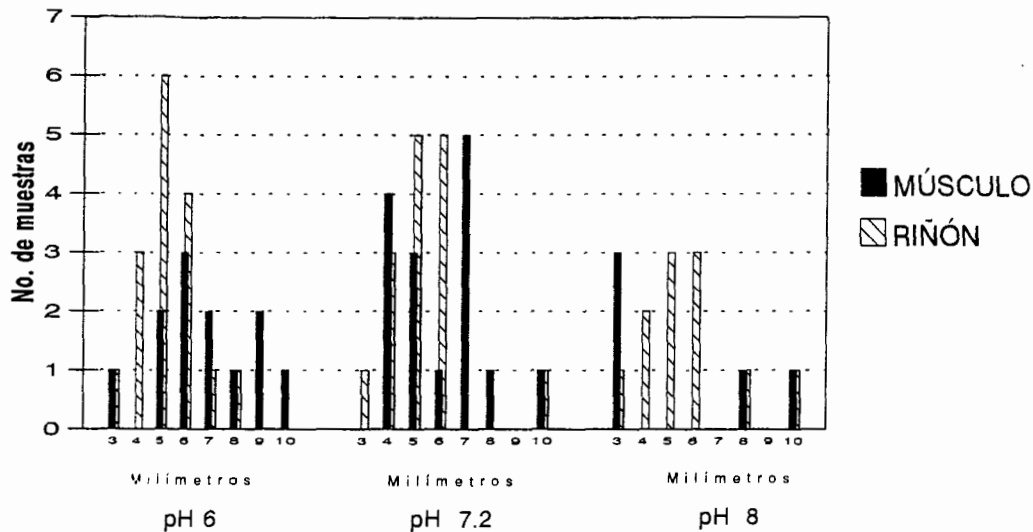
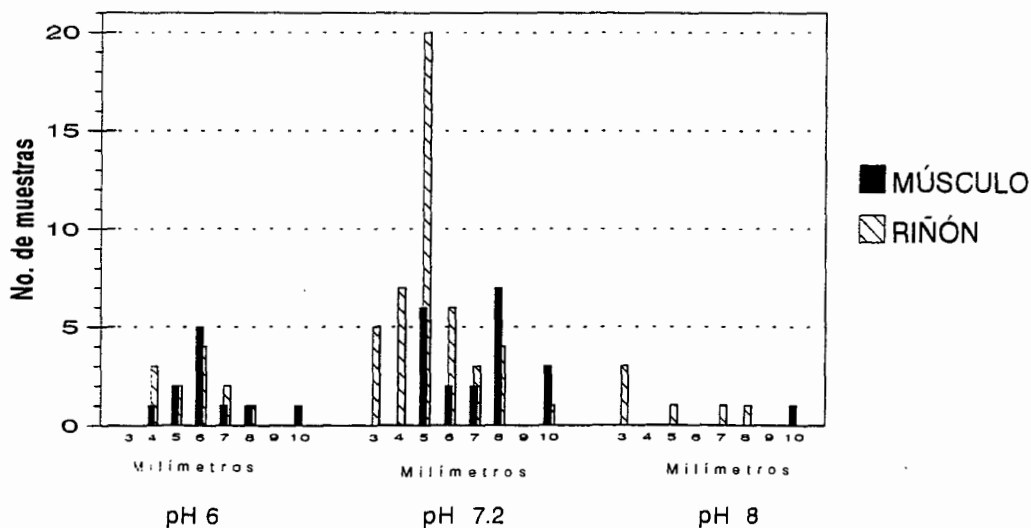
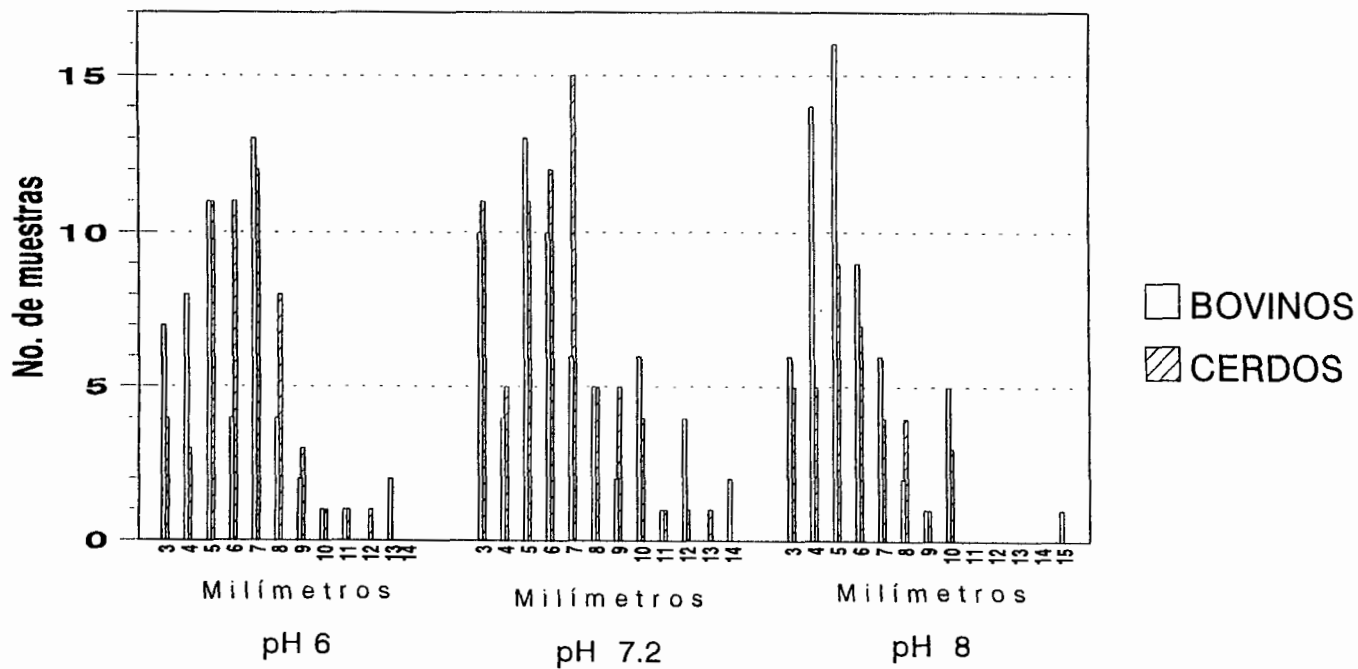


Fig 3. Halos de inhibición observados en órganos de cerdos sacrificados en el Rastro Municipal de Tlaquepaque, Jal.



**Fig 5. Halos de inhibición observados en muestras positivas de hígados de animales sacrificados en el Rastro Municipal de Tlaquepaque, Jal.**



**Cuadro 2. Combinaciones de resultados a la prueba de inhibidores en órganos de animales sacrificados en el Rastro Municipal de Tlaquepaque Jal,**

ÓRGANO		COMBINACION <sup>a</sup>																		TOTAL		
		-	-	+	+	-	o	-	-	o	o	-	-	+	+	+	o	-	-		+	+
MÚSCULO		-	-	+	+	-	o	-	-	o	o	-	-	+	+	+	o	-	-	+	+	
RINÓN		-	+	+	-	-	-	o	-	+	o	+	+	o	+	+	-	o	o	-	-	
HÍGADO		+	+	+	+	-	+	+	o	+	+	o	-	+	o	-	o	o	-	-	o	
<b>B O V I N O S</b>	Macho	11	7	6	8	6	0	2	8	5	2	* <sup>b</sup>	0	1	*	0	1	0	0	1	*	58
	Hembra	13	2	3	6	6	9	3	1	1	2	*	1	0	*	1	0	1	1	0	*	50
	TOTAL	24	9	9	14	12	9	5	9	6	4	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	108
<b>C E R D O S</b>	Macho	8	13	5	3	2	1	2	0	1	*	2	0	1	0	0	*	*	*	*	1	39
	Hembra	12	18	9	5	6	2	7	2	1	*	2	2	1	3	1	*	*	*	*	0	71
	TOTAL	20	31	14	8	8	3	9	2	2	0	4	2	2	3	1	0	0	0	0	0	1
<b>TOTAL</b>		<b>44</b>	<b>40</b>	<b>23</b>	<b>22</b>	<b>20</b>	<b>12</b>	<b>14</b>	<b>11</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>218</b>

<sup>a</sup> + = Positivo - = Negativo o = Dudoso

<sup>b</sup> \* = combinación no observada

## DISCUSION

Hasta 1994 en México, oficialmente la detección de residuos solo era obligatoria en las plantas tipo inspección federal (TIF) y tenía por finalidad obtener carne con la calidad sanitaria requerida internacionalmente para su exportación<sup>44,45,46</sup>. La Norma Oficial para el Control de Residuos publicada en agosto de 1994 "tiene por objeto establecer las bases para la detección y el control de residuos tóxicos en tejidos alimenticios primarios de origen animal y es aplicable a la carne, grasa, hígado y riñón de bovinos, equinos, porcinos y ovinos, provenientes de establecimientos de sacrificio ubicados en el país o de una planta aprobada por la Secretaría de Agricultura y Recursos Hídricos, cuando éstos sean de importación"<sup>43</sup>. Por tanto, los resultados del presente estudio nos dan una imagen de la frecuencia de residuos antimicrobianos en animales sacrificados en el rastro municipal de Tlaquepaque previa a la entrada en vigor de normas para el control de residuos en carne para consumo nacional.

Tomando como referencia que en Estados Unidos, una frecuencia del 4% de residuos es considerada inaceptable<sup>22</sup>, los porcentajes de positividad encontrados, así como los obtenidos en otros estudios realizados en México<sup>5,29,41,42</sup> hacen suponer que en nuestro medio, el envío al rastro de animales con residuos de antimicrobianos es frecuente y que constituye un problema que requiere de atención. Las frecuencias de muestras positivas de este trabajo fueron mayores a las reportadas para bovinos<sup>41</sup> y cerdos<sup>5</sup> sacrificados en el rastro municipal de Guadalajara, Jal.

La presencia de residuos en tejidos animales a sido atribuida principalmente a: no respetar el tiempo que debe transcurrir desde la última aplicación de un medicamento a cuando el animal se sacrifica, o bien al consumo de alimento medicado por animales que no debían consumirlo, esto último puede ocurrir por un error en la distribución de alimento o por presencia de medicamento en el equipo donde se prepara el alimento<sup>6</sup>.

La mayoría de las sustancias son eliminadas rápidamente del tejido muscular, por lo que las muestras de músculo positivas muestran más un nivel farmacológico que un nivel de residuos <sup>26</sup>.

La frecuencia con que se encontraron muestras positivas simultáneamente por músculo y riñón y el hecho que durante el tiempo que duró el estudio se detectaban cada semana al menos un bovino y un cerdo positivo por los 3 tejidos estudiados, hacen suponer que era frecuente el envío de animales al rastro de Tlaquepaque, sin respetar los tiempos de espera para la eliminación de medicamentos.

Por su función zootécnica, a las vacas se les considera ser un grupo sospechoso de haber recibido tratamientos con antibióticos antes de ser enviadas al rastro <sup>32</sup>. En nuestro medio, los cebuínos generalmente se utilizan para la producción de carne, los porcentajes de muestras positivas a residuos encontrados tanto en bovinos Holsteín como en cebuínos indicó que ambos grupos fueron expuestos a inhibidores microbianos. La frecuencia de muestras positivas en cebuínos pudiera explicarse como una consecuencia del empleo de antimicrobianos como profilácticos en las engordas de bovinos, práctica que ha sido observada en varios municipios de Jalisco (Rosas Barbosa B., Comunicación personal).

La difusión de los diferentes grupos de antimicrobianos se favorece a determinados pH. Los macrólidos y aminoglucósidos son mucho más activos a un pH alcalino (pH 8) que a un pH ácido <sup>23</sup>, mientras que las penicilinas lo son a pH 6 y en las sulfonamidas la solubilidad se eleva conforme el pH aumenta <sup>50</sup>.

El 43% de las muestras positivas de bovinos lo fueron simultáneamente a 2-3 de los distintos pH a que se ajustaron los medios (cuadro 1). Esto hace suponer que los animales de donde procedían las muestras, fueron expuestos antes de ser enviados al rastro a más de un inhibidor microbiano o bien a un inhibidor con un rango de pH para difundir que abarcaba los pH incluidos en este estudio.



En los cerdos, el 62 % de las muestras positivas fueron detectadas en riñón a pH 7.2 (cuadro 1). Tomando en cuenta que las sulfonamidas son excretadas fundamentalmente por riñón <sup>50</sup> y que en la placa ajustada a pH 7.2 se favorecen las condiciones para la detección de sulfonamidas, tentativamente puede suponerse que las muestras positivas a pH 7.2 provenían con frecuencia de cerdos que estuvieron expuestos a este tipo de antimicrobianos.

Se asume que la tasa de residuos en hígado con relación al músculo es de 3:1 <sup>12</sup> pues siendo un órgano de detoxificación, contiene de dos a cinco veces mayor cantidad de residuos que la concentración presente en músculo <sup>40</sup>.

Sí bien la prueba de las tres placas no contempla su empleo para la detección de residuos en hígado, la proporción entre muestras positivas por hígado y positivas por músculo en ambas especies correspondió a 3:1 lo que consideramos es un indicador de que la prueba es válida para detección de residuos en hígado, pero es conveniente realizar una valoración mas a fondo la eficacia de esta técnica para la detección de residuos en hígado.

Es evidente que bajo las condiciones económicas de México, el consumo de vísceras representa una opción nutricional mas barata que las porciones musculares, sin embargo, su consumo puede implicar una exposición frecuente a niveles de residuos por arriba de los límites máximos permitidos.

Para lograr una reducción en la ocurrencia de residuos en los alimentos es necesario implementar programas de orientación al productor al mismo tiempo que se lleva a cabo un programa de detección de residuos. En Estados Unidos empleando este sistema, se observó que el porcentaje de muestras positivas al CAST se redujo de 5 % en 1984 a alrededor del 2 % en 1986 <sup>11</sup>.

## CONCLUSIONES

- 1.- Es alta la frecuencia con que se detectan inhibidores microbianos en carne de bovinos y cerdos sacrificados en el rastro de Tlaquepaque, Jal.
- 2.- Es posible que las frecuencias de residuos observadas en bovinos y cerdos se deban a la falta de observancia del período de retiro de antimicrobianos previo al envío de los animales al sacrificio.

## LITERATURA CITADA

- 1.- Agarwal V. K (ed).: Analysis of antibiotic/drugs in food products of animal origin. **Plenum Press**, New York. 1992.
- 2.- Anonym.: "Hemmstoffe in Muskulatur und Niere (Dreiplattentest mit TMP)" in: Allgemeine Verwaltungsvorschrift über die Durchführung der amtlichen Untersuchungen nach dem Fleischhygienegesetz(VwVFIHG). **Bundesanzeiger**. pp. 13-14. Vom 11. Dezember 1986.
- 3.- Anonymous.: Sulfa review urged. **Feed International.**, 11: 38-39 (1990).
- 4.- Augsburg, J. K.: Sulfa residues in pork: An update. **J. Anim. Sci.**, 67: 2817-2821 (1989).
- 5.- Bayardo Uribe, A. y Pelayo Ramírez, R.: Estudio de monitoreo de residuos de sulfonamidas en carne de cerdo sacrificados en el rastro municipal de Guadalajara, Jalisco. Tesis de licenciatura. **Fac. de Med. Vet. y Zoot.** Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jal., 1993.
- 6.- Bevill, R. F.: Factors influencing the occurrence of drug residues in animal tissues after the use of antimicrobial agents in animal feeds. **JAVMA.**, 185: 1124-1126 (1984).
- 7.- Bogaerts, R., Groodt De, M.J., and Vos De, D.: An ultra-sensitive microbiological method for the semi-quantitative detection of low-level sulfonamides. **J. Food Sci.**, 46: 158-160 (1981).
- 8.- Boisseau, J.: Basis for the evaluation of the microbiological risks due to veterinary drug residues in food. **Vet Microbiol.**, 35: 187-192 (1993).
- 9.- Booth, N.H. y McDonald L.E.: Farmacología y terapéutica veterinaria. **Acribia**. Zaragoza, España. 1988.
- 10.- Corpet, D.E.: An Evaluación of methods to assess the effect of antimicrobial residues on the human gut flora. **Vet Microbiol.**, 35: 199-212 (1993).
- 11.- Cordle, M. K.: USDA Regulation of residues in meat and poultry products. **J. Anim. Sci.**, 66: 413-433 (1988).

- 12.- Cordle, M.K.: Sulfonamide residues in pork: Past, present, and future. *J. Anim. Sci.*, **67**: 2810-2816 (1989).
- 13.- Dayan, A.D.: Allergy to antimicrobial residues in food: assessment of the risk to man. *Veterinary Microbiology.*, **35**: 213-226 (1993).
- 14.- Dewdney, J.M., Maes, L., Raynaud, J.P., Blanc, F., Scheid, J.P., Jackson, T., Lens, S., and Verschueren, C.: Risk assessment of antibiotic residues of  $\beta$ -lactams and macrolides in food products with regard to their immuno-allergic potential. *Fd Chem. Toxic.*, **29**: 477-483 (1991).
- 15.- Ebrech Von Annelotte.: Verbesserung des Hemmstofftestes durch Zusatz von Trimethoprim zum Nachweis van Sulfonamiden. *Archiv für Lebensmittelhygiene.*, **33**: 109-136 (1982).
- 16.- Fink Gremmels, J.: Nutrition residues and health. *Fleischwirtsch.*, **72**: 1541-1546 (1992).
- 17.- Fitzpatrick, C.S.: New food safety initiatives in the Food and Drug Administration. *J. Animal Sci.*, **68**: 870-873 (1990).
- 18.- Food and Agriculture Organization of the United Nations.: Residues of veterinary drugs in foods. Report of a Joint FAO/WHO Expert consultation 1984. FAO Fod and Nutrition Paper No. 32 FAO. Roma 1985.
- 19.- Franco, A. D., Webb, J. and Taylor, E. C.: Antibiotic and sulfonamide residues in meat: Implications for human health. *J. Food Prot.*, **53**: 178-185 (1990).
- 20.- Fraunfelder, F. T., Grover, C., Bagby, Jr., Kelly, D.J. : Fatal aplastic anemia following topical administration of ophthalmic chloramphenicol. *Am. J. Ophthalmol.*, **93**: 356-360 (1982).
- 21.- Giacco Del, G. S. Del., Petrini, M. T., Jannelli, S. and Carcassi U.: Fatal bone marrow hypoplasia in a shepherd using chloramphenicol spray. *Lancet.*, **8223-8235**: 945 (1981).
- 22.- Guest, G.: Food- animal drug residues. *Veterinary Medicine.*, **83**: 404-416 (1988).
- 23.- Jawetz, E., Melnick J. L., y Adelberg, E. A.: Manual de Microbiología Médica. **El Manual Moderno**, México, D.F. 1981.

- 24.- Kanny, G., Puygrenier, J., Beaudoin, E., Moneret-Vautrin, D.A.: Choc anaphylactique alimentaire: implication des residus de penicilline. *Allergie et Immunologie.*, **26**: 181-183 (1994).
- 25.- Koenen-Dierick, K., and Van Hoof, J.: Failure in dry sausage production caused by penicilin and tetracycline residues in meat. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift.*, **57**: 109-112 (1988).
- 26.- Koenen-Dierick, K., Okerman, L., Zutter De, L., Degroodt, J.M., Hoof Van, J., and Srebrnik, S.: A one-plate microbiological sacreening test for antibiotic residue testing in kidney tissue and meat: an alternative to the EEC four-plate method?. *Food Additives and Contaminants.*, **12**: 77-82 (1995).
- 27.- Korsrud, G.O., Naylor, J.M., Salisbury, C.D., and MacNeil, J.D.: A comparison of three bioassay techniques for the detection of chloramphenicol residues in animal tissues. *J. Agric. Food Chem.*, **35**: 556-559. (1987).
- 28.- Korsrud, G. O., Craig, D.C., Salisbury, C., Fesser, A. C. E., and Macneil J. D.: Laboratory evaluation of the Charm Farm Test for antimicrobial residues in meat. *J. Food Prot.*, **58**: 1129-1132 (1995).
- 29.- Lara y Lara, J., Coello Echeverría, P. y Hernández Carvajal, M.: Residuos de antibióticos en carne de hígado de cerdo y aves que se consumen en la ciudad de Mérida. *Vet Méx.*, **XXII**:2: 53-56. (1991).
- 30.- Levin, R.I.: Estadística para administradores. 2 ed. **Prentice-Hall Hispanoamericana**. México (1988).
- 31.- Lund, C.: Indentification of antibiotic residues in animal tissue under practical conditions. Proceedings from the 2nd World Congress Foodborne Infections and Intoxications Berlin ISBN 3-924403-92-9/ISBN 0175-4262., 819-824 (1986).
- 32.- Masztis, P.S.: Antibiotic residue testing in beef slaughterhouse. *Can Vet J.*, **25**: 329-330 (1984).
- 33.- McCaughey, W.J., Elliott, C.T., Campbell, J.N., Blanchflower, W.J., and Rice, D. A.: Tissue residues in pigs fed on meal contaminated with sulphadimidine during mixing. *Irish Vet J.*, **43**: 127-130, (1990).

- 34.- Mercer, H.D.: *Vet Clin North Am.*, 5: 3 (1975). **Citado en:** Booth, N.H. y McDonald, L.E.: Farmacología y terapéutica veterinaria. **Acribia**, Zaragoza, España. 1988.
- 35.- Moats, W.A.: Inactivation of antibiotic by heating in foods and other substrates - A Review. *J. Food Prot.*, 51: 491-497 (1988).
- 36.- Neidert, E., Saschenbrecker, W.P., and Tittiger, F.: Thin Layer Chromatographic/Bioautographic method for identification of antibiotic residues in animal tissues. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 70: 197-200 (1987).
- 37.- Nouws, J.F.M.: Tolerances and detection of antimicrobial residuos in slaughtered animals. *Archiv für Lebensmittelhygiene.*, 32: 103-110 (1981).
- 38.- O'Brien, J.J., Campbell, N., and Conaghan, T.: Antibiotic residues in meat: Cooking and cold storage effects. *Vet. Rec.*, 106: 365 (1980).
- 39.- Poucke Van, L.S.G., and Peteghem Van, C.H.: Pharmacokinetics and tissue residues of sulfathiazole and sulfamethazine in pig. *J. Food Prot.*, 57: 796-801 (1994).
- 40.- Randeker, V.W., Reayan, J. A., Engel, R.E., Soderberg, D.L. and McNeal, J.E.: Serum and urine as predictors of sulfametazine, Levels in swine muscle, live and kidney. *J. Food Prot.* 50: 115 (1987). **Citado por:** Cordle, M.K.: USDA Regulation of residues in meat and poultry products. *J. Anim. Sci.*, 66: 413-433 (1988).
- 41.- Sánchez, Chávez, A.: Detección de inhibidores microbianos en carne de bovino. Tesis de licenciatura. *Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias División de Ciencias Veterinarias*. Universidad de Guadalajara. Zapopan, Jal., 1995.
- 42.- Sánchez Rodríguez, L., Fuentes Hernández, V. O., Sumano López, H. y Reza Guevara, C.: Detección de residuos de sulfonamidas en carne y vísceras de bovino sacrificados en rastos del Distrito Federal y Zona Metropolitana. *Vet. Mex.*, 19: 35-38 (1988).
- 43.- SECRETARIA DE AGRICULTURA Y RECURSOS HIDRAULICOS.: " Norma Oficial Mexicana NOM-004-ZOO-1994 , Control de residuos toxicos en carne, grasa, hígado y riñón de bovinos, equinos, porcinos y ovinos." *Diario Oficial de la Federación*. México D.F. 11 de agosto de 1994. pp. 10-24.

- 44.- SECRETARIA DE AGRICULTURA Y RECURSOS HIDRAULICOS.: " Acuerdo por el cual se aprueba y establece en el territorio nacional con carácter de obligatorio y permanente el Programa para el Control de Residuos Tóxicos, Biológicos, y Contaminantes en Productos y Subproductos de Origen Animal, Utilizados en las distintas especies que puedan resultar nocivos a la salud del hombre y que procedan de las unidades de Producción Pecuaria y de las Plantas y Establecimientos de tipo Inspección Federal". *Diario Oficial de la Federación*. México D.F. 11 de enero de 1984. pp. 5-6.
- 45.- SECRETARIA DE AGRICULTURA Y RECURSOS HIDRAULICOS.: " Programa de control de residuos toxicos y contaminantes en productos y subproductos de origen animal procedentes de unidades de producción pecuarias o de plantas y establecimientos tipo inspección federal." *Diario Oficial de la Federación*. México D.F. 5 de enero de 1984. pp. 21-23.
- 46.- SECRETARIA DE AGRICULTURA Y GANADERIA.: Programa de control de residuos biológicos. SAG. **Subsecretaría de Ganadería. Dirección General de Ganadería - Departamento de empacadoras**. México D.F. 1975.
- 47.- Setrepani, J.A.: The hazard of using chloramphenicol in food animals. *JAVMA.*, **184**: 930-931 (1984).
- 48.- Somogyi A.P.: Residuos medicamentosos. *Salud Mundial.*, **Julio**: 26 (1985).
- 49.- Stowe, C.M.: Life before and after residues. *J Am Vet Med Assoc.*, **192**: 622-624 (1988).
- 50.- Sumano López, H., Ocampo Camberos, L.: Farmacología Veterinaria. **McGRAW-HILL**. México D.F. 1990.
- 51.- United States Department of Agriculture.: Domestic Residue Data Book National Residue Program 1988-1989. Food Safety and Inspection Service, Science and Technology (s.l)(s.e.). December(1990).
- 52.- United States Food and Drug Administration, Center for Veterinary Medicine, Industry Information Staff, HFV-12, 301/443-4557.: Monitoring for residues in food animals. CVM MEMO., CVMM-19, pp.1-4. **U.S. Department of Health and Human Services**, Maryland. 1990.

- 53.- Veisseyre R.: Lactología Técnica. Acribia. Zaragoza, España. 1986. 1era Reimpresión, 1988.
- 54.- Woodward K.N.: Hipersensitivity in humans and exposure to veterinary drugs. *Veterinary & Human Toxicology.*, 33: 168-172 (1991).
- 55.- Zamora, B. M.; Yabut, J. M. P.: Detection of antibacterial residues in pork using Hemsstoff Test. *Phil. J. Vet. Med.*, 26: 3-6 (1989).