

DETECCIÓN DE RESIDUOS ANTIMICROBIANOS EN TEJIDOS COMESTIBLES Y TETRACICLINAS EN HUESO DE CERDO

Miriam Susana Medina, Delia Guillermina González y A. Ramírez

Dpto. Salud Pública, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA),
Las Agujas Nextipac, Zapopan Jalisco, México, correo electrónico: msuemi@yahoo.com

RESUMEN: Se investigó la presencia de residuos de antimicrobianos en tejidos y tetraciclinas en huesos de cerdos en el Matadero Municipal de la zona Metropolitana de Guadalajara, México. El estudio se realizó en tres etapas por dos métodos diferentes. La primera etapa tuvo como propósito investigar la frecuencia de cerdos positivos a tetraciclinas y arrojó que de 277 canales examinados 47% fueron positivos. En la segunda se realizó la detección visual de fluorescencia en muestras de fémur, húmero y costilla de cerdos. De las 172 muestras de hueso analizadas 81% fueron positivas. En la tercera se investigó la presencia de residuos de antimicrobianos en tejidos por el método microbiológico de las tres placas. De los 62 cerdos estudiados, 50% fueron positivos, 27,4% negativos y 22,6% dudoso, resultaron a su vez positivas en riñón 41,9%, en músculo 54,8%, y en hígado 66,1%. Los resultados obtenidos indicaron que es elevado el porcentaje de animales donde se detectaron tetraciclinas y sustentan que el envío al matadero de animales con residuos de antimicrobianos es frecuente.

(Palabras clave: residuos; antimicrobianos; tejidos; tetraciclinas; huesos; cerdos)

DETECTION OF ANTIMICROBIAL RESIDUES IN ANIMAL TISSUES AND TETRACYCLINES IN BONES OF PIGS

ABSTRACT: The presence of antimicrobial residues in tissues and tetracyclines in bones of pigs was researched in the slaughter house of the Metropolitan Zone of Guadalajara, Mexico. The study was organized in three stages using two different methods. The first stage researched the frequency of tetracyclines in pigs. From 277 pig carcasses tested, the 47% was positive to tetracyclines. In the second stage, the fluorescence visual detection in samples of femur, humerus and rib of pigs was conducted. From 172 bone samples, the 81% was positive. In the third stage, the presence of antimicrobial residues in tissues was researched using the three-plate microbiological method. From 62 pigs analyzed, the 50% was positive, the 27,4% negative and the 22,6% was uncertain. Kidney, muscle and liver samples were 41,9%, 54,8% and 66,1% positive respectively. The incidence of antimicrobials in contaminated animals detected in this study showed evidences that slaughter is commonly carried out in animals containing antimicrobial residues at the Guadalajara's slaughter house.

(Key words: residues; antimicrobials; tissues; tetracyclines; bones; pigs)

INTRODUCCIÓN

El uso intensivo de antibióticos en la producción de carne de cerdo es una práctica en las granjas de México y se utilizan para aumentar su productividad y rentabilidad. La utilización de promotores de crecimiento conduce a un incremento del 4 al 5% en el peso corporal de los animales que los reciben (19).

La utilización indiscriminada de antibióticos como aditivos en el alimento con el fin de estimular el crecimiento tiene varios inconvenientes. El riesgo más grande es para la salud de los consumidores por el desarrollo de resistencia de los microorganismos a los antibióticos. Esta resistencia da lugar a fallos terapéuticos en tratamientos veterinarios, y riesgo de transferencia de bacterias resistentes de los anima-

les al hombre, o de los genes portadores de información que codifica resistencia de bacterias de animales a bacterias humanas (4).

La resistencia de las bacterias a los antibióticos es un problema grave en el mundo, particularmente en América Latina. Lamentablemente los datos de susceptibilidad a los antibióticos son escasos y la vigilancia de la resistencia no se lleva a cabo en todos los países (15,16).

Para la identificación de residuos se emplean métodos microbiológicos, fisicoquímicos y serológicos. Aunque carecen de especificidad, los métodos de tamizaje microbiológico (prueba de las tres placas con Trimetoprim), permiten detectar un amplio rango de grupos de antimicrobianos en un corto tiempo (24 horas) comparado con otros métodos, con un bajo costo, que los hacen ideales como pruebas de tamizaje a nivel de matadero, pues ayuda a que los tiempos de detección de canales sospechosos de contener residuos, sean breves (9).

En México existe 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 (1), siendo muy utilizadas en este sentido las tetraciclinas. Son numerosas las propiedades que hacen de las tetraciclinas excelentes agentes terapéuticos, lo que ha favorecido que exista un uso intensivo de las mismas, tanto en terapia como en control y profilaxis de infecciones bacterianas en humanos y animales en los últimos años (17).

Actualmente en la Comunidad Europea, el 67% de los antibióticos utilizados terapéuticamente en la producción animal, son tetraciclinas. Su extensa utilización tiene como consecuencia la aparición de residuos en los alimentos de origen animal y en hueso: los huesos son ampliamente utilizados como materia prima para la elaboración de harina de carne y hueso y gelatina (11, 8).

Debido a las propiedades quelantes de las tetraciclinas y su afinidad por el calcio óseo, los huesos pueden contener residuos de estas en concentraciones superiores a los 50 mg/kg. Estudios recientes han demostrado que las tetraciclinas pueden ser liberadas en el organismo y quedar nuevamente biodisponibles, además de que pueden formarse varios productos tóxicos de la degradación de las tetraciclinas durante el calentamiento. Por otra parte, en soluciones ácidas utilizadas en la producción de gelatina a partir de hueso se han encontrado altas concentraciones de tetraciclinas, y ya que estas soluciones se procesan como fuen-

te de fosfato dicálcico para uso como suplemento en la alimentación animal y como fertilizante en la agricultura, el riesgo de reciclaje de estos residuos en la cadena alimentaria es elevado (11, 13).

Por todo lo anterior, el objetivo de este trabajo fue determinar la presencia de antibióticos en tejidos de cerdo y residuos de tetraciclinas en hueso de cerdo.

MATERIALES Y MÉTODOS

El muestreo se realizó en los meses de febrero a Julio del 2004. De acuerdo al volumen de matanza por mes se obtuvo el tamaño de muestra representativa preliminar de 277 canales de cerdos que fueron examinadas después de la inspección en el Matadero Municipal de Guadalajara, México durante un período de 30 días. Se utilizó como método de monitoreo o "screening" una lámpara de luz ultravioleta para detectar la fluorescencia de las tetraciclinas a 366 nm según el método de Kühne y Ebrecht, 1993 (12). De acuerdo al método, como primera etapa del estudio en los cerdos se procedió a iluminar las canales con la lámpara de luz UV haciendo oscuro el interior de la canal con una manta negra, ya que los canales de cerdos no permanecen en refrigeración y no se cortan a la mitad, en este caso sólo fue posible iluminar las costillas, por lo que el resultado se tomó como positivo ante cualquier área fluorescente.

En una segunda etapa, de acuerdo con el volumen de matanza de cerdos por mes, se obtuvo una muestra de 172 cerdos para la detección visual de la luz ultravioleta. Se recolectaron huesos de fémur, húmero y costilla. Los huesos fueron debidamente identificados y transportados en bolsas de plástico, se mantuvieron en refrigeración 4–7°C hasta su observación. Los huesos ya debidamente identificados se limpiaron minuciosamente separando la grasa y periostio y posteriormente fueron examinados visualmente en un cuarto oscuro usando una lámpara de luz ultravioleta (UV) (12). La fluorescencia en los huesos con residuos de tetraciclinas es de color amarillo, 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%

En la tercera etapa del trabajo, salvo algunas modificaciones que se indican, se realizó la recolección y el análisis de las muestras de tejidos para la detección de antimicrobianos según la prueba de inhibidores en músculo y riñón (prueba de las tres placas con Trimetoprim), la cual es el procedimiento oficial de rutina en Alemania, para la detección de inhibidores microbianos en carne (14). 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, conservación y del posible residuo antimicrobiano. Después se procedió a su análisis.

Para el análisis de las muestras se recolectaron asépticamente muestras de 3 cm³ de músculo, riñón e hígado. De cada una de las muestras colectadas se cortaron con un sacabocados estéril, porciones cilíndricas de 8mm de diámetro y 2 mm de alto. En las muestras de riñón, las porciones analizadas fueron tomadas de la médula renal. Las muestras fueron colocadas en cajas de Petri con agar nutritivo ajustándolo a pH 6, 7.2 y 8 posteriormente fueron 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) para la detección de sulfonamidas.

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.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 Estreptomicina 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 presentarán 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 fue considerada 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

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la primera etapa, el estudio preliminar en el Matadero Municipal de Guadalajara, con una muestra de un total de 277 canales de cerdo reveló 130 (47%) positivos y 147 (53%) negativo, lo que demostró que había una elevada presencia de residuos.

Por otro lado, de los 172 cerdos muestreados durante los meses de febrero a julio del 2004, 139 (81%) fueron positivos y 33 (19%) fueron negativos. La cantidad de fluorescencia en los huesos positivos se muestra en la Tabla 1.

De la segunda etapa, se conoce que el método de detección visual usando la lámpara de luz ultravioleta puede dar resultados positivos a dosis de 50 μ g de oxitetraciclina kg⁻¹ de tejido óseo (10), por lo que los resultados obtenidos del muestreo preliminar y mostrados en la tabla 1 demuestran que con el método de detección de fluorescencia, es posible a nivel matadero detectar concentraciones de tetraciclinas en canales sospechosas. El 40% de los huesos analizados en este estudio fueron positivos a +++ cruces. Esto indica que probablemente la última administración con tetraciclinas a los animales de donde se obtuvieron las muestras, fue realizada pocos días o semanas antes del sacrificio. Durante el análisis de los huesos de cerdo recolectados, se pudo observar con frecuencia una fluorescencia en forma de anillo en áreas más profundas de las capas del hueso; lo cual podría ser el resultado de aplicaciones realizadas en etapas tempranas de la producción, es decir mucho antes de que los animales fueran enviados al sacrificio.

La concentración de las oxitetraciclinas (OTC) depende de la edad de los animales presentándose alta incidencia en lechones y menor en cerdas. Durante el período de producción pueden ocurrir enfermedades respiratorias en las granjas y esto es una razón para tratar con antibióticos a los animales. La dispersión de los niveles de residuos encontrados en este estudio podría ser el resultado de tratamientos terapéuticos realizados de manera individual o a la administración de las tetraciclinas en el alimento o el agua. Considerando los pocos trabajos que se han publicado sobre la presencia de residuos de tetraciclinas en hueso en México, el presente trabajo aporta importantes datos sobre esta área de investigación.

En la tercera etapa se encontró que de los 62 cerdos estudiados por el método de tres placas, 31 (50%) fueron positivos, 17 (27.4%) negativos y 14 (22.6%) dudosos (Fig. 1). El mayor número de mues-

TABLA 1. Detección de residuos de tetraciclinas en hueso de cerdo por medio de la luz ultravioleta n(172)./ *Detection of tetracycline residues in bones by UV (n=172)*

Fluorescencia	(+)	(++)	(+++)	Negativo
No. Animales	44	24	71	33
%	26	14	40	19

Área fluorescencia del hueso < 20%

Entre 20% a 80% = (+ +)

> 80% = (+ + +)

tras positivas se observó en el medio ajustado a pH 7.2 con 27 muestras (Fig. 2), lo que quiere decir que los cerdos positivos contenían en su mayoría sulfonamidas y que el riñón es una víscera que concentra mayores cantidades de estas sustancias. En el riñón se detectaron 26 (41.9%) muestras positivas, negativas 25 (40.3%) y dudosas 11 (17.8%). En músculo 34(54.8%) muestras fueron positivas, 14 (22.6%) negativas y 14 (22.6%) dudosas, en hígado 41 (66.1%) fueron positivas, 13 (21%) negativas y 8 (12.9%) fueron dudosas (Fig. 3).

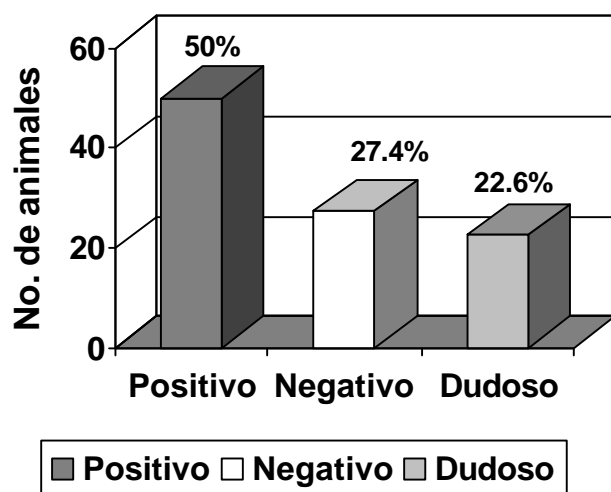


FIGURA 1. Incidencia de inhibidores en tejidos de cerdos analizados./ *Incidence of inhibitors in pig tissues.*

La Norma Oficial Mexicana (NOM-004-ZOO-1994), sobre la detección y control de residuos publicada en agosto de 1994, tiene por objeto establecer las bases para la detección y control de los límites máximos permisibles de residuos tóxicos en tejidos alimenticios primarios de origen animal y es aplicable a la carne, grasa, hígado y riñón de bovinos, equinos, porcinos y ovinos, provenientes de establecimientos de sacrificio ubicados en el país o cuando estos sean de importación, en una planta aprobada por la Secre-

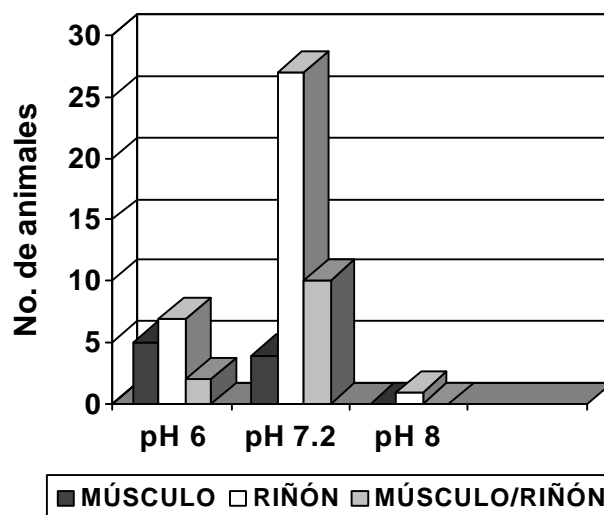


FIGURA 2. pH en el que se detectaron las muestras positivas de cerdo./ *pH in which the positive samples of pig were detected.*

taría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (3). Por tanto los resultados del presente estudio nos muestran la frecuencia de residuos antimicrobianos en animales sacrificados en el matadero después de la entrada en vigor de esta norma para el control de residuos en carne para el consumo nacional.

Tomando como referencia que los Estados Unidos FSIS/ USDA, considera una frecuencia del 4% de residuos es inaceptable (5), los porcentajes de positividad encontrados así como los obtenidos en otros estudios realizados en México hacen suponer que en nuestro medio, el envío al matadero de animales con residuos antimicrobianos es frecuente y constituye un problema que requiere atención.

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 hasta cuando el animal se sacrifica, o bien al consumo de alimento medicado por animales que no debían consumirlo, esto ultimo puede ocurrir

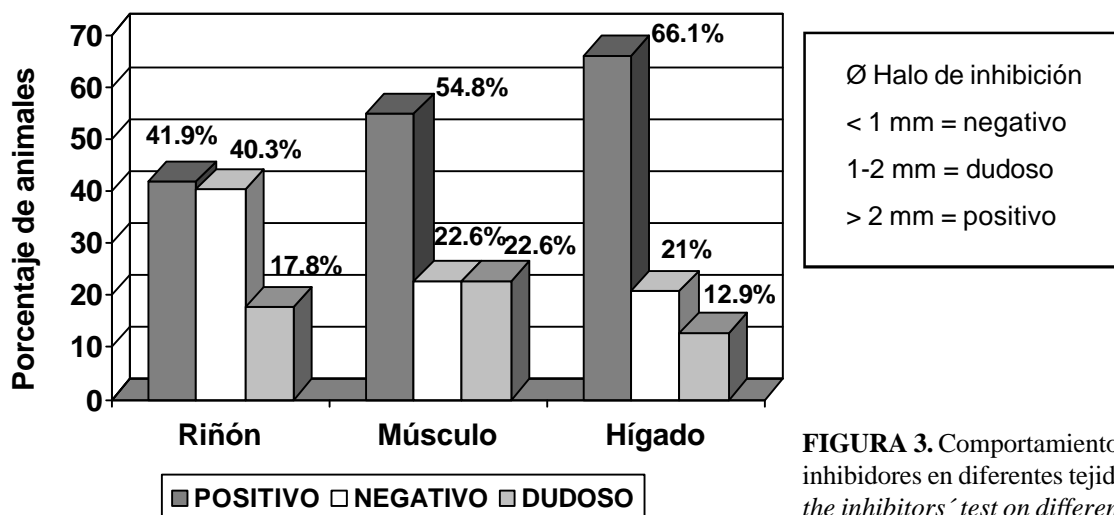


FIGURA 3. Comportamiento de la prueba de inhibidores en diferentes tejidos./ *Behavior of the inhibitors' test on different tissues.*

por un error en la distribución o por la presencia de residuos del medicamento en el equipo donde se prepara (2).

La mayoría de las sustancias son eliminadas rápidamente del tejido muscular, por lo que las muestras de músculo positivas evidencian más un nivel farmacológico que un nivel de residuos (7).

La frecuencia con que se encontraron muestras positivas en este trabajo fue mayor a las reportadas para riñón de los animales sacrificados en el matadero de Tlaquepaque lo que hace suponer que era frecuente el envío de animales al matadero de Guadalajara, sin respetar los tiempos de espera para la eliminación de los medicamentos.

La difusión de los diferentes grupos de antimicrobianos se favorece a determinados pH. Los macrólidos y aminoglucidos 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 al pH 7.2. (6,18).

La frecuencia alta de residuos en las muestras analizadas podría ser atribuida al uso intensivo de antibióticos en las granjas de cerdo. Práctica efectuada en nuestro medio.

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

El 66 % de las muestras positivas fueron detectadas en hígado a pH 7.2. Lo que hace suponer que los cerdos fueron tratados mayormente con sulfas. De-

bido a que el hígado es el órgano encargado del metabolismo de la mayoría de las sustancias tóxicas, es de esperar concentraciones altas en este tejido. Además conociendo que en México las costumbres alimenticias permiten aprovechar no solo la masa muscular del cerdo, sino también las vísceras, sería recomendable continuar realizando estudios de detección de residuos en este órgano.

Los tejidos con mayor concentración de residuos fueron en riñón e hígado. La concentración de un antibiótico expresada en una zona de inhibición no puede ser calculada con precisión. Por tanto el resultado positivo arrojado con los métodos de inhibición debería ser confirmada con un posterior análisis químico.

Es posible que la causa de los residuos antimicrobianos detectados en cerdos se deba a la falta de vigilancia del periodo de retiro previo al envío de los animales al sacrificio.

REFERENCIAS

1. Amézquita, R.H.; Barcena, L.; Figueroa, A.; Majarro, J.L.; Saad, G. (1994): Investigación Documental sobre períodos 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.
2. Bevill, R.F. (1984): Factor influencing the occurrence of drug residues in animal tissues after the use of antimicrobial agents in animal feeds, *JAVMA*. 185:1124-1126.

3. 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, P. 10 - 24
4. Errecalde, O.J. (2004): Uso de antimicrobianos en animales de consumo. *FAO*. p. 5-65.
5. Guest, G. (1998): Food – animal drug residues. *Vet. Med.* 83: 404-416.
6. Jawetz E.; Melnick, J.L.; Adelberg, E.A. (1981): *Manual de Microbiología Médica*, editorial Manual Moderno, México, D.F.
7. Koenen-Dierick (1995): A one-plate microbiological screening test for antibiotic residue testing in kidney tissue and meat: an alternative to the EEC four-plate method. *Food Additives & Contaminants*. 12: 77-82.
8. Körner, U.; Kühne, M.; Siegfried, W. (2001): Tetracycline residues in meat and bone meals. Part 1: Methodology and examination of field samples, *Food Additives & Contaminants*. 18(Suppl. 4): 293-302.
9. Korsrud, G.O.; Craig, D.C.; Salisbury, C.D.; Fesser, A.C.E.; Macneil, J.D. (1995): Laboratory evaluation of the Charm Farm Test for antimicrobial residues in meat. *J. Food Prot.* 58:1129-1132.
10. Kühne, M.; Wegmann, S.; Kobe, A.; Fries, R. (2000): Tetracycline residues in bones of slaughtered animals. *Food Control*. 11: 175-180.
11. Kühne, M. y Mitzcherling, Anika T. (2004): Zum Eintrag von gebundenen Tetracycline Rückständen in die Nahrungskette- Ein Beitrag zur Gefahrenidentifikation, Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 117: 2-7.
12. Kühne M. y 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, p. 429-432.
13. Kühne, M.; Körner, U. y Siegfried, W. (2001): Tetracycline residues in meat and bone meals. Part 2: The effect of heat treatments on bound tetracycline residues. *Food Additives & Contaminants*. 18(Suppl. 7): 593-600.
14. Levetzow, R. (1971): Untersuchungen auf Hemmstoffe im Rahme der Bacteriologischen fleischuntersuchung (BU). *Bundesgesundheitsbl.* 14: 211-213.
15. O.C.L. (2004): Uso inapropiado de antibióticos, Boletín PROAPS-REMEDIAR. 7: 4-5.
16. Salvatierra, R. y Benguigui, Y. (2000): Resistencia antimicrobiana en América Magnitud del problema y contención. *OPS*. 258-266.
17. Schnappinger, D.; Hillen, W. (1996): Tetracyclines: antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms. *Arch Microb.* 165: 359-369.
18. Sumano López, H.S. y Ocampo Camberos, L. (2006): *Farmacología Veterinaria*, Editorial McGraw Hill Interamericana, México. p. 147-168.
19. Witte, W. (1999): Uso de antibióticos en la producción animal y desarrollo de la resistencia en las infecciones humanas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*. 19(Suppl. 2): 83-86.

(Recibido 16-1-2007; Aceptado 20-9-2007)