

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias



CONTAMINACIÓN DE CARNE DE BOVINO CON RESIDUOS DE ANTIMICROBIANOS EN CUATRO RASTROS DEL ESTADO DE JALISCO

Tesis Profesional que para obtener el Título de:

Licenciado en Biología

Presenta:

José Guadalupe Mercado García

Director:

Dra. Delia Guillermina González Aguilar

Asesor:

Dra. Elisa Cabrera Díaz

Guadalajara, Jalisco. Abril de 2011



Universidad de Guadalajara
Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias
Coordinación de Carrera de la Licenciatura en Biología

COORD-BIO-035/2011

C. JOSÉ GUADALUPE MERCADO GARCÍA
PRESENTE

Manifiestamos a usted, que con esta fecha, ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de **TESIS E INFORMES** opción **TESIS** con el título: "**CONTAMINACIÓN DE CARNE DE BOVINO CON RESIDUOS DE ANTIMICROBIANOS EN CUATRO RASTROS DEL ESTADO DE JALISCO**", para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos, que ha sido aceptado como director de dicho trabajo a la **Dra. Delia Guillermina González Aguilar** y como asesora a la **Dra. Elisa Cabrera Díaz**.

Sin más por el momento, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal., 10 de Marzo de 2011.

DRA. TERESA DE JESÚS ACEVES ESQUIVIAS
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

M.C. GLORIA PARADA BARRERA
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

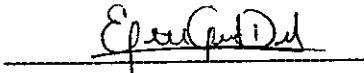
Dra. Teresa de **Jesús** Aceves Esquivias.
 Presidente del Comité de Titulación.
 Licenciatura en **Biología**.
 CUCBA.
 Presente

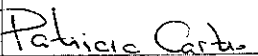
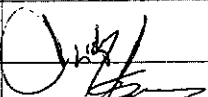
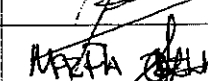

Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad tesis e informes, opción tesis con el título: **“CONTAMINACIÓN DE CARNE DE BOVINO CON RESIDUOS DE ANTIMICROBIANOS EN CUATRO RASTROS DEL ESTADO DE JALISCO”** que realizó el pasante José Guadalupe Mercado García con número de código 301341693 consideramos que ha quedado debidamente concluido por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

Atentamente
 Las Agujas, Zapopan, Jalisco, al 11 de Marzo del 2011


 Director
 Dra. Delia Guillermina González Aguilar


 Asesor
 Dra. Elisa Cabrera Díaz

Nombre completo de los Síndicos asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
Dra. Patricia Castro Félix		14-03-2011
M.C. Margarita Bonilla Moreno		14-03-2011
M.C. Sergio Álvarez Barajas		14-03-2011
Biol. Martha Delia Ocegueda Reyes		14-MAR-11

Bo

AGRADECIMIENTOS

Primero que nada quiero agradecer a Dios por haberme ayudado a terminar exitosamente mis proyectos, ayudarme en los momentos difíciles de mi vida, y sobre todo al brindarme salud y fuerza para seguir adelante.

A mis padres, por apoyarme en todas mis decisiones que he tomado, por darme los recursos necesarios, y gracias a ellos soy lo que soy, porque con su ejemplo y comprensión lograre lo que me proponga.

A mis hermanos, por brindarme su apoyo en todo momento, y demostrarme el cariño que me tienen.

A mis maestros, por compartirme día a día sus conocimientos y con ello llevar a cabo mi realización como persona y profesionalista.

A mis sinodales, por ayudarme a mejorar mi tesis, porque con cada comentario, que me hicieron, eso hizo la realización de este trabajo de la mejor manera. De verdad gracias.

A mi directora la Dra. Delia Guillermina González Aguilar, por su excelente compañerismo que me brindo en todos estos años, por su paciencia, por su alegría, y sobre todo por su entrega al ayudarme en la elaboración de mi tesis.

A la Dra. Elisa Cabrera Díaz por su sabiduría y profesionalismo al ayudarme a mejorar este trabajo, cada comentario hecho se le agradece.

A mis amigos, por su amistad y todos los momentos divertidos que me han hecho vivir.

A mi Universidad, por dejarme demostrar los conocimientos que poco a poco logre con el tiempo.

También aquellas personas que estuvieron indirectamente conmigo.

INDICE GENERAL

Resumen.....	5
Introducción.....	6
Marco teórico.....	8
Planteamiento del problema.....	15
Justificación.....	16
Hipótesis.....	17
Objetivos generales y objetivos particulares.....	17
Materiales y métodos.....	18
Resultados.....	23
Discusión.....	26
Conclusiones.....	29
Literatura citada.....	30
Anexo.....	35

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Colocación de las muestras en la caja de petri.....	21
Figura 2. Procedimiento del método tetrasensor.....	22
Figura 3. Detección de residuos antimicrobianos por el método microbiológico de inhibición en placa en canales de bovinos sacrificados en rastros municipales del estado de Jalisco.....	23
Figura 4. Detección de residuos antimicrobianos en músculo y riñón de bovinos sacrificados en rastros municipales del estado de Jalisco.....	24
Figura 5. Muestras positivas a antimicrobianos de bovinos en medios a diferentes valores de pH.....	25

RESUMEN

Los agentes antimicrobianos han sido aplicados con éxito contra el tratamiento de enfermedades infecciosas, con fines profilácticos y para promover el crecimiento. Su uso intensivo y extensivo ha resultado en la aparición de patógenos bacterianos altamente resistentes. Dada la importancia de la producción bovina, el consumo de carne y los problemas de salud pública que causa la presencia de residuos antimicrobianos, es importante conocer la situación de éstos en tejidos de los animales sacrificados para el consumo humano.

Los objetivos de este trabajo fueron investigar la presencia de residuos antimicrobianos en músculo y riñón de bovinos por el método microbiológico de inhibición en placa y determinar residuos de tetraciclina en músculo y riñón de bovino por el método Tetra-sensor. Se recolectaron muestras de músculo y riñón de bovino (n=454), se analizaron con el método microbiológico de inhibición en placa que emplea *B. subtilis* BGA como cepa de referencia en medios de cultivos con pH 6.0, 7.2 y 8.0. Del total de las muestras de bovino investigadas, 61 (13%) resultaron positivas y 170 (38%) dudosas. Se analizaron 25 muestras por el método Tetra-sensor y una muestra de riñón resultó positiva a tetraciclina.

Para evitar la exposición del consumidor a estos residuos, es necesario establecer programas de control que eviten el envío de animales al rastro que contengan tales sustancias, y un estricto cumplimiento de los tiempos de retiro en la producción animal.

INTRODUCCIÓN

Los antibióticos son utilizados en la producción animal con fines terapéuticos, profilácticos y como promotores de crecimiento. Entre los antibióticos de más uso están las tetraciclinas, los β -lactámicos (penicilinas, cefalosporinas), sulfonamidas, macrólidos (tilosina, eritromicina) y aminoglucósidos (estreptomicina, kanamicina). En 1997 se estimó que el 48% del total de antibióticos utilizados en la terapia veterinaria en la Unión Europea y Suiza fue del 33% y como promotores de crecimiento el 15%. En Estados Unidos de Norteamérica aproximadamente la mitad del total del consumo de antibióticos es con fines pecuarios, principalmente para animales, y de estos cerca del 80% son usados en la profilaxis y como promotores de crecimiento.

Uso de antimicrobianos en animales

La utilización de los antimicrobianos con fines terapéuticos o profilácticos, tanto en medicina humana como en veterinaria, ha contribuido a mantener la Salud Pública. Su uso en animales productores de alimentos proporciona, de igual modo, innegables ventajas al promover el crecimiento y por lo tanto mejorar la producción, al mismo tiempo que facilita el control de sus enfermedades (Pérez de Ciriza, 1999).

Mellon y col. (2004) indican que anualmente son administradas por lo menos 20 millones de libras de antibióticos a los animales para promover el crecimiento o para compensar el alto riesgo de infección debido a las condiciones de confinamiento durante la cría intensiva. Trece millones de libras de esos antibióticos usados anualmente en el ganado

son “medicamento importantes”, esto es, son los mismos o muy similares a los antibióticos empleados en medicina humana (Mellon, y col. 2004). Esto es cuatro veces más de la cantidad anual estimada de esos mismos medicamentos que es proporcionada a humanos. La consecuencia es que el uso de estos antibióticos en la alimentación animal contribuye al incremento de la resistencia antibiótica de microorganismos transmitidos a humanos, particularmente, aunque no exclusivamente, a través de los alimentos de origen animal. Varios estudios han evidenciado que productos cárnicos con frecuencia están contaminados con bacterias patógenas, de las cuales un porcentaje significativo son resistentes a uno a más antibióticos (Price, 2003, Guerra, y col. 2003).

MARCO TEÓRICO

Problemas asociados con el uso de antibióticos en animales

Los antibióticos se desarrollaron inicialmente para combatir enfermedades en medicina veterinaria y humana, sin embargo se incorporaron a los sistemas de producción intensiva, donde el contacto entre los animales es muy estrecho y por tanto, el riesgo de transmisión de enfermedades infecciosas es alto y las medidas de prevención de enfermedades son muy importantes. En la década de los cincuenta se observó que el empleo de antibióticos a dosis subterapéuticas por periodos largos en animales de abasto sanos aumentaba significativamente la velocidad de crecimiento. La administración de tales dosis contribuye a favorecer el crecimiento al no tener que destinar una parte de los nutrientes que reciben con la dieta para combatir las infecciones que sufren. El riesgo implícito en esto es la posibilidad de que residuos de tales sustancias lleguen a la cadena alimentaria humana en forma de residuos y tengan efectos nocivos para la salud de los consumidores (Witte, 1999).

Un residuo es una sustancia o sus metabolitos con actividad farmacológica transmitidas a través de alimentos de origen animal, que durante la producción animal fueron administradas voluntariamente o accidentalmente, y que pueden ser nocivas para la salud humana (Botsoglou, 2001). Entre otros efectos, los residuos de antibióticos en los alimentos de origen animal pueden causar problemas a través de la toxicidad directa de los residuos (por ejemplo, el cloranfenicol fue prohibido en la Unión Europea por esta razón), las reacciones alérgicas involucradas (por ejemplo, con los antibióticos β -lactámicos), el desarrollo de cepas resistentes a antibióticos de bacterias comunes al hombre y los animales, y la interferencia con

cultivos utilizados para fermentar productos alimenticios incluyendo quesos, yogurt, embutidos, etc. (WHO, 2003).

El empleo de antibióticos en medicina humana ha originado en gran parte, el desarrollo de cepas patógenas resistentes. También el uso de antibióticos en la producción animal ha contribuido a este problema en gran medida. Numerosos estudios han relacionado el uso de antibióticos en animales y el consecuente aumento de aislamientos resistentes en muestras animales (Barbosa, 2000).

El límite máximo de residuos (LMR) es el criterio de uso común para el monitoreo de residuos en los alimentos adoptado por los Comités del *Codex Alimentarius* de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación y por la Organización Mundial de la Salud. Es por ello que en países de Europa y de Norteamérica existen programas de detección y control de residuos de antimicrobianos en alimentos de origen animal (Nows, 1981; Livingston, 1985; FDA, 1991).

En México, la Norma Oficial Mexicana NOM-004-ZOO-1994, modificación 2001, sobre los límites máximos permisibles y procedimientos de muestreo para grasa, hígado, músculo y riñón en aves, bovinos, caprinos, cérvidos, equinos, ovinos y porcinos, especifica límites máximos de residuos (LMR) para tetraciclina, sulfonamidas, estreptomina y penicilina en músculos y riñón de 0.250, 0.100, 0.500, 0.50 mg/kg, respectivamente (SAGARPA, 1994).

El estado de Jalisco es el primer productor agropecuario del país y contribuye con el 17% de la producción de leche de bovino y con más del 11.3% de carne de ganado bovino y 19.3% de carne de cerdo (SIAP, 2009). Para mantener una producción óptima se utilizan los antimicrobianos de manera profiláctica o terapéutica. Si éstos son empleados de manera errónea pueden quedar residuos en los tejidos de los animales enviados a consumo. Se ha observado que en los países donde se tienen programas periódicos de seguimiento de residuos y resistencia antibiótica se han implementado medidas de control y con esto se ha logrado disminuir su presencia (Honkanen y Reybroek, 1997).

Los productos terapéuticos utilizados para el tratamiento de las enfermedades deben ser medicamentos autorizados, prescritos mediante la correspondiente receta veterinaria. Para establecer un programa eficaz de control de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos, el *Codex Alimentarius* recomienda que los países adopten una serie de medidas entre las cuales esta definir los límites máximos de residuos (LMR) para todo medicamento que sea autorizado a nivel nacional. Los LMR son la concentración máxima de residuos (expresada en miligramos por kilo o en microgramos por kilo), resultante del uso de un medicamento veterinario y que se recomienda se permita legalmente o se reconozca como admisible en el alimento. Cuando en un alimento se detectan concentraciones residuales sobre los LMR, estos se consideran contaminados y dañinos para el consumidor.

Después del uso de los antimicrobianos es necesario respetar un periodo de retiro antes de utilizar los productos alimenticios obtenidos a partir de ellos, para que el producto anti-

infeccioso haya sido eliminado y no queden residuos, o que éstos se encuentren por debajo de sus límites máximos fijados (Pérez de Ciriza, 1999).

Como consecuencia del uso de antimicrobianos, existe el riesgo de que los residuos de medicamentos o sus metabolitos persistan en el animal y en los alimentos obtenidos a partir de él, llegando a la cadena de alimentación humana. Esto tiene importantes repercusiones en la calidad de los alimentos y sobre todo en el campo de la Salud Pública (OMS, 1992).

Para evitar todos estos problemas es preciso disponer de medicamentos de calidad, lo que implica compromiso entre eficacia y residuo mínimo. Por otro lado, su utilización debe ser correcta, lo que implica un correcto control veterinario y farmacéutico. Se debe procurar que estos fármacos no se utilicen en medicina humana y a su vez modificarlos cada dos o tres años con el fin de no promover la selección de microorganismos resistentes. Un aspecto importante es la fijación de límites máximos de residuos en alimentos. Sin embargo, para implementar una legislación respecto al uso de un producto determinado, es condición indispensable disponer de un método de detección de dicho producto. Esto lleva implícito el desarrollo de técnicas analíticas que permitan comprobar esta presencia y su adecuación a los niveles permitidos (Pérez de Ciriza, 1999).

Métodos microbiológicos para detectar antimicrobianos en tejidos y alimentos

Los métodos microbiológicos de inhibición en placa son ampliamente utilizados como tamizaje para la detección de residuos de antibióticos en tejidos comestibles de animales. Sin embargo, los métodos de tamizaje utilizados de rutina proveen de una información limitada

sobre la naturaleza de los residuos. En ciertos casos se requiere de un análisis químico cualitativo y cuantitativo para confirmar resultados positivos de una prueba de difusión en agar. Si no hay información disponible sobre una medicación del animal antes del sacrificio que ha dado un resultado positivo, se debe llevar a cabo el análisis químico cualitativo para varios grupos de antimicrobianos. Un método microbiológico para detectar la presencia de estas sustancias debe ser realizado antes de un análisis químico. Estos carecen de especificidad pero se reduce considerablemente el tiempo y el costo involucrado. Las placas contienen una variedad de microorganismos de prueba, diferentes valores de pH y sustancias que bloquean la acción de determinados antibióticos (Lund, 1986). Los diámetros de los halos de inhibición de crecimiento formados por las muestras colocadas sobre el agar son usados entonces para recopilar patrones de actividad microbiológica, los cuales son comparados con patrones de referencia obtenidos con soluciones estándar de antimicrobianos para identificar el residuo.

La utilización de métodos cuantitativos cromatográficos en muestreos de rutina para detectar la presencia de residuos de todos los antibióticos posibles es muy costosa ya que estos métodos requieren de equipo sofisticado. Para cada familia de antibióticos se necesita un procedimiento diferente de extracción y detección y además muchos métodos cromatográficos no son capaces de detectar los LMR de todos los miembros de la misma familia. Por lo tanto, las muestras de alimentos de origen animal deben ser probadas primero con un método de tamizaje que sea fácil, rápido y de bajo costo, con el fin de seleccionar muestras que contengan o puedan contener niveles por arriba de lo permitido de residuos de antibióticos de la gran mayoría de la muestras que no contengan dichos residuos.

Los métodos microbiológicos usados para detectar antibióticos en tejidos animales dependen de su habilidad para inhibir el crecimiento de una bacteria sensible. Cuando una muestra es positiva a la pruebas de inhibición microbiológica, se puede llevar a cabo un método específico a un grupo de antibióticos, antes de realizar una identificación cromatográfica, sin embargo, este procedimiento requiere una gran cantidad de trabajo, dinero y tiempo (Johnston, y col. 1981).

Una de las ventajas del método microbiológico de las tres placas es que puede implementarse como prueba de tamizaje a nivel rastro, pues hacen posible que los tiempos de retención de las canales sospechosas de contener residuos, sean breves. En Estados Unidos la detección de sustancias inhibitorias en riñón, tiene como consecuencia que la canal sea retenida y se realice una análisis para la identificación y cuantificación del inhibidor presente (Korsrud, 1995). 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 (Masztis, 1984).

Estas pruebas originalmente se desarrollaron para detectar grupos de antibióticos, como β -lactámicos, tetraciclinas, aminoglucósidos y macrólidos. Sin embargo, con esta prueba no es posible saber cuál antibiótico del grupo está presente ya que el microorganismo de referencia que se utiliza, es *Bacillus subtilis* y es sensible a todos ellos, lo cual hace posible que cualquiera pueda ser detectado (Masztis, 1984).

Las pruebas tamiz para residuos de antimicrobianos varían de un país a otro, de una especie a otra e incluso, dentro de una misma especie varían según la edad al sacrificio. Para establecer la magnitud del problema de residuos en un lugar, es necesario conocer con qué frecuencia y en qué especie destinada a consumo humano se observan concentraciones de residuos arriba de los límites máximos de residuos, esa actividad es conocida como monitoreo. En México existen métodos oficiales para detectar residuos de antibióticos los cuales se encuentran en la Norma Oficial Mexicana NOM-032-ZOO-1996, para la determinación de antibióticos en hígado, músculo y riñón de bovinos, ovinos, equinos, porcinos, aves, caprinos y cérvidos por la prueba de la torunda y por bioensayo (SAGARPA, 1996).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La falta de un programa adecuado de vigilancia y control oficial de presencia de residuos antimicrobianos en los lugares de sacrificio, favorece el uso indiscriminado de estas sustancias. Todo esto tiene consecuencias negativas en la salud pública entre las que se incluyen resistencia bacteriana, hipersensibilidad en individuos susceptibles, cambios en la microbiota intestinal, etc. Por lo tanto es importante determinar la presencia de residuos de antimicrobianos en tejidos de bovinos para conocer el grado de contaminación con tales residuos en tejidos de bovinos que se sacrifican para consumo.

JUSTIFICACIÓN

Entre los antimicrobianos más utilizados en la producción animal con fines terapéuticos y profilácticos y como promotores de crecimiento se encuentran las tetraciclinas penicilinas y sulfonamidas, estas requieren de un periodo de retiro al ser aplicadas en los animales de abasto, para evitar los residuos en los tejidos que pueden afectar la salud del consumidor. Considerando el consumo de carne de bovino en la zona Metropolitana de Guadalajara y otras entidades de Jalisco se hace necesario conocer la calidad sanitaria de la carne. De aquí la importancia de determinar la presencia de residuos de antimicrobianos en bovino que tienen gran demanda por el consumidor. Por esto es necesario llevar a cabo estudios para verificar la situación actual de los residuos antimicrobianos para informar a las autoridades en pro de un control efectivo en la detección de estas sustancias en la carne de bovino y de esta manera, impedir que llegue al consumidor carne contaminada.

HIPÓTESIS

Si unas de las sustancias mayormente utilizadas en la producción bovina son los antimicrobianos y existe una escasa vigilancia y regulación oficial y además no se respetan los periodos de retiro especificados para estas sustancias, entonces es de esperar que los animales lleguen a las plantas de sacrificio contaminados con residuos de antimicrobianos.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de residuos de antimicrobianos en tejidos de bovinos procedentes de 4 rastros municipales de Jalisco.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar la presencia de residuos de antimicrobianos en músculo y riñón de bovinos por el método microbiológico de inhibición en placa.
2. Determinar residuos de tetraciclina en músculo y riñón de bovino por el método Tetra-sensor.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se realizó en el área de Residuos Tóxicos del Departamento de Salud Pública de la División de Ciencias Veterinarias del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara durante el periodo de diciembre 2008 a octubre 2009.

Muestreo y recolección de muestras

De acuerdo con el volumen de sacrificio de bovinos por mes en cada uno de los cuatro rastros del estado de Jalisco incluidos en el estudio, que en lo sucesivo se denominarán A, B, C y D, se obtuvo el número de muestras a recolectar usando el programa Win Episcopo 2.0 (Thrusfield, 2001).

Se recolectaron tejidos de músculo y riñón de 454 canales de bovinos sacrificados en los cuatro rastros municipales. El número obtenido de muestras de los rastros A, B, C y D fueron 134, 120, 103 y 97, respectivamente. Los tejidos debidamente identificados se colocaron y transportaron por separado en bolsas de polietileno y se mantuvieron en refrigeración (4-7°C) hasta su llegada al laboratorio. En el laboratorio las muestras se congelaron durante 2 horas a -20°C para facilitar su manejo y para la conservación del tejido y de los posibles residuos antimicrobianos presentes.

Método I. Método microbiológico de inhibición en placa

Para el análisis de las muestras se utilizó el método microbiológico de inhibición en placa (Bogaerts, 1985). El medio (agar para antibióticos N° 1) se preparó en 3 matraces para ajustar

a los distintos valores de pH requeridos: 6.0, 7.2 y 8.0. Se prepararon volúmenes de 500 ml para facilitar su manejo cuando se adiciona la suspensión de esporas de *B. subtilis*. Los ingredientes se mezclaron con el agua destilada y se agregó 0.1% de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4). El medio se calentó para obtener una adecuada disolución de los ingredientes, posteriormente se ajustó el pH a los valores de 6.0, 7.2 y 8.0. Para ajustar el pH del medio se utilizó ácido clorhídrico (HCl) o hidróxido de sodio (NaOH). El medio se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

El pH de los medios se verificó y de ser necesario, se ajustó nuevamente después de la esterilización, en tal caso, se tomaron en cuenta las medidas necesarias para evitar la contaminación del medio. Cuando la temperatura del medio ya esterilizado descendió a 50°C, se agregaron y mezclaron 0.5 ml de suspensión de *B. subtilis* BGA por cada 500 ml de medio para obtener 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 adicionaron 0.5 ml de solución de uso de trimetoprim para obtener una concentración de trimetoprim de 0.05µg/ml de medio. Un volumen de 10 ml de cada medio fue vertido en cajas de petri de 9 mm obteniendo un grosor del medio solidificado de 2 mm. Una vez solidificado el medio, se mantuvo en refrigeración (3–5°C) hasta el momento de su utilización. Las cajas de petri con el medio preparado, fueron utilizadas en el transcurso de los 2 días posteriores a su elaboración.

De cada una de las muestras de tejido recolectadas se cortaron con un sacabocados estéril, 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 muestras fueron colocadas en cajas de Petri con agar nutritivo inoculado con esporas de *Bacillus subtilis* BGA a una concentración de 10^4 esporas/ml de medio y a un pH de 6.0, 7.2 y 8.0.

En cada placa se colocaron 6 muestras en forma simétrica y en el centro se colocó un disco control de papel filtro (Whatman No. 4) de 6 mm de diámetro con antimicrobianos Standard: 0.01 U.I. de penicilina en el medio ajustado a pH 6.0, 0.5 μ g de sulfametazina en el medio ajustado a pH 7.2 y 0.5 μ g de estreptomina en el medio ajustado a pH 8.0 (Figura 1).

Las muestras se incubaron a 35°C durante 18 a 24 h. Posteriormente se verificó que los discos control con antimicrobianos presentaran halos de inhibición de 5 a 10 mm esto es debido a la sensibilidad y efectividad del antimicrobiano. Se procedió a medir los halos de inhibición observados en las muestras. Los halos de inhibición se midieron del borde del tejido al límite del halo de inhibición. La interpretación de resultados de la prueba de inhibición en placa fue considerada de la siguiente manera (Bogaerts, 1985):

Zona de inhibición	>2 mm el resultado es positivo
Zona de inhibición entre	1-2 mm el resultado es dudoso
Zona de inhibición	<1 mm el resultado es negativo



Figura 1. Colocación de las muestras en la caja de Petri

Método II. Método Tetrasensor para la detección de tetraciclinas en tejidos animales

El método Tetrasensor es una prueba para la determinación rápida de la cantidad de tetraciclinas presentes en una muestra de alimentos. Esta permite detectar moléculas de tetraciclina, oxitetraciclina, doxiciclina y clortetraciclina con una sensibilidad de 100 partes por billón (ppb). La prueba puede llevarse a cabo con tejido muscular y renal de bovino, cerdo y pez (Okerman, 2004).

El procedimiento fue el siguiente: se pesaron 10 g de músculo o riñón y se colocaron en una bolsa de plástico. Se agregaron 30 ml de la solución buffer de “tejidos 1X” y se mezclaron durante dos minutos en un homogeneizador de laboratorio (BagMixer). Con una pipeta se midió 1 ml del homogeneizado y se agregó en un tubo Eppendorf y se centrifugó a 10,000 rpm durante 1 min para separar el sobrenadante del material sólido. Se tomó un vial del kit Tetrasensor y se colocaron 200 μ l del sobrenadante. Se introdujo una tira reactiva dentro

del vial durante 10 minutos. Los resultados se interpretaron comparando los colores obtenidos en la tira reactiva (Figura 2).

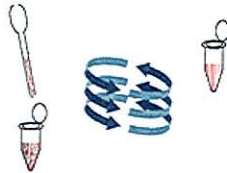
Adicionar 10g de tejido en una bolsa de plástico y 30 mL de buffer



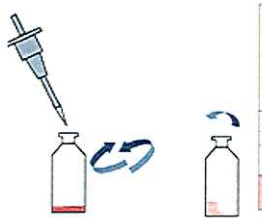
Mezclar continuamente en el stomacher por 2 minutos



Despues de los 2 minutos, tomar 1mL y centrifugar 1 minuto.



Adicionar 200 ul del sobrenadante, girar manualmente y sumergir una tira



Esperar 10 minutos para verificar los resultados.



Figura 2 Procedimiento del método tetrasensor

RESULTADOS

De las 454 muestras de canales de bovino analizadas 61 (13%) fueron positivas a la presencia de residuos de antimicrobianos y 170 (38%) resultaron dudosos, como se puede observar en la Figura 3.

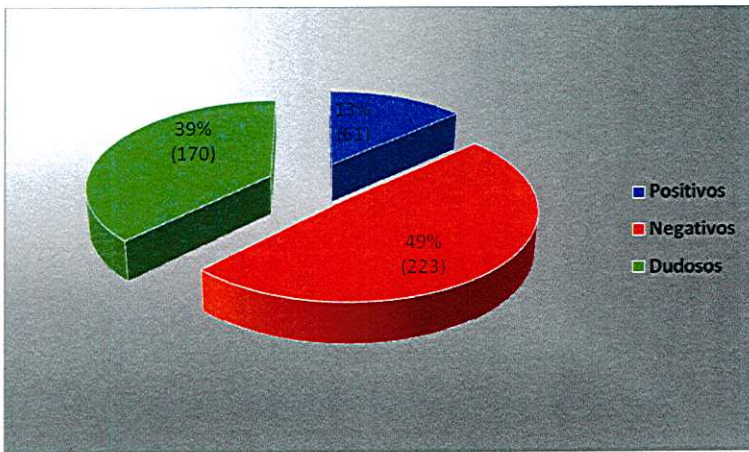


Figura 3. Detección de residuos antimicrobianos por el método microbiológico de inhibición en placa en canales de bovinos sacrificados en rastros municipales del estado de Jalisco (n=454).

En el caso de muestras de riñón, el 8% (37) fueron positivas a la presencia de residuos de antimicrobianos, 59% negativas (267) y 33% dudosas (150). En músculo se encontraron 7% (30) de muestras positivas, 85% negativas (384) y 9% (40) dudosas (Figura 4).

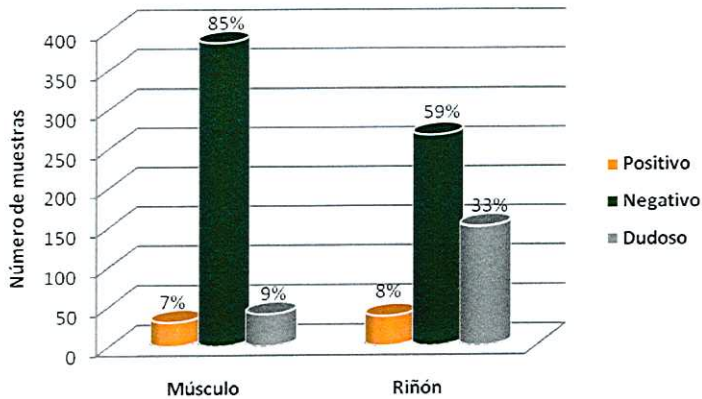


Figura 4. Detección de residuos antimicrobianos en músculo y riñón de bovinos sacrificados en rastros municipales del estado de Jalisco (n=454).

El mayor número de muestras positivas se detectaron en el medio ajustado a pH 6.0 con 41 muestras positivas de ambos tejidos, de las cuales 21 corresponden al riñón (Figura 5). Quince muestras de riñón y nueve de músculo fueron positivas a pH 7.2. Considerando que en la placa pH 7.2 se favorecen las condiciones para la detección de sulfonamidas, podría suponerse que estas muestras provenían de bovinos que estuvieron expuestos a este tipo de antimicrobianos.

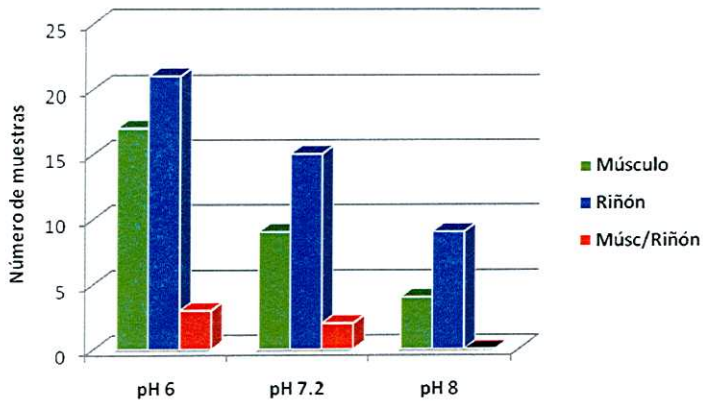


Figura 5. Muestras positivas a antimicrobianos de bovinos en medios a diferentes valores de pH (n=454).

Por el método de Tetrasensor se analizaron 25 muestras, de las cuales una muestra resultó positiva a tetraciclina en tejido renal. El método permite detectar 100 ppb de tetraciclina, por tanto es probable que el resto de las muestras tuvieran menor concentración.

DISCUSIÓN

La Norma Oficial Mexicana para el control de residuos publicada en agosto de 1994, modificación 2001, tiene por objeto establecer las bases para la detección y el control de residuos tóxicos en tejidos alimenticios 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, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) cuando estos sean de importación.

De acuerdo con Ebrecht, la prueba microbiológica de las tres placas permite detectar desde: 0.01 $\mu\text{g/ml}$ de penicilina, 0.0075 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina, 0.0015 $\mu\text{g/ml}$ de tetraciclina, 0.04 $\mu\text{g/ml}$ de aminoglucósidos y 0.06 $\mu\text{g/ml}$ de tilosina. Por ser un agente sinérgico de las sulfonaminas, la adición de trimetoprim al medio permite aumentar hasta 100 veces la sensibilidad del microorganismo, permitiendo detectar desde 0.024 $\mu\text{g/ml}$ de sulfonamidas en tejidos.

Las muestras que resultaron positivas en el presente trabajo evidenciaron que los animales fueron enviados al rastro con residuos de antimicrobianos. En Estados Unidos, una frecuencia del 4% de animales positivos a residuos de antimicrobianos se considera inaceptable (Guest, 1988). De acuerdo con nuestros resultados, el 13% de los animales sacrificados en los rastros municipales incluidos en el estudio fueron positivos a la presencia de residuos de antimicrobianos en tejidos y esto coincide con otros estudios realizados en

México (Santillan, 2006; González, 2004; Lara, 1991; Sánchez, 1995). La frecuencia de muestras positivas observadas en este trabajo fue mayor a la reportada para bovinos por Gesche, 1998, quien encontró una frecuencia del 4.3% de muestras positivas del total de los animales analizados y Gibbons y col. (1996) reportan un 9.2% de canales de ganado positivas a la presencia de residuos. Por otra parte Edwards y col. (1995) tomaron muestras de 30 canales de bovino, de las cuales 3 (10%) presentaron residuos de antimicrobianos.

La presencia de residuos en tejidos animales ha 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. (Sumano, 2003)

La mayoría de las sustancias antimicrobianas son eliminadas rápidamente del tejido muscular, por lo que las muestras de músculo que fueron positivas evidencian un nivel farmacológico, es decir una concentración más alta que en el riñón, la orina o leche en la que se encuentran a un nivel de residuos (Koenen, 1995), lo que hace suponer que las muestras positivas de tejido muscular provenían de animales que habían sido tratados pocos días antes del sacrificio.

La difusión de los diferentes grupos de antimicrobianos se favorece a determinados pH y los macrólidos y aminoglucósidos son mucho más activos a un pH alcalino (pH 8.0) que a un pH ácido, mientras que las penicilinas lo son a pH 6.0 y en las sulfonamidas la solubilidad

se eleva conforme el pH se acerca a 7.2 (Jawetz, 1981). En el presente estudio, 15 (3.3%) de las muestras de riñón y 9 (2%) de músculo fueron positivas a pH 7.2, estos valores son mayores a los publicados por Pena, y col. (2004) quienes encontraron 3 (1.5%) muestras de riñón y 3 (1.5%) de músculo positivas a este valor de pH. Es evidente que bajo las condiciones económicas de México, el consumo de vísceras representa una opción nutricional más barata que las porciones musculares, sin embargo, su consumo puede implicar una exposición frecuente a niveles de residuos. Por lo que se sugiere que para la utilización de dichas sustancias, se deben tomar medidas para reducir en lo posible la contaminación de la carne y esta sea consumida con residuos.

CONCLUSIONES

De acuerdo al método microbiológico de inhibición en placa, el porcentaje de muestras de riñón positivas a residuos indica que los bovinos fueron expuestos a antimicrobianos y enviados al sacrificio durante el periodo de eliminación del medicamento.

Los resultados positivos fueron mayores a pH 6.0, a este pH se favorece la detección de los β -lactámicos, como las penicilinas.

De acuerdo a los resultados del estudio, el 13 % de los bovinos fueron enviados al sacrificio antes de que finalizara el periodo de eliminación de dichas sustancias.

LITERATURA CITADA

- Anonym, 1986. Hemmstoffe in Muskulatur und Niere (Dreiplattentest mit TMP) in: Allgemeine Verwaltungsvorschrift über die Durchführung der amtlichen Untersuchungen nach dem Fleischhygienegesetz (VwVFIHG). Bundesanzeiger 11, 13-14.
- Barbosa, M.T., Levy, B.S., 2000. The impact of antibiotic use on resistance development and persistence. Drug Resistance Updates 3, 303-311.
- Bayardo, U. A., Pelayo, R., 1993. Estudio de monitoreo de residuos de sulfonamidas en carne de cerdo sacrificados en el rastro municipal de Guadalajara, Jalisco. Tesis de licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Universidad de Guadalajara. 37p.
- Bogaerts, R., Brussels, W., 1985. A standardized method for the detection of residues of antibacterial substances in fresh meat. Fleischwirtschaft, 5-6.
- Botsoglou, N., Fletouris, D., 2001. Drug residues in foods pharmacology, food safety, and analysis. Marcel Dekker, Inc. Pp. 1-9.
- Errecalde, J. O., 2004. El uso de antimicrobianos en animales de consumo: Estudios FAO: Producción y sanidad animal. Udelar. 162p.
- Edwards, F., Simpson, R., Brown, W., 1995. Bacteriologic culture and histological examination of samples collected from recumbent cattle at slaughter. Journal of American Veterinary Medical Association 207, 1174-1176.
- Gesche, E., Emilfork, C., 1998. Residuos antimicrobianos en canales de vacas. Archivos en Medicina Veterinaria 30, 137-143.

- Gibbons, N., Kaneene, J., Lloyd, W., 1996. Patterns of chemical residues detected in US beef carcasses between 1991 and 1993, *Journal of American Veterinary Medical Association* 209, 589-593.
- González, B., Ornelas, L., 2004. Detección cualitativa de tetraciclina en hueso de bovino que se comercializa en la región Ciénega. Tesis de licenciatura para obtener el título de Médico Veterinario y Zootecnista. Centro Universitario de la Ciénega. Universidad de Guadalajara. Ocotlán, Jal. 38p.
- Guerra, B., Malorny, A., Leman, B., Helmuth, S., 2003. Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in German *Escherichia coli* isolates from cattle, swine and poultry. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 52, 489-492.
- Honkanen, B. T., Reybroeck, W., 1997. Antimicrobials, in *Monograph on residues and contaminants in milk and meat products*. IDF Brussels, Belgium. Pp. 26-33.
- Johnston, R. W., Reamer, R. H., Harris, E. W., Fugate, H. G., Schwab, B., 1981. A new screening method for the detection of antibiotic residues in meat and poultry tissues. *Journal of Food Protection* 44, 828-831.
- Jawetz, E., Melnick, J. L., Adelberg, E. A., 1981. *Manual de Microbiología Médica. El Manual Moderno*, México, D.F. 283p.
- Koenen, D., Okerman, L., Zutter, L., Degroodt, J., Hoof Van, J., Srebnik, S., 1995. A one-plate microbiological screening 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.

- Korsrud, G. O., Craig, D. C., Salisbury, C. D., Fesser, A., Macneil J. D., 1995. Laboratory evaluation of the Charm Farm Test for antimicrobial residues in meat. *Journal Food Protection* 58, 1129-1132.
- Lara y Lara, J., Coello, P., Hernandez, M., 1991. Residuos de antibióticos en carne de hígado de cerdo y aves que se consumen en la ciudad de Mérida. *Veterinaria Mexico* 2, 53-56.
- Livingston, R.C., 1985. Antibiotic residues in animals derived food, *Journal Association of Official Analytical Chemists* 68, 966-967.
- Masztis, P.S., 1984. Antibiotic residue testing in beef slaughterhouse. *Canadian Veterinary Journal* 25, 329-330.
- Mellon, M., Benbrook, C., Benbrook, K., 2004. Estimates of antimicrobial abuse in livestock. Cambridge, Massachusetts: Union of Concerned Scientist. 67p.
- Nouws, J.F., 1981. Tolerances and detection of antimicrobial residues in slaughtered animals. *Archiv fur Lebensmittelhygiene* 32, 103-110.
- Okermann, E., 2004. Evaluation and establishing the performance of different screening tests for tetracycline residues in animal tissues. *Food Additives and Contaminants* 21, 145-153.
- Organización Mundial de la Salud (OMS), 1992. Evaluación de ciertos residuos de fármacos en alimentos. Serie de informes técnicos 832. 40to. Informe del comité mixto FAO/OMS de Expertos en aditivos alimentarios. 70p.
- Pena, A., Serrano, C., Reu, C., Baeta, C., Calderón, V., Silveira, I., Sousa, J., Peixe, L., 2004. Antibiotic residues in edible tissues and antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in pigs from Portugal. *Food Additives and Contaminants* 21, 759-755.

- Pérez de Ciriza, J., Huarte, A., Saiz, A., Ozcariz, I., Purroy, M. T., 1999. Residuos de sustancias inhibidoras en carnes. *Anales Sir San Navarra* 22, 231-238.
- Price, L.B., On, S., Siemer, B., Silbergeld, E., 2003. Fluroquinolone-resistant *Campylobacter* carriage on US retail poultry products grown with and without antibiotics. Presentado en el Congreso *Campylobacter, Helicobacater* y organismos relacionados. Aarhus, Dinamarca.113,557-560.
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación), Norma Oficial Mexicana NOM-004-ZOO-1994, modificación 2001, control de residuos tóxicos 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.
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación), Norma Oficial Mexicana NOM-032-ZOO-1996, modificación 2008, determinación de antibióticos en hígado, musculo y riñón de bovinos, ovinos, equinos, porcinos, aves, caprinos y cérvidos por la prueba de torunda y por bioensayo. Diario Oficial de la Federación. México D.F., 26 de Febrero de 1996.
- Sánchez, A., 1995. Detección de inhibidores microbianos en carne de bovino. Tesis de licenciatura para obtener el título de Médico Veterinario y Zootecnista. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias División de Ciencias Veterinarias. Universidad de Guadalajara, Zapopan, Jal. 87p.
- Santillán, M., 2006. Determinación de la presencia de residuos de antimicrobianos en tejidos de cerdo y bovino sacrificados en los rastros municipales de Tonalá y Tlaquepaque, Jal. Recolectados durante el periodo de enero a abril del 2001. Tesis de

Maestría en Ciencia de los Alimentos. Centro Universitario del Sur. Universidad de Guadalajara, Cd. Guzman, Jal. 41p.

- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera), 2009. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. [www. siap.gob.mx](http://www.siap.gob.mx). Fecha de consulta: 8 de Noviembre 2010.
- Sumano, H., Ocampo, C., 2003. Farmacología Veterinaria. 2da. Ed. Mcgraw-Hill Interamericana. México. Pp.117-205.
- Thrusfield, M., Ortega, C., De Blas, C. I., Noordhuizen, J., Frankena, J., 2001. WIN EPISCOPE 2.0: improved epidemiological software for veterinary medicine. *Veterinary Record*; 148, 567-572.
- WHO (World Health Organization), 2003. Impacts of antimicrobial growth promoter termination in Denmark: World Health Organization International Review Panels. Evaluation of the termination of the use of antimicrobial growth promoters in Denmark. 6-8 November 2002, Foulum, Denmark. WHO/CDS/CPE/ZFK/ 2003:1. Copenhagen: World Health Organization.
- Witte, W., 1999. Uso de antibióticos en la producción animal y desarrollo de la resistencia en las infecciones humanas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología* 19, 83-86.

ANEXO

Agar para antibióticos N° 1

La composición, preparación e incubación del medio de cultivo se detallan a continuación:

Medio Nutritivo

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

Solución de trimetoprim

1.- Solución Madre

Se colocaron 10 mg de trimetoprim Sustancia Oficial de Referencia pureza 99. 7% en 10 ml de etanol, esta solución se calentó a 50°C para favorecer la completa disolución de la trimetoprim. Esta solución se mantuvo estable durante 14 días en un ambiente frío y oscuro.

2.- Solución de uso

Está solución contiene 50 µg/ml de trimetoprim . Dependiendo de la cantidad de muestras que se procesaron, es el volumen de solución que se preparó. Considerando que la solución madre tiene una concentración de 1000 microgramos por mililitro, se prepararon 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. Otra opción fue medir en

un matraz volumétrico 0.5 ml de solución madre y se aforó con agua destilada a 10 ml. La solución se puede mantener en refrigeración por máximo de 14 días.

c) Suspensión de esporas

B. subtilis BGA (ATCC 6633) se inoculó en 3 tubos con el medio No. 1 para antibióticos y se incubaron a 32-35°C durante 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se lavó el crecimiento de la superficie de los tubos con 3 ml de solución salina fisiológica (SSF) estéril y se pasó el líquido a una botella de Roux conteniendo 200 ml de medio No.1 para antibióticos.

La suspensión de microorganismos se distribuyó sobre la superficie del medio utilizando perlas de vidrio estériles. Se incubaron a 32-35°C durante 5 días. Se lavó el crecimiento de la superficie del agar con 50 ml de SSF estéril, esta suspensión se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos y posteriormente se decantó el líquido sobrenadante. El sedimento se suspendió en 50-70 ml de SSF estéril y se calentó a 70°C durante 30 minutos y después se conservó en refrigeración. La densidad de la suspensión obtenida fue de 10^4 esporas por ml, la cual se determinó mediante la técnica de vaciado en placa.