

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

DIVISION DE CIENCIAS VETERINARIAS



DETERMINACIÓN DE PENICILINA Y TETRACICLINA EN MÚSCULO Y RIÑÓN
DE CABRAS Y BORREGOS POR MEDIO DE ELECTROFORESIS EN GEL CON
ALTO VOLTAJE

TESIS PROFESIONAL QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE MÉDICO
VETERINARIO ZOOTECNISTA PRESENTAN:

P.M.V.Z. Paulo César Hernández Lozano.

P.M.V.Z. Ana Catalina Lazarín Nazario.

DIRECTOR:

Dra. Delia Guillermina González Aguilar

ASESOR:

M.C. Carlos Pacheco Gallardo

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jalisco, Octubre 2007.

AGRADECIMIENTOS:

A Dios

Por haber permitido llegar hasta este momento en mi vida.

A mis Padres

Gracias por su apoyo, comprensión y cariño porque lograron sacarme adelante y por ellos he llegado hasta donde estoy.

A mis Tías.

Por su apoyo incondicional en el momento que lo necesite.

A Paulo Hernandez

Por su apoyo, su consejo y su amor que me ha brindado durante todos estos años, fueron para mí la fuerza para salir adelante y por estar ahí cuando lo necesite.

A la Universidad de Guadalajara.

Por darme un lugar, para formarme académicamente como profesional para enfrentar diariamente retos en la vida.

A mi Escuela y a mis maestros.

Por sus enseñanzas y sus consejos que formaron parte de mi formación profesional y académica.

A la maestra Delia González y al maestro Carlos Pacheco.

Por su paciencia, dedicación y amistad que me brindaron durante toda la elaboración de esta tesis.

A todos los que directa o indirectamente participaron en mi formación profesional y personal.

Agradecimientos:

- A un ser poderoso ... DIOS:

Por ayudarme a lograr esta gran proeza de terminar mi carrera.

- A mi madre:

Por su enorme apoyo incondicional a lo largo de la carrera que me alento a seguir adelante y no desfallecer en mi logro, le dedico este logro a ella.

- A mis hermanos Alma y Jair:

Su enorme apoyo a lo largo de este tiempo en que estudie, aquí ese sueño se ve cristalizado.

- A mi Universidad:

Dentro de sus aulas me formé y me dio una educación muy valiosa para toda mi vida, le agradezco mucho por haberme escogido como alumno... ¡gracias!

- A la Dra. Delia González:

Por su enorme apoyo, paciencia y atención a lo largo de esta tesis, por ser mi guía y significar mucho en mi vida universitaria. Gracias por que creyo en mí todo momento.

- Al M.C. Carlos Pacheco:

Muchas gracias por haber compartido sus conocimientos, paciencia y consejos en esta tesis, por lo que le agradezco infinitamente por todo lo que me ha dado... ¡gracias!

- A mi novia Ana Lazarin:

Sin su enorme amor y cariño, no seria posible esta tesis... te agradezco mucho que estuviste a mi lado siempre y espero que sigamos juntos siempre...

- A todas las personas que me apoyaron:

A todas las personas que me ayudaron a que me formara como MVZ, muchisimas gracias y estoy infinitamente agradecido.

RESUMEN

Los antibióticos son utilizados en producción animal para tratar enfermedades infecciosas o como promotores de crecimiento. La finalidad del presente trabajo fue detectar la presencia de residuos antimicrobianos en cabras y borregos sacrificados para el abasto en la zona metropolitana de Guadalajara. Se recolectaron muestras de músculo y riñón de cabra (n=278) y borrego (n=47) analizadas con el método microbiológico de inhibición de la triplica 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 se sometieron a análisis con electroforesis en gel de agarosa con alto voltaje para detectar la presencia de penicilina y tetraciclina. Del total de cabras (n=278) y borregos (n=47) investigados para la presencia de residuos antimicrobianos resultaron positivos 14 y 2 respectivamente, lo cual corresponde al 5% y 4.2%. Cuatro muestras de riñón de cabra fueron positivas a tetraciclina presentando un halo de inhibición de 7, 5, 2.5 y 4 cm y una en músculo con 9.5 cm. En borregos, una muestra de riñón fue positiva a penicilina con 5.0 cm. Concluyendo que la mayoría de las muestras positivas se detectaron a pH 6.0 y pH 8.0 En cabras el mayor número de muestras positivas correspondió a tejido muscular. El número de muestras positivas detectado en ambas especies indica que los animales estuvieron tratados antes de ser enviados a sacrificio.

INTRODUCCIÓN Y MARCO TEÓRICO

La aplicación de antibióticos para el control de enfermedades en animales es una práctica habitual en las explotaciones pecuarias. Estas sustancias son administradas en bajas dosis en la alimentación animal, no con fines terapéuticos, sino para promover su crecimiento y engorda (Anderson, 2000).

También es imprescindible su uso en medidas profilácticas en contra de enfermedades que pueden dañar seriamente la productividad de la explotación, ya que, en un momento dado, pueden alcanzar proporciones clínicas y afectar rápidamente a todos los animales (Ortega, 1988).

Muchos antibióticos utilizados en el ganado 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 está las tetraciclinas y penicilinas (Errecalde, 2004).

Las tetraciclinas son un grupo de antibióticos de amplio espectro, tienen una estructura química básica, actividad antimicrobiana y propiedades farmacológicas comunes. Los microorganismos resistentes a este grupo muestran resistencia cruzada amplia a todas las tetraciclinas. Se aislaron en el año 1945 producidos por el género *Streptomyces*, este pertenece al grupo de bacterias actinomicetales; por cultivo o en forma semisintética se han formulado las siguientes:

Clortetraciclina (aureomicina). Producida por *Streptomyces aureofacies*.

Oxitetraciclina (terramicina). Producida por *streptomyces rimosus*.

Tetraciclina (aeromicina). Es semisintética y también se aísla de *streptomyces* libres en crecimiento.

Dimetil clortetraciclina (deciomicina), Rolitetraciclina, Doxiciclina (DC), Metaciclina u Minociclina (MC) son tetraciclinas semisintéticas (Sumano, 2006).

En la farmacopea moderna, las tetraciclinas son consideradas drogas principales para la presencia de *rickettsias*, *micoplasmas*. Así como también pueden ser usadas preferencialmente con algunos bacilos gramnegativos como *Brucella*.

Por la aparición de cepas resistentes, las tetraciclinas han perdido parte de su utilidad inicial, *Proteus spp* con frecuencia son resistentes; entre las bacterias coliformes *Pneumococos*, *Stafhylococcus*, *Streptococcus*, *Shigella spp*, cada vez son más comunes las cepas resistentes a las tetraciclinas (Rodríguez, 1998).

Las penicilinas, es uno de los grupos de antibióticos más generosos, desde el punto de vista de su eficacia y casi nula toxicidad. Originalmente se aislaron del *Penicillium notatum*, en la actualidad los cultivos en tanques de *Penicillium chrysogenum* irradiado hacen de la extracción de penicilina un proceso fácil y productivo.

De todas las penicilinas que se obtienen (F, X, K, G, O), la única que resultó clínicamente útil fue la benzilpenicilina G (sódica, potásica, procaínica y benzatínica).

Además de las penicilinas más conocidas existen otras de menor difusión comercial, entre las que destacan propicilina, tienamicina, carfecilina, bacampicilina, talampicilina, ciclacilina, epicilina, carindacilina, azlocilina, mezlocilina y piperacilina consideradas de amplio espectro y de posible uso en la práctica veterinaria en el futuro.

Las penicilinas, tienen características generales, donde deben considerarse inestables y su mezcla casi siempre da lugar a inactivación, higroscópicas, sufren un deterioro de su potencia en presencia de ácidos y álcalis; por lo general, la velocidad a la que se alteran en solución aumenta conforme se incrementa la temperatura. La mayor parte de los agentes oxidantes las destruye muy rápidamente. Las penicilinas se pueden ver afectadas por otros factores como: metales pesados y grupos alcohólicos y tiol, que alteran el anillo tiazolidina.

En cuanto a mecanismo de acción, las penicilinas inhiben la transpeptidación, además existe la liberación del ácido lipoteico. Este compuesto bloquea a la hidrolasa mureínica ó autolisina. Al liberarse de la bacteria dicho ácido queda activada la enzima hidrolasa mureínica y se degrada la pared bacteriana. La penicilina impide las transpeptidacion de la pared, evitando la unión polimérica, la inhibición de la transpeptidación ocurre por bloqueo de dos enzimas (transpeptidasa y carboxipeptidasa). El resultado de la interrupción en la regeneración de la pared, así como la aceleración de su autólisis, origina un desequilibrio que destruye a la bacteria.

En su farmacocinética, las penicilinas tienen una acción cinética de absorción parenteral y produciendo una cifra máxima en plasma de tres a cuatro horas. Se distribuyen en bajas concentraciones en líquidos articulares, pleurales y pericárdicos. En sangre, hígado, bilis, piel e intestino se producen altos valores de penicilina y en riñón la concentración es alta. Se excretan en un porcentaje aproximado de 80% por vía renal y sin biotransformación, donde el total, 20% se excreta por filtración glomerular y 80% por transporte tubular activo.

En cuanto a su espectro, existen tres grupos de penicilinas, naturales, semisintéticas y semisintéticas de amplio espectro, en el primer grupo las bacterias sensibles son especies de *Clostridium*, *Sthapylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium* y especies de *Erisypela*.

En el segundo grupo, especies grampositivo y a las anteriormente mencionadas, pero se han hecho resistentes por producción de β -lactamasa.

En penicilinas semisintéticas de amplio espectro, comprende a *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Pseudomonas* y *Klebsiella* (Sumano, 2006).

Los ovinos representan un gran potencial en México, ya que por sus hábitos alimenticios y tamaño, aprovechan de manera eficiente la vegetación de las tierras de pastoreo. Además, son una fuente de proteínas de origen animal, representan una alternativa viable para la diversificación agropecuaria (Bores, 2000).

En cuanto a la cría de la especie caprina, históricamente ha estado asociada a sectores marginales y a los países más pobres, donde la producción de leche y carne se destina principalmente al autoconsumo.

En México la producción caprina es una actividad tradicional que se encuentra estrechamente ligada al desarrollo cultural de la población, desde que los españoles introdujeron las cabras, hace ya casi 500 años (Arbiza, 1996)

La producción de carne de ovino en el 2004 fue de 44, 300 toneladas y en el 2005, fue de 45, 400 toneladas. En la producción de carne de cabra en el 2004, fue de 42, 000 toneladas; en el 2005 fue de 42, 500 toneladas (SAGARPA, 2006).

La mayor parte de la producción de carne de ovino (75%), se concentra en solo 10 estados, que son México, Hidalgo, Veracruz, Puebla, Zacatecas, San Luis Potosí, Sinaloa, Oaxaca, Jalisco y Michoacán, siendo la región Centro y Centro-Norte donde se ubica la mayor producción (Bores, 2000).

El consumo per cápita de la carne de ovino y cabra en México, respectivamente es de 1.0 Kg./persona/año y de 0.4 Kg/persona /año (2004). En el año 2005, en ovino fue de 0.8 Kg/persona/año y en cabra de 0.4 Kg/persona/año (SAGARPA, 2006).

La población ovina estatal se localiza principalmente en los municipios de Ojuelos, Arandas, Tepatitlán, Lagos de Moreno, mientras que la mayor parte de los caprinos se encuentra en Zapotlanejo, Huejuquilla el Alto, Tizapán y Lagos de Moreno. El sacrificio comúnmente es realizado en lugares no aptos para este fin y en algunos casos no son inspeccionados por un médico veterinario acreditado.

En México existe la explotación tradicional de estas especies, lo cual ha provocado paulatinamente la marginación de las mismas, confinada a los estratos campesinos más pobres. Estas explotaciones se llevan a cabo en condiciones de reducida infraestructura y con frecuencia se realizan un uso inadecuado de los antibióticos al ser aplicados por personal sin conocimientos o por el médico veterinario que no vigila que se respeten los períodos de restricción favoreciendo la aparición de residuos en carne y sus consecuencias en la salud pública (INEGI 2003).

La carne procedente de ganado caprino posee importantes ventajas nutricionales, por ejemplo, de los mismos cortes la carne de cabra tiene de un 50 a 65 % menos de grasa que la de bovino (con una similar proporción de proteína), entre un 42 y un 59 % menos de grasa que el cordero y alrededor de un 25 % menor que la carne de ternera (Adrizzo, 1994).

La carne de ovino se caracteriza por su buena calidad nutricional se estima un valor nutricional promedio para la carne magra de 18.2 % de proteína, 12.5 % de grasa y para la carne semigrasa de 16.4 % de proteína y 26.4 % de grasa (Arbiza, 1996).

Además, el porcentaje de grasa saturada de la carne de cabra es 40 % menor que la carne de pollo sin piel, menor que la de bovino, menor que la de cerdo y aún menor que la de cordero (USDA, 1989).

La producción ovina está dirigida principalmente al mercado de barbacoa y ésta se canaliza hacia centros de consumo, los cuales en México se encuentran en gran medida, en zonas urbanas de los estados de la región del centro, aunque a últimas fechas su consumo se ha generalizado en toda la república; el resto se destina a satisfacer ciertas necesidades de autoconsumo no cuantificadas (Arteaga, 2002).

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 intencionada 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. La toxicidad de estos residuos varía desde la inocuidad hasta presentar consecuencias clínicas (Simal, 2000).

De acuerdo al Codex Alimentarius los residuos de antimicrobianos en los alimentos de origen animal son indeseables, aunque en muchos casos inevitables y por tanto tolerables hasta ciertas concentraciones desde el punto de vista sanitario, en el que la Organización Mundial de la Salud (OMS), ha establecido límites máximos para evitar consecuencias en la salud pública.

La Norma Oficial Mexicana 004-ZOO-1994, especifica un límite máximo de residuos de 0.4 ppm de penicilina y tetraciclina en músculo y riñón de ovino y caprino (SAGARPA 1994); mientras tanto en el codex alimentarius especifica un límite máximo de residuos en riñón de ovino 1200 mg/kg y en músculo 200 mg/kg de tetraciclina (Codex Alimentarius 2005).

Como resultado de la preocupación de los problemas que conlleva el mal uso de los antibióticos en la producción animal y debido a la necesidad de asegurar controles homogéneos entre los países que impidan el establecimiento de barreras comerciales, se han desarrollado una legislación sobre distintos aspectos del problema tales como la utilización de los antibióticos en animales destinados a consumo humano (Real decreto 109/1995, Directiva 70/524/CEE).

En la Unión Europea (UE), el uso de medicamentos veterinarios esta regulado por el reglamento 2377/90/EC, el cual describe el proceso para establecer los límites máximos de residuos (LMRs) de productos veterinarios en alimentos de origen animal.

El control de los residuos de antibióticos en carne se realizan en tres fases: Cribado, post-cribado y confirmación. En la primera se pueden utilizar técnicas cualitativas, como las microbiológicas, mientras que la fase de confirmación se utiliza técnicas cuantitativas como cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y pruebas inmunológicas.

La técnica de cribado de las cuatro placas, es la más utilizada en la Unión Europea, se admite como técnica oficial. Se basa en la difusión del antimicrobiano contenido en la muestra en el medio de cultivo de varias placas que contienen *Bacillus subtilis* BGA ó *Micrococcus luteus* ATCC 9341.

Las sustancias antibacterianas presentes en la muestra difunden alrededor de éstas provocando la aparición de zonas de inhibición del crecimiento del microorganismo.

Otra técnica, es la microbiológica de las tres placas en la que se emplea el *Bacillus subtilis* BGA en un medio de cultivo a tres niveles diferentes de pH (pH 6.0, 7.2 y 8.0) y la adición de Trimetoprima.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Uno de los productos farmacéuticos más comúnmente empleados en la producción caprina y ovina son los antibióticos. El abuso en la aplicación de estas sustancias y el no respetar los períodos de retiro, es decir al tiempo en que no se deberá consumirse los productos o subproductos de los animales tratados, puede ocasionar que la carne de estos animales pueda contener residuos de antibióticos como penicilinas y tetraciclinas.

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 antibióticos. Todo esto tiene consecuencias negativas en la salud pública (resistencia bacteriana, hipersensibilidad en individuos susceptibles, cambios en la microflora intestinal, etc.) Por tanto es importante determinar la presencia de residuos en tejidos de estos animales para conocer el grado de contaminación con residuos antimicrobianos en músculo y riñón de animales que se sacrifican en la zona metropolitana de Guadalajara.

JUSTIFICACIÓN

Considerando el consumo de cabra y borrego 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 inccuidad para los consumidores y es indispensable si se quiere ser competitivo en el mercado.

Por esto es necesario llevar a cabo estudios para verificar la situación actual de los residuos antimicrobianos en estas especies y con ello informar a las autoridades en pro del control efectivo en la detección de antimicrobianos en carne de ovino y caprino y de esta manera impedir que llegue al consumidor carne contaminada.

HIPÓTESIS

Si las sustancias mayormente utilizadas en la producción pecuaria son los antibióticos y no se respetan los periodos de restricción especificados y además existe una escasa vigilancia y regulación oficial. Entonces es de esperar un alto porcentaje de muestras de riñón y músculo de ovinos y caprinos contaminado con residuos antimicrobianos.

OBJETIVOS

GENERAL.

Determinación de antimicrobianos en músculo y riñón de cabras y borregos por medio de electroforesis en gel con alto voltaje durante el periodo de marzo – agosto del 2006.

PARTICULARES.

Determinación de penicilina y tetraciclina en músculo y riñón de cabra y borregos sacrificados en el rastro municipal de Guadalajara.

MATERIALES Y METODOS

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 cabras y borregos en el mes, se recolectó muestras de músculo y riñón de cabras y borregos sacrificados en el rastro municipal de Guadalajara durante un periodo de marzo – agosto 2006.

El tamaño de muestra se determinó con la siguiente fórmula:

TAMAÑO DE MUESTRA PARA ESTIMAR PROPORCIONES PARA POBLACIÓN FINITA CON ERROR DE MAGNITUD

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

N = Tamaño de muestra, p = proporción aproximada del fenómeno de estudio en la población de referencia, q = proporcione de la población que no representa el fenómeno en estudio, N = Tamaño de la población, B = Error de magnitud, Z = Valor de z critica correspondiente a nivel de error aceptado (Levin, 1998).

Métodos de análisis:

La muestra tuvo dos procedimientos de análisis y de determinación de antimicrobianos que fueron los siguientes:

l) 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 tomaron, conforme a la prueba para inhibidores en músculo y riñón (prueba de las tres placas con Trimetoprim) para la detección de inhibidores microbianos en carne (Bogaerts R. Wolff F., Brussels, 1985).

Los tejidos, fueron identificados, y 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, después se procedió a su análisis.

Método microbiológico de inhibición en placa.

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 fueron tomadas de la medula renal.

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

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

0.01 U/ de disco de penicilinas y tetraciclinas en medio ajustado a pH 6.0

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

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

Zona de inhibición	>2 mm el resultado es positiva
Zona de inhibición entre	1-2 mm el resultado es dudosa
Zona de inhibición	<1 mm el resultado es negativa

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 en la sustancia presente en músculo y/o 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. El tamaño de la zona de inhibición es una medida del efecto inhibitorio.

II) Método de electroforesis en gel de alto voltaje.

Las muestras de tejido positivas con el método microbiológico se sometió al análisis cuantitativo de electroforesis en gel de alto voltaje.

Se aplicó el método de electroforesis en gel con alto voltaje para identificar el comportamiento electroforetico de los antibióticos antes mencionados y se determinó el halo de inhibición bacteriana con relación a la concentración presentada (Crosby, 1991).

Examen químico-microbiológico.

El principio de la electroforesis, consiste en la separación de mezclas iónicas en un campo de corriente eléctrica continua. Si las sustancias contenidas en las muestras tienen diferente carga eléctrica y diferente configuración molecular, entonces se moverán a diferentes distancias hacia cátodo o ánodo.

Las muestras de antibióticos se colocaron sobre una placa de gel de agarosa y se le aplicó una corriente eléctrica inicial de 500 volts los primeros 10 minutos, después a 1000 volts y se dejó durante 1 hora 50 minutos el proceso de separación, para concluir en 2 horas, 5 minutos antes de elevar la temperatura a 10°C para enfriar la placa.

Al concluir la separación se cubrió la placa de gel con una mezcla de agar de esporas de *Bacillus subtilis* para hacer visibles las áreas donde se encontrarán antibióticos, tras la incubación por 24 horas a una temperatura de 33-35°C.

RESULTADOS

La frecuencia de los residuos antimicrobianos en tejidos fue investigada usando el método microbiológico de triplaca con trimetoprim y la presencia de penicilina y tetraciclina por medio de electroforesis en gel con alto voltaje.

I) Determinación de residuos de sustancias antimicrobianas en músculo y riñón de cabra y borrego por el método microbiológico de la triplaca.

La interpretación de resultados con el método microbiológico de la triplaca, se consideró según el diámetro del halo de inhibición de la siguiente manera: diámetro > 2mm positivo, diámetro de 1-2 mm dudoso y diámetro <1mm negativo.

Del total de las cabras (n=278) y borregos (n=47) investigados para la presencia de residuos antimicrobianos resultaron positivos 15 cabras y 2 borregos respectivamente, lo cual corresponde ambas el 5%, en sospechosos fueron de 14 cabras y 4 borregos que corresponde al 4% y 9% (Figura 1y 2).

Fig 1.- Comportamiento a la prueba de antimicrobianos en cabras (n=278).

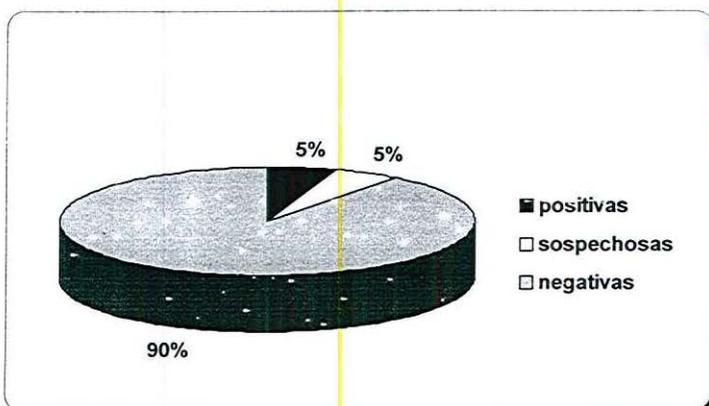
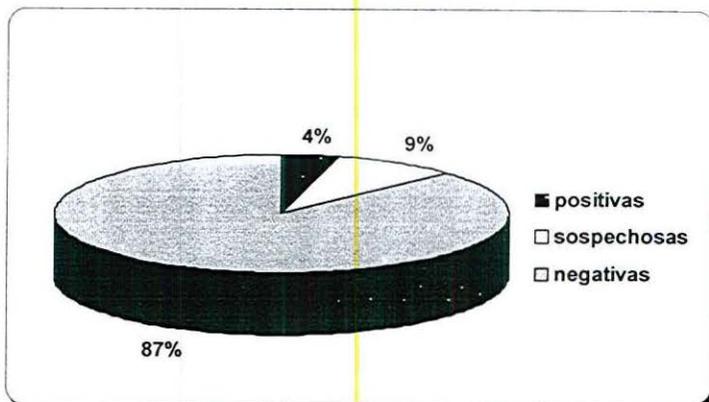


Fig 2.- Comportamiento a la prueba de antimicrobianos en borregos (n= 47).



Los medios con mayor número de muestras positivas en cabra que se detectaron fueron el ajustado a pH 6.0 con 6 muestras y a pH 8.0 con 5 muestras, siendo el músculo el tejido con más resultados positivos. La mayoría de los resultados sospechosos se observaron en el medio ajustado a pH 7.2 y pH 8.0 (Figura 3 y 4).

Fig.- 3 p.H. de los medios en que se detectaron muestras positivas en cabras (n= 278).

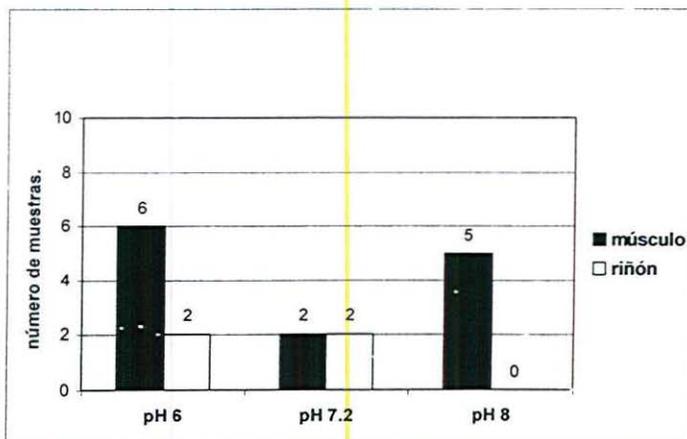
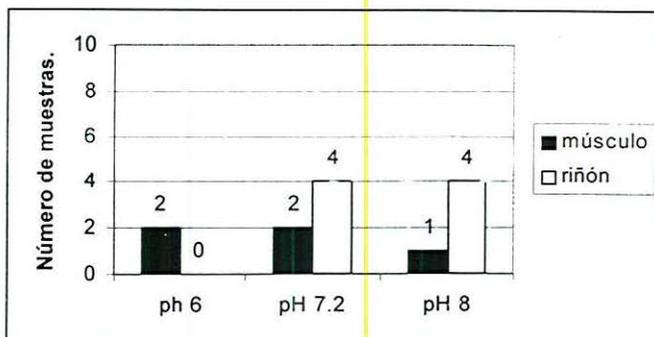


Fig 4.- p.H. de los medios en que se detectaron muestras sospechosas en cabras (n=278).



En lo que respecta a borregos, las muestras positivas se detectaron en pH 8.0, presentando un halo de inhibición en riñón de 2 mm y en músculo de 5 mm (figura 5). La mayoría de los resultados sospechosos se observaron en pH 7.2 con tres y en pH 6.0 con una (figura 6).

Fig 5.- p.H. de los medios en que se detectaron muestras positivas en borregos (n=47).

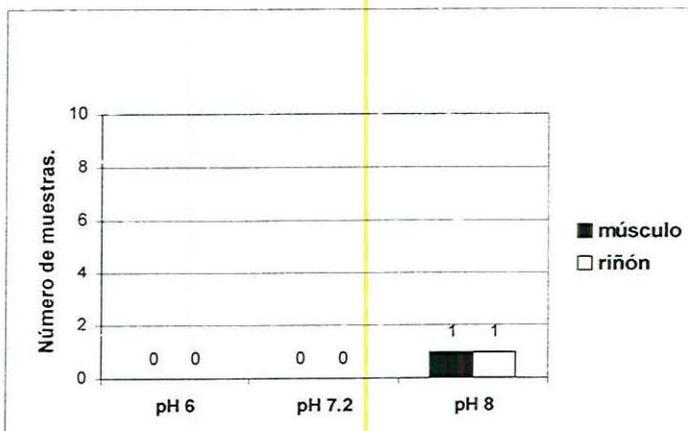
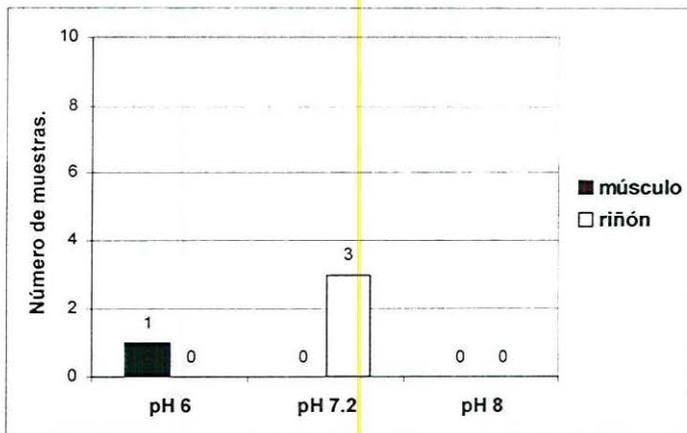


Fig 6.- p.H. de los medios en que se detectaron muestras sospechosas en borregos (n=47).



El tamaño de las zonas de inhibición en las muestras positivas en ambas especies osciló entre 3 mm y 6 mm predominando los halos 3 mm y 5 mm (Figura 7 y 8).

Fig 7.- Presentación de halos de inhibición en músculo y riñón de cabras (n= 278).

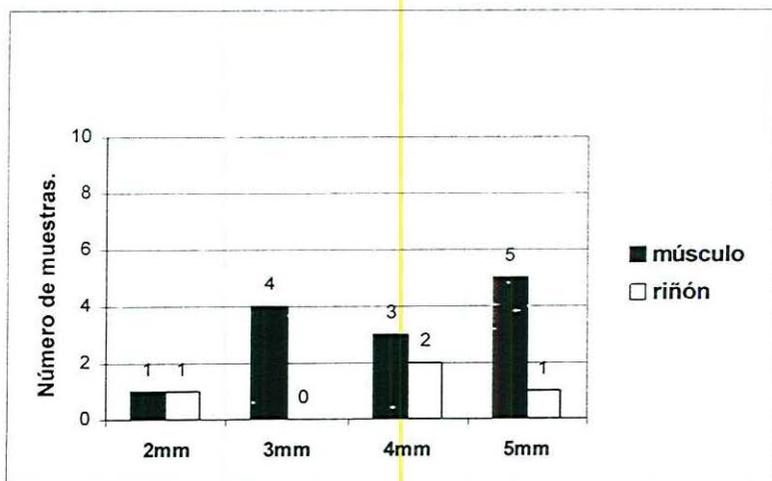
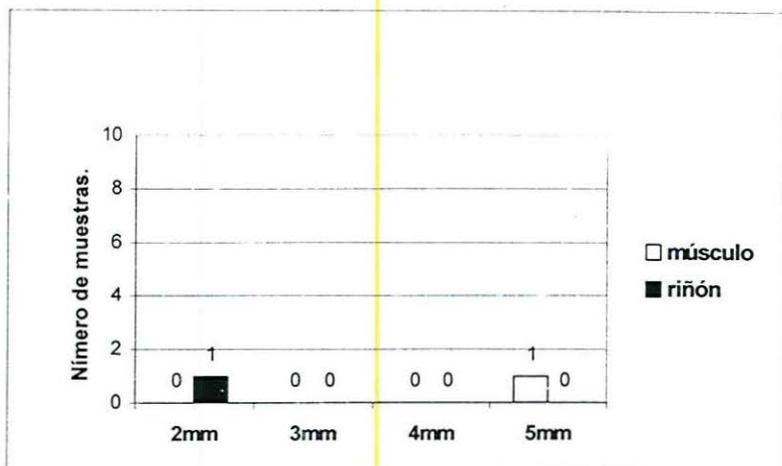


Fig 8.- Presentación de los halos de inhibición en músculo y riñón de borrego (n=47).



II) Determinación de residuos de penicilina y tetraciclina por el método de electroforesis en gel con alto voltaje.

Cuatro muestras de riñón de cabra fueron positivas a tetraciclina presentando un halo de inhibición de 7, 5, 2.5 y 4 cm. respectivamente y en el músculo 9.5 cm.

En borregos, una muestra de riñón fue positiva a penicilina con 5 cm de halo de inhibición (tabla 1).

Tabla 1. Resultados electroforesis en cabras y borregos

Especie	Tejido	Tamaño de halo (cm)	Antibiótico.
Caprino	Riñón	7 cm	Tetraciclina.
Caprino	Riñón	5 cm	Tetraciclina.
Caprino	Riñón	2.5 cm	Tetraciclina.
Caprino	Riñón	4 cm	Tetraciclina.
Caprino	Músculo	9.5 cm	Tetraciclina.
Ovino	Riñón	5 cm	Penicilina.

DISCUSIÓN

La Norma Oficial Mexicana para el control de residuos tóxicos en productos de origen animal 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 aves, bovinos, caprinos, equinos, ovinos, porcinos y cérvidos. 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 Guadalajara.

Tomando como referencia que en Estados Unidos, una frecuencia del 4% de residuos es considerada inaceptable (Guest, G. 1988), los porcentajes de positividad encontrados, 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 menores que las reportadas por Zepeda O., y Oroz, B. (1998) para cabras y ovinos, con 10.65 % y 16.66 % respectivamente. Similares son los datos de Gesche, E. et. al. (1998) que encontraron el 4.3 % del total de vacas sometidas a análisis resultaron positivas a la detección de residuos antimicrobianos, pero difieren mayormente por los señalados por Guerrero G. (1997) quien encontró positivas 38.9 % de las vacas y 61.8 % de los cerdos sometidas a análisis. Un monitoreo efectuado en Estados Unidos (United Status Depart.of Agri. (1990) indico el 2.9 % de bovinos positivos y el 1.2 % en cerdos. Mas tarde Gibbons y col. (1996) reportan en el mismo país un 9.2 % de presencia de residuos de antimicrobianos en canales de ganado. Edwards. F. et al. (1995) en una evaluación sobre los potenciales riesgos que constituyen los bovinos, tomaron muestras de 30 canales que ya habían pasado por la inspección rutinaria ante mortem, de las cuales 3 (10%) presentaron residuos de antibióticos. En un estudio en un rastro de Canadá, el porcentaje de bovinos positivos fue del 2.5 % (Masztis, 1984). Utilizando también el método de las tres placas, Zamora y Yabut (1989) en Filipinas encontraron una frecuencia de 12 % de muestras positivas a

residuos antimicrobianos procedentes de carne de cerdo recolectadas en expendios. Lara y Lara 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.

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 la presencia de medicamento en el equipo donde se prepara el alimento (Bevill, 1984). 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.

La frecuencia con que se encontraron muestras positivas en músculo y riñón y el hecho de que durante el tiempo que duró el estudio detectaban por lo menos una cabra u ovino positivo o sospechoso por uno de los dos tejidos estudiados, hacen suponer que era frecuente el envío de animales al rastro municipal de Guadalajara, sin respetar los tiempos de espera para la eliminación de los medicamentos. En México muchas explotaciones de caprinos y ovinos se llevan a cabo de manera extensiva. Los manejos zootécnicos más frecuentes son la desparasitación y la vacunación. Los medicamentos antimicrobianos son administrados individualmente debido a enfermedades del tracto respiratorio o desordenes digestivos. En EEUU, el programa Nacional de residuos 1990 reportó 122 borregos y 41 cabras, una de ellas fue positiva a la prueba cualitativa STOP (Swab test on premises) en el monitoreo de 1989.

Es común el mal uso de los antibióticos al ser aplicados por personal no capacitado, y si es aplicado por un médico veterinario, no siempre se vigila que se respeten los períodos de restricción. Por lo general si el animal no responde satisfactoriamente a dicho tratamiento, es enviado al rastro o es sacrificado en

traspatio. Situación que prevalece en muchas entidades del estado de Jalisco y que consideramos pudo repercutir en la presencia de residuos en los tejidos de estas especies.

En este estudio las muestras procedieron por lo general de caprinos y ovinos destinados a la producción de carne, los porcentajes de muestras positivas a residuo encontrado indicó que ambos grupos fueron expuestos a antimicrobianos. La frecuencia de muestras positivas en cabras pudiera explicarse como una consecuencia del empleo de antimicrobianos aplicados individualmente como terapia para el tratamiento de enfermedades, práctica que ha sido observada en varias explotaciones caprinas y ovinas de Jalisco.

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 8.0) que a un pH ácido (Jawets et al. 1981), mientras que las penicilinas lo son a pH 6.0. En las sulfonamidas la solubilidad se eleva conforme el pH aumenta (Sumano L. 1990). En este estudio fueron pocas las muestras positivas a pH. 7.2 Tomando en cuenta que en la placa ajustada a pH 7.2 se favorecen las condiciones para la detección de sulfonamidas, tentativamente puede suponerse que los animales estuvieron poco o no expuestos a este tipo de antimicrobianos.

La mayoría de las muestras positivas de caprinos y ovinos lo fueron a los pH 6.0 y pH 8.0 a que se ajustaron los medios. Eso podría ser debido a que los animales de donde procedían las muestras, fueron expuestos antes de ser enviados al rastro a más de un antimicrobiano, de los macrólidos, aminoglucósidos o penicilinas.

Con el método de electroforesis, la penicilina emigra al ánodo y la tetraciclina al cátodo.

De las 15 muestras positivas de cabra y dos de borrego detectadas con el método microbiológico en placa, con el método de electroforesis solo cuatro muestras de riñón de cabra y una en músculo fueron positivas a tetraciclina y en borregos, solo una muestra de riñón fue positiva a penicilina.

Esto se pudo deberse a que dichas muestras contenían un antimicrobiano diferente a los estándares de penicilina y tetraciclina utilizados en la prueba.

Tomando en cuenta que bajo las condiciones económicas de México, el consumo de vísceras representa una opción nutricional más barata que las porciones musculares, su consumo frecuente podría implicar una exposición a niveles de residuos por arriba de los límites máximos permitidos.

Para lograr una reducción en la ocurrencia de residuos en los alimentos, sería conveniente implementar programas de orientación al productor al mismo tiempo que se lleve a cabo un programa de detección de residuos.

CONCLUSIONES

Las muestras positivas que se detectaron a pH 6.0 y pH 8.0, indican que probablemente las muestras contenían penicilina y estreptomina.

En cabras el mayor número de muestras positivas correspondió a tejido muscular (5%), demostrando que los animales no habían eliminado los antimicrobianos de su organismo.

El número de muestras positivas detectado en ambas especies indica que los animales estuvieron expuestos a un agente antimicrobiano pocas semanas antes de ser enviados a sacrificio.

BIBLIOGRAFÍA

1. Addrizzo, J.R. (1994). Use of goat milk and goat meat as therapeutic aids in cardiovascular diseases. <http://goats.clemson.edu/NC%20>
2. Anderson, P. M. y Pascual, V. C. (2000). Microbiología Alimentaria Metodología analítica para alimentos y bebidas. Ed. Díaz de Santos pp 209. España.
3. Arbiza A. S. Y De Lucas T. J. (1996) Producción de carne ovina. Editores Mexicanos Unidos, S.A.México. pp 168.
4. Arteaga, C. J. (2002). Situación y perspectivas de la industria ovina en México. Revista del Borrego. Ed. Especial Julio octubre. México.
5. Becill, R. F.: (1984). Factors Influencing the occurrence of drug residues in animal tissues after the use of antimicrobial agents in animal feeds. *JVMA.*, 185: pp 1124 – 1126.
6. Bogaerts R., Wolff F., Brussels, (1985) A standardized method for the detection of residues of antibacterial substances in fresh meat, *fleischwirtsch # 60 (4)* pags 672 – 673.
7. B.O.E. Real Decreto 109 sobre medicamentos veterinarios. Boletín Oficial del Estado N° 53 de 27 de enero de 1995.
8. Bores, F y Vega C. (2003). La investigación pecuaria ante los retos y desafíos de la ovicultura en México, introducción, comportamiento nacional de la población y producción de ovinos. INIFAP México pp. 80, 83.

9. Codex Alimentarius, "Límites máximos de residuos para medicamentos veterinarios en alimentos" (2005) Actualización de la 28° sesión de la comisión del codex Alimentarius Julio 2005, CAC/LMR 02 2005, pp 3 y 4.
10. Crosby N. T. (1991) Determination of veterinary residues in food, I title II serie 1991, editorial: Ellis Horwood, pp. 103 – 108.
11. Errecalde, J. O. (2004). Bacterias resistentes en medicina veterinaria en: Uso de antimicrobianos en animales de consumo, incidencia del desarrollo de resistencias en salud publica. Food and Agriculture Organization, pp 31.
12. Edwards, F. J., Simpson, R. B., Brown, W. C. (1995). Bacteriologic culture and histologic examination of samples collected from recumbent cattle an slaughter, *journal of american veterinary medical association* 207: pp 1174 – 1176.
13. Food and Drug Administration (1991). Tolerance and / or safe levels of animal drug residues in milk. Department of Health and Human Services: 1 –2.
14. Gesche, E. (1986). Detección de residuos de antibióticos en carne. Técnica Del *Bacillus subtilis* BGA, monografías de medicina veterinaria 8: pp 1 – 5.
15. Gibbons, N. S, J. B. Kaneene, W. J. Lloyd. (1996). Patterns of chemical residues detected in US Beef carcasses between 1991 and 1993, *journal of american veterinary medical association*. 209: pp 589 – 593.
16. 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*.
17. Guest, G.: Food (1988) – "Animal drug residues. Veterinary Medicine". 83: pp 404 –416.

18. Hays, B. W. (1986). "Benefits and risk of antibiotics use in agriculture. En: MOATS, W. A. 1996. Agricultural uses en antibiotics. American chemicals society, Washington D.C.
19. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. (2003) Agricultura y ganadería. En: El sector alimentario en México. ISSN 0188-8374 México 11-64.
20. Jawetz, E., Melnick J. L. Y Adelberg, E. A. (1981). Manual de microbiología médica. Ed. El manual moderno, México, D. F.
21. 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: pp 53 – 56.
22. Levine, R. I. (1988). Estadística para administradores. Ed. Prentice – Hall Hispanoamericana. México.
23. Masztis, P. S. (1984) "Antibiotic Residue Testing in Beef Slaughterhouse". *Can Vet J.*, 25: pp 329 – 330.
24. Miller, D.: (2001). Química de Alimentos, Manual de Laboratorio. Apéndice VI. Electroforesis. Ed. Limusa Miley. Primera Edición. México, pp 165.
25. Moreno, B. (2003). "Higiene e Inspección de Carnes " Tómo II. ED. Díaz de Santos España, pp. 444.
26. Ortega, P. M (1988). Empleo de Antibióticos en Alimentos para Animales y sus consecuencias sobre la salud pública. *La revista de investigación clínica # 40:* pp. 463 – 472.

27. Prescott, J.F., Baggot. J.D (1991). Incorporación de antibióticos a los piensos como estimulantes del crecimiento. En: Terapéutica antimicrobiana veterinaria. Acribia, Zaragoza ; Pp 297-307.
28. Rodríguez, M. Y González G. J. (1998) Tetraciclinas. Acta médica, 8 (1): 75 – 9
29. Secretaría de Agricultura Ganadería Recursos y Pesca "Norma oficial Mexicana NOM-004-ZOO-1994, control de residuos tóxicos en carne, grasa, hígado y riñón de bovinos, equinos, porcinos y ovinos.
30. Secretaría de Agricultura, Ganadería Recursos y Pesca "Consumo per cápita, Consumo nacional aparente ovino y caprino, consumo nacional aparente"
<http://www.sagarpa.gob.mx/Dgg/Dpcar.htm>,
<http://www.sagarpa.gob.mx/Dgg/CNAovi.htm>,
<http://www.sagarpa.gob.mx/Dgg/CNAcap.htm>, ingreso: 19 noviembre 2006.
31. Simal. J. Y Cancho, B. (2000). "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, pp 42.
32. Sumano L. H. Y Ocampo C. L. (2006) Farmacología veterinaria. Ed. Mcgraw-hill interamericana. Méx pg 118 – 122.
33. United States Food and Drug Administration (1990), Center for Veterinary Medicine, Industry information Staff, HFV – 12, 301/443 – 4557. Monitoring for residues in food animals. CVM MEMO., CVMM-19, U.S. Department of health and Human Services, Maryland, pp 1 – 4.
34. USDA. (1989). Official united state standards for grades of carcass beef. USDA, agricultural marketing service, Washington DC, USA.

35. Zamora, B. M.; Yabut, J. M.: "Detection of antibacterial residues in pork using Hemsstoff Test. *Phil. J. Vet. Med.*, 26: pp 3 – 6.
36. Zepeda Cortez J., Oroz Bitar D. (1998) "Determinación de inhibidores microbianos en carne de ovinos y caprinos "Tesis de Licenciatura *Fac. De Med Vet y Zoot. CUCBA. Universidad de Guadalajara.*