

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

DIVISIÓN DE CIENCIAS VETERINARIAS



DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE SUSTANCIAS ANTIMICROBIANAS EN
GALLINAS DE POSTURA

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA PRESENTA:

P.M.V.Z. TANIA MERINO NORIEGA

DIRECTOR:
DRA. DELIA GUILLERMINA GONZÁLEZ AGUILAR

ASESORES:
DR. MICHEL KÜHNE
M.V.Z. MIRIAM SUSANA MEDINA LERENA

LAS AGUJAS, NEXTIPAC, ZAPOPAN, JALISCO, MAYO 2006

Querido Dios:

*Agradezco mucho la Oportunidad de estar aquí y ahora.
De ver terminado lo que era un Sueño y una Ilusión.
De permitirme Seguir, de permitirme Crecer.
De pertenecer a una Familia que me Apoya, me Comprende y me Ama.
De poner en mi camino personas buenas dignas de Admirar y Valorar.*

Gracias por permitirme Confiar, Esperar y Creer.

Gracias por estas Alas con las que inicio el Vuelo.

CONTENIDO

	Página
Resumen.....	X
Introducción.....	1
Planteamiento del Problema.....	7
Justificación.....	8
Hipótesis.....	9
Objetivos.....	10
Material y método.....	11
Resultados.....	18
Discusión.....	23
Conclusiones.....	26
Bibliografía.....	27

Resumen

Los residuos antimicrobianos en los alimentos de origen animal pueden tener un doble efecto implicando riesgos para la salud del consumidor así como la consecuente aparición de cepas patógenas multiresistentes. El objetivo del presente trabajo fue la determinación de residuos de sustancias antimicrobianas al sacrificio por medio del método de la triplaca y determinación de la presencia de tetraciclinas en hueso de gallina de postura por medio de la técnica de luz ultravioleta. Las muestras utilizadas se recolectaron en el Rastro de Aves "Los Gavilanes" en el municipio de Tlajomulco en los meses de abril a junio del 2004. Las muestras fueron procesadas en el área de residuos tóxicos en alimentos del Departamento de Salud Pública de la División de Ciencias Veterinarias del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara. Resultando de los 153 canales para detección de antimicrobianos en tejidos fue en músculo 49 (32%) fueron positivos, 104 (68%) negativos y ningún dudosos y en riñón, 79 (52%) fueron positivos, 55 (36%) negativos y 19 (12%) dudosos. De los 120 hígado muestreados 73 (61%) fueron positivas, 29 (24%) negativas y 18 (15%) fueron dudosas y de los 247 canales para determinación de tetraciclinas en hueso 100% fueron negativos. Los resultados anteriores demuestran que es alto el porcentaje de inhibidores antimicrobianos lo que hace suponer que es frecuente el envío al rastro de animales con residuos antimicrobianos. En hueso se deduce que por el poco tiempo de vida reproductiva de una gallina de postura, ésta no logra acumular suficiente tetraciclina para ser detectada al momento del sacrificio.

Introducción

Los productos avícolas como la carne de pollo y el huevo, representan una fuente de proteína de origen animal que es nutritiva y barata. El pollo en México se comercializa principalmente en canal. El tipo de distribución o presentación es: vivo en 30%, rosticero 23%, mercados públicos 26%, en supermercados 5%, en partes el 11% y productos de valor agregado 5% (Zárate y col., 2004). La carne, vísceras, huesos y plumas de gallinas de postura enviadas al rastro; son procesadas y utilizadas como subproductos en plantas de rendimiento (Lyons, 2001).

Jalisco ocupa el primer lugar con el 11% de la producción nacional proyectada al 2004, México se ubica como el cuarto productor de pollo a escala mundial y su consumo per-cápita es de 22.9 kg (Secretaría de Desarrollo Rural, 2004). En el caso de la producción de huevo Jalisco esta en primer lugar teniendo para esta actividad cerca de 56'835,384 aves de postura, seguido de los estados de Puebla, Sonora, Guanajuato y Yucatán (Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera, 2005).

Se espera que la producción pecuaria y la demanda de productos animales aumenten con rapidez en los próximos 20 años, debido al crecimiento acelerado de la población mundial, y además porque la mayor proporción de ésta se ubica en las grandes ciudades, la ganadería nacional en general demanda de la incorporación de nuevas y mejores tecnologías en la mayoría de los procesos productivos (Zárate y col., 2004).

La industria pecuaria para mantener una producción óptima requiere del uso de sustancias aditivas y antibióticos que durante varias décadas se han utilizado como promotores de crecimiento. El uso de promotores de crecimiento conduce a un incremento del 4 al 5% en el peso corporal de los animales que los reciben (Witte, 1999; Gesche y Rojas, 1987).

Por más de cincuenta años los antibióticos han sido utilizados en forma intensa y satisfactoria, tanto en terapéutica animal como para prevenir enfermedades. Sin embargo, se han presentado muchos problemas, que han obligado a hacer una re-evaluación acelerada y más completa de la situación. Los antibióticos son sustancias producidas por varias especies de microorganismos que suprimen el crecimiento de otros microorganismos y pueden incluso llegar a destruirlos. La presencia de residuos de medicamentos en productos de origen animal debería ser muy fácil de resolver, como se hace en numerosos países; es simplemente un problema de control y disciplina de la industria y los productores (Sumano y Ocampo, 2002).

En México encontramos una gran cantidad de medicamentos con carácter residual disponibles comercialmente que son empleados en aves, bovinos de carne, bovinos de leche, cerdos ovinos y caprinos (Amezquita y col., 1994).

En la industria avícola se utilizan abundantemente fármacos y antibióticos para prevenir un gran número de enfermedades que sufren las parvadas, son utilizados por tres razones principales, ayudan en la promoción y mejora de la conversión alimenticia, ayudan en el tratamiento y prevención de enfermedades. Estos pueden ser administrados a través del alimento, del agua de bebida (Tabla 1). Los antibióticos se utilizan para controlar enfermedades en las aves, sus efectos benéficos se deben a la capacidad de interrumpir varias fases del metabolismo de la célula, y actúan modificando la flora intestinal. Algunos antibióticos se agregan en forma continua y en pequeñas dosis a la ración con el fin de mejorar el crecimiento y la conversión alimenticia (North y Bell, 1993).

La presencia de residuos en alimentos de origen animal puede interferir en la elaboración de productos lácteos y cárnicos fermentados, pero también implica riesgos toxicológicos, microbiológicos e inmunopatológicos para el consumidor (Booth 1988).

En México la NOM-004-ZOO-1994. Grasa, Hígado, músculo y Riñón en Aves, Bovinos, Caprinos, Cérvidos, Equinos, Ovinos y Porcinos. Residuos Tóxicos, Límites Máximos Permisibles y Procedimientos y Muestreo, es de observancia en todo el territorio nacional y tiene por objeto establecer los límites máximos permisibles de residuos tóxicos (Diario Oficial de la Federación, 1994).

Para proteger al consumidor de pollos y huevos la Food and Drug Administration (FDA) Estados Unidos ha marcado tolerancias muy precisas para los residuos de fármacos, el tiempo de eliminación antes de sacrificio para muchos fármacos está dado en el número de días que deben pasar entre el último tratamiento con el fármaco y el día en que los pollos pueden enviarse para el sacrificio (North y Bell, 1993).

Con el fin de lograr un equilibrio entre la utilización de fármacos, con las ventajas que representan y la necesidad de reducir los riesgos que implican los residuos de medicamentos en los alimentos que consume el hombre, se han hecho estudios para determinar a que concentración el consumo de una sustancia o su metabolito no representa riesgo para la salud del consumidor y cuanto tiempo debe transcurrir para que se permita establecer periodos de suspensión o retiro del medicamento previo al sacrificio de los animales, de los límites máximos permitidos de sustancias, así como el desarrollo de métodos de detección de residuos y la implementación de programas de control (USDA). Para la identificación de residuos se emplean métodos microbiológicos, fisicoquímicos y serológicos. Aunque carecen de especificidad de los métodos de tamizaje microbiológico, permite detectar un amplio rango de grupos antimicrobianos en un corto tiempo (24hrs.) comparado con otros métodos a un bajo costo, y sus ventajas los hacen ideales para implementarse como pruebas de tamizaje a nivel rastro, pues ayuda a que los tiempos de detección de canales sospechosas de contener residuos, sean breves (Korsrund y col., 1995).

Lamentablemente los datos sobre la susceptibilidad a los antibióticos son escasos y la vigilancia de la resistencia no se lleva a cabo en todos los países. La

falta de vigilancia lleva a que los antibióticos se distribuyan y se vendan libremente sin prescripción médica (Salvatierra, 2000).

TETRACICLINAS

Las tetraciclinas son antibióticos de amplio espectro con características antimicrobianas similares, aunque difieren entre sí en cuanto a sus espectros y distribución farmacocinética. Existen tetraciclinas naturales y varios derivados semisintéticos. Los tiempos de eliminación permiten clasificarlas en compuestos de acción corta (tetraciclina, oxitetraciclina, clortetraciclina), de acción intermedia (demetilclortetraciclina y metaciclina) y de acción prolongada (doxiciclina y minociclina). Tienen un amplio espectro contra bacterias Gram positivas y Gram negativas. Son un grupo de antibióticos producidos por el género *Streptomyces*, que es la fuente más abundante de antibióticos utilizables para combatir las enfermedades bacterianas en los tejidos animales. Por vía oral, las tetraciclinas se absorben en el estómago y la porción inicial del intestino delgado. Los valores se reducen de modo gradual hasta que solo quedan residuos a las 24 horas y se concentran en hígado las cuales son excretadas en bilis y reabsorbidas por el intestino, gracias a esto persisten en la sangre mucho tiempo después de su administración. Todos los derivados de las tetraciclinas son sustancias cristalinas, amarillentas anfóteras que forman sales con ácidos y bases en solución acuosa. Los componentes tienen afinidad por iones de calcio, de aquí que los residuos llegan a ser depositados en dientes y huesos. Presentan fluorescencia cuando se exponen a la luz ultravioleta (Díaz y Calderón, 1997; Merck, 2000; Sumano y Ocampo, 2002).

USO Y EFECTOS DE LAS TETRACICLINAS:

Las tetraciclinas han sido ampliamente utilizadas para fines terapéuticos y como promotores de crecimiento, a pesar de la advertencia sobre el incremento de la resistencia de microorganismos hacia estas, y de su prohibición como promotores de crecimiento. Actualmente más del 65% de los medicamentos prescritos en

veterinaria son con tetraciclinas (Kühne, 2000). En 1968, su uso como promotores de crecimiento fue discutido porque los científicos fueron alarmados por la alta resistencia que producían. Las tetraciclinas fueron la base terapéutica usada en medicina veterinaria y medicina humana, así como aditivos en alimentos en Europa. En Estados Unidos las tetraciclinas son todavía aceptadas como promotores de crecimiento (De Wasch y col., 1998).

En aves provoca una reducción de los requerimientos de energía y mantenimiento, mejorando la producción de huevo, además de disminuir los problemas ocasionados por el estrés calórico (Sumano y Ocampo, 2002).

El debate científico sobre los posibles riesgos que acarrea para la salud pública el uso de antimicrobianos en los animales productores de alimentos ha durado más de 30 años (Salvatierra, 2000). La utilización indiscriminada de antibióticos como aditivos en el pienso con el fin de estimular el crecimiento y la producción animal tiene varios inconvenientes. El riesgo más grande para la salud de los consumidores que implica la utilización de los antibióticos en los animales no está dada por los residuos, sino por el desarrollo de resistencias en bacterias de los mismos animales. Estas resistencias pueden, dar lugar a fallos terapéuticos en tratamientos veterinarios, y riesgo de transferencia de bacterias residentes de los animales al hombre, o de los genes portadores de información que codifica resistencia de bacterias de animales a bacterias humanas (Errecalde, 2004).

Tabla1. Periodo de eliminación para fármacos y antibióticos

Ingrediente activo	Días de eliminación
Copidol	5
Clorotetraciclina	1
Sulfato de dehidroestreptomicina y sulfato de estreptomicina	30
Furazolidona	5
Monensina	5
Nicarbazina	4
Nitrofurazona	5
Novobiocina	4
Oxitetraciclina	3 (alimento)
Sodio de sulfacilopirazina monohidratada	4
Dihidroclorida de estreptomicina centahidratada	5 (agua)
Sulfato de estreptomicina	4 (agua)
Sulfadimetoxina	5 (agua)
Sulfanitrán y aklomida	5
Sulfaquinoxalina	10
Tilosina	5 (alimento)

Fuente: North y Bell, 1993

Planteamiento del problema

La producción de aves en México durante los últimos diez años ha aumentado a un ritmo de crecimiento anual del 5.6% y el consumo per-cápita se ha incrementado del 19.6 a 23.4 kg entre el 2000-2004.

En nuestro país la gallina de desecho es aprovechada para la elaboración de embutidos y productos procesados. Los subproductos como los huesos son utilizados como suplemento en la alimentación animal y en la fabricación de grenetina. En Jalisco son pocos los estudios sobre la presencia de residuos en gallinas de desecho. Dada la importancia estatal de la producción avícola es importante determinar la situación actual de los residuos.

Justificación

Se han realizado investigaciones para detectar residuos de antimicrobianos en los animales de abasto (bovinos y cerdos), pero se desconoce la situación actual en gallinas de desecho. Por lo cual el presente estudio contribuirá a determinar la presencia de residuos antimicrobianos en músculo, vísceras y hueso que son enviados a plantas de rendimiento.

Hipótesis

En la fase productiva de la gallina de postura se emplea un gran número de antibióticos con fines terapéuticos, profilácticos y promotor de crecimiento. La escasa vigilancia y control sobre el uso de estas sustancias en nuestro país favorece su utilización indiscriminada. Por tanto, es de esperar la presencia de residuos en los tejidos de las gallinas desecho enviadas para consumo.

Objetivo General

Determinar de residuos de sustancias antimicrobianas en gallinas de postura, al sacrificio.

Objetivos Particulares

1. Determinar de residuos de sustancias antimicrobianas en hígado, músculo y riñón de gallina de postura, por el método microbiológico de triplaca.
2. Determinar la presencia de tetraciclinas en hueso de gallina de postura por medio de la técnica de luz ultravioleta.

Material 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 volumen de matanza por mes en aves en el rastro de los Gavilanes, se registraron en enero, febrero y marzo un promedio de 309,347 de aves sacrificadas al mes, de esta cantidad se obtuvo el tamaño de muestra.

con la siguiente fórmula:

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

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

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).

El presente trabajo se realizo en dos etapas:

Etapla I determinación de residuos de sustancias antimicrobianas en hígado, músculo y riñón de gallina de postura por el método microbiológico de la triplaca

La recolección y análisis de las 153 muestras se hicieron, salvo algunas modificaciones que se indican, conforme a la prueba para inhibidores en músculo y riñón (prueba de las tres placas con Trimetoprim), la cual es el procedimiento oficial de la rutina de Alemania, para la detección de inhibidores microbianos en carne (Robert- Von - Ostertag -Institut, 1979).

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

Análisis de muestras:

Se recolectaron asépticamente muestras de 3 cm³ de músculo, riñón e hígado. De cada una de las muestras colectadas con un sacabocados estéril, se cortaron porciones cilíndricas de 8mm de diámetro y 2 mm de alto. En las muestras de riñón, las porciones analizadas fueron tomadas de la medula renal.

Las muestras fueron colocadas en cajas de petri con agar nutritivo ajustado a pH 6, 7.2 y 8 inoculados con esporas *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 microgramos / ml).

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

U.I. de Penicilinas en el medio ajustado a pH 6.0

0.5 mcg de Sulfadiazina en el medio ajustado a pH 7.2

0.5 mcg de Estreptomocina en el medio ajustado a pH 8.0

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 presentaran halos de inhibición de 5 a 10 mm ** procediéndose luego a medir los halos de inhibición observados en las muestras.

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

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

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 que al colocar una muestra de tejido que contenga un inhibidor, sobre un medio nutritivo sólido que contiene una concentración conocida de células bacterianas, el inhibidor se difundirá en el medio de cultivo y formará un halo de inhibición alrededor del tejido. El tamaño de la zona de inhibición es una medida del efecto inhibitorio.

*El procedimiento alemán recomienda 30°C. La incubación se hizo a 35°C porque a está temperatura, con la cepa utilizada, se obtiene un crecimiento más denso y uniforme.

**Los halos promedio de los discos testigos en éste trabajo fueron Penicilinas: 7 mm, Estreptomicina: 8 mm, Sulfametazina: 10 mm.

De acuerdo con Ebrecht, la prueba de las tres placas permite detectar desde:

- 0.01 mcg/ml de Penicilina
- 0.0075 mcg/ml de Ampicilina
- 0.0015 mcg/ml de Tetraciclina
- 0.04 mcg/ml de Aminoglucósidos

0.06 mcg/ml de Tilosina

Por ser un agente sinérgico de las sulfonaminas, la adición de Trimetoprim al medio permite aumentar hasta 100 veces la sensibilidad del microorganismo, permitiendo detectar desde 0.024 mcg/ml de sulfonamidas en tejidos.

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.

El medio se preparó en 3 matraces para ajustar a los distintos pH requeridos: pH 6, 7.2 y 8. Se recomienda preparar volúmenes de 500 ml para facilitar su manejo cuando se adiciona la suspensión de esporas de *B. Subtilis*. Los ingredientes se mezclan con el agua destilada y se agrega 0.1 % de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4). El medio se calienta para obtener una adecuada disolución de los ingredientes, posteriormente se ajusta el pH a 6,7.2 y 8. Para ajustar el pH del medio se utiliza ácido clorhídrico (HCL) o hidróxido de sodio (NaOH). El medio se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

El pH de los medios se 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 le agregaron y mezclaron 0.5 ml de suspensión de *B. Subtilis* a 500 ml. del medio, se obtuvo 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 adicionó 0.5 ml (25 microgramos) de solución de uso de Trimetoprim. De esta forma se obtuvo una concentración de Trimetoprim de 0.05 microgramos/ml. Los medios se vertieron en cajas de petri. El grosor del medio ya solidificado fue de 2 mm (este grosor se obtuvo adicionando 10 ml de medio en cajas de petri de 9 cm de diámetro). 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.

b) Solución de Trimetoprim

1.- Solución Madre

Se colocaron 10 mg de Trimetoprim 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 a usar

Esta solución contiene 50 microgramos de Trimetoprim por mililitro. 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 pueden preparar volúmenes de 200 ml, y 100 ml adicionando 10 ml de solución madre a 190 ml de agua destilada, o bien, 5 ml de solución madre a 95 ml de agua destilada. Otra opción es medir en un matraz volumétrico 0.5 ml de solución madre y completar con 9.5 ml de agua destilada. La solución se puede mantener en refrigeración por máximo de 14 días.

c) Suspensión de esporas*

El *Bacillus subtilis* se sembró 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 centrifugo a 3000 rpm durante 10 minutos y posteriormente se decanto 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 conservo en refrigeración. La densidad de la suspensión obtenida fue de 107 esporas por ml, la cual se determinó mediante la técnica de vaciado en placa.

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

Etapa II Detección visual de la fluorescencia con lámpara de luz ultravioleta en fémur de gallina de postura

Se recolectaron un total de 247 huesos de fémur que fueron identificados y transportados en bolsas de plástico, donde se mantuvieron en refrigeración (4 – 7°C) hasta su análisis.

Método de detección visual de la fluorescencia con luz ultravioleta:

Para su análisis los huesos ya debidamente identificados se limpiaron minuciosamente separando la grasa, periostio y posteriormente fueron examinados visualmente en un cuarto oscuro usando una lámpara de luz ultravioleta (UV) (366 nm, 4w: Merck Nr. 13203) (Künhe- Ebrecht, 1993). La fluorescencia en los huesos con residuos de tetraciclinas es color amarilla, a mayor superficie del hueso que muestre fluorescencia, mayor será la concentración de esta sustancia.

La intensidad de la fluorescencia se clasificó de la siguiente manera:

- Positivo (+) extensión de la fluorescencia en un área < 20%
 - Positivo (+ +) extensión de la fluorescencia en un área de 20% a 80%
 - Positivo (+ + +) extensión de la fluorescencia en un área > 80%
- (Kühne 2000)

Después los huesos positivos se partieron en fragmentos que se dejaron secar a medio ambiente durante 24 horas, posteriormente se verificó si hubo una exposición temprana a tetraciclinas por medio de luz ultravioleta.

El grado de intensidad de la fluorescencia de los huesos fue documentado en hojas de registro de resultados.

Resultados

La frecuencia de los residuos antimicrobianos en tejidos fue investigado usando el método microbiológico de triplaca con Trimetropim y en la frecuencia de tetraciclinas en hueso de gallina de postura con la detección de fluorescencia con lámpara de luz ultravioleta.

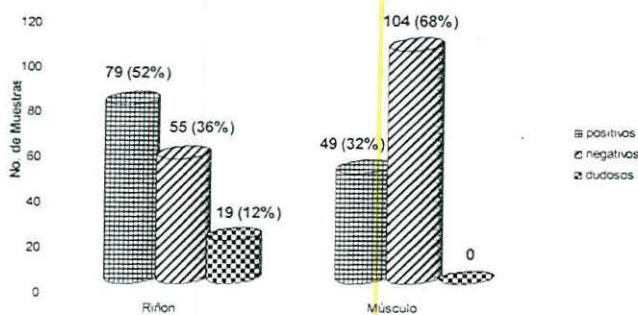
Etapa I Determinación de residuos de sustancias antimicrobianas en hígado, músculo y riñón de gallina de postura por el método microbiológico de la triplaca

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

De las 153 muestras de canales de gallina de postura analizadas con el método para residuos de antimicrobianos, se obtuvieron en músculo 49 (32%) fueron positivos, 104 (68%) negativos y ningún dudosos y en riñón, 79 (52%) fueron positivos, 55 (36%) negativos y 19 (12%) dudosos (Figura 1). En hígado 73 (61%) muestras fueron positivas, 29 (24%) negativas y 18 (15%) dudosas (Figura 2).

El tamaño de las zonas de inhibición en muestras positivas osciló entre 3mm y 6 mm predominando los halos 3mm y 4mm (Figura 3). En hígado se observaron halos de inhibición entre 3mm y 7mm predominando los halos entre 4mm y 6mm (Figura 4). Los medios con mayor número de muestras positivas que se detectaron fueron el ajustado a pH 7.2 y pH 6 con 154 y 94 muestras positivas respectivamente, siendo el riñón el tejido con más resultados positivos (Figura 5). En el caso de músculo y riñón el mayor número de muestras positivas se observaron en el medio ajustado a pH 7.2 mientras que en hígado fue a pH 6 (Figura 6).

Fig.1 Comportamiento a la prueba inhibidores en canales de gallina de postura (n = 153)



0 Halo de inhibición:
 < 1 mm = negativo
 1-2 mm = dudoso
 > 2 mm = positivo

Fig.2 Comportamiento a la prueba inhibidores antimicrobianos en hígado (n = 120)

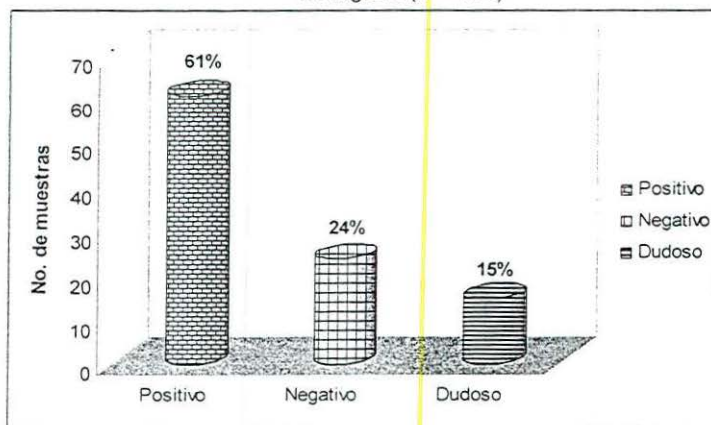


Fig.3 Halos de inhibición observados en músculo y riñón (n = 79)

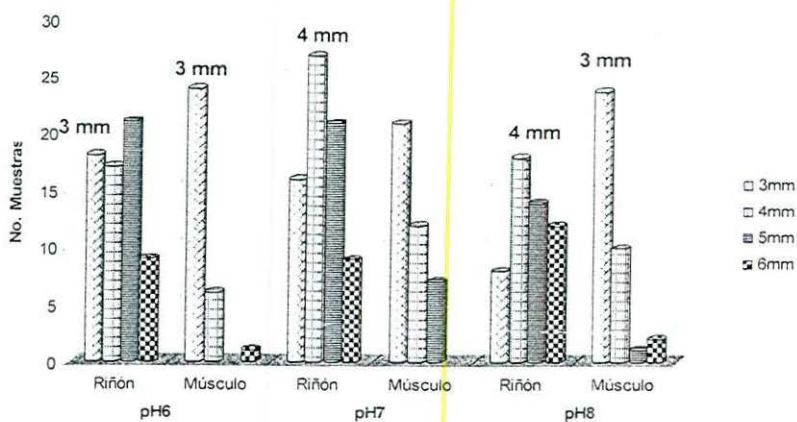


Fig.4 Halos de inhibición observados en hígado (n = 73)

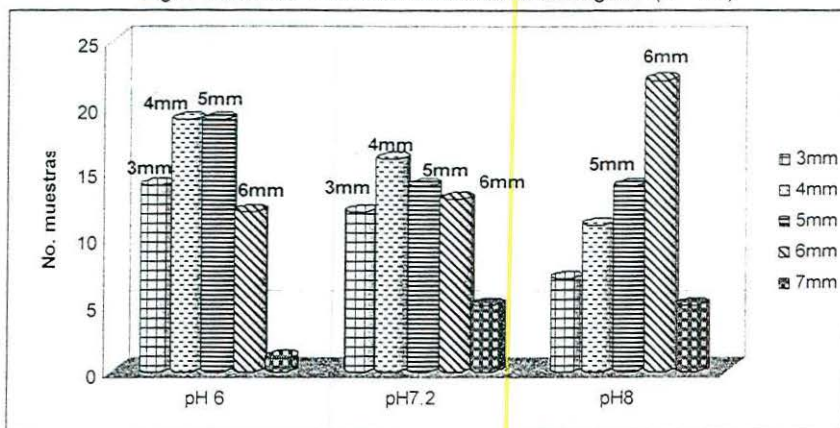


Fig. 5 pH de los medios en el que se detectaron las muestras positivas en gallina de postura en músculo y riñón (n = 79)

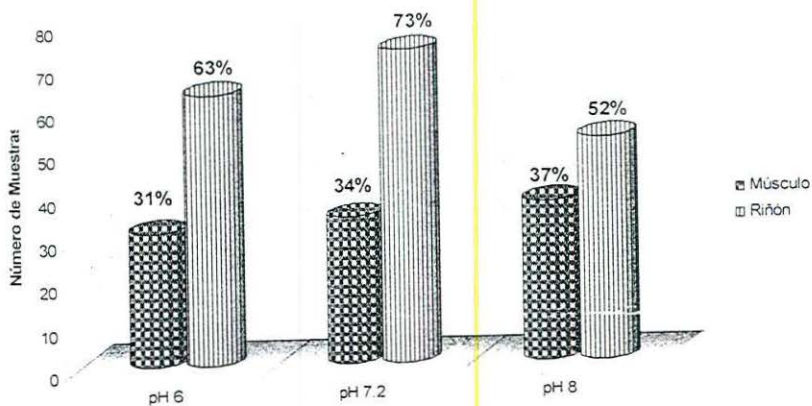
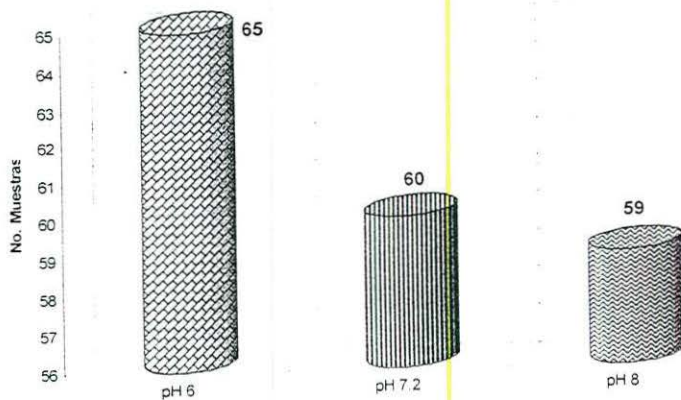


Fig.6 pH en el que se detectaron las muestras positivas en hígado en gallina de postura (n = 73)



Etapa II Detección visual de la fluorescencia con lámpara de luz ultravioleta en fémur de gallina de postura

Con este método la medición de la intensidad de la fluorescencia de los huesos, se consideró de la siguiente manera:

- Positiva (+): La extensión de la fluorescencia se detectó en un área < 20 %.
- Positiva (++) : La extensión de la fluorescencia se detectó en un área entre 20 y 80 %.
- Positiva (+++) : La extensión de la fluorescencia se detectó en un área < 80%.
- Negativa (-): Cuando no se detectó fluorescencia.

En este estudio, las 247 muestras de fémur de gallina de postura que fueron estudiadas en el primer semestre de 2004, fueron todas negativas (Tabla 1).

Tabla 1.
Detección de residuos de TTC en hueso de gallina
por medio de la luz ultravioleta n(247)

Fluorescencia	(+)	(++)	(+++)	Negativo
No. Animales	0	0	0	247
%	0	0	0	100

Interpretación

Área fluorescencia del hueso < 20%

Entre 20% a 80% = (+ +)

> 80% = (+ + +)

Discusión

En México la detección de residuos tiene como finalidad obtener carne con la calidad sanitaria requerida internacionalmente para su exportación y consumo. Actualmente se dispone de diversos métodos de análisis cuantitativos para la detección de inhibidores bacterianos en alimentos, sin embargo como método de control rutinario se utilizan ampliamente los métodos de tamizaje microbiológico que aunque carecen de especificidad permiten detectar un amplio rango de grupos de antimicrobianos en 24 horas, y comparado con otras técnicas, a un bajo costo. Estos pueden implementarse como pruebas de tamizaje a nivel rastro, pues tienen la ventaja de que requieren poco tiempo en su proceso. Los rastros municipales en México tienen en términos generales un común denominador, esto es, no se efectúa, entre otras cosas, una inspección sanitaria adecuada de los animales sacrificados y no se realizan exámenes para detectar residuos. Por esta razón es muy probable que llegue hasta el consumidor la carne y otros tejidos comestibles, que conforme la legislación y las normas sanitarias, no sean aptos para consumo humano. Por otro lado, en nuestro país se pueden encontrar un gran número de medicamentos con carácter residual disponibles comercialmente que son empleados en aves, bovinos, cerdos, ovinos y caprinos. La NOM-032-ZOO-1996, Determinación de antibióticos en hígado, músculo y riñón de bovino, ovino, equino, porcino, aves, caprino y cérvidos por la prueba de torunda y por bioensayo, en su objetivo establece el método de prueba para la determinación de antibióticos en hígado, músculo y riñón de bovinos, ovinos, porcinos, aves, caprinos y cérvidos. Esta prueba no se lleva a cabo en los establecimientos de sacrificio y raramente se realizan monitoreos por parte de las autoridades de salud.

De este modo, el presente estudio aporta datos importantes sobre la situación de la contaminación de los huesos y canales de gallina de desecho destinadas, entre otras, a la producción de embutidos y suplementos minerales.

Los resultados en el presente estudio mostraron que en riñón se presentaron la mayoría de los resultados positivos. En músculo se detectaron el menor número de resultados positivos. 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.

El alto número de muestras positivas en riñón indica que los animales estuvieron expuestos a los antimicrobianos pocas semanas antes de ser enviados al sacrificio.

Se asume que la tasa de residuos en hígado en relación al músculo es de 3 a 1, siendo un órgano de desintoxicación. Contiene de 2 a 5 mayor cantidad de residuos que la concentración presente en músculo.

En la detección de residuos de antibióticos por el método microbiológico de inhibición en placa se emplean tres diferentes pH (pH 6, 8 y 7.2). Los macrólidos y aminoglucósidos son mucho más activos a un pH alcalino (pH 8) que a un pH ácido, mientras que las penicilinas lo son a pH 6 y en las sulfonamidas la solubilidad se eleva conforme el pH aumenta.

El pH en el que se detectaron el mayor número de muestras positivas fue de 6 y 7.2, lo cual podría indicar que probablemente los animales estudiados llegaron al sacrificio conteniendo residuos de penicilina y sulfonamidas.

En el presente trabajo con 79 canales resultaron positivas. Esto coincide con el dato del Plan Nacional de Residuos que se llevó a cabo en Portugal en donde encontraron que de las 167 muestras de pollo, 82 fueron positivas (Organización de consumidores y usuarios, 2003). La Soil Association del Reino Unido ha elaborado un informe en el que constata, según cifras del gobierno británico, un incremento del número de huevos con residuos del antibiótico lasalocid, que en ocasiones se incorpora a los piensos utilizados por los ganaderos en la alimentación animal.

Según el informe el porcentaje de huevos en los que se han encontrado residuos de antibióticos ha aumentado del 1% en 1999 al 12% en el 2003. El uso de éste antibiótico está permitido en los piensos para gallinas, pavos, faisanes y codornices destinados a carne. Sin embargo, no está permitido su uso en gallinas ponedoras (Anonymus, 2004). En otro estudio realizado en Francia demuestra que la administración de sulfonamidas en gallinas de postura produce un rápido y sustancioso incremento de residuos de éstas en huevos, especialmente en la albúmina (Roudaut y Garnier, 2002).

El abuso de antibióticos como aditivo alimenticio puede provocar bacterias resistentes a estos medicamentos poniendo en riesgo la salud de los consumidores. Muchos de los antibióticos usados en las granjas, como las penicilina, tetraciclina y eritromicina son los mismos o parecidos a los prescritos para el tratamiento de un gran número de infecciones en los humanos. Las bacterias pueden desarrollar resistencia a uno o más antibióticos, lo que crea un serio problema de efectividad en el tratamiento médico de las personas infectadas (Antibiotica in Geflügelfleisch).

Varios estudios han evidenciado la presencia de residuos de antibióticos en aves de consumo. Consideramos que medidas como la prohibición legal no bastan para asegurar que no se usen estas sustancias. Es preciso poner en marcha sistemas de control rigurosos y fiables que garanticen la seguridad de los consumidores.

La presencia de residuos en los tejidos animales ha sido atribuida principalmente a no respetar el tiempo que debe transcurrir desde la última aplicación de un medicamento hasta cuando el animal se sacrifica, o bien al consumo de alimento medicado por animales que no debían consumirlo, este último puede ocurrir por un error en la distribución de alimento o por presencia de medicamentos en el equipo donde se prepara el alimento (Guerrero, 1997).

Conclusiones

La detección de residuos antimicrobianos en tejidos de gallinas ponedoras de desecho indica que probablemente estuvieron expuestas a tales sustancias por error o negligencia poco tiempo antes de ser enviadas al sacrificio.

El método microbiológico de la triplaca es un procedimiento sencillo y rápido para detectar sustancias antimicrobianas en tejidos de gallina de postura.

No se detectó la presencia de residuos de tetraciclinas en los huesos de las gallinas muestreadas en el presente estudio.

Bibliografía

1. Anonymus, 1982, Detection of antibiotics and chemotherapeutic in meat. Discusion of Finnish Ministry of Agriculture and Forestry.
2. Anonymus, 2004, El Reino Unido detecta Residuos de antibióticos en huevos.
3. Anonymus, Antibiotica in Geflügelfleisch, www.bell.ch/antibiotika_im_gefluegel.
4. Amézquita R. H., L. Barcena, A. Figueroa, J. L. Majarro, y G. Saad. 1994. Investigación Documental sobre periodos de retiro de medicamentos con carácter residual que son usados en animales proveedores de alimentos al hombre. Tesis profesional de Licenciatura. Universidad de Guadalajara, México.
5. Errecalde O. Jorge, 2004, Uso de antimicrobianos en animales de consumo, FAO, Págs 5-65.
6. De Wasch K, y col. 1998, Detection de residues of tetracyclines antibiotics in pork and chicken meat; correlation between results of screening and confirmatory test. The Analyst, Vol 123, Pages. 2737-2741.
7. Diario Oficial de la Federación, 1994, SECRETARIA DE AGRICULTURA Y RECURSOS HIDRAULICOS, Norma Oficial Mexicana NOM-004-ZOO-1994, 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, Págs. 10 – 24.
8. Gesche y Rojas, 1987, Detección de residuos de antibióticos en aves tratadas experimentalmente con dosis terapéuticas. Instituto de Medicina Preventiva Veterinaria. Universidad de Austral de Chile, Págs 4-7.

9. Guerrero, G. H.;1997, Detección de Residuos Antimicrobianos en tejidos de bovinos y cerdos por el método de triplaca, Tesis de Licenciatura, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, División de Ciencias Veterinarias, Universiada de Guadalajara, Zapopan, Jalisco, Pág. 1 - 5.
10. Honkel Karl O; Schmidt Udo, Wolterdorf Wolfgang, Leistner Lothar,1978, Effect of storage and processing on tetracyclines residues in meat and bones. Association of Official Analytical Chemists, Inc. Vol. 61 No. 5, Págs.1222 - 1227.
11. Koenen-Dierick, et al. 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, Págs. 77 - 82.
12. Körner Ute., Kühne Michael, and Siegfried Wenzel, 2001, Tetracycline residues in meat and bone meals. Part 1: Methodology and examination of field samples, Food Additives and Contaminants, Vol. 18 No.4, Págs. 293 - 302.
13. Kühne Michael; Wegmann S., Kobe A., Fries R., 2000, Tetracyclines residues in bones of slaughtered animals, Food Control 11, Págs.175 - 180.
14. Kühne Michael, Anika T. Mitzcherling;2004, Zum Eintrag von gebundenen Tetracyclin-Rückständen in die Nahrungskette- Ein Beitrag zur Gefahrenidentifikation, Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 117, Págs. 2 - 7.
15. Kühne Michael, and Ebrecht A., 1993, The detection of fluorescence in bones – a suitable screening for tetracyclines. Euro Residues II, Conference and residues of Veterinary drugs in food. Veldhoven the Netherlands, 3 -5. May 1993, Págs. 429 - 432.

16. Kühne Michael, Ute Körner and Siegfried Wenzel. Tetracycline residues in meat and bone meals. Part 2: The effect of heat treatments on bound tetracycline residues, Food Additives and Contaminants, 2001, Vol. 18 No. 7, Págs. 593 - 600.
17. Kühne Michael, et al 2000, Tetracyclines residues in bones of Slaughtered animals, Food Control 11, Págs. 175-180.
18. Lyons, Jesse L., 2001, Spend Hen Utilization, Midwest Poultry Federation Egg, Dept of Animal Sciences, University of Missouri.
19. North, y Bell, 1990, Manual de Producción Avícola, editorial Manual Moderno, Tercera Edición, Págs. 697-705
20. Organización de consumidores y usuarios, 2003, Pollos con residuos www.ocu.org/map/show/4941/src/41451.htm
21. Roudaut, B y Garnier, M, 2002, Sulphonamide residues in eggs following drug administration via the drinking water.
22. Salvatierra Roxane, et al 2000, Resistencia antimicrobiana en las Américas Magnitud del problema y su contención. Organización Panamericana de la Salud, Págs. 258-266.
23. Secretaría de Desarrollo Rural, 2004, Cadena Carne de Pollo.
24. Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y pesquera (2005), www.siea.sagarpa.gob.mx/av.compec-pobqan.html

25. Sumano y Ocampo, 2002, Farmacología Veterinaria, editorial, McGraw-Hill Interamericana, Págs, 95-100,148-160, 205-212.
26. Witte Wolfgang, 1999, Uso de antibióticos en la producción animal y desarrollo de la resistencia en las infecciones humanas. Enfermedades infecciosas y Microbiología, Vol. 19 Núm 2, Págs 83-86.
27. Zarate y col. 2004, Producción de Pollo para Carne en México (1980-2002) Estudio Descriptivo y Análisis de la Cadena Productiva Responsable, Departamento de Zootecnia, Universidad Autónoma Chapingo. http://www.economia.gob.mx/pics/p/p1763/POLLO_040304.pdf.
28. (Pollos con residuos, Organización de consumidores y usuarios, 2003).www.ocu.org/map/show/4941/src/41451.htm).