
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
AGROPECUARIAS

DIVISIÓN DE CIENCIAS VETERINARIAS



DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE SULFAMETAZINA POR EL
MÉTODO DE INMUNO ENSAYO ENZIMÁTICO ABSORBENTE
(ELISA) EN TEJIDOS DE BOVINO Y CERDO SACRIFICADOS EN
EL RASTRO DE TONALÁ, JALISCO.

TESIS PROFESIONAL QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

PRESENTA:

PMVZ. EDUARDO AVALOS FLORES

DIRECTOR:

Dra. DELIA GUILLERMINA GONZÁLEZ AGUILAR

ASESOR:

Dr. FEDERICO GABRIEL ROJO

Agradecimientos

En nuestras vidas nos encontramos siempre una mano amiga que nos ayuda a levantarnos cuando hemos caído o nos da alguna lección de vida.

Varias personas han estado en mi camino y se han convertido en pieza importante desde el principio de mi preparación académica o de la vida misma.

Agradezco entonces:

A Dios, por darme vida, por colocarme a mí poseo a todas aquellas personas que mediante él han sido guía en mi camino. También por darme fuerza cuando me he sentido vencido.

A mis Padres, a quienes adoro, por cuidar cada uno de mis pasos, gracias por su amor y comprensión, por ustedes soy lo que soy.

A Mis hermanos, por los peores o muchos momentos que disfrute de su compañía saben que los quiero.

A Gerardo, gracias por tu paciencia y ayuda en la realización de este trabajo. De ti he aprendido mucho, gracias por todo.

A mis Maestros, en especial a la Dra. Dolia Guillermina González Aguilar, a quien admiro por ser el gran ser humano que es. Gracias por orientarme en la elección y realización del proyecto y levantarme el ánimo.

A mis Amigos, por su amistad y todos los momentos divertidos que hemos disfrutado, espero tener su amistad por siempre.

CONTENIDO

	Páginas
Resumen.....	X
Introducción y marco teórico.....	1
Planteamiento del problema.....	8
Justificación.....	10
Hipótesis.....	11
Objetivos.....	12
Material y métodos.....	13
Resultados.....	24
Discusión.....	34
Conclusiones.....	39
Bibliografía.....	40

RESUMEN

El uso indiscriminado de sustancias antimicrobianas durante la producción pecuaria ha provocado que estas sustancias permanezcan de manera residual en los tejidos de los animales sacrificados y destinados para el consumo humano. Las sulfonamidas son utilizadas en la producción animal como promotores de crecimiento y como terapéuticos. El objetivo del presente trabajo fue investigar la presencia de sulfametazina en tejidos de bovino y cerdo sacrificados en el rastro de Tonalá, Jalisco con el método de Inmuno Ensayo Enzimático Absorbente (ELISA). Se recolectaron muestras de músculo y riñón de bovino (n=260) y de cerdo (n=179) las cuales fueron analizadas con el método cualitativo microbiológico de inhibición en placa que emplea el *Bacillus subtilis* BGA como cepa de referencia y un medio de cultivo a tres niveles de pH 6.0, 7.2, y 8.0. Las muestras positivas a pH 7.2, lo cual puede referir a residuos de sulfonamidas, se sometieron al análisis con el método de (ELISA) para detectar la presencia de sulfametazina. Del total de las muestras de bovino (n=260) y de cerdo (n=179) investigadas para la presencia de residuos antimicrobianos resultaron positivas 52 (20 %) en bovinos y 97 (54 %) en cerdos. De las muestras sometidas al análisis de ELISA, en bovinos 4 tuvieron concentraciones de 71.1, 18.5, 14.0, 12.9 partes por billón (ppb), y en cerdos 14 tuvieron concentraciones de 64.7, 60.3, 49.0, 31.1, 29.8, 25.0, 17.4, 14.2, 11.0, 10.5, 9.7 y 8.3 ppb. Para evitar la exposición del consumidor a estos residuos, es necesario establecer programas de control que evite el envío de animales al rastro conteniendo tales sustancias, y en la producción animal un estricto cumplimiento a los tiempos de retiro.

INTRODUCCIÓN Y MARCO TEÓRICO

La creciente demanda de productos de origen animal por parte de la población humana, ha llevado a la intensificación de los sistemas de producción. Esto conduce a que los animales estén cada vez más expuestos a sufrir enfermedades de diversa índole (San Martín, 2001). Esta situación da lugar a que se utilicen los antimicrobianos para controlar las enfermedades.

El estado de Jalisco es el primer productor agropecuario del país contribuyendo con el 17 % de la producción de leche de bovino y más del 11.3 % de carne de ganado bovino y 19.3 % de carne de cerdo (SIAP, 2007). 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.

Reciben el nombre de residuos, las pequeñas cantidades de ciertas sustancias y/o de sus metabolitos, y de elementos químicos que se encuentran a veces en los alimentos, como consecuencia de la utilización de estas sustancias en la producción animal y que son extraños a su composición natural o exceden está pudiendo resultar nocivos para la salud humana (Moreno, 2003).

La localización de estos residuos es variable. El tejido muscular y la grasa son los lugares preferentes aunque también se han identificado en los tejidos menos consumidos como son el hígado y el riñón (Simal, 2000).

Los posibles efectos tóxicos de los residuos de medicamentos veterinarios han llevado a las autoridades sanitarias de los países a establecer límites máximos de estos residuos (LMR) para poder garantizar la inocuidad de los alimentos. A nivel internacional la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), han formado un programa conjunto, a través del Codex Alimentarius, para establecer y recomendar los LMR de medicamentos de uso veterinario. A nivel nacional, cada país implanta sus propias regulaciones al respecto. Se ha observado que en los países donde se tienen programas periódicos de seguimiento de residuos se ha logrado disminuir su incidencia (Honkanen y Reybroek, 1997).

En México, La Norma Oficial Mexicana NOM-004-ZOO-1994 modificación 2001, Grasa, Hígado, Músculo, y Riñón en aves, bovinos, caprinos, cérvidos, equinos, ovinos y porcinos. Residuos tóxicos. Límites máximos permisibles y procedimientos de muestreo. Especifica un límite máximo de residuos (LMR) 100 partes por billón (ppb) de sulfonamidas en músculo y riñón de bovino y cerdo (SAGARPA 1994).

En comparación con el Codex Alimentarius que recomienda un límite máximo de residuos (LMR) en músculo y riñón de bovino y cerdo 100 ppb de sulfonamidas (Codex Alimentarius 1993). Esto 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 de consumo humano.

Muchos antimicrobianos utilizados en el ganado bovino y porcino son los mismos a los prescritos para el tratamiento de un gran número de infecciones en humanos. Las bacterias pueden desarrollar resistencia a uno o más antibióticos. Entre las sustancias utilizadas con más frecuencia están las sulfas, penicilinas y tetraciclinas (Errecalde, 2004).

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).

En las explotaciones actuales, convive una gran cantidad de animales confinados en un pequeño espacio que favorece el rápido contagio de enfermedades. La prevención incluyendo antibióticos en la alimentación, es una práctica ganadera muy común. Los antimicrobianos se añaden al pienso en dosis subterapéuticas durante periodos de tiempos prolongados, ya que esta forma de dosificación permite tratar al mismo tiempo a toda la población. Este procedimiento se puede utilizar en algunos casos de tratamiento terapéutico, puesto que en este tipo de explotaciones sería imposible actuar tratando a cada individuo por separado (Zamarreño, 1993).

Los productos terapéuticos, utilizados para el tratamiento de las enfermedades, deben ser medicamentos autorizados prescritos mediante la correspondiente

receta veterinaria. Después de su utilización 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).

Algunos de estos medicamentos poseen una actividad doble, ya que al controlar la flora intestinal mejoran también el aprovechamiento del alimento ingerido, actuando por lo tanto como promotores del crecimiento (Sumano, 2003). En última instancia, los beneficios los alcanza el consumidor, que encuentra disponibles con mayor facilidad proteínas de origen animal (OMS (A), 1990).

Como consecuencia de todo esto, 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 (B), 1992).

Al ser consumidas por el ser humano pequeñas dosis de antimicrobianos presentes en los alimentos, se puede producir hipersensibilidad, de manera que al tratar a las personas sensibles con el antibiótico respectivo se presentan reacciones adversas que van desde un simple prurito hasta el shock anafiláctico (Ortega, 1988).

Igualmente hay que considerar la presión que ejercen estos residuos sobre la flora intestinal, favoreciendo la proliferación de microorganismos con resistencia. Por otro lado alguna de estas sustancias puede tener carácter carcinogénico, incluso teratogénico, o simplemente conducir a procesos degenerativos que aceleran el envejecimiento (OMS (B), 1992).

Para evitar todos estos problemas es preciso en primer lugar disponer de medicamentos de calidad, lo que implica compromiso entre eficacia y mínimo residuo. 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 crear resistencias. Un aspecto importante es la fijación de límites máximos de residuos en alimentos. Pero 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).

Para la identificación de residuos se emplean métodos microbiológicos, fisicoquímicos y serológicos. Los métodos de tamizaje microbiológico son de utilidad para trabajos de monitoreo por su amplio espectro de detección, su fácil manejo, la posibilidad de trabajar sin equipo sofisticado ni personal entrenado y su relativamente costo bajo. No obstante, estas pruebas tienen la desventaja de ser inespecíficas y que algunas sustancias del mismo grupo se detectan con mayor o menor sensibilidad, dependiendo de su forma de actuar sobre el microorganismo

de prueba. Las pruebas de confirmación pueden ser por inhibición microbiana, receptor microbiano, receptor de anticuerpos, inmuno ensayo enzimático absorbente (ELISA), cromatografía en capa fina (CCF), cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC), cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) o espectrofluorométricos. Algunas de estas pruebas sirven, además, para identificar el tipo de sulfonamida presente (Suhren y Heeschen, 1996).

Aunque los métodos fisicoquímicos como cromatografía líquida de alta presión son usados ampliamente para la detección de sulfametazina, su aplicación de rutina en numerosas muestras por supuesto es limitada por su costo y la instrumentación. Por otra parte, el inmuno ensayo enzimático (ELISA) presenta considerables ventajas sobre los métodos convencionales. Con respecto a una alta sensibilidad, límite de detección, equipo técnico, y mayor número de muestras en menor tiempo. Es posible detectar sulfametazina en una gran variedad de alimentos. Además todos los reactivos necesarios para el inmuno ensayo enzimático están contenidos en los kits de prueba. El kit de prueba es suficiente para 96 determinaciones (incluyendo los estándares) con una sensibilidad de 2 ppb dentro de un rango de 2-81 ppb. Las pruebas de ELISA son más específicas y proporcionar resultados más rápidos y a menor costo. Por esto es un método muy viable y confiable para la detección de sulfametazina en tejidos de cerdo y bovino (Bio Scientific Corp., 2008).

En México existen métodos oficiales para detectar residuos de antibióticos los cuales se encuentran en la Norma Oficial Mexicana NOM-032-ZOO-1996, 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).

Dada la importancia de la producción pecuaria y el consumo de carne y sub-productos en Jalisco, es importante conocer la situación de los residuos antimicrobianos en tejidos de los animales sacrificados para el consumo humano.

Con la presente investigación se pretende aportar información de forma descriptiva sobre la frecuencia que tiene la presencia de residuos de sulfonamidas en tejidos de bovinos y cerdos sacrificados en rastros de Tonalá, Jalisco.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las sulfonamidas son medicamentos muy eficientes y como grupo se colocan como primera elección de uso en los animales de abasto (Sumano, 2003) con diferentes fines: para combatir enfermedades infecciosas, para prevenir enfermedades y como promotores del crecimiento.

La administración inadecuada de estas sustancias y el no respetar los períodos de retiro, es decir el tiempo en que no deberán consumirse los productos o subproductos de los animales tratados, puede conducir a la presencia de residuos en los tejidos destinados al consumo humano.

En México la falta de un programa adecuado de vigilancia y control oficial de presencia de residuos antimicrobianos en carne y tejidos comestibles en los lugares de sacrificio, favorece el uso indiscriminado de estas sustancias.

Los residuos de sulfonamidas en la carne representan un problema de Salud Pública, ocasionando preocupación entre los consumidores a nivel mundial. Varias investigaciones han evidenciado que con el transcurrir de los años, estos fármacos han inducido la aparición de microorganismos patógenos multiresistentes, así como hipersensibilidad en individuos susceptibles o cambios en la microflora intestinal.

Por tanto es importante determinar la presencia de residuos en tejidos de estos animales para conocer el grado de contaminación con residuos de sulfonamidas en músculo y riñón de animales que se sacrifican en el rastro municipal de Tonalá, Jalisco y estimar su potencial impacto en el consumidor.

JUSTIFICACIÓN

Considerando la importancia de la ganadería y el consumo de carne de bovino y cerdo en la zona metropolitana de Guadalajara y otras entidades de Jalisco, se hace necesario conocer la calidad sanitaria de la carne.

El control sanitario de la carne en México es importante para garantizar una mejor calidad e inocuidad para los consumidores y es indispensable si se quiere ser competitivo en el mercado.

La sulfametazina es uno de los compuestos bacteriostáticos más utilizados en la producción pecuaria (Escobedo, 2007). Por esto es necesario llevar a cabo estudios para verificar la situación actual de los residuos de sulfametazina en estas especies y con ello informar a las autoridades en pro del control efectivo en la detección de las mismas en carne de bovino y cerdo de esta manera impedir que llegue al consumidor carne contaminada.

HIPÓTESIS

La sulfametazina es utilizada con frecuencia en la producción de cerdos. Con esto, es posible encontrar residuos de estas sustancias, en músculo y riñón de animales sacrificados para el consumo humano.

OBJETIVOS

GENERAL:

Determinar la presencia de residuos de sulfametazina en tejidos de bovinos y cerdos sacrificados en el rastro municipal de Tonalá, Jalisco.

PARTICULARES:

1. Determinar la presencia de residuos de antimicrobianos en bovinos y cerdos por el Método Microbiológico de inhibición en Placa como prueba tamiz.
2. Determinar la presencia de sulfametazina en bovinos y cerdos por el Método de Inmuno Ensayo Enzimático Absorbente (ELISA).

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.

Muestreo y recolección de muestras

De acuerdo con el número de animales en la matanza de bovinos y cerdos durante el periodo de Enero a Octubre de 2006, se recolectaron muestras de músculo y riñón de bovinos y cerdos sacrificados en el rastro municipal de Tonalá, Jalisco.

El tamaño de muestra se determinó con la siguiente fórmula:

Tamaño de Muestra para Estimar Proporciones para Población Finita

$$n = \frac{N * Z_{\alpha}^2 * p * q}{d^2 * (N - 1) + Z_{\alpha}^2 * p * q}$$

Donde:

- N = Total de la población
- $Z^2 = 1.96^2$ (si la seguridad es del 95%)
- p = Proporción esperada (en este caso 5% = 0.05)
- q = 1 – p (en este caso 1-0.05 = 0.95)
- d = Precisión.

(Levin, 1998).

Seguridad = 95%; Precisión = 2.66%. Proporción esperada = se asume que puede ser próxima al 5%; si no existiera ninguna idea de dicha proporción se emplea el valor p = 0,5 (50%) que maximiza el tamaño a muestrear:

$$n = \frac{15,000 * 1.96^2 * 0.05 * 0.95}{0.0266^2 * (15,000 - 1) + 1.96^2 * 0.05 * 0.95} = 254$$

Métodos de análisis:

Las muestras se sometieron a dos procedimientos de análisis de determinación cualitativa y cuantitativa para antimicrobianos que son los siguientes:

I) Determinación de Residuos de Antimicrobianos en Músculo y Riñón por el Método Microbiológico de Inhibición en Placa.

La recolección y análisis de las muestras se realizó conforme a la prueba para inhibidores en músculo y riñón (prueba de las tres placas con Trimetoprim) para la detección de inhibidores antimicrobianos en carne (Bogaerts, 1985).

Recolección Preparación y Procesamiento de Muestras.

Los tejidos, fueron identificados, y se transportaron por separado en bolsas de polietileno, y se mantuvieron en refrigeración (4°C). Las muestras al llegar al laboratorio se congelaron durante 2 horas a -18°C para facilitar su manejo y conservación del tejido y del posible residuo antimicrobiano, después se procedió a su análisis.

Se recolectaron asépticamente muestras de 3 cm³ de músculo y riñón de cada una de las muestras 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 que se analizaron se tomaron de la medula renal.

Las muestras fueron colocadas en cajas de petri con agar nutritivo, ajustado a pH 6.0, 7.2 y 8.0, inoculado con esporas de *Bacillus subtilis* BGA a una concentración de 10⁷ esporas/ml de medio, al medio ajustado a pH 7.2, se le adiciono además Trimetoprim (0.05 µg/ml).

En cada placa con muestras sé coloco un disco de papel filtro (Whatman 4) de 6 mm de diámetro con antimicrobianos de referencia (Fig. 1).

0.01 UI de penicilina en el medio ajustado a pH 6.0

0.5 μ g de estreptomicina en el medio ajustado a pH 8.0

0.5 μ g de sulfadimidin en el medio ajustado a pH 7.2

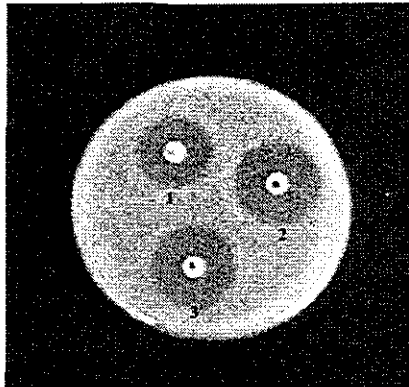


Figura 1: Halos de Inhibición en Discos con Antibiótico de Referencia.

Las muestras se incubaron a 35° C durante 18 a 24 h. Terminando el tiempo de incubación se verificó los discos control con antimicrobianos que presentaran halos de inhibición de 5 a 10 mm, se procedió luego a medir los halos de inhibición observados en las muestras (fig. 2).

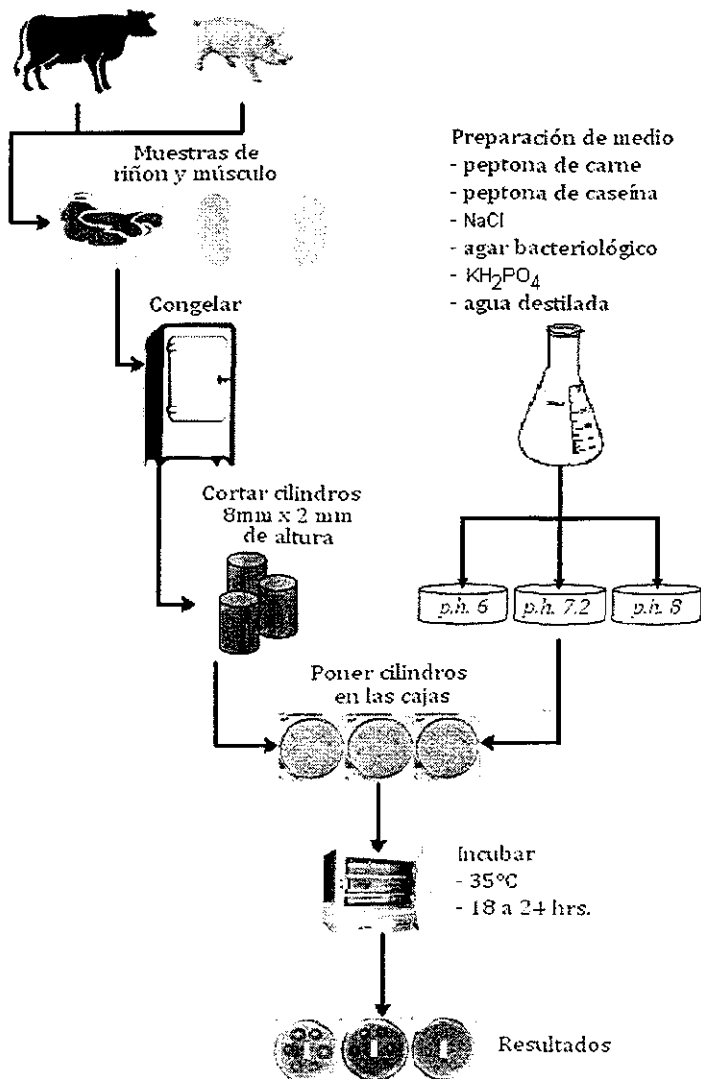


Figura 2: Procedimiento del Método Microbiológico de Inhibición en Placa.

La interpretación de resultados de la prueba de inhibición en placa se considero de la siguiente manera:

Zona de inhibición <1 mm el resultado será negativo

Zona de inhibición 1-2 mm el resultado será dudoso

Zona de inhibición >2 mm el resultado será positivo

(Bogaerts, 1985).



Figura: 3 Resultados de Muestras en Placa.

La prueba de inhibidores en músculo y riñón o prueba de las tres placas con Trimetoprim es una prueba de tamizaje en el que se emplea un procedimiento microbiológico para mostrar la actividad antibacteriana de la sustancia presente en músculo y riñón.

Esta prueba se basa en 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 (Fig. 3). El tamaño de la zona de inhibición es una medida del efecto inhibitorio.

II) Método de Inmuno Ensayo Enzimático Absorbente (ELISA) para la detección de sulfametazina.

Las muestras seleccionadas de los tejidos positivos a pH 7.2 con el método microbiológico se sometieron al análisis cuantitativo de Inmuno Ensayo Enzimático Absorbente (ELISA) para detectar sulfametazina.

Preparación y Procesamiento de Muestras.

Las muestras se homogenizaron con Ultra Turrax en un vial (tubo cónico), se tomó de la mezcla 5 g en otro vial después se le añadió 20 ml de solución de Acetonitrilo al 84 % (84 ml de Acetonitrilo, 16 ml de Agua destilada) se agitaron vigorosamente por 10 minutos para después centrifugarlas por 10 min/ 3000 g/ 15°C (5310 rpm) luego se diluyeron 3 ml del sobrenadante con 3 ml de agua destilada en otro vial y se le añadió 4.5 ml de Acetato de etilo, nuevamente se agitaron vigorosamente por 10 minutos y se centrifugaron por 10 min/ 3000 g/ 15°C (5310 rpm) después se tomó 5 ml del sobrenadante con pipeta Pasteur a un vial (Screw Thread with cap 16x50 mm) para secarlas en una placa de reacción con flujo de nitrógeno, finalmente se resuspendieron con 1.5 ml de buffer 1 incluido en el kit RIDASCREEN® para así poder utilizarlas en el método de ELISA.

El principio de la prueba de ELISA, consiste en la reacción antígeno-anticuerpo. Los microtítulos de los pozos estarán cubiertos con una proteína conjugada de sulfametazina. Los estándares de sulfametazina, la solución de muestra y los anticuerpos anti-sulfametazina se añadieron. La sulfametazina libre y la

sulfametazina inmovilizada compiten por la encuadernación del espacio del anticuerpo para sulfametazina. Cualquier anticuerpo no unido será después removido en el paso de lavado y se añade una enzima secundaria etiquetada como anticuerpo que será dirigida contra el anticuerpo anti-sulfametazina. Después de remover la enzima no unida etiquetada como anticuerpo en el paso de lavado se añade un sustrato y un cromógeno en los pozos y se incuba. La enzima conjugada unida cambiará con el cromógeno sin color a un producto azul. La adición de un reactivo llegará a un cambio de color de azul a amarillo. La medición estará hecha fotométricamente a 450 nm. La absorción es proporcionalmente inversa a la concentración de sulfametazina en la muestra (Manual de kit RIDASCREEN[®]) (Fig. 4 y 5).

El cálculo e interpretación de resultados se consideró de acuerdo al Manual de kit RIDASCREEN[®] y el software RIDASOFT-WIN[®] de la siguiente manera:

El kit establece un rango de 2 ppb a 81 ppb lo cual;

El resultado < 2 ppb será no detectable a 2 ppb

El resultado entre 2 ppb a 81 ppb será positivo

El resultado > 81 ppb será por arriba de límite máximo de detección

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA PARA LA DETERMINACIÓN DE
SULFONAMIDAS Y TETRACICLINAS POR EL MÉTODO DE ELISA

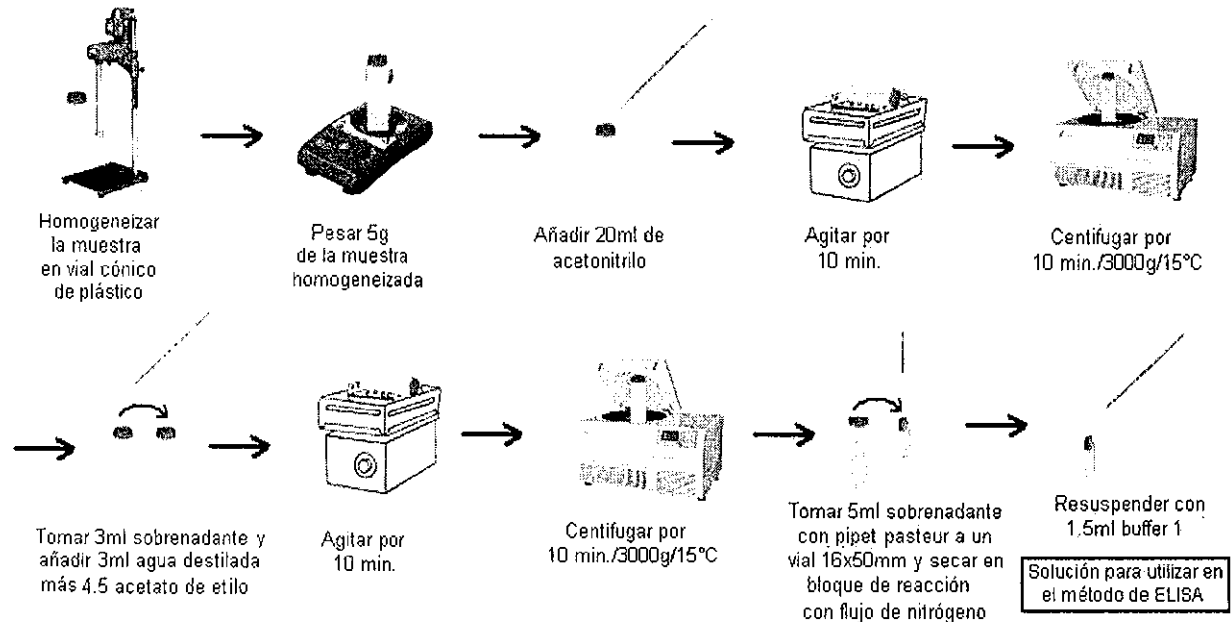


Figura 4 Preparación de la muestra para el método de ELISA.

**PROCEDIMIENTO DEL METODO DE ELISA PARA
LA DETERMINACION DE SULFONAMIDAS**

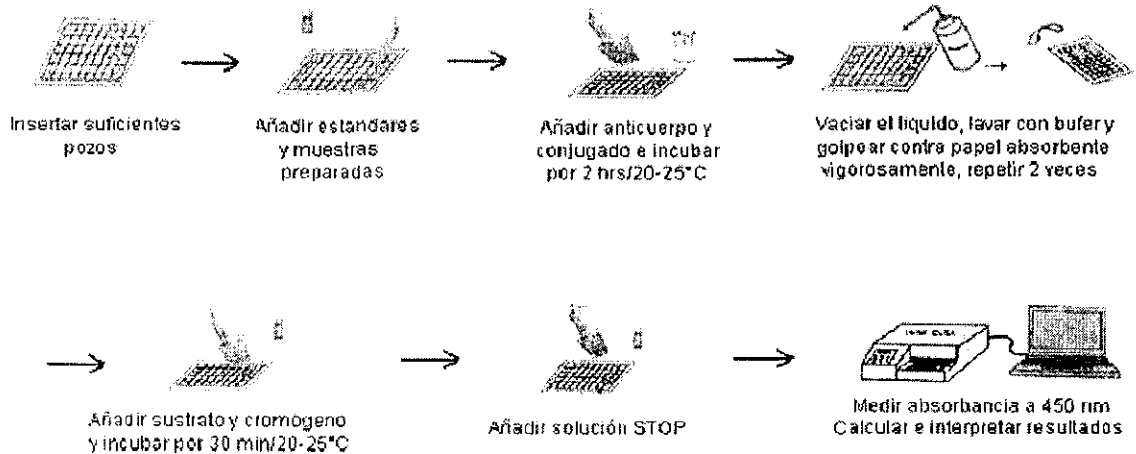


Figura 5 Procedimiento del Método de ELISA.

RESULTADOS

1) Determinación de residuos antimicrobianos en músculo y riñón de bovinos y cerdos por el método Microbiológico de Inhibición en Placa.

Bovinos

La figura 6 permite observar los resultados de 260 bovinos estudiados para la presencia de residuos antimicrobianos. De los cuales 52 bovinos fueron positivos (20 %), 169 fueron negativos (65 %) y 39 dudosos (15 %).

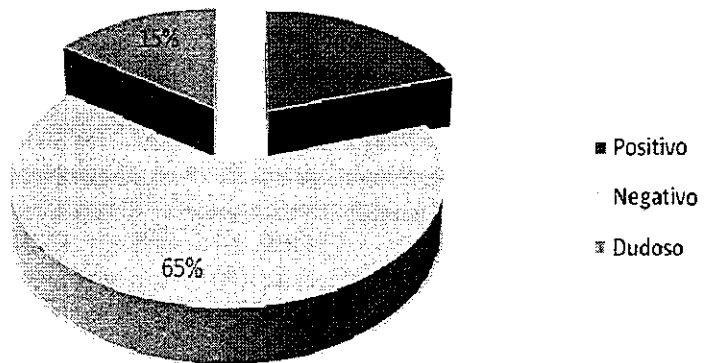


Figura 6: Prueba microbiológica de inhibición en placa en bovinos (n=260).

En la figura 7 se muestran los resultados de los dos tejidos analizados. En músculo se detectaron 19 (7 %) muestras positivas, 228 (88 %) negativas y 13 (5 %) dudosas. En riñón se encontraron 36 (14 %) positivas, 192 (74 %) negativas y 32 (12 %) dudosas. Del total de las muestras analizadas solo 3 fueron positivas en ambos tejidos, y de los dos tejidos el riñón resulto con mayor número de muestras positivas.

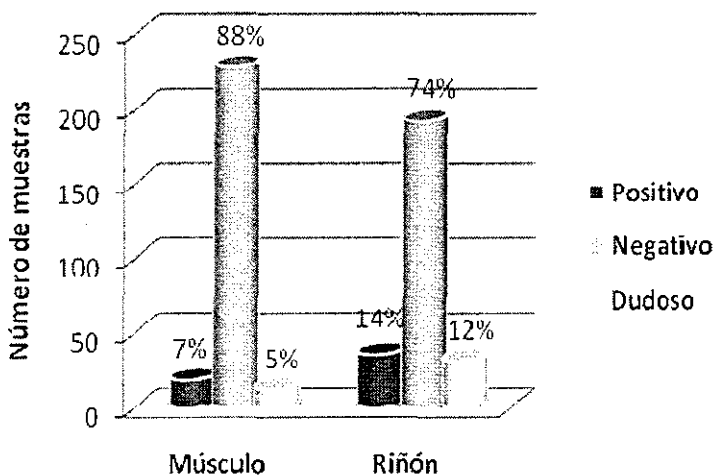


Figura 7: Prueba microbiológica de inhibición en placa en músculo y riñón de bovino (n=260).

En la figura 8 se observa que el mayor número de muestras positivas para la presencia de inhibidores en músculo y riñón en relación al pH del medio de cultivo. Los resultados indican que las muestras positivas se presentaron en mayor número a pH 6 con 15 y 18 para músculo y riñón respectivamente.

También se puede observar que el riñón reaccionó positivamente en los diferentes pH ajustados en el medio de cultivo.

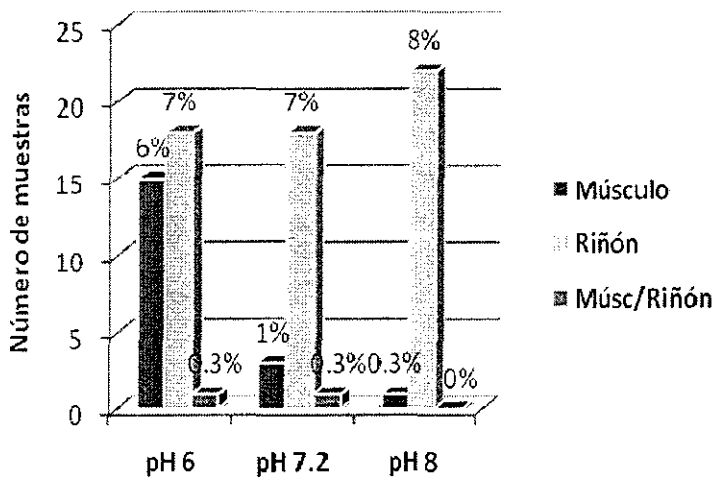


Figura 8: Muestras positivas de bovinos en medios ajustados a diferentes pH (n= 260).

Cerdos

La figura 9 permite observar los resultados de los 179 cerdos estudiados para la presencia de residuos antimicrobianos. De los cuales 97 cerdos fueron positivos (54 %), 33 fueron negativos (19 %) y 49 fueron dudosos (27 %).

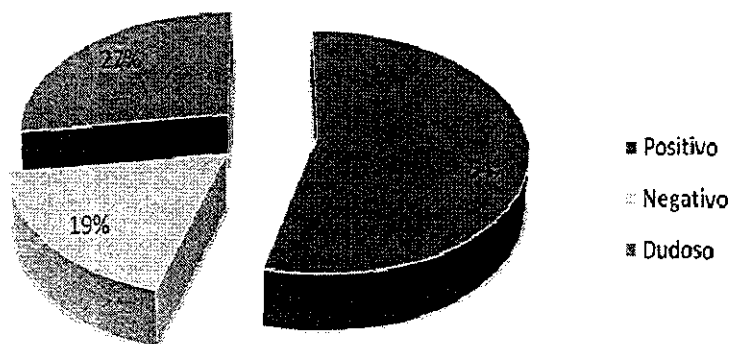


Figura 9: Prueba microbiológica de inhibición en placa en cerdos (n=179).

En la figura 10 se muestran los resultados de los dos tejidos analizados. En músculo se detectaron 23 (13 %) muestras positivas, 109 (61 %) negativas y 47 (26 %) dudosas. En riñón se encontraron 87 (49 %) positivas, 36 (20 %) negativas y 56 (31 %) dudosas. Del total de las muestras analizadas solo 13 fueron positivas en ambos tejidos, y de los dos tejidos el riñón resultó con mayor número de muestras positivas.

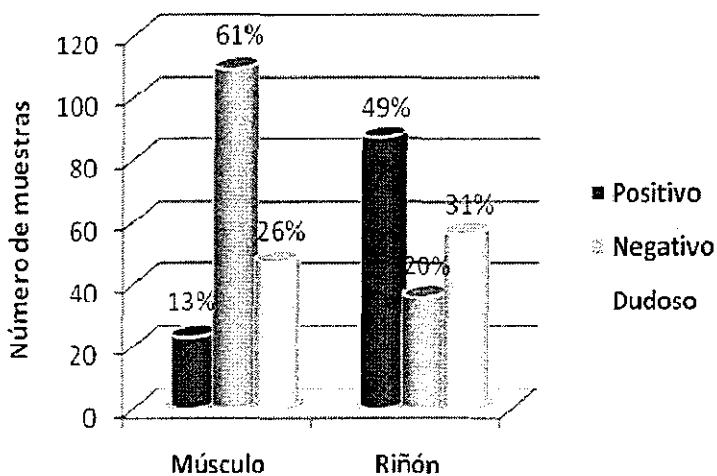


Figura 10: Prueba microbiológica de inhibición en placa en músculo y riñón de cerdo

(n=179)

En la figura 11 se observa que el mayor número de muestras positivas para la presencia de inhibidores en músculo y riñón en relación al pH del medio de cultivo. Los resultados indican que las muestras positivas se presentaron en mayor número a pH 6 con 18 y 40 para músculo y riñón respectivamente. También se puede observar que el riñón reaccionó positivamente en los diferentes pH ajustados en el medio de cultivo.

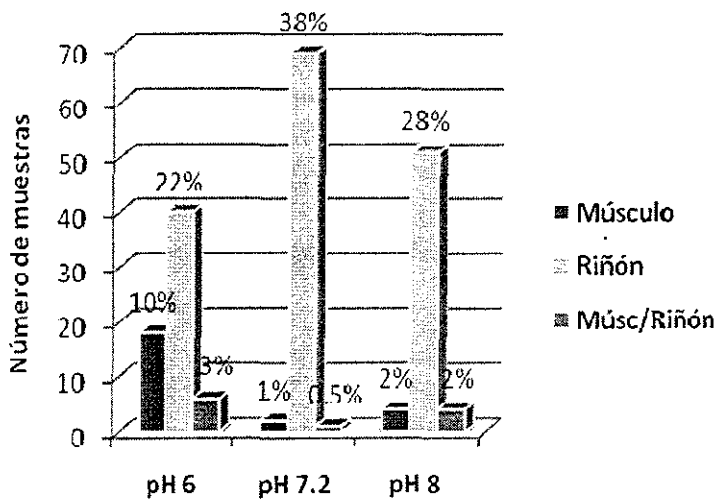


Figura 11: Muestras positivas de bovinos en medios ajustados a diferentes pH (n=179).

2) Determinación de residuos de sulfametazina en músculo y riñón de bovinos y cerdos por el método Inmuno Ensayo Enzimático Absorbente (ELISA).

Bovinos

En bovinos, de las muestras que resultaron positivas con el método microbiológico, se seleccionaron 20 muestras de músculo y riñón correspondientes al medio ajustado a pH 7.2 para ser analizadas con el método de ELISA para la determinación de sulfametazina. En el cuadro 1 se observan las concentraciones encontradas en 4 muestras (20 %) con un promedio de 29.1 partes por billón (ppb) en un rango de 12.9 a 71.1 ppb, tomando como referencia el rango establecido en el kit (2-81 ppb) para su interpretación (Cuadro 3). En el resto de las muestras no se detectó sulfametazina.

Cuadro 1: Concentraciones detectadas de sulfametazina en tejidos de bovinos con el método Inmuno Ensayo Enzimático Absorbente (n=20).

Muestras Bovino	Concentraciones Detectadas	No detectable
B3		ND
B5		ND
B11		ND
B110	12.9	
B118	14.0	
B121		ND
B123		ND
B169		ND
B171		ND
B190		ND
B193		ND
B195		ND
B197		ND
B199	71.1	
B202		ND
B215		ND
B220		ND
B226	18.5	
B230		ND
B237		ND

ppb: partes por billón; ND: no detectable

Cerdos

En cerdos, de las muestras que resultaron positivas con el método microbiológico, se seleccionaron 25 muestras de riñón correspondientes al medio ajustado a pH 7.2 para ser analizadas con el método de ELISA para la determinación de sulfametazina. En el cuadro 2 se observan las concentraciones encontradas en 12 muestras (58 %) con un promedio de 27.6 partes por billón (ppb) en un rango de 8.3 a 64.7 ppb, tomando como referencia el rango establecido en el kit (2-81 ppb) para su interpretación (Cuadro 3). En el resto de las muestras no se detectó sulfametazina.

Cuadro 2: Concentraciones detectadas de sulfametazina en tejidos de cerdos con el método Inmuno Ensayo Enzimático Absorbente (n=25).

Muestras Cerdo	Concentraciones Detectadas	No detectable
C13		ND
C26	31.1	
C27	9.7	
C28		ND
C29	25.0	
C30		ND
C31		ND
C32		ND
C33		ND
C34	29.8	
C35	11.0	
C36		ND
C37		ND
C42		ND
C43	64.7	
C44	8.3	
C47	17.4	
C110		ND
C120		ND
C125	14.2	
C129	49.0	
C132	10.5	
C138		ND
C143	60.3	
C145		ND

ppb: partes por billón; ND: no detectable

Cuadro 3: Concentraciones de sulfametazina en músculo y riñón de bovinos y cerdos (ppb).

	Bovinos n=20	Cerdos n=25
Rango	12.9 - 71.1	8.3 - 64.7
Promedio	29.1	27.6
Desviación estándar	28.1	20.2

DISCUSIÓN

Durante varias décadas se han utilizado agentes antimicrobianos con fines; terapéuticos, profilácticos y como promotores de crecimiento (Wolfgang, 1999). El uso de estas sustancias como aditivos en los alimentos pueden provocar la aparición de residuos en los tejidos del animal destinados para consumo humano, lo cual representa un serio problema de Salud Pública.

Por lo que, para salvaguardar la salud humana, varios países han implementado las medidas correctivas necesarias para disminuir la presencia de dichos residuos en los tejidos animales. En México, la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) emitió a través del Diario oficial de la Federación la Norma Oficial Mexicana para el control de residuos tóxicos en productos de origen animal publicada en agosto de 1994 (NOM-004-ZOO-1994) que tiene por objeto establecer las bases para la detección y el control de residuos tóxicos en productos alimenticios de origen animal y es aplicable a la carne, grasa, hígado, y riñón de aves, bovinos, caprinos, equinos, ovinos, porcinos y cérvidos, especificando una concentración de 100 partes por billón (ppb) como límite máximo permitido de residuos de sulfametazina.

En comparación con el Codex Alimentarius que recomienda un límite máximo de residuos (LMR) 100 ppb de sulfonamidas en músculo y riñón de bovino y cerdo (Codex Alimentarius 1993).

La presencia de residuos en tejidos animales ha sido atribuida principalmente a la falta de cumplimiento en el periodo de retiro, esto es el tiempo que debe transcurrir desde la última aplicación de un medicamento a cuando el animal se sacrifica. Puede deberse también a la medicación accidental por pre-mezclas contaminadas o residuos de una formulación anterior en la mezcladora. (Sumano, 2003).

Los resultados del presente estudio indican que 20 % en tejidos de bovinos y 54 % de cerdos fueron positivos a la presencia de residuos de antimicrobianos. Los cuales son mayores a los reportados por Gesche (1998) de un 4.3 % de bovinos positivos, y son menores que las encontradas por Guerrero G. (1997) quien indicó un 38.9 % de bovinos positivos y 61.8 % de cerdos. Por otro lado Espin (1985), reporta un 22 % de muestras de bovinos positivas con residuos de antibióticos, lo que es muy similar al resultado obtenido en el presente trabajo en tejidos de bovino. En Chile un programa de control de residuos en productos pecuarios señala que un 10 % de tejidos de bovinos resultaron positivos y 17 % en cerdos a la presencia de residuos (Chedy, 2005), siendo un porcentaje muy por debajo de lo encontrado en este estudio. En Venezuela, Albelin, (1994) al igual que Chedy reporta un porcentaje de 28.66 % en cerdos a la presencia de antibióticos menor al obtenido en el presente trabajo. Por otro lado Lara y Lara (1991) utilizando el método en placa difieren en sus resultados con un 44 % de muestras con residuos de antibióticos en carne de cerdo procedente del rastro municipal de Mérida, Yucatán.

En riñón se detectó mayor frecuencia de residuos en las dos especies estudiadas, esto, coincide con el estudio de Albelin, (1994) quien encontró mayor número de muestras positivas en riñón con 6.66 % positivas y 2.66 % en músculo. La presencia de antimicrobianos en riñón señala que el animal todavía estaba eliminando el antimicrobiano cuando fue sacrificado. En músculo la presencia podría indicar que el animal fue tratado pocos días antes del sacrificio, lo que hace suponer que no se respetan los tiempos de retiro del medicamento (Escobedo, 2006).

De acuerdo a los diferentes pH ajustados en el medio de cultivo el análisis indica que en bovinos y cerdos las muestras tuvieron mayor inhibición en pH 6 tanto en músculo como en riñón. Lo cual podría referirse a la presencia de β -Lactámicos. Por otro lado el riñón reaccionó positivamente en los tres pH y teniendo mayor número de muestras positivas en pH 8 en bovinos y a pH 7.2 en cerdos. Esto puede ser debido a la presencia de estreptomicinas y sulfonamidas respectivamente. El pH es un parámetro determinante en la reacción de las sustancias antimicrobianas en el método microbiológico de inhibición en placa (Bogaerts, 1985). En el caso de los macrólidos (eritromicina) y aminoglucósidos (estreptomina) son mucho más activos a un pH alcalino (pH 8) que a un pH ácido (Jawets, 1991), mientras que los β -Lactámicos (penicilinas y cefalosporinas) lo son a pH 6 (Sumano, 2003). Por otro lado las sulfonamidas tienen una tendencia a la alcalinidad en un pH de 7.2 (Prescott, 1991).

Con el fin de cuantificar la concentración de sulfametazina en las muestras que resultaron positivas en pH 7.2 se sometieron al análisis cuantitativo de Inmuno Ensayo Enzimático Absorbente (ELISA). En bovinos, 4 muestras tuvieron en promedio una concentración de 29.1 partes por billón (ppb), en cerdos 14 muestras con un promedio de 27.6 ppb. Resultados menores que los encontrados por Wasch, (1998) utilizando el método de ELISA reporta una concentración de 218 ppb de tetraciclinas encontradas en 12 muestras de cerdo. Siendo una concentración que rebasa los límites máximos de residuos establecidos tanto por la Norma Mexicana como por el Codex Alimentarius. Las concentraciones de sulfametazina encontradas en el presente estudio con la prueba de ELISA no manifiestan una relación con los resultados obtenidos en la prueba microbiológica de inhibición en placa, aun así se esta prueba confirma la presencia de dicha sustancia en las muestras analizadas.

Es común el mal uso de los antimicrobianos al ser aplicados por personal no capacitado, y si es aplicado por un médico veterinario, no siempre se vigila que se respete el periodo de retiro. Por lo general si el animal no responde satisfactoriamente a dicho tratamiento, es enviado al rastro.

En México es deficiente el control tanto del uso de medicamentos en la producción animal como el de residuos de fármacos en alimentos de origen animal por lo que favorece a su uso indiscriminado. Es por esto que existe la necesidad de continuar realizando estudios para documentar la presencia de residuos antimicrobianos en productos derivados de animales destinados a

consumo humano. Debido al potencial de riesgo que representa para la salud en la población a la exposición de estas sustancias y por ende, su contribución a un problema de Salud Pública. Así mismo, establecer programas de vigilancia a nivel local en acuerdo con las regulaciones a fin de dar cumplimiento a lo especificado por la Norma Mexicana.

CONCLUSIONES

Es evidente la frecuencia de que bovinos y cerdos son enviados al sacrificio conteniendo cantidades residuales de sustancias antimicrobianas en sus tejidos.

De los tejidos analizados el riñón fue el que resultó con mayor número de muestras positivas en ambas especies, así como en los métodos empleados.

El método microbiológico de inhibición en placa resultó muy adecuado en la detección de residuos antimicrobianos en forma cualitativa. Mientras que el método de ELISA confirmó la presencia de sulfametazina en forma cuantitativa.

BIBLIOGRAFIA

1. Albelin M. A. Detección de residuos de antibióticos en carne fresca de cerdo, Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía, tesis 684 para el Título de Ingeniero Agrónomo mención Agroindustrial, Caracas, Venezuela, 1994.
2. Bioo Scientific Corp., Veterinary Drug Residues, Max Signal, Sulfamethazine ELISA Test, Kit, Austin, Texas, USA (2008).
3. Bogaerts, R; Wolff, F; Brussels.: A standardized method for the detection of residues of antibacterial substances in fresh meat, fleischwirtsch # 60 4, (1985).
4. Chedy, N. M, V. Servicio Agrícola y Ganadero, División de Protección Pecuaria, Resultados del Programa de Control de Residuos en Productos Pecuarios, año 2004, Boletín Veterinario Oficial N° 3 marzo – abril, Chile, 2005.
5. Codex Alimentarius.: Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias, ALINORM 93/31, Residuos de Medicamentos Veterinarios en los Alimentos, Suiza (1993).
6. Domínguez, R. L. Utilización de antimicrobianos en producción animal y otras alternativas. Departamento de Patología Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. Diciembre 2001.
7. Errecalde, J. O.: El uso de antimicrobianos en animales de consumo: Estudios FAO: Producción y sanidad animal 162 (2004).
8. Escobedo, Y; Espinosa, A; Robles, M; Bermúdez, M.: Transformación de Sulfametazina en Porcinos Alimentados con una Dieta Medicada. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. Volumen 38: 5-13(2007).

9. Espin, P. L. Tana, P. A.: Determinación de residuos de antimicrobianos y quimioterapéuticos en carne de bovino sacrificados en el Camal de Quito. Universidad Central del Ecuador, Quito. Facultad de Medicina Veterinaria Y Zootecnia. Tesis (Dr. Med. Vet. Zoot). Quito, Ecuador 1985.
10. Gesche, E. y Emilfork, C. Residuos de antimicrobianos en canales de vacas. Arch. Med. Vet., vol. 30, no. 2 1998.
11. Guerrero, G. (1997). Detección de residuos de antimicrobianos en tejidos de bovinos y cerdos por el método de triplaca. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. CUCBA. Universidad de Guadalajara.
12. Honkanen, B.T; y Reybroeck, W; Antimicrobials, en Monograph on Residues and Contaminants in Milk and Meat Products. IDF Brussels, Belgium. 26-33, (1997).
13. Jawets, E. Melnick, J. L. y Adelberg, E. A. (1991). Manual de microbiología médica. Editorial. El manual moderno, México, D. F.
14. Lara y Lara, J.; Echeverría Coello, P.; Carvajal Hernández, M. Residuos de antibióticos en carne e hígado de cerdos y aves que se consumen en la ciudad de Mérida. Veterinaria México (México). 1991.
15. Levine, R. I.: Estadística para Administradores. Ed. Prentice-Hall Hispanoamericana. México, 1988.
16. Manual de kit RIDASCREEN® Sulfamethazin, R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany (Art. No.: R3001).
17. Moreno, B.: Higiene e Inspección de Carnes. Tómo II. Ed. Díaz de Santos España, 2003. pág. 444.

18. Organización Mundial de la Salud (OMS) (A): Evaluación de ciertos residuos de fármacos de uso veterinario en los alimentos. Serie de informes técnicos 799. 36° Informe del comité mixto FAO/OMS de Expertos en aditivos alimentarios, (1990).
19. Organización Mundial de la Salud (OMS) (B): Evaluación de ciertos residuos de fármacos en alimentos. Serie de informes técnicos 832. 40° Informe del comité mixto FAO/OMS de Expertos en aditivos alimentarios, (1992).
20. Ortega, P. M.: Empleo de antibióticos en alimentos para animales y sus consecuencias sobre la salud pública. La revista de investigación clínica, 40, 463-472 (1988).
21. Pérez de Ciriza J.A; Huarte, A; Saiz, I; Ozcáriz, M.T; Purroy, M.T.: Residuos de sustancias inhibidoras en carnes. Anales Sir San Navarra, Vol. 22 suplemento 3. 231-238. (1999).
22. Prescott, J. F., Desmond Baggot. Terapéutica antimicrobiana. Editorial Acribia S. A. Zaragoza, España. 1991.
23. San Martín, Betty.: Residuos químicos en los alimentos de origen animal. Un análisis global de la situación mundial y nacional. TECNO VET. Año 7 N°3, (2001).
24. SAGARPA (Secretaría de Agricultura Ganadería Recursos y Pesca) "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.
25. SIAP (Servicio de Información Estadística Agroalimentaria y pesquera), con información de las delegaciones de la SAGARPA, Diciembre 2007.

26. Simal, J. y Cancho, B.: El uso de los antibióticos en la alimentación animal: perspectiva actual, límite máximo residual de un antibiótico. Ciencia y tecnología de los alimentos Vol # 3, No 1, ALTAGA. España, pág. 42. (2000).
27. Suhren, G. y Heeschen, W. Detection of inhibitors by microbial test. A review. Nahrung. 40 (1): 1-7 (1996).
28. Sumano, L. H. y Ocampo, C.: Farmacología Veterinaria. 2da ed. Mcgraw-Hill Interamericana, México, 2003. pág. 117,205.
29. Wasch K., Okerman L., Croubels S., and Backerb P., Detection of residues of tetracycline antibiotics in pork and chicken meat: correlation between results of screening and confirmatory tests. Department of Veterinary Food Inspection, Faculty of Veterinary Medicine of the University of Ghent, Belgium, 1998.
30. Wolfgang, W. Uso de antibióticos en la producción animal y desarrollo de la resistencia en las infecciones humanas. Enfermedades infecciosas y microbiología. Vol. 19, n° 2, Marzo 1999.
31. Zamarreño A. Caracterización farmacocinética y niveles de residuos de clenbuterol en animales, 1993.