



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**Detección, identificación y cuantificación de residuos
de cuatro antimicrobianos en carne bovina destinada al
consumo humano como contribución al sistema de gestión
de inocuidad alimentaria en el marco de aplicación de
Medidas Sanitarias y Fitosanitarias**

Karen Lorena Vela Perdomo

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia
Bogotá, Colombia
2014

**Detección, identificación y cuantificación de residuos
de cuatro antimicrobianos en carne bovina destinada al
consumo humano como contribución al sistema de gestión
de inocuidad alimentaria en el marco de aplicación de
Medidas Sanitarias y Fitosanitarias**

Karen Lorena Vela Perdomo

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias-Farmacología

Directora:

Médico Veterinario, M.Sc. Ph.D.(c) Martha Cecilia Suárez Alfonso

Codirector:

Médico veterinario, M.Sc., Ph.D. Mc allister Tafur Garzón

Universidad Nacional de Colombia - Sede Bogotá
Facultad de Ciencias
Departamento de Farmacia
Bogotá, Colombia
2014

La ciencia aumenta nuestro poder de manera proporcional, ya que disminuye nuestro orgullo. (Claude Bernard).

Dedico este trabajo a mis seres queridos. Ellos siempre confiaron en mí.

Agradecimientos

Quiero manifestar mi profundo agradecimiento a Dios por darme la facultad de la vida para hacer las cosas con Su hermosa y Santa ayuda. De manera especial les agradezco a mis padres, a mi esposo y a mi hija por su paciencia, y a todas aquellas personas que contribuyeron con su apoyo al desarrollo y culminación de este trabajo.

A la Directora y al Codirector, gracias por las enseñanzas, consejos y dedicación recibidos durante todo el periodo de mi formación.

A Martha Patricia Vela, por su invaluable apoyo y colaboración.

Al Instituto Colombiano Agropecuario ICA, y en especial a la Dirección Técnica de Inocuidad e Insumos Veterinarios y al Laboratorio Nacional de Insumos Pecuarios LANIP, por el respaldo financiero, científico y laboral.

Al Frigorífico Guadalupe EFEGE, por el apoyo logístico que permitió la toma de las muestras.

Al Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia y a la Dirección de Investigación sede Bogotá DIB, por haber contribuido a la financiación del trabajo a través de la convocatoria de apoyo a programas de posgrado.

Resumen

El control de residuos de sustancias antimicrobianas en productos de origen animal como la carne bovina, es de gran importancia porque los residuos pueden generar en las personas que los consumen problemas de salud como alergias, cambios en la flora intestinal y resistencia antimicrobiana en bacterias. En Colombia, la vigilancia del cumplimiento de los Límites Máximos de Residuos LMRs de antimicrobianos veterinarios en carne bovina es limitada, debido a que la capacidad analítica es insuficiente para monitorear un gran número de muestras y un amplio rango de antibióticos. Uno de los métodos de elección para la detección de residuos, es el bioensayo microbiológico descrito en la Guía de Laboratorio de Microbiología MLG 34.02, desarrollado por la agencia de salud pública FSIS del Departamento de Agricultura de Estados Unidos USDA, para la detección, identificación y semi-cuantificación de residuos antimicrobianos. Éste documento presenta la evaluación preliminar que se realizó del bioensayo por primera vez en Colombia, para la determinación de residuos de cuatro antimicrobianos en músculo diafragmático de bovinos machos y hembras de varias edades y procedencias, sacrificados en la planta de beneficio ubicada en Bogotá D.C. "Frigorífico Guadalupe EFEGE", como contribución al sistema de gestión de inocuidad en el marco del Acuerdo sobre la aplicación de Medidas Sanitarias y Fitosanitarias.

El protocolo de estandarización del bioensayo usó tejidos provenientes de animales no tratados con medicamentos veterinarios, las matrices se fortificaron con diferentes concentraciones de penicilina G potásica, oxitetraciclina, eritromicina y estreptomycin, como representantes de cuatro familias de antimicrobianos de uso veterinario, y se establecieron preliminarmente criterios de funcionamiento del método bajo algunos lineamientos de la guía de la Decisión Europea 2002/657/CE.

El bioensayo mostró excelente especificidad (ningún falso-positivo); los límites de detección se determinaron para los cuatro antibióticos en relación con sus respectivos límites máximos de residuos: Betalactámicos (penicilina G =LMR), tetraciclinas (oxitetraciclina=LMR), macrólidos (eritromicina =LMR) y aminoglucósidos (estreptomycin >4 LMR); sin embargo, la sensibilidad del bioensayo para este último no fue satisfactoria. La exactitud

relativa calculada para los límites de detección de los cuatro antimicrobianos fue satisfactoria; la estabilidad de los analitos en la matriz fortificada al límite de detección, resultó adecuada durante el período de tiempo evaluado.

Una vez estandarizado el bioensayo, se evaluaron ciento cuatro muestras de músculo bovino tomadas en la planta de beneficio, no detectando residuos que violaran los límites permitidos por el *Codex Alimentarius*. De manera paralela, las muestras fueron procesadas y analizadas mediante los métodos microbiológicos del hisopo y la prueba comercial Premi® Test, determinando resultados concordantes en todas las pruebas. Adicionalmente, se analizaron tejidos de un bovino dosificado con un antibiótico compuesto de penicilina y estreptomina. Los tejidos probados presentaron residuos violatorios de penicilina, pero resultaron negativos para el caso de estreptomina, corroborando la baja sensibilidad del método para la detección del aminoglucósido.

La evaluación preliminar del bioensayo, mejoró la capacidad analítica del laboratorio oficial (Laboratorio Nacional de Insumos Pecuarios-LANIP) en su calidad de autoridad sanitaria responsable de la inocuidad de los alimentos en Colombia, contribuyendo a la implementación del "Programa de Control de Residuos de Medicamentos Veterinarios" para el país, orientado a garantizar la inocuidad alimentaria para mejorar las condiciones de competitividad y cumplir los requisitos del comercio internacional de alimentos de origen animal.

Palabras clave: residuos antimicrobianos, bioensayo, Límite Máximo de Residuos LMRs, inocuidad alimentaria, medidas sanitarias y fitosanitarias.

Abstract

The control of antimicrobial residues in cattle meat is important, since these residues can generate in people who consume health problems like allergies, changes in the intestinal flora and antimicrobial resistance. In Colombia, the vigilance of the Maximum Residue Limits MRLs of veterinary antimicrobials in cattle meat is limited, because the analytical capacity is insufficient to monitor a large number of samples and a wide range of antibiotics. One of the methods of choice for the detection of residues microbiological bioassay is described in the Microbiology Laboratory Guide MLG 34.02 that is a microbiological method developed by the health public agency of the United States Department of Agriculture (USDA) for the detection, identification and semi-quantification of antimicrobial residues. This paper shows the preliminary evaluation of bioassay was performed for the first time in Colombia, for the detection of four antimicrobials in diaphragm muscle of bovine males and females of various ages and backgrounds, slaughtered in the processing plant located in Bogota DC "Frigorífico Guadalupe EFEGE", as contribution to the safety management system under the Agreement on the Application of Sanitary and Phytosanitary Measures.

The standardization protocol of bioassay used tissues from animals not treated with veterinary drugs, the matrix were fortified with varying concentrations of penicillin G potassium, oxytetracycline, erythromycin and streptomycin, as representatives of the four most important families of antibiotics used in veterinary, and it was preliminarily established the method performance criteria under some guidelines of the European Decision 2002/657/.

The test showed excellent specificity (no false positive); detection limits were determined for the four antibiotics in relation to their respective Maximum Residue Limit MRLs: Beta-lactams (penicillin G =MRL), tetracyclines (oxytetracycline =MRL) and macrolides (erythromycin =LMR), the detection limits meet with the LMRs in bovine muscle according to national legislation. However, the sensitivity of the bioassay aminoglycosides (streptomycin >4 MRL); however, the sensitivity of bioassay for the last one was unsatisfactory. The relative accuracy for limits of detection of antimicrobial four was satisfactory. Stability of the analytes in the matrix was adequate during the period evaluated.

With the standardized bioassay method, it were evaluated one hundred four bovine muscle samples taken at the processing plant, not detecting residues breaking out the permit limits allowed by the Codex Alimentarius. In parallel, samples were processed and analyzed by swab microbiological methods and the commercial test Premi ® Test, determining concordant results among all tests. Additionally, incurred tissues with a product containing penicillin and streptomycin were evaluated. Muscle samples analyzed by bioassay showed penicillin violated residues, but were negative for streptomycin, which confirms the low sensitivity of the method for detection of aminoclycoside.

The preliminary assessment of the microbiological bioassay analytical method made, improved analytical capability official laboratory (Laboratorio Nacional de Insumos Pecuarios-LANIP) in his capacity as health authority responsible for food safety in Colombia, will support the implementation of the "Programme for Control of Veterinary Drugs" in our country, contributing to ensure food safety to enhance the competitiveness and meet the requirements of international trade in food of animal origin.

Keywords: antimicrobial residues, bioassay, Maximum Residue Limit MRLs, innocuity food, sanitary and phytosanitary measures.

Contenido

RESUMEN.....	5
ABSTRACT	7
LISTA DE FIGURAS.....	13
LISTA DE TABLAS	15
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	17
INTRODUCCIÓN.....	19
OBJETIVOS	22
1. MARCO TEÓRICO.....	23
1.1 Política nacional de inocuidad alimentaria	23
1.2 Antimicrobianos	26
1.2.1 Penicilinas	27
1.2.2 Tetraciclinas.....	28
1.2.3 Aminoglucósidos	30
1.2.4 Macrólidos	31
1.3 Residuos de antimicrobianos en alimentos de origen animal.....	32
1.3.1 Efectos sobre la flora intestinal humana	32
1.3.2 Reacciones de hipersensibilidad	33
1.3.3 Problemas tecnológicos	34
1.3.4 Resistencia bacteriana	34
1.4 Control oficial de residuos antimicrobianos.....	35
1.5 Aspectos toxicológicos de los residuos de medicamentos veterinarios	39
1.6 Métodos de análisis de residuos de antimicrobianos veterinarios en alimentos de origen animal	40

1.7 Bioensayo para la detección, identificación y semi-cuantificación de residuos antimicrobianos en músculo bovino	43
2. MATERIALES Y MÉTODOS	45
2.1 Adecuación del bioensayo en placas de agar	45
2.1.1 Equipos, reactivos y medios	45
2.1.2 Organismos de prueba	45
2.1.3 Tejido blanco o de control.....	46
2.1.4 Placas del bioensayo	46
Preparación de las soluciones antimicrobianas.....	46
Preparación de los medios de cultivo	46
Preparación de las soluciones <i>buffer</i>	46
Preparación de los inóculos bacterianos	47
Inoculación de agares	47
2.1.5 Control de calidad del bioensayo	49
2.1.6 Curvas de calibración con soluciones estándares de antimicrobianos	50
2.1.7 Evaluación de los criterios de funcionamiento del bioensayo	51
Determinación de la sensibilidad, especificidad y exactitud relativas	53
Análisis de la estabilidad.....	53
Estudio de la recuperación.....	53
Preparación de tejidos fortificados	54
Preparación de extractos de músculo bovino	54
Montaje del bioensayo con extractos de músculo fortificado	55
Interpretación de la lectura	55
2.2 Evaluación del cumplimiento de los LMR y de los tiempos de retiro en músculo bovino	55
2.2.1 Bioensayo en placas con muestras de músculo diafragmático de bovinos faenados	55
Montaje.....	57

Interpretación de resultados	58
2.2.2 Pruebas microbiológicas adicionales al bioensayo en placas con muestras de músculo diafragmático de bovinos faenados.....	58
Prueba del hisopo.....	59
Prueba comercial.....	60
2.3 Cálculo de la concentración de residuos antimicrobianos en tejidos dosificados	62
2.3.1 Tejido dosificado.....	62
2.3.2 Bioensayo para detección de penicilina y estreptomina en extractos.....	64
2.3.3 Pruebas microbiológicas adicionales al bioensayo en placas con muestras de tejido dosificado bovino	64
Bioensayos con líquidos tisulares de descongelación.....	65
Prueba del hisopo.....	65
3. RESULTADOS.....	67
3.1 Adecuación del bioensayo en placas de agar	67
3.1.1 Curvas de calibración	67
3.1.2 Criterios de funcionamiento del bioensayo	72
Determinación de la sensibilidad, especificidad y exactitud relativas	73
Análisis de la estabilidad.....	76
Estudio de la recuperación.....	77
3.2 Evaluación del cumplimiento de los LMR y de los tiempos de retiro en músculo bovino	81
3.3 Cálculo de la concentración de residuos antimicrobianos en tejidos dosificados	82
3.3.1 Bioensayo para detección de penicilina y estreptomina en extractos.....	82
3.3.2 Bioensayos con líquidos tisulares de descongelación	87
3.3.3 Prueba del hisopo	89
4. DISCUSIÓN.....	91
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	109

	12
5.1 Conclusiones.....	109
5.2 Recomendaciones.....	110
A. ANEXO: GLOSARIO.....	111
B. ANEXO: PREPARACIÓN DE INÓCULOS DE SUSPENSIONES DE CÉLULAS VEGETATIVAS Y DE SUSPENSIONES DE ESPORAS.....	112
C. ANEXO: PRODUCCIÓN DE ESPORAS DE <i>BACILLUS CEREUS</i> ATCC 11778 (SECUENCIA FOTOGRAFICA).....	114
D. ANEXO: AJUSTE CONCENTRACIÓN DE ESPORAS DE <i>BACILLUS SUBTILIS</i> ATCC 6633 PARA INOCULACIÓN EN PLACAS (EJEMPLO).....	115
E. ANEXO: ESPECIFICACIONES DE MEDIOS ANTIBIÓTICOS.....	116
F. ANEXO: PREPARACIÓN DE SOLUCIONES AMORTIGUADORAS DE FOSFATO O <i>BUFFERS</i> FOSFATO.....	117
G. ANEXO: PREPARACIÓN DE SOLUCIONES ANTIMICROBIANAS.....	118
H. ANEXO: APROBACIÓN DEL BIOENSAYO EN EL SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DEL ICA.....	119
I. ANEXO: MUESTRAS DE MÚSCULO DIAFRAGMÁTICO DE PLANTA DE BENEFICIO 120	
J. ANEXO: MUESTRAS ANALIZADAS CON PREMI® TEST.....	123
K. ANEXO: “PRUEBAS T PARA DOS MUESTRAS SUPONIENDO VARIANZAS DESIGUALES” EN EL BIOENSAYO A TEJIDOS DOSIFICADOS.....	124
BIBLIOGRAFÍA.....	127

Lista de Figuras

FIGURA 1. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LAS PENICILINAS.....	27
FIGURA 2. ESTRUCTURAS DE TETRACICLINAS	29
FIGURA 3. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LOS AMINOGLUCÓSIDOS	30
FIGURA 4. ESTRUCTURA QUÍMICA DE ERITROMICINA	31
FIGURA 5. HISOPADOS DE MÚSCULO DIAFRAGMÁTICO	60
FIGURA 6. MONTAJE DE HISOPADOS DE MUESTRAS	60
FIGURA 7. VIALES DE PREMI® TEST INOCULADOS CON FLUIDO CÁRNICO	61
FIGURA 8. PRUEBA CON LÍQUIDOS TISULARES DE DESCONGELACIÓN (PARTE A)	65
FIGURA 9. PRUEBA DEL HISOPO A TEJIDOS DOSIFICADOS.....	66
FIGURA 10. REGRESIÓN LINEAL CURVA DE CALIBRACIÓN DE ERITROMICINA.....	68
FIGURA 11. REGRESIÓN LINEAL CURVA DE CALIBRACIÓN DE OXITETRACICLINA	69
FIGURA 12. REGRESIÓN LINEAL CURVA DE CALIBRACIÓN DE PENICILINA G POTÁSICA	70
FIGURA 13. REGRESIÓN LINEAL CURVA DE CALIBRACIÓN DE ESTREPTOMICINA.....	71
FIGURA 14. REGRESIÓN LINEAL CURVA DE CALIBRACIÓN DE NEOMICINA	72
FIGURA 15. COMPARACIÓN DE LOS LMRS Y LOS LDD DE LOS ANTIMICROBIANOS EVALUADOS EN EL BIOENSAYO	75

FIGURA 16. REPORTE OFICIAL DE RESULTADOS DE PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS A MUESTRA DE MÚSCULO	81
FIGURA 17. CONTROL DEL BIOENSAYO CON SENSIDISCOS.....	82
FIGURA 18. ZI PROMEDIO (MM) BIOENSAYO DETECCIÓN BETALACTÁMICOS (PENICILINA).....	84
FIGURA 19. ZI PROMEDIO (MM) BIOENSAYO DETECCIÓN AMINOGLUCÓSIDOS (ESTREPTOMICINA).....	85
FIGURA 20. BIOENSAYO DETECCIÓN ESTREPTOMICINA EN RIÑÓN	86
FIGURAS 21A Y 21B. PRUEBA CON LTD (PARTE A)	87
FIGURAS 22A Y 22B. PRUEBA CON LTD (PARTE B1).....	88
FIGURAS 22C Y 22D. PRUEBA CON LTD (PARTE B2).....	88
FIGURA 23. PRUEBA DEL HISOPO EN RIÑONES	90
FIGURA 24. PRUEBA DEL HISOPO EN HÍGADO	90

Lista de tablas

TABLA 1. LMR DE CUATRO ANTIMICROBIANOS EN MÚSCULO BOVINO.....	40
TABLA 2. GENERALIDADES PLACAS DEL BIOENSAYO ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.	
TABLA 3. PATRONES DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIBIÓTICA DE LOS MICROORGANISMOS DE PRUEBA	49
TABLA 4. CONTROL DE CALIDAD DE LAS PLACAS SEGÚN LOS PATRONES CON SENSIDISCOS	50
TABLA 5. ANTIBIÓTICOS Y CONCENTRACIONES EVALUADAS EN LAS CURVAS DE CALIBRACIÓN.....	51
TABLA 6. ESPECIFICACIONES DE LA PREPARACIÓN DE LAS PLACAS DEL BIOENSAYO PARA LA DETECCIÓN DE ANTIMICROBIANOS EN MÚSCULO BOVINO	52
TABLA 7. ANTIBIÓTICOS Y CONCENTRACIONES EVALUADAS	54
TABLA 8. PAUTAS PARA LA IDENTIFICACIÓN PRESUNTIVA DE RESIDUOS ANTIMICROBIANOS	58
TABLA 9. ESPECIFICACIONES DE LOS ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS CON TEJIDO DOSIFICADO	63
TABLA 10. CURVA DE CALIBRACIÓN CON SOLUCIONES DE ERITROMICINA.....	68
TABLA 11. CURVA DE CALIBRACIÓN CON SOLUCIONES DE OXITETRACICLINA	69
TABLA 12. CURVA DE CALIBRACIÓN CON SOLUCIONES DE PENICILINA G POTÁSICA.	70
TABLA 13. CURVA DE CALIBRACIÓN CON SOLUCIONES DE ESTREPTOMICINA.....	71
TABLA 14. CURVA DE CALIBRACIÓN CON SOLUCIONES DE NEOMICINA.....	72

TABLA 15. SENSIBILIDAD Y LDD DE LOS ANTIMICROBIANOS EN MÚSCULO BOVINO.	73
TABLA 16. PARÁMETROS DEL BIOENSAYO EN MÚSCULO BOVINO FORTIFICADO CON PENICILINA G POTÁSICA	74
TABLA 17. PARÁMETROS DEL BIOENSAYO EN MÚSCULO BOVINO FORTIFICADO CON OXITETRACICLINA	74
TABLA 18. PARÁMETROS DEL BIOENSAYO EN MÚSCULO BOVINO FORTIFICADO CON ESTREPTOMICINA	75
TABLA 19. PARÁMETROS DEL BIOENSAYO EN MÚSCULO BOVINO FORTIFICADO CON ERITROMICINA.....	75
TABLA 20. ESTABILIDAD DE LOS ANTIMICROBIANOS EN MÚSCULO BOVINO FORTIFICADO AL LDD	76
TABLA 21. RECUPERACIÓN DE ERITROMICINA EN BIOENSAYO CON MÚSCULO BOVINO FORTIFICADO	77
TABLA 22. RECUPERACIÓN DE OXITETRACICLINA EN BIOENSAYO CON MÚSCULO BOVINO FORTIFICADO	78
TABLA 23. RECUPERACIÓN DE ESTREPTOMICINA EN BIOENSAYO CON MÚSCULO BOVINO FORTIFICADO	79
TABLA 24. RECUPERACIÓN DE PENICILINA G POTÁSICA EN BIOENSAYO CON MÚSCULO BOVINO FORTIFICADO	80

Lista de símbolos y abreviaturas

Símbolo	Término
ppm	partes por millón
ppb	partes por billón
mm	milímetro
µg	microgramo

Abreviaturas

AMG, Aminoglucósidos

BC, *Bacillus cereus*

BS, *Bacillus subtilis*

CCE, Comisión de las Comunidades Europeas

CMI, Concentración Mínima Inhibitoria

CONPES, Consejo Nacional de Política Económica y Social

DNP, Departamento Nacional de Planeación

EMA, *European Medicines Agency*

FAO, *Food and Agriculture Organization*

FDA, *Food and Drug Administration*

FSIS, *Food Safety and Inspection Service*

G, Gravedades

HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*

ICA, Instituto Colombiano Agropecuario

IDA, Ingesta Diaria Admisible

INVIMA, Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos

JECFA, *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*

KRER, *Kocuria rhizophila* resistente a eritromicina

KR, *Kocuria rhizophila*

LANIP, Laboratorio Nacional de Insumos Pecuarios

LDC, Límite de cuantificación

LDD, Límite de detección

LMR, Límite Máximo de Residuos

MSF, Medidas Sanitarias y Fitosanitarias

OMC, Organización Mundial del Comercio

OMS, Organización Mundial de la Salud

OTC, Oxitetraciclina

Pen G, Penicilina G

R.P.M, Revoluciones por minuto

SE, *Staphylococcus epidermidis*

UE, Unión Europea

UFC, Unidades Formadoras de Colonias

USDA, *United States Department of Agriculture*

Introducción

En la especie bovina los antimicrobianos son administrados con fines terapéuticos para el tratamiento de infecciones, o como profilácticos en el control de entidades infecciosas (1). Sin embargo, el uso inapropiado o indiscriminado de estos medicamentos, así como errores en la posología o el incumplimiento del tiempo de retiro, pueden generar la presencia de residuos en los alimentos de origen animal destinados al consumo humano, lo cual supone un grave riesgo para la salud de los consumidores (2). Aunque los problemas de toxicidad aguda son poco probables (3), los residuos pueden tener efectos tóxicos crónicos directos en los consumidores, por ejemplo, reacciones alérgicas en individuos sensibilizados, o la inducción de resistencia antimicrobiana en aislamientos bacterianos (4); (5) y la eventual transmisión de organismos zoonóticos resistentes (o de determinantes genéticos de resistencia) al hombre (6).

Por otra parte, es importante considerar el efecto de los residuos antimicrobianos sobre la composición de la microflora intestinal humana y los problemas tecnológicos para la elaboración de productos cárnicos fermentados (7).

La importancia de garantizar la inocuidad de los productos alimentarios de origen animal radica en salvaguardar el bienestar de las personas, procurando que se comercialicen con la máxima certidumbre sobre su procedencia y calidad. Esto se traduce en un razonable grado de confianza de los consumidores hacia los productos que adquieren y en el incremento de la posibilidad de acceder exitosamente a mercados internacionales. En ese sentido, la aplicación de las Medidas Sanitarias y Fitosanitarias -MSF- afecta la competitividad de los productos agroalimentarios en el mercado. Por esta razón, es necesario garantizar la inocuidad con el debido soporte técnico, que conlleve un grado adecuado de protección para brindar la seguridad requerida para el comercio, evitando trabas injustificadas.

En este contexto, el Gobierno Nacional, consciente de la necesidad de fortalecer el sistema nacional MSF con el fin de mejorar las condiciones de sanidad e inocuidad de los productos agroalimentarios y facilitar su acceso a los mercados internacionales, estableció la Política Nacional de Sanidad Agropecuaria e Inocuidad de Alimentos. Esta adopta como fundamento del sistema MSF los conceptos "de la granja a la mesa" y "análisis de riesgo", entendido como la capacidad

de un sistema para desarrollar sus actividades soportado en los principios de evaluación, gestión y comunicación del riesgo (8).

Con base en el trabajo conjunto del Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos -INVIMA-y del Instituto Colombiano Agropecuario -ICA-, Colombia inició el monitoreo de residuos de medicamentos veterinarios y contaminantes químicos en alimentos de origen animal, lo cual fundamentó la determinación de la "línea base" de aquellas sustancias a ser consideradas en el Plan Subsectorial de Vigilancia y Control de Medicamentos Veterinarios y Contaminantes Químicos en Carne de Bovino a implementarse en el país, con el propósito de evaluar gradual y progresivamente la presencia de residuos de medicamentos veterinarios (incluidos algunos antimicrobianos de uso prohibido o restringido) en carne de bovino por ser uno de los alimentos que representa el mayor impacto y riesgos en términos de seguridad alimentaria e inocuidad para los consumidores, y para poder estructurar de una forma más objetiva un Plan de Control de Residuos de Medicamentos Veterinarios. La vigilancia del cumplimiento de los Límites Máximos de Residuos LMRs de medicamentos veterinarios en carne bovina establecidos en la Resolución 1382 de 2013 (9) del Ministerio de Salud y Protección Social, se constituye en una estrategia del referido Plan Subsectorial.

En Colombia existía formalmente un plan específico para el monitoreo y control de residuos en alimentos de origen animal para la exportación de productos de la acuicultura, mas no para el consumo interno (10). No se han realizado suficientes estudios que indiquen la incidencia de residuos de antimicrobianos en alimentos de origen bovino. En parte esta situación se explica por la escasa capacidad analítica para la determinación de residuos de antimicrobianos en tejidos, la cual resulta limitada para la realización de análisis rutinarios básicos o de *screening* que permitan monitorear una gran cantidad de muestras y un rango amplio de antimicrobianos.

En consideración al gran número de muestras y de antimicrobianos a determinar, en nuestro país se hace inviable la utilización desde el principio de técnicas de alta especificidad como métodos fisicoquímicos cromatográficos, debido a su elevado costo y laboriosidad. Para monitorear la presencia de residuos antimicrobianos, el primer paso es el de la detección, cribado o *screening*; con frecuencia la etapa de cribado se basa en métodos microbiológicos porque son económicos, rápidos y multiresiduos. Estos métodos son definidos por la Decisión Europea 2002/657/CE (11) como "los utilizados para detectar la presencia de una sustancia, o tipo de sustancias, al nivel de interés. Estos métodos permiten tratar un elevado número de muestras y se utilizan para cribar grandes cantidades de muestras en busca de posibles resultados no conformes. Están diseñados específicamente para evitar resultados de falso conforme". El bioensayo descrito en la Guía de Laboratorio de

Microbiología, MLG 34.02 del *Food Safety and Inspection Service -FSIS-* agencia de salud pública dentro del *United States Department of Agriculture -USDA-*, es un método microbiológico de referencia internacional que se evaluó por primera vez en Colombia para la detección de residuos de cuatro antimicrobianos en músculo de bovinos sacrificados en la planta de beneficio más grande del país. El bioensayo trabaja con diferentes placas de agar con condiciones específicas que las hacen sensibles preferencialmente a una familia de antibióticos mediante el uso de 7 placas: la placa 1 a tetraciclinas, la 2 y la 3 a β -lactámicos, la 4 y la 7 a aminoglucósidos y las placas 5 y 6 a macrólidos (12). De esta manera el método permite realizar simultáneamente el *screening* y el *post-screening*, ya que es posible identificar presuntivamente los residuos antimicrobianos detectados, a partir de los perfiles de susceptibilidad de las especies bacterianas. Las tres últimas décadas han mostrado un significativo desarrollo de los métodos de inhibición microbiológicos, en el que la tendencia más importante que puede ser observada es el reconocimiento del hecho de que la detección adecuada de varios grupos antibióticos, es posible únicamente usando pruebas multiplacas basadas en la combinación de diferentes microorganismos de prueba (13).

El trabajo conjunto del sector académico y del oficial, representado por el Laboratorio de Residuos de Medicamentos Veterinarios -área de microbiología analítica- del Laboratorio Nacional de Insumos Pecuarios del ICA-LANIP, se constituye en una contribución al sistema de gestión de inocuidad en el marco del Acuerdo sobre la aplicación de MSF, que apoyará la implementación de un programa nacional de residuos de medicamentos veterinarios, en defensa de la salud pública y en la generación de confianza en los alimentos de origen animal en el contexto del comercio internacional.

Objetivos

Objetivo General

Detectar, identificar y cuantificar residuos de cuatro antimicrobianos de uso veterinario en músculo diafragmático de bovinos sacrificados en la planta de beneficio "Frigorífico Guadalupe EFEGE", como contribución al sistema de gestión de inocuidad en el marco de aplicación de Medidas Sanitarias y Fitosanitarias (MSF).

Objetivos Específicos

Adecuar un bioensayo para la detección e identificación de residuos de penicilina G, oxitetraciclina, estreptomina y eritromicina en músculo diafragmático de bovinos beneficiados, acorde con una metodología de referencia internacional en el ámbito de la microbiología analítica del "Servicio de Inspección de Inocuidad de Alimentos" FSIS.

Calcular la concentración de residuos de penicilina G, oxitetraciclina, estreptomina y eritromicina de uso veterinario en tejido muscular diafragmático de bovinos beneficiados mediante la técnica de bioensayo descrita por el FSIS.

Evaluar el cumplimiento de los "Límites Máximos de Residuos" en carne bovina establecidos por el ICA como autoridad sanitaria competente en Colombia y del "tiempo de retiro" de los cuatro antimicrobianos veterinarios usados en los bovinos beneficiados, para contribuir a la evaluación y protección de la inocuidad alimentaria.

Relacionar la presencia de residuos de los cuatro antimicrobianos de acuerdo al género, edad y procedencia de los bovinos sacrificados.

Contribuir al establecimiento de un "Programa de control de residuos de medicamentos" y al mejoramiento de las condiciones sanitarias requeridas por el país para su adecuación a las reglas del comercio internacional de alimentos de origen animal.

1. Marco teórico

1.1 Política nacional de inocuidad alimentaria

Mediante la Ley 170 de 1994 Colombia aprobó el Acuerdo de la OMC, el cual contiene entre otros, el "Acuerdo sobre Medidas Sanitarias y Fitosanitarias" y el "Acuerdo sobre Obstáculos Técnicos al Comercio" que representan los lineamientos de la política de inocuidad alimentaria, al reconocer la importancia de que los Países Miembros adopten las medidas necesarias para la protección de la salud y vida de las personas, los animales, las plantas y la preservación del medio ambiente y para la protección de los intereses esenciales en materia de seguridad de todos los productos, comprendidos los industriales y agropecuarios, dentro de los cuales se encuentran, los reglamentos técnicos (14).

Según la Ley 170 de 1994 se denomina MSF, toda medida aplicada:

"...b) Para proteger la vida y la salud de las personas y de los animales en el territorio del Miembro de los riesgos resultantes de la presencia de aditivos, contaminantes, toxinas u organismos patógenos en los productos alimenticios, las bebidas o los piensos. En materia de inocuidad de los alimentos se crean las normas, directrices y recomendaciones establecidas por la Comisión del *Codex Alimentarius* sobre aditivos alimentarios, residuos de medicamentos veterinarios y plaguicidas, contaminantes, métodos de análisis y muestreo, y códigos y directrices sobre prácticas en materia de higiene...".

Las MSF comprenden todas las leyes, decretos, reglamentos, prescripciones y procedimientos pertinentes, con inclusión, entre otras cosas, de: criterios relativos al producto final; procesos y métodos de producción; procedimientos de prueba, inspección, certificación y aprobación; regímenes de cuarentena, incluidas las prescripciones pertinentes asociadas al transporte de animales o vegetales, o a los materiales necesarios para su subsistencia en el curso de tal transporte; disposiciones relativas a los métodos estadísticos, procedimientos de muestreo y métodos de evaluación del

riesgo pertinentes; y prescripciones en materia de embalaje y etiquetado directamente relacionadas con la inocuidad de los alimentos..." (14).

La Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), refiere al surgimiento "...de un nuevo concepto: «un mundo, una salud», que subraya la súbita toma de conciencia colectiva del vínculo existente entre las enfermedades animales y la salud pública" (15). En este sentido el uso responsable de los medicamentos veterinarios por parte de productores para controlar las enfermedades de sus animales, y las labores de Inspección, Vigilancia y Control (IVC) que desarrollen las autoridades sanitarias y de inocuidad del orden nacional, en la evaluación del riesgo en cuanto a la presencia de residuos de medicamentos veterinarios, deben direccionar en cierta medida las acciones a tomar para gestionar los riesgos a través del desarrollo normativo y el mejoramiento de la capacidad operativa, técnica y científica del país, con el fin de mitigar los impactos sobre la salud pública, en lo que atañe a la resistencia a los antimicrobianos y su relación con los residuos generados en los alimentos.

En el marco internacional, los Sistemas MSF requieren actualmente que no solo se evalúen y controlen al final de los procesos las condiciones de sanidad e inocuidad de los productos agroalimentarios, sino que el Sistema con toda su institucionalidad sea capaz de demostrar a través de acciones desarrolladas con el enfoque "de la granja a la mesa" la reducción del riesgo a lo largo de cada etapa para lograr la mínima incertidumbre en aspectos de sanidad e inocuidad. Este propósito requiere de los Sistemas MSF, un planteamiento preventivo, de estructura integrada y sistemática, con la capacidad suficiente para ofrecer la seguridad que los consumidores y el comercio requiere (16).

Estos aspectos son pilares del desarrollo de la política sanitaria y de inocuidad. El Estado colombiano cuenta con los Consejos Nacionales de Política Económica y Social, instancias en donde se estructuran las políticas públicas de acuerdo a las necesidades que como país se tienen. En el año 2006, el Departamento Nacional de Planeación, mediante el Decreto No. 2833 del 23 de agosto, crea la Comisión Intersectorial de Medidas Sanitarias y Fitosanitarias. Esto representa un avance en la elaboración de un plan nacional interinstitucional (17), planteado en los documentos CONPES 3375 (Política Nacional de Sanidad Agropecuaria e Inocuidad de Alimentos para el Sistema de MSF) y 3376 (Política Sanitaria y de Inocuidad para las Cadenas de la Carne Bovina y de la Leche), cuyo objetivo es mejorar el estatus sanitario de la producción agroalimentaria del país, con el fin de proteger la salud y vida de las personas, los animales y las plantas, preservar la calidad del medio ambiente, y al mismo tiempo mejorar la competitividad de la producción nacional a través de su capacidad para obtener la admisibilidad sanitaria de sus

productos pecuarios en los Estados Unidos, la Unión Europea y otros mercados internacionales (16), (8). Estos CONPES tuvieron una vigencia de 5 años y su continuidad se consolidó en la "Política sanitaria y de inocuidad para las cadenas láctea y cárnica", mediante el documento CONPES 3676 de 2010 (18).

Mejoramiento de la capacidad operativa, técnica y científica

Teniendo en cuenta que el Sistema MSF se rige por el "análisis de riesgo", el documento CONPES 3375 de 2005 recomendó el fortalecimiento en cuanto a la evaluación de riesgo para la expedición de medidas, la gestión y comunicación del riesgo. Dentro de las principales medidas adoptadas por el CONPES 3375 para la evaluación de riesgo están las agendas de investigación que el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, el Ministerio de Protección Social, el Ministerio de Ambiente y el de Comercio, presentaron para establecer líneas base y poder desarrollar evaluaciones de riesgo en las áreas de sanidad agropecuaria e inocuidad de alimentos (16).

En cuanto a la gestión de riesgo, dichas entidades fortalecieron la base normativa y las acciones de control y prevención. De este modo se realizó una evaluación de la normativa para priorizar las necesidades y diseñar una agenda que adecuara la base normativa (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural y demás instituciones). La comunicación del riesgo se hace través de las entidades productoras de MSF con protocolos y manuales de procedimientos. Por su parte el Ministerio de Comercio desarrolló un mecanismo para atender las consultas públicas internacionales de MSF del país (16).

Mediante el Decreto 1500 de 2007 (19) expedido por el Ministerio de la Protección Social, se establece el reglamento técnico a través del cual se crea el Sistema Oficial de Inspección, Vigilancia y Control de la Carne, Productos Cárnicos Comestibles y Derivados Cárnicos, destinados para el Consumo Humano y los requisitos sanitarios y de inocuidad que se deben cumplir en su producción primaria, beneficio, desposte, desprese, procesamiento, almacenamiento, transporte, comercialización, expendio, importación o exportación, como una medida necesaria para garantizar la calidad de estos productos alimenticios, con el fin de proteger la salud humana y prevenir posibles daños a la misma. El desarrollo de esta nueva normativa permite al país armonizarse con las directrices internacionales y modernizar el sistema oficial de inspección, vigilancia y control de acuerdo con los esquemas de los sistemas sanitarios en el mundo, para facilitar los procesos de equivalencia estipulados en el Acuerdo de MSF de la OMC.

En el Artículo 29 del mencionado Decreto 1500 de 2007, se formula el "Plan de Residuos de Medicamentos Veterinarios y Contaminantes" para la carne y los derivados cárnicos, que se soportará en la integración de todas las actividades en la cadena agroalimentaria para prevenir,

controlar y vigilar la presencia de los residuos y contaminantes que ofrezcan riesgo a la inocuidad del producto. Para ello, el INVIMA articulará el diseño e implementación de este plan, con las demás autoridades sanitarias, de acuerdo con sus competencias. El plan de residuos contendrá, entre otras:

"...1. El cumplimiento de los LMRs y contaminantes químicos establecidos en la legislación vigente y la detección de la presencia de productos químicos no aprobados.

2. Las acciones para la planeación, evaluación y verificación con el fin de supervisar, detectar, reducir y controlar residuos y contaminantes químicos.

3. Actualización anual del plan, con base en la evaluación del riesgo, para determinar su ámbito de aplicación y el desarrollo de medidas de gestión del riesgo.

4. Los procedimientos de toma de muestra, técnicas de muestreo, frecuencia, personal autorizado, condiciones de transporte en caso de requerirse, metodología analítica, sistema de registro de resultados de las pruebas, criterios para la evaluación de los resultados de las pruebas y acciones correctivas. Este programa estará disponible para ser verificado por las autoridades sanitarias competentes con el fin de tomar medidas en caso de incumplimiento".

1.2 Antimicrobianos

Los antibióticos son sustancias producidas por organismos vivos, que tienen la capacidad de destruir microorganismos o de inhibir el crecimiento de los mismos. De acuerdo al sentido literal de la frase, las sustancias producidas sintéticamente (entre ellas sulfonamidas y quinolonas) no se considerarían antibióticos, pero la definición de antibióticos también ha sido usada para incluir las sustancias derivadas químicamente (20); (21). En la presente revisión de literatura se usa el término "antimicrobiano", haciendo referencia a las sustancias producidas por organismos vivos y a las sustancias producidas sintéticamente.

Los antimicrobianos son clasificados de varias formas, la primera es de acuerdo a la estructura química (cada familia se caracteriza por un núcleo estructural típico y sus miembros se diferencian por la adición o la supresión de estructuras químicas secundarias al núcleo estructural), también pueden clasificarse por su espectro de acción (amplio o reducido), dependiendo del rango de especies bacterianas contra las que son activos o eficaces; y una tercera clasificación de los antimicrobianos está dada por el mecanismo de acción, los que

bloquean el crecimiento y la multiplicación celular, se denominan bacteriostáticos, y los que tienen la capacidad de eliminar bacterias son conocidos como bactericidas (20).

Estos mecanismos se dividen en cuatro categorías: inhibición de la síntesis de la pared celular, daño a la función de la membrana celular, inhibición de la síntesis o la función del ácido nucleico, e inhibición de la síntesis de proteínas (21).

Los agentes antimicrobianos han sido ampliamente usados en medicina veterinaria con tres fines principales: como agentes antiinfecciosos en la terapia de enfermedades de origen bacteriano, empleándolos durante un tiempo determinado; como profilácticos en el control de entidades infecciosas por un período establecido; y como aditivos alimenticios promotores de crecimiento, con el fin de mejorar la eficiencia alimenticia en los animales de consumo, a dosis subterapéuticas, durante prácticamente todo el tiempo de vida de los mismos (22), (23), (6) y (24).

Las familias de antimicrobianos más comúnmente usados terapéuticamente en los animales productores de alimentos incluyen los β -lactámicos, las tetraciclinas, los aminoglucósidos, las lincosamidas, los macrólidos, las quinolonas y las sulfonamidas (1); (24). Los agentes antimicrobianos son administrados a los animales por inyecciones (intravenosa, intramuscular, o subcutánea), oralmente en el alimento o el agua, tópicamente sobre la piel y por infusiones intramamaria e intrauterina. Teóricamente, todas estas rutas pueden dejar residuos en alimentos de origen animal tales como leche, carne y huevos (21); (24).

1.2.1 Penicilinas

Las penicilinas constituyen un grupo de sustancias antibacterianas naturales o semisintéticas que derivan directa o indirectamente de cepas de hongos del género *Penicillium spp.* y otros hongos del suelo. La estructura básica de las penicilinas es un anillo de tiazolidina conectado a un anillo betalactámico, al que se une una cadena lateral (R) (Figura 1). Las alteraciones químicas o metabólicas de este núcleo permiten la inactivación (5).

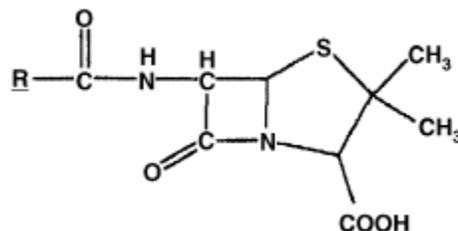


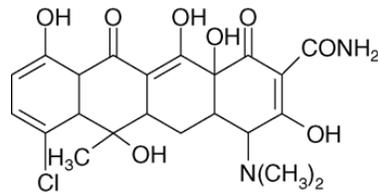
Figura 1. Estructura química de las penicilinas

Las penicilinas en solución acuosa se absorben rápidamente a partir de los lugares de inyección parenteral, presentan excelente distribución en el organismo; generalmente se obtienen concentraciones importantes en el hígado, bilis, riñón, intestino, músculo y pulmones, pero solo concentraciones reducidas en otras áreas con poca perfusión, como la córnea, cartílago y hueso. Las penicilinas se unen de forma reversible a las proteínas plasmáticas y se excretan en forma inalterada principalmente a través de filtración glomerular (25). Su mecanismo de acción consiste en la interferencia en los últimos pasos de la síntesis del peptidoglicano, por lo que su efecto es bactericida. Los β -lactámicos son activos frente a bacterias Gram-positivas patógenas (estreptococos, estafilococos), clostridios, ciertas formas Gram-negativas, algunas espiroquetas y hongos (26). Los β -lactámicos son probablemente la clase de antimicrobianos más ampliamente usada en medicina veterinaria para el tratamiento de infecciones bacterianas de bovinos criados para la producción de carne y/o leche (5). Entre otras indicaciones, la Penicilina G administrada parenteralmente ha sido usada para el tratamiento de mastitis, artritis e infecciones respiratorias (27).

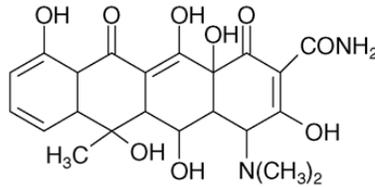
En 1991, la OMS expresó que, a pesar de su naturaleza no tóxica, los β -lactámicos parecen ser los responsables de la mayoría de las reacciones alérgicas por antimicrobianos reportadas en humanos (28) y, en un estudio sobre los residuos de fármacos veterinarios en carnes procesadas y sus riesgos potenciales para la salud, se argumenta que la prevalencia de alergias por la penicilina en diferentes poblaciones ha sido estimada del 3-10% y que existen evidencias de personas con sensibilidad conocida a las penicilinas que sufren una reacción alérgica cuando consumen alimentos que contienen residuos de éste antibiótico. La resistencia a los β -lactámicos, también ha sido reportada y según (29), ésta es debida a la producción de una penicilinasa o β -lactamasa.

1.2.2 Tetraciclinas

La estructura básica de las tetraciclinas es un esqueleto hidronaftaceno que contiene cuatro anillos fusionados. Las diversas tetraciclinas difieren principalmente en sus patrones de sustitución en las posiciones C5, C6 y C7 (Figura 2) (5).



Chlortetracycline



Oxytetracycline

Figura 2. Estructuras de tetraciclinas

Las tetraciclinas no deben administrarse por vía oral en dosis terapéuticas a los rumiantes porque se absorben mal y pueden reducir sustancialmente la actividad de la flora ruminal. Se pueden administrar por vía intramuscular e intravenosa soluciones de tetraciclina. Se distribuyen rápida y extensamente en el organismo tras su administración parenteral. Penetran en casi todos los tejidos y líquidos corporales; se encuentran concentraciones elevadas en riñones, hígado, bilis, pulmones, bazo y huesos. Se detectan concentraciones menores en los líquidos seroso, sinovial, líquido cefalorraquídeo prostático y humor vítreo. Debido a su tendencia a quelar iones calcio, estos antibióticos se depositan irreversiblemente en los huesos, dentina y esmalte dental. Las tetraciclinas se unen en proporciones variables a las proteínas plasmáticas (por ejemplo, oxitetraciclina 30%; doxiciclina 90%). En la mayoría de los animales domésticos, la biotransformación de las tetraciclinas parece ser limitada, y normalmente se excreta un tercio de la dosis administrada sin transformar. Las tetraciclinas se excretan principalmente vía urinaria por filtración glomerular, y en el tracto digestivo por eliminación biliar y directamente. En general se recupera en orina entre el 50 y el 80% de la dosis administrada (30).

Las tetraciclinas son antimicrobianos bacteriostáticos que inhiben la síntesis de proteínas bacterianas, ligándose a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano (20) y tienen un amplio espectro ya que son eficaces frente a cepas de estreptococos, bacilos Gram-negativos, bacterias del género *Rickettsia* y espiroquetas (26). Las tetraciclinas pueden alterar el equilibrio de la flora bacteriana intestinal y genitourinaria favoreciendo la presentación de infecciones secundarias en el tracto gastrointestinal o genitourinario. Por otra parte, las

tetraciclinas se emplean cada vez menos en humanos debido a la aparición de un gran número de cepas bacterianas resistentes. Según Berends y su grupo, se ha reportado que a dosis terapéuticas, las tetraciclinas están asociadas ocasionalmente con manchas en los dientes y cambios en la presión periférica; además pueden causar reacciones alérgicas y tóxicas en humanos y animales a esas dosis (31).

La oxitetraciclina (OTC) es un antibiótico usado para tratar una variedad de infecciones y también es empleado como promotor de crecimiento en animales (5); de acuerdo a estudios toxicológicos éste fármaco no fue mutagénico, carcinogénico o teratogénico, pero la OTC induce resistencia antibiótica en coliformes en el intestino humano (28).

1.2.3 Aminoglucósidos

Los aminoglucósidos (AMG) son una gran familia de antibióticos que característicamente contienen dos o más aminoazúcares unidos por enlaces glucosídicos a un alcohol cíclico hexagonal con grupos aminos (aminociclitol) (Figura 3) (32).

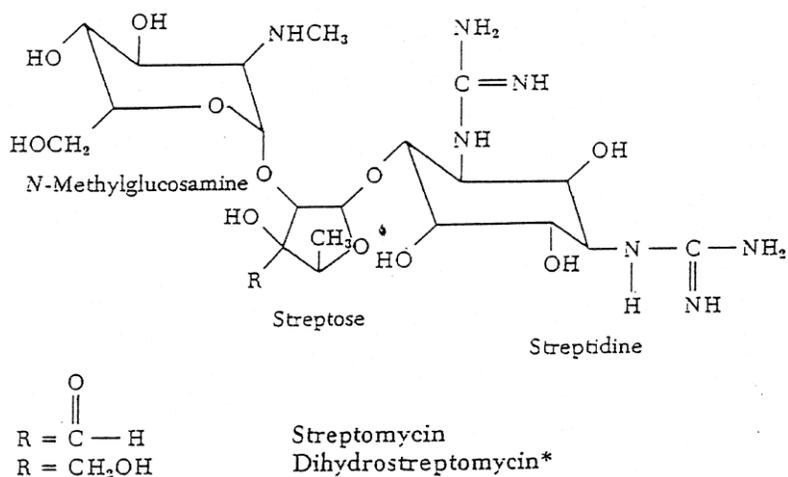


Figura 3. Estructura química de los aminoglucósidos

La absorción a partir de los lugares de inyección intramuscular es rápida y casi completa (disponibilidad >90%). Las concentraciones sanguíneas máximas generalmente se logran en los 30-90 minutos posteriores a la administración intramuscular. Debido a su polaridad a pH fisiológico, los AMG se distribuyen en el espacio del líquido extracelular y apenas penetran en la mayoría de los tejidos. Se

acumulan en la corteza renal y en la endolinfa del oído interno. Los antibióticos AMG no se metabolizan en el organismo. Se eliminan inalterados en la orina por filtración glomerular, recuperándose en la orina del 80 al 90% del fármaco administrado en las 24 horas siguientes a su administración intramuscular (30).

Los AMG son antimicrobianos de espectro restringido que inhiben la síntesis de proteínas bacterianas en bacilos Gram-negativos y estafilococos (32), ligándose irreversiblemente a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano (25). Los AMG más conocidos son la gentamicina, la neomicina y la estreptomina (5); aunque los más de 30 AMG existentes pueden causar efectos adversos de nefrotoxicidad y ototoxicidad (33), ocasionalmente se emplean para el tratamiento de infecciones serias y con frecuencia se utilizan en combinación con penicilina. A parte de los efectos adversos mencionados, los AMG pueden provocar reacciones de hipersensibilidad en humanos susceptibles (34), (35) y, a pesar de la introducción de los AMG en 1944, en el año 1950 emergieron líneas de *Staphylococcus aureus* resistentes a AMG (29).

La estreptomina es uno de los AMG más antiguos y junto con la penicilina, es de los antimicrobianos más utilizados (26).

1.2.4 Macrólidos

La estructura química de todos los macrólidos se compone de un anillo lactónico macrocíclico unido por un enlace glucosídico a diversos desoxiazúcares aminados. Se clasifican según el número de átomos de carbono presentes en el anillo lactónico (Figura 4) (32).

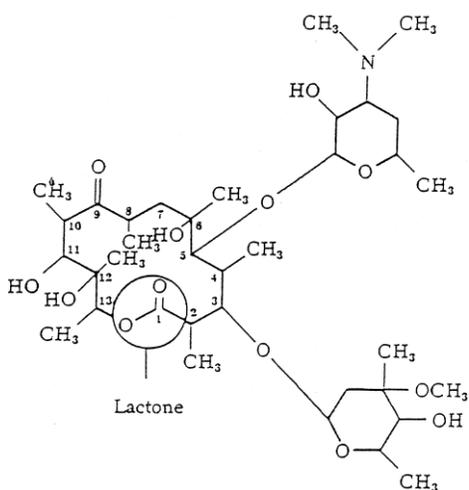


Figura 4. Estructura química de eritromicina

La absorción tras la inyección intramuscular es rápida. Los macrólidos se distribuyen ampliamente en los tejidos, y las concentraciones son prácticamente iguales a las plasmáticas; tienden a concentrarse en el bazo, hígado, riñón, y especialmente en los pulmones. Hasta un 75% de la dosis se une a proteínas plasmáticas. Los antibióticos macrólidos se excretan principalmente en la bilis (>60%). El aclaramiento urinario suele ser lento y variable pero puede representar una vía más importante de eliminación tras la administración parenteral (25).

Los macrólidos tienen una acción bacteriostática de amplio espectro que inhibe la síntesis de proteína mediante la unión reversible a las subunidades ribosomales 50 S en microorganismos sensibles (32). Son extensamente usados en la práctica veterinaria para tratar enfermedades respiratorias, o adicionados al alimento como promotores de crecimiento (5). Algunos de los efectos secundarios de los macrólidos incluyen náuseas, vómitos y diarrea; y pueden producir, de forma excepcional, alteraciones auditivas transitorias (26).

1.3 Residuos de antimicrobianos en alimentos de origen animal

Los residuos, según el *Codex Alimentarius* son los compuestos que permanecen en el organismo animal o en cualquier porción comestible del producto animal como consecuencia de un tratamiento, incluyendo el principio activo original y/o los productos de biotransformación o metabolitos (36). La presencia de estos residuos, en mayor o menor proporción, está relacionada con la naturaleza del producto, la dosis utilizada, la forma de aplicación y el tiempo transcurrido desde su aplicación hasta la faena (en el caso de la carne y las vísceras) o hasta la recolección del producto (cuando se trata de leche y huevos).

Los efectos de los residuos antimicrobianos no se presentan como un problema de toxicidad aguda, la manifestación es a largo plazo por la ingestión de pequeñas cantidades de residuos por períodos prolongados (26). Además de los efectos tóxicos, son importantes los efectos sobre la flora intestinal y el sistema inmune (37), (38), (39). En la evaluación de los residuos antimicrobianos originarios de animales de producción, se consideran más sensibles las consecuencias microbiológicas que los efectos toxicológicos (40).

1.3.1 Efectos sobre la flora intestinal humana

La administración de agentes antimicrobianos puede causar disturbios en las funciones de la comunidad ecológica (41). La magnitud de las alteraciones que se producen en el equilibrio ecológico entre el huésped y los microorganismos, dependen del espectro del agente

antimicrobiano, la dosis, las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas, y de la inactivación *in vivo* del agente (42). Se han identificado cuatro efectos microbiológicos relacionados con los residuos y la salud pública. Los residuos pueden modificar la actividad metabólica de la microbiota, así como generar cambios en las poblaciones bacterianas, favorecer la selección de bacterias resistentes, y perturbar o alterar el efecto barrera (40), (37), (39).

En casos de reducción de resistencia a la colonización, no son únicamente las infecciones mínimas o las dosis de patógenos colonizadoras o la resistencia bacteriana considerablemente más baja, pero los animales también excretan estas bacterias en gran cantidad y por un periodo de tiempo prolongado comparado con los animales con una resistencia intacta a la colonización (43).

Se han reportado algunos datos sobre la susceptibilidad antimicrobiana y la aparición de bacterias resistentes con dosis bajas de agentes antimicrobianos (44), (45), (46). Del mismo modo, se ha descrito el aumento de la susceptibilidad a la infección por *Salmonella* con dosis bajas de antimicrobianos. Las tetraciclinas pueden, en dosis relativamente bajas, tener algún impacto sobre la microbiota anaerobia intestinal de seres humanos (47), (38).

Se encontró una relación estrecha entre residuos de tetraciclina, estreptomycin, gentamicina y cloranfenicol y la resistencia de las bacterias aisladas a partir de muestras, lo que sugiere que la presencia de niveles bajos de antimicrobianos podría ejercer una presión positiva hacia la selección y la expresión de la resistencia en las bacterias que colonizan los tejidos animales (48).

Es posible, aunque no se ha demostrado, que las dosis bajas de medicamentos antimicrobianos podrían alterar la actividad enzimática intestinal y tener un efecto sobre ciertas hormonas y fármacos (37).

1.3.2 Reacciones de hipersensibilidad

Los residuos de medicamentos antimicrobianos en tejidos animales pueden causar reacciones de hipersensibilidad en humanos. Una reacción alérgica puede desencadenarse por residuos de antimicrobianos en un individuo previamente sensibilizado (49). A pesar de su naturaleza no tóxica, los β -lactámicos son los responsables de la mayoría de reacciones alérgicas reportadas en humanos (50). También están implicados en reacciones alérgicas los aminoglucósidos, sulfonamidas, tetraciclinas y ciertos macrólidos (49), (35).

Sin embargo, solo se han reportado unos pocos casos de hipersensibilidad como resultado de una exposición a residuos en carne. Se han descrito reacciones anafilácticas debidas a residuos de penicilina en carne porcina y bovina (51), (52).

1.3.3 Problemas tecnológicos

En varios trabajos se describe la influencia de los procesos tecnológicos sobre los residuos que se pueden encontrar en los alimentos. Los tratamientos térmicos, pueden disminuir las concentraciones residuales de estos compuestos en los alimentos (53). Se han realizado varios estudios de estabilidad para residuos de penicilina (54), cloranfenicol (55), sulfonamidas y tetraciclinas (56), (57), (58) durante procesos de calentamiento, aunque la mayoría de ellos sólo estudian la desaparición del compuesto principal y no tienen en cuenta la aparición de otros compuestos de degradación.

Las carnes contaminadas con residuos de antibióticos, si se utilizan para la obtención de productos fermentados, pueden presentar fermentaciones anormales y fallos de los cultivos iniciadores. Asimismo, la presencia de estos residuos en la leche puede inhibir o alterar el crecimiento de los microorganismos necesarios para la fabricación de queso y/o yogur (59), (60).

Además, los residuos de antibióticos podrían llegar incluso a alterar el desarrollo de la flora microbiana contaminante, lo que podría ocasionar el enmascaramiento de algunos agentes patógenos durante el control bacteriológico de los alimentos (61).

1.3.4 Resistencia bacteriana

En los microorganismos patógenos pueden producirse mutaciones para obtener resistencia a los agentes quimioterapéuticos y, en presencia del medicamento, la forma mutante tiene una ventaja selectiva y puede sustituir al tipo original de microorganismo (1).

La historia ha mostrado que la introducción de un nuevo antimicrobiano es seguida frecuentemente por el desarrollo de bacterias resistentes al mismo, y su uso provee el potencial para la selección de líneas resistentes. Según Schito (29), hay varias razones fundamentales para

este fenómeno, entre ellas el mal uso de los antimicrobianos por la dificultad de acceso a tratamientos apropiados, y la falla para completar el curso del tratamiento; también las características inherentes al microorganismo juegan un papel importante además de las características sociales y tecnológicas que contribuyen a la difusión de la resistencia antibiótica debido al incremento sustancial en la disponibilidad y facilidad de viajar dentro y entre países.

La resistencia puede desarrollarse casi en todos los fármacos, y se sabe que tiene lugar tanto *in vivo* como *in vitro*. La resistencia puede no ser controlable por otros agentes quimioterapéuticos y pasarse de un individuo a otro; al respecto Shea (62) también argumenta que el uso incontrolado de agentes antimicrobianos en medicina veterinaria y humana es responsable por el incremento en las crisis de resistencia a los antimicrobianos y que entre el 40-80% de los agentes antimicrobianos usados en los Estados Unidos cada año son usados en los alimentos animales; muchos son idénticos o muy similares a los fármacos usados en humanos. La mayor parte de estos medicamentos se usan como promotores de crecimiento o profilácticamente. No obstante, es conveniente aclarar que a pesar de los muchos años en que se aplican los antimicrobianos en la alimentación animal es difícil determinar los efectos debidos a la aplicación subterapéutica de antimicrobianos. En la actualidad existen alrededor de treinta antimicrobianos de uso común en humanos y en animales (1), (63), (21), (62).

Se considera que la resistencia se puede minimizar si solamente se utilizan los fármacos para enfermedades severas y se dan en dosis suficientes de modo que se reduzca la población antes que los mutantes tengan la posibilidad de aparecer. Otra manera que puede reducir al mínimo la resistencia es combinando dos agentes quimioterapéuticos no relacionados, de modo que haya un eventual mutante resistente a uno y que sea sensible al otro (26).

1.4 Control oficial de residuos antimicrobianos

De acuerdo con Aerts y colaboradores (64) los principales objetivos del control regulatorio de residuos de antimicrobianos son garantizar y asegurar la sanidad del suministro de los alimentos, y aplicar acciones después de la identificación de los productos adulterados. Para que los mencionados propósitos se cumplan, autoridades regulatorias como por ejemplo la EMA, establecen los LMRs para todas las sustancias farmacológicamente activas para las especies animales y los tejidos o productos relevantes. Éstos LMRs son la base para la

determinación de los límites de detección (LDD) de varios métodos analíticos usados en la vigilancia de residuos (21).

Por otra parte, la estrategia para la evaluación de residuos de productos medicinales veterinarios dentro de la UE es muy similar a la empleada por el Comité Mixto FAO/WHO de Expertos en Aditivos en Alimentos (JECFA), que determina la evaluación de la seguridad de residuos de medicamentos veterinarios en nombre del *Codex Alimentarius*. En la UE este trabajo es desarrollado por el Comité para Productos de Medicina Veterinaria (CVMP) de la EMA, y en los Estados Unidos por EU Administración de Alimentos y Fármacos (US FDA) (21).

Análisis y control de residuos de medicamentos veterinarios en Colombia

Debido a los avances científicos y técnicos es posible detectar la presencia de residuos de medicamentos veterinarios en productos de origen animal como la carne. En este sentido, la detección de estas sustancias en matrices biológicas es un indicador del uso de los medicamentos veterinarios en la producción primaria y por tanto de la inocuidad de los alimentos destinado al consumo humano. El conocimiento de la magnitud de exposición de la población a estos compuestos es de importancia fundamental para desarrollar acciones de vigilancia y control encaminadas a proteger la salud de los consumidores.

En Colombia, la responsabilidad de la vigilancia de los residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos, es compartida entre el ICA y el INVIMA y algunas entidades territoriales de salud. De acuerdo con la normatividad, ambas instituciones tienen facultades en esta materia, la competencia y marco institucional del ICA está dirigida esencialmente a la vigilancia de estos residuos en la cadena pecuaria en la producción primaria y las del INVIMA y entidades territoriales de salud, sobre alimentos que han sido sometidos a procesamiento (2).

El ICA, según la Ley 101 de 1993 o Ley Marco de Desarrollo Agropecuario y Pesquero y su Decreto reglamentario 1840 de 1994 (65), tiene asignada la función del desarrollo de las políticas institucionales y planes dirigidos a la protección de la sanidad, producción y productividad del sector agrícola y pecuario, y asumió la responsabilidad de ejercer el control técnico de las importaciones, exportaciones, manufactura, comercialización y uso de insumos agropecuarios destinados a proteger la producción agropecuaria nacional y a minimizar los riesgos alimentarios y ambientales que provengan del empleo de los mismos y a facilitar el acceso de los productos nacionales al mercado internacional (66).

El ICA es responsable de la vigilancia y control zoonosario de los animales y sus productos. La entidad fue reestructurada mediante el Decreto 4765 de 2008, disposición esta que de manera formal le asigna responsabilidad de inspección, vigilancia y control de la inocuidad en la producción primaria de especies animales, vegetales y sus productos (67).

Dentro de la legislación sanitaria y de inocuidad al respecto de las funciones del ICA, pueden mencionarse las siguientes competencias relacionadas con el Plan de Monitoreo para la Vigilancia y Control de Residuos de Medicamentos Veterinarios en la producción primaria de carne bovina:

Es la entidad responsable de minimizar los riesgos sanitarios, alimentarios y ambientales provenientes de la utilización de los medicamentos veterinarios y otras sustancias químicas en salud y producción animal (66).

- Es responsable de ejercer vigilancia sobre los riesgos sanitarios, biológicos y químicos para la producción agropecuaria y facilitar mediante controles técnicos y certificaciones el acceso de productos de origen animal y vegetal a los mercados internacionales (68).
- Debe impedir el ingreso, comercialización y salida del país de productos de origen animal con residuos químicos que excedan los niveles máximos de residuos aceptados nacional e internacionalmente. Igualmente puede interceptar, destruir productos que superen los niveles y realizar investigación básica o aplicada para resolver los problemas que afecten la comercialización de animales, vegetales y sus productos (68).
- Es responsable del control técnico de insumos veterinarios, registro de medicamentos veterinarios y alimentos medicados para animales (69). El Laboratorio de Análisis de Insumos Pecuarios LANIP, tiene a cargo el desarrollo del diagnóstico y análisis en el control de residuos de medicamentos veterinarios en la producción primaria.
- Audita a los laboratorios productores de los medicamentos veterinarios, los cuales deben estar registrados ante el ICA. Igualmente lleva a cabo esta labor en las fábricas productoras de piensos o alimentos balanceados para comercialización y autoconsumo (69).
- Es el encargado de registrar los establecimientos que comercializan medicamentos veterinarios, controla la comercialización restringida bajo fórmula del Médico Veterinario, de algunos medicamentos como antibióticos, hormonales,

analgésicos narcóticos, tranquilizantes, relajantes musculares, entre otros productos (69).

La Subgerencia de Análisis y Diagnóstico del ICA, a través de su Laboratorio Nacional de Insumos Pecuarios (LANIP), creó el "Laboratorio de Residuos de Medicamentos Veterinarios" que tiene entre otras funciones la generación de normas y parámetros para el control de residuos, y la estandarización y evaluación de técnicas analíticas para la determinación de ciertas sustancias (2), cuyo control es requisito para el comercio internacional de productos e insumos pecuarios.

Los criterios utilizados por el ICA para la evaluación de estos residuos, se fundamentan en las normas del *Codex Alimentarius*, normas de la UE, de la FDA o de requerimientos especiales de países compradores, así como en las licencias de venta otorgadas por el ICA a los medicamentos, señalando además, las sustancias que se deben controlar en un programa de residuos(2).

En este sentido los planes de monitoreo de residuos de medicamentos veterinarios que el ICA viene desarrollando a partir del año 2006, se basan en las labores desarrolladas en el marco del sistema oficial de IVC para la implementación y certificación de las Buenas Prácticas Ganaderas y trazabilidad; la reglamentación nacional sobre sustancias prohibidas, de uso restringido y permitidas en Colombia en animales; la frecuencia del uso de medicamentos veterinario en la especie bovina; la disponibilidad de metodologías analíticas confiables, y la capacidad analítica del Laboratorio de Residuos de Medicamentos Veterinarios de LANIP y finalmente, los referentes internacionales reconocidos en cuanto a las sustancias prohibidas y permitidas para su uso en la especie bovina (68).

El ICA en la Resolución 2341 de 2007, reglamenta las condiciones sanitarias y de inocuidad en la producción primaria de ganado bovino y bufalino destinado al sacrificio para consumo humano, entre ellas, las Buenas Prácticas para el Uso de Medicamentos Veterinarios (BPUMV) (70). Así, los antimicrobianos usados deben ser oficialmente autorizados por el ICA y prescritos mediante la correspondiente receta veterinaria; y después de su utilización es necesario respetar el periodo de supresión o tiempo de retiro consignado en el rotulado, antes de utilizar los productos alimenticios obtenidos a partir de los animales tratados.

Un aspecto importante es la fijación de LMRs; a este respecto a través de la Resolución No. 1382 de mayo de 2013, el Ministerio de Salud y Protección Social y el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, establecieron los límites máximos para residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal, destinados al consumo humano (9). Es así que por medio de la Resolución 1382 de 2013,

Colombia básicamente adopta los LMRs de sustancias farmacológicas de uso veterinario incluidas en los documentos del *Codex Alimentarius*.

1.5 Aspectos toxicológicos de los residuos de medicamentos veterinarios

Para la evaluación del riesgo de los residuos de medicamentos veterinarios en alimentos, se toman en cuenta parámetros establecidos mediante estudios de toxicidad llevados a cabo en animales de laboratorio y en especial se consideran los resultados de los estudios a largo plazo por ingestión regular del producto, definiéndose así el *Nivel Sin Efectos Adversos Observables* (NOAEL), que es la dosis más alta que no produce efectos adversos observables en la especie más sensible estudiada (1).

Otro aspecto importante relacionado con los residuos de medicamentos veterinarios es la *Ingesta Diaria Admisible* (IDA). La IDA se define como la cantidad diaria de un determinado residuo que puede ingerir el hombre durante toda su vida sin riesgo para la salud (71). Se calcula dividiendo el NOAEL por un *Factor de Seguridad* (FS) que se fija arbitrariamente, teniendo en cuenta el grado de certeza con que los resultados toxicológicos pueden extrapolarse a los humanos.

Considerando los dos parámetros anteriormente mencionados se define un *Límite Máximo de Residuos* (LMR), que es la concentración máxima de un residuo expresada en mg/kg del peso del producto fresco, que es legalmente permisible o se reconoce como aceptable dentro de un alimento o en la superficie del mismo y que no representa riesgo para la salud del consumidor (36). Se calcula tomando la IDA, multiplicándola por el peso de una persona promedio de 60 kg y dividiendo esa cifra por la ingesta media diaria del alimento considerado. Cuando se establece un LMR para una sustancia, se especifica en qué tejido deben cuantificarse los residuos y cuáles son los compuestos que deben analizarse. La Tabla 1 contiene los LMRs en músculo bovino de cuatro antimicrobianos. Se define como tejido/s marcador/es (músculo, hígado, riñón, grasa) a aquel para el cual se fija el LMR y que debe ser analizado para los fines de control de residuos. Con frecuencia es el tejido en donde los metabolitos permanecen un tiempo prolongado (71). Los LMR son fijados basados en los datos toxicológicos relevantes y la información incluye la absorción, distribución, metabolismo y excreción (1).

Tabla 1. LMR de cuatro antimicrobianos en músculo bovino

Sustancia farmacológicamente activa	LMR MÚSCULO BOVINO ($\mu\text{g/g}$)			
	COLOMBIA	EE.UU	CA	UE
ERITROMICINA	----	0.1	----	0.2
ESTREPTOMICINA	0.6	0.5	0.6	0.5
BENCILPENICILINA	0.05	0.05	0.05	0.05
OXITETRACICLINA	0.2	0.2	0.2	0.1

EE.UU: Estados Unidos de América CA: *Codex Alimentarius* UE: Unión Europea

Para garantizar que la concentración residual de los antimicrobianos no sea superior a su correspondiente LMR, se hace necesario establecer un tiempo de espera en función del perfil cinético de la eliminación tisular del fármaco (inalterado y/o metabolitos) en los animales (26).

El tiempo de retiro garantiza que los residuos del antimicrobiano han declinado a concentraciones seguras luego del uso del producto en el animal. El tiempo de retiro es el periodo de tiempo que transcurre entre la última dosis administrada al animal y el momento en el que la concentración de residuos en los tejidos (músculo, hígado, riñón, piel/grasa o productos como leche, huevos y miel) es menor o igual que el LMR (1). El tiempo de retiro debe ser respetado hasta el sacrificio de los animales para poder consumir la carne o recoger sus productos para su comercialización e ingestión. El irrespeto del cumplimiento del periodo de retiro recomendado es la causa primaria de la presencia de niveles no permitidos de residuos de antimicrobianos veterinarios en los alimentos (28).

1.6 Métodos de análisis de residuos de antimicrobianos veterinarios en alimentos de origen animal

Las muestras biológicas (leche, huevos, hígado, riñón, grasa y músculo) utilizadas para el control de residuos en producción animal pueden contener concentraciones traza del analito de interés del orden de $\mu\text{g/Kg}$. La estrategia de análisis y control de residuos de antibióticos de uso veterinario en alimentos de origen animal debe

basarse en tres pasos secuenciales: tamizaje o cribado (*screening*), segundo nivel de tamizaje y finalmente confirmación (72).

Un método ideal detectaría todos los antimicrobianos autorizados por debajo de sus LMRs y debería ser robusto, rápido, simple (preferiblemente automatizado), de alto rendimiento, económico y capaz de identificar eficazmente potenciales muestras no conformes a partir de una gran cantidad de muestras negativas (11), (13), (73).

Métodos de *screening*

Para monitorear la presencia de residuos antimicrobianos, el primer paso es el de la detección, cribado o *screening*. El gran número de muestras y de antibióticos a determinar hace inviable la utilización desde el principio de métodos de alta especificidad debido a su elevado costo y laboriosidad. Es necesario recurrir a una técnica de cribado que seleccione aquellas muestras que, en principio, pueden contener algún residuo de antibiótico. Una técnica de cribado de residuos de antibióticos debe tener una serie de características: Económica y sencilla, ya que se aplica a un número elevado de muestras; rápida, porque en ocasiones se retiene la canal o deben proseguir otros análisis de post-cribado, confirmación, contradictorios o dirimientes; multiresiduo, capaz de detectar varios compuestos, dado que lo que se busca al principio es un grupo de inhibidores y no un antibiótico concreto; con un LDD ajustado al LMR. No solo se debe alcanzar el límite máximo establecido para evitar falsos resultados negativos sino que conviene que ambos límites estén cercanos para evitar falsos resultados positivos que llevan a confirmar muestras que no deberían pasar la fase del cribado.

Los métodos de *screening* comprenden pruebas de inhibición microbiológicas, pruebas enzimáticas, pruebas de receptores, inmunoensayos (ELISA), pruebas de biosensores y cromatografía de capa delgada (74).

Las pruebas de inhibición microbiológicas fueron los primeros métodos desarrollados para la detección de residuos antibióticos y aún son ampliamente usados. Ellos son muy costo-efectivos y en contraste por ejemplo con pruebas inmunológicas, tienen el potencial de cubrir un amplio rango de compuestos antimicrobianos con un solo análisis (73).

Se distinguen dos principales formatos de pruebas microbiológicas: la prueba multiplacas y la prueba de tubo. Una prueba de placa consiste de una capa de agar nutriente inoculado, con muestras aplicadas sobre la capa, o en pozos en el agar. El crecimiento bacteriano torna el agar en una capa opaca, lo que genera una clara área de crecimiento inhibido alrededor de la muestra si contiene sustancias antimicrobianas. En Europa esta ha sido la prueba principal desde que

inició el *screening* para la determinación de la presencia de antibióticos en animales destinados al sacrificio (73). Una prueba de tubo, vial o ampolla, consiste de un medio de crecimiento inoculado con esporas de una bacteria de prueba sensible, suplementado con un indicador de pH o redox. A la temperatura apropiada, la bacteria empieza a crecer y produce ácido, que causará un cambio de color. La presencia de residuos antimicrobianos prevendrá o retrasará el crecimiento bacteriano, y así es indicado por la ausencia o retraso del cambio de color. Este formato es comúnmente aplicado en *screening* de rutina de leche, pero también se ha incrementado su uso para análisis de otras matrices como músculo, hígado y riñón(74).

Los métodos microbiológicos poseen alta sensibilidad pudiendo medir en ppm. Sin embargo, su relativa inespecificidad hace que su utilidad esté en las fases de cribado y post-cribado antes de pasar a la confirmación definitiva (75).

Aunque las pruebas de *screening* microbiológicas pueden revelar alguna información sobre la naturaleza del residuo antibiótico, una caracterización *post-screening* del residuo reducirá significativamente los esfuerzos dedicados a la identificación y cuantificación por métodos químicos. El uso de un método microbiológico en la etapa *post-screening* tiene muchas ventajas en términos de costos, practicidad y manejo de las muestras. Además, los procedimientos de extracción son simples o no son necesarios (21).

Las pruebas de identificación microbiológica usan líneas bacterianas con sensibilidades diferentes a determinados antimicrobianos sobre medios de cultivo con valores de pH que incrementan la actividad de los antibióticos. El medio puede ser suplementado con sustancias que bloquean o aumentan la acción de ciertos antimicrobianos o grupos de antimicrobianos. Algunos ejemplos los constituyen la adición de penicilinas, que bloquea la acción de penicilinas sensibles; el sulfato de magnesio heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) bloquea la acción de tetraciclinas; la cisteína bloquea la acción de la estreptomina; la acción de las sulfonamidas es bloqueada por el PABA y el trimetoprim por el contrario ejerce sobre las sulfas una acción sinérgica que favorece su identificación (21).

Además del uso de agentes bloqueadores, los antimicrobianos pueden identificarse con bacterias selectivamente resistentes, es el caso de *Kocuria rhizophila* ATCC 9341a que es resistente a dihidroestreptomina y estreptomina y de *Kocuria rhizophila* ATCC 15957, resistente a eritromicina, lincomicina y espiramicina.

El pH del medio también puede ayudar en la identificación de residuos antimicrobianos, así, la disminución del pH del medio de 8 a 6 incrementa la actividad de tetraciclinas y cefalexina. En contraste, el incremento del pH del medio de 6 a 8 aumenta la actividad de

aminoglucósidos, macrólidos, fluoroquinolonas, trimetoprim, sulfadoxina y sulfadiazina. La identificación se desarrolla visualmente por observación de los perfiles obtenidos. En éste sentido, la formación técnica y la experiencia son fundamentales para realizar de manera exitosa la identificación (21).

Métodos confirmatorios

En el caso de un resultado sospechoso no conforme obtenido con pruebas de *screening* y *post-screening*, debe ser corroborado mediante un método confirmatorio. Los métodos de confirmación son aquellos que permiten obtener información adicional para la cuantificación e identificación inequívoca del analito (11).

En los últimos años, los avances técnicos de la cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas (LC-MS-MS) han contribuido a su elección como método oficial de confirmación en el campo del análisis de residuos de algunos compuestos (20), (5).

1.7 Bioensayo para la detección, identificación y semi-cuantificación de residuos antimicrobianos en músculo bovino

El bioensayo es un método microbiológico desarrollado por el *Food Safety and Inspection Service* (FSIS) como prueba de *screening* para determinar la presencia de residuos antimicrobianos en muestras de bovinos y aves. Alternativamente, es posible utilizar las siete placas que lo componen para realizar de manera simultánea la identificación presuntiva y la semi-cuantificación. En los casos en que se conoce anticipadamente cuál es el residuo antimicrobiano presente, puede realizarse de forma directa la semi-cuantificación para calcular su concentración.

En Estados Unidos, la técnica es usada por USDA-FSIS como un procedimiento de rutina *post-screening* para las muestras que resultan positivas en las pruebas de *screening* iniciales tales como *Swab Test On Premises STOP*, *Calf Antibiotic and Sulfa Test CAST* y *Fast Antibiotic Screen Test FAST* (73).

El bioensayo utiliza bacterias que son relativamente sensibles o resistentes a determinadas clases de antimicrobianos. Las bacterias son usadas en combinación con agares de cuatro pH diferentes, y extractos de muestras. Si un residuo antimicrobiano detectable está presente en una muestra, se produce una zona de inhibición en una o más de las placas de Petri. Zonas superiores a 9 mm indican un resultado positivo, considerando que corresponde a la medida del diámetro externo de los cilindros en los que se depositan los extractos.

Aunque con esta técnica no es posible identificar inequívocamente el antibiótico presente en la muestra analizada, si se puede comparar el tamaño de los halos de inhibición obtenidos, con el perfil de actividad de distintos antibióticos estudiados (76), (12), (77). Los diferentes grupos antimicrobianos presentan variaciones en cuanto a sus perfiles de susceptibilidad en las siete placas utilizadas. Así, las tetraciclinas causan las mayores zonas de inhibición en la placa de *Bacillus cereus* a pH 4,5; los betalactámicos en la placa de *Kocuria rhizophila* de pH 6,0; los aminoglucósidos en la placa de *Bacillus subtilis* pH 8,0; y los macrólidos en la placa con *Kocuria rhizophila* pH 8,0.

Ciertos residuos antimicrobianos pueden ser identificados presuntivamente de acuerdo a sus patrones característicos de inhibición o perfiles de actividad. Una vez han sido presuntivamente identificados los residuos antimicrobianos, es posible determinar la concentración del residuo mediante una curva de calibración por comparación de los tamaños de las zonas producidos por la muestra, con los causados por una concentración conocida de un antimicrobiano de referencia estándar (12).

2. Materiales y métodos

2.1 Adecuación del bioensayo en placas de agar

Se realizó el bioensayo de siete placas para la detección, identificación y semi-cuantificación de residuos antimicrobianos en músculo bovino según los lineamientos de la "Guía de Laboratorio de Microbiología, MLG 34.02" del USDA/FSIS, denominada "*Bioassay for the detection, identification and quantitation of antimicrobial residues in meat and poultry tissue*".

2.1.1 Equipos, reactivos y medios

Cajas de Petri (100x15 mm), cilindros, homogenizador de alimentos, baño serológico, calibrador, pinzas, incubadoras, desecador, micropipetas, balones volumétricos, botellas de Roux, bolsas para homogenizar muestras, pipetas graduadas, refrigerador, ultracongelador, balanza analítica, licuadora, mezclador vortex, HCl, NaCl, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , NaOH, $\text{MnSO}_4\text{H}_2\text{O}$, metanol, penicilinas, sensidiscos, estándares certificados de estreptomycin, eritromicina, penicilina G potásica, oxitetraciclina y neomicina, medios para antibióticos (Merck) No.: 4, 5, 8, 11.

2.1.2 Organismos de prueba

Se utilizaron los siguientes microorganismos certificados de referencia adquiridos por el ICA: *Kocuria rhizophila* (antes *Micrococcus luteus*), ATCC 9341a; *Kocuria rhizophila*, ATCC 15957; *Staphylococcus epidermidis*, ATCC 12228; esporas de *Bacillus cereus* var. *mycoides*, ATCC 11778 y esporas de *Bacillus subtilis*, ATCC 6633.

2.1.3 Tejido blanco o de control

Con el fin de disponer de tejido proveniente de animales no tratados con ningún medicamento veterinario (tejido de control o tejido blanco), para ser usado como control negativo en todos los ensayos microbiológicos y para contar con matriz para fortificar como control positivo, se obtuvo músculo esquelético de dos bovinos machos criados en una granja del ICA ubicada en el municipio de Mosquera-Cundinamarca. A estos animales no se les administraron productos farmacéuticos de ninguna clase durante los cuatro meses previos al sacrificio. El tejido muscular se mantuvo almacenado a -70°C en un ultracongelador del LANIP hasta su uso.

2.1.4 Placas del bioensayo

Las características y especificaciones para la preparación de cada una de las siete placas se indican en la Tabla 2.

Preparación de las soluciones antimicrobianas

Se utilizaron estándares antibióticos Sigma-Aldrich® certificados, preparando soluciones *stock* de 1000 ppm de cada estándar, después de la corrección de la potencia: Penicilina G potásica se disolvió en *buffer* fosfato 0.1 M, pH 6.0 ± 0.1 , clorhidrato de oxitetraciclina en HCl 0.01 N, eritromicina en metanol y *buffer* fosfato 0.2 M, pH 8.0 ± 0.1 y sulfato de estreptomycinina en agua destilada, trisulfato de neomicina en *buffer* fosfato 0.1 M pH 8.0 ± 0.1 (Anexos F y G).

Preparación de los medios de cultivo

Los medios de cultivo se prepararon siguiendo las instrucciones del fabricante. La composición y las especificaciones de su preparación se encuentran descritas en el Anexo E.

Preparación de las soluciones *buffer*

Las soluciones *buffer* se prepararon según se indica en el Anexo F. Luego se esterilizaron y se verificó su pH y esterilidad antes del uso.

Preparación de los inóculos bacterianos

Para la obtención de las suspensiones de células vegetativas, las cepas de trabajo fueron sembradas e incubadas y sus cultivos cosechados, lavados, centrifugados, resuspendidos y cuantificados para usarse en la preparación de las placas 2, 3, 5, 6 y 7 del bioensayo (Anexo B).

Los microorganismos esporoformadores fueron activados y las esporas obtenidas en agar esporulante fueron cosechadas y se lavaron por centrifugación (Anexo B).

El contenido de células vegetativas o esporas/ml de suspensión se calculó por recuento en superficie en placas de Petri (Anexos B y D).

Inoculación de agares

Con el número estimado de células vegetativas/esporas por ml de suspensión, se calculó el volumen requerido para inocular el agar antibiótico correspondiente, de tal forma que se cumpliera con las concentraciones finales de microorganismos especificadas en la Tabla 2.

Las suspensiones de células vegetativas o de esporas bacterianas a las concentraciones indicadas fueron adicionadas a los medios de cultivo correspondientes mantenidos a $48 \pm 2^\circ\text{C}$. En los casos requeridos se adicionó 1 ml de penicilinas concentrada (10,000,000 unidades Kersey/ml Difco®) por cada 100 ml de agar, posterior a la inoculación de la bacteria y en las placas 1 y 4 con esporoformadores, luego de la incubación del medio en baño serológico. El medio inoculado fue vertido en volumen de 8-8.5 ml en placas de Petri de 100x15 mm. El agar fue distribuido uniformemente hasta cubrir el fondo, permitiendo que se solidificara sobre una superficie nivelada. Las placas se rotularon y almacenaron entre 2 y 8°C hasta por siete días.

No.	Propiedad	Antib.	Agar antibiótico	Buffer fosfato/ pH	Organismo	Concentración inóculo células vegetativas o esporas/ml medio de cultivo	Disco control	Incubación baño serológico *	Adición penicilinas **	Incubación °C (16-18 h)
1	Detección tetraciclín.	O	No. 8	0,1M pH 4,5	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	5x10 ³ esporas/ml	T30 µg	45 min.	1ml/100ml agar	29±1°C
2	Detección β-lactám.	P	No. 4	0,1M pH 6,0	<i>Kocuria rhizophila</i> ATCC 9341a	8x10 ⁵ cel.vegetativas /ml	P10 unidad.	Ninguna	Ninguna	29±1°C
3	Confirmac.P	P	No. 4	0,1 M pH 6,0	<i>Kocuria rhizophila</i> ATCC 9341a	8x10 ⁵ cel.vegetativas /ml	P10 unidad.	Ninguna	1ml/100ml agar	29±1°C
4	Detección ES	ES	No. 5	0,1M pH 8,0	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	1x10 ⁴ esporas/ml	ES.10 µg	75 min.	1ml/100ml agar	29±1°C
5	Detección macrólidos	ER	No. 11	0,2 M pH 8,0	<i>Kocuria rhizophila</i> ATCC 9341a	8x10 ⁵ cel.vegetativas /ml	ER 15 µg	Ninguna	1ml/100ml agar	29±1°C
6	Confirmac. ER	ER	No. 11	0,2 M pH 8,0	<i>Kocuria rhizophila</i> ATCC 15957	1x10 ⁵ cel.vegetativas /ml	ER 15 µg	Ninguna	1ml/100ml agar	29±1°C
7	Detección aminoglucós.	N	No. 11	0,1 M pH 8,0	<i>Staphylococ. epidermidis</i> ATCC 12228	1x10 ⁵ cel.vegetativas /ml	G N5 µg	Ninguna	1ml/100ml agar	37±1°C

O: Oxitetraciclina P: Penicilina ES: Estreptomycin ER: Eritromicina N: Neomicina

*Baño serológico a 48±2°C. Esporas incubadas en el agar derretido.

**La adición de la penicilinas se realizó después de la inoculación de la bacteria y para las placas 1 y 4 después de la incubación del medio con la bacteria.

2.1.5 Control de calidad del bioensayo

De manera permanente se llevaron registros del funcionamiento de los equipos empleados en todos los procedimientos, según el sistema de aseguramiento de la calidad del laboratorio del ICA.

Para cada una de las cepas de referencia cultivadas se confirmó la pureza e identidad mediante pruebas microbiológicas convencionales. Mediante el uso de soluciones antimicrobianas y adicionalmente de sensidiscos, se realizó la verificación de los patrones de susceptibilidad antimicrobiana reportados para cada cepa. La primera prueba se hizo con un bioensayo en agar libre de penicilinas utilizando cilindros en los que se adicionaron 200 μ l de las concentraciones antibióticas especificadas en la Tabla 3. Para la interpretación de los resultados en la prueba de sensibilidad se observaron zonas de inhibición de 9 a 15 mm y para concentraciones >200 μ g/ml una zona de inhibición inferior a 9 mm.

Tabla 3. Patrones de susceptibilidad antibiótica de los microorganismos de prueba

Plato y propiedad	Organismo de prueba	Agar antib	Concentración antibiótico μ g/ml				
			Eritromicina	Neomicina	Penicilina	Estreptomina	Tetraciclina
1: Detección tetraciclinas	BC 11778	8	0.25	2.00	20	1.00	0.08
2: Detección β -lactámicos. 3: Confirmación penicilina	KR 9341a	4	0.05	5.0	0.0125	> 200	0.5
4: Detección estreptomina	BS 6633	5	0.04	0.25	0.0125	0.2	0.08
5: Detección macrólidos	KR 9341a	11	0.025	1.5	0.0125	250	0.4
6: Confirmación eritromicina	KR 15957	11	> 200	1.5	0.0125	1.0	0.2
7: Detección aminoglucósidos	SE 12228	11	0.075	0.25	0.8	1.5	250

La segunda forma consistió en realizar la verificación de la susceptibilidad antimicrobiana con sensidiscos a las concentraciones especificadas en la Tabla 4.

Tabla 4. Control de calidad de las placas según los patrones con sensidiscos

Placa No. & Organismo	Agar antibiótico	Sensidisco antibiótico				
		Te30	P10	S10	E15	N5
1 - <i>B. cereus</i> ATCC 11778	No. 8	S	R	S	S	S
2 - <i>K. rhizophila</i> ATCC 9341a	No.4 sin penicilinasa	S	S	R	S	R
3 - <i>K. rhizophila</i> ATCC 9341a	No. 4 con penicilinasa	S	R	R	S	R
4 - <i>B. subtilis</i> ATCC 6633	No. 5	S	R	S	S	S
5 - <i>K. rhizophila</i> ATCC 9341a	No. 11	S	R	R	S	S
6 - <i>K. rhizophila</i> ATCC 15957	No. 11	S	R	S	R	S
7 - <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	No. 11	R	R	R	S	S

S = Zona de inhibición

R = No produce zona de inhibición

Adicionalmente en cada montaje del bioensayo se incluyó una placa con extractos de tejido de control (negativo) y se usó una placa con extractos de tejido fortificado con cada uno de los representantes antimicrobianos, con el fin de comprobar la capacidad de cada placa para la identificación presuntiva del antibiótico en matriz.

A los medios de cultivo se les realizó control de calidad relacionado con los materiales (agua y placas de Petri), validación de la esterilización, características macroscópicas del medio vertido, prueba de esterilidad y pH (antes y después de la esterilización) (78), (79). A las soluciones *buffer* el control de calidad se efectuó depositando 200 µl en tres cilindros dispuestos en sus correspondientes placas. Se comprobó que luego de la incubación no se observara zona de inhibición alguna. Previamente se hizo control de esterilidad y verificación del pH.

2.1.6 Curvas de calibración con soluciones estándares de antimicrobianos

Las curvas de calibración se generaron para penicilina G potásica, oxitetraciclina, eritromicina, estreptomina y neomicina, utilizando placas que cumplieron el control de calidad. Se rotularon con las concentraciones antibióticas, usando tres placas para cada dilución requerida para la curva, excepto para la concentración del estándar de referencia designada como la concentración media, que procuró ajustarse al LMR en músculo, para un total de doce placas. Se dibujó una línea a un lado y al fondo de cada placa para el alineamiento adecuado de los cilindros.

Con la ayuda de pinzas se ubicaron seis cilindros estériles igualmente espaciados alrededor del perímetro de la placa, para posteriormente llenar tres pozos alternados con $200 \pm 4 \mu\text{l}$ de la concentración media del estándar de referencia, y los otros tres con $200 \pm 4 \mu\text{l}$ de cada una de las otras cuatro concentraciones del mismo antimicrobiano (diluciones inferiores y superiores al LMR), como se describe en la Tabla 5. Las placas 1, 2, 4 y 5 se incubaron 16 a 18 horas, a $29^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ y la placa 7 a $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$. Luego se removieron los cilindros para leer los diámetros de las zonas de inhibición a la décima más cercana de un milímetro usando un calibrador.

Tabla 5. Antibióticos y concentraciones evaluadas en las curvas de calibración

Antibiótico	LMR músculo bovino (ppm)	Concentraciones escogidas (ppm)
Penicilina G	0,05	0,0125 -0,025-0,05-0,1-0,2
Oxitetraciclina	0,2	0,05-0,1-0,2-0,4-0,8
Eritromicina	0,2	0,1-0,2-0,4-0,8-1,6
Estreptomina	0,6	0,45-0,6-1,2-2,4-4,8
Neomicina	0,5	0,25-0,5-1,0-2,0-4,0

La concentración o dilución más baja debía producir una zona de inhibición clara, al menos de 9 mm que corresponde al diámetro de los cilindros. Los resultados se registraron en un formato y se calculó la curva de calibración y la regresión lineal usando Excel, calculando el promedio de las zonas para las concentraciones de las 12 placas por cada antibiótico, y se realizó una gráfica usando los valores corregidos de los diámetros de las zonas de inhibición en el eje x y los logaritmos naturales de las concentraciones antibióticas en el eje y.

La línea de la regresión lineal se usó para determinar la recuperación o concentración en el análisis semi-cuantitativo de los antibióticos en los tejidos fortificados y dosificados.

2.1.7 Evaluación de los criterios de funcionamiento del bioensayo

Considerando algunos lineamientos de la guía de la Decisión Europea 2002/657/CE que se refiere al funcionamiento de los métodos analíticos, se establecieron los criterios de funcionamiento para el bioensayo en placas de agar con tejido muscular de control en blanco fortificado a diferentes concentraciones de antibióticos. Los parámetros evaluados fueron la sensibilidad, la especificidad y la exactitud relativas. Adicionalmente se analizaron la estabilidad y

la recuperación. Las especificaciones de las placas usadas se indican en la Tabla 6.

La evaluación de cada antimicrobiano se llevó a cabo en la placa del bioensayo que corresponde a la detección del grupo, así: oxitetraciclina con BC, penicilina y eritromicina con KR y estreptomycinina con BS; teniendo en cuenta los resultados de estudios previos de la sensibilidad de cada una de las placas de las que consta la técnica, a diferentes soluciones de antibióticos (76), (12), (77), y considerando que en el bioensayo con las siete placas (ver Tabla 2), las placas 3 y 6 son consideradas confirmatorias para la detección de penicilina y eritromicina, respectivamente.

Tabla 6. Especificaciones de la preparación de las placas del bioensayo para la detección de antimicrobianos en músculo bovino

No.	Antibiótico	Agar antibiót.	Buffer fosfato /pH	Organismo	Concentración inóculo células vegetativas o esporas/ml medio de cultivo	Disco control	Incubación baño serológico*	Incubación °C (16-18 h)
1	Oxitetraciclina	No. 8	0,1M pH 4,5	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	5x10 ³ esporas/ml	Tetraciclina 30 µg	45 min.	29±1°C
2	Penicilina G potásica	No. 2 (con dextrosa)	0,1M pH 6	<i>Kocuria rhizophila</i> ATCC 9341a	8x10 ⁵ cel. vegetativas/ ml	Penicilina 10 unidades	Ninguna	29±1°C
3	Estreptomycinina	No. 5	0,1M pH 8	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	1x10 ⁴ esporas/ml	Estreptomycinina 10 µg	75 min.	29±1°C
4	Eritromicina	No. 11	0,2 M pH 8	<i>Kocuria rhizophila</i> ATCC 9341a	8x10 ⁵ cel. vegetativas/ml	Eritromicina 15 µg	Ninguna	29±1°C

*Baño serológico a 48±2°C. Esporas incubadas en el agar derretido.

Para el establecimiento de los criterios de funcionamiento del bioensayo en músculo bovino, se prepararon seis (6) repeticiones de cada uno de los niveles o concentraciones para los cuatro

antimicrobianos. Así, el nivel 0 correspondió a las matrices que no fueron fortificadas, y los niveles 1, 2, 3, 4 y 5, a las concentraciones antibióticas menores, iguales y superiores al LMR de cada uno de los cuatro antimicrobianos. Se analizaron extractos obtenidos de 24 muestras de tejido blanco de bovinos. Estas matrices se probaron con el bioensayo en las cuatro placas cuyas características están detalladas en la tabla anterior.

Determinación de la sensibilidad, especificidad y exactitud relativas

Para cada una de las concentraciones antibióticas o niveles de fortificación, se calcularon tres parámetros diferentes: la sensibilidad relativa ($\text{Verdaderos Positivos} / \text{Verdaderos Positivos} + \text{Falsos Negativos} * 100$); la especificidad relativa ($\text{Verdaderos Negativos} / \text{Verdaderos Negativos} + \text{Falsos Positivos} * 100$) y la exactitud relativa ($\text{Verdaderos Positivos} + \text{Verdaderos Negativos} / n * 100$). El límite de detección se estableció como la menor concentración evaluada que generó una sensibilidad relativa del 100%.

Análisis de la estabilidad

Soluciones de antimicrobianos a los límites de detección establecidos, fueron preparadas e inoculadas en músculo blanco que posteriormente se congeló a -70°C . El bioensayo se le realizó a éstas matrices el día en que fueron fortificadas y 30 días después de la adición de los antibióticos.

Estudio de la recuperación

La recuperación de los antimicrobianos en los tejidos inoculados, se calculó extrapolando las medidas de los diámetros de las zonas de inhibición en la línea de regresión elaborada con las curvas de calibración con las soluciones estándares. Esto permitió realizar una estimación semi-cuantitativa de la concentración de los analitos.

El porcentaje de la concentración aproximada de cada uno de los antimicrobianos, recuperado durante el procedimiento analítico del bioensayo, se determinó a través de experimentos con matriz en blanco enriquecida con las concentraciones inferiores, iguales y superiores al límite permitido, mediante la siguiente ecuación: % de recuperación = $100 \times \text{contenido medido/nivel de enriquecimiento}$.

Para el desarrollo de los ensayos de determinación de los criterios de funcionamiento del bioensayo multiplacas, se llevaron a cabo los siguientes procedimientos:

Preparación de tejidos fortificados

Las muestras de tejido blanco se descongelaron a temperatura ambiente y luego se homogenizaron y pesaron individualmente en bolsas estériles, cada una con $5 \pm 0,2$ g de tejido.

La fortificación de tejido de control con cada analito se realizó mediante la adición de las concentraciones antimicrobianas mencionadas en la Tabla 7. Por ejemplo, para obtener una concentración en músculo equivalente a 0,05 ppm ó 50 ppb de penicilina G (nivel correspondiente al LMR), 125 μ l de una solución de 2 ppm del antibiótico β -lactámico se añadieron a $5 \pm 0,2$ g de músculo homogenizado. Después de la fortificación, el tejido se dejó reposar durante quince minutos antes de la extracción. Los tejidos fueron fortificados y analizados durante el mismo día.

Tabla 7. Antibióticos y concentraciones evaluadas

Antibiótico	LMR músculo bovino (ppm)	Concentraciones escogidas (ppm)
Penicilina G	0,05	0,025-0,05-0,1-0,2-0,4
Oxitetraciclina	0,2	0,05-0,1-0,2-0,4-0,8
Estreptomicina	0,6	0,45-0,6-1,2-2,4-4,8
Eritromicina	0,2	0,1-0,2-0,4-0,8-1,6

Preparación de extractos de músculo bovino

A las porciones de $5 \pm 0,2$ g de tejidos fortificados y no fortificados, contenidos en bolsas estériles identificadas con los tipos de soluciones *buffer* pH 4.5, pH 6.0, pH 8.0-0.1M y pH 8.0-0.2 M (ver preparación en el Anexo F), se les adicionaron $20 \pm 0,5$ ml del *buffer* correspondiente (Tabla 6).

Los tejidos y las soluciones *buffer* fueron mezclados en un homogenizador de alimentos (Stomacher® 400 Circulator Seward) durante sesenta (60) segundos a 592 r.p.m. Los extractos obtenidos se dejaron reposar por cuarenta y cinco (45) minutos y luego se transfirieron a tubos, los cuales fueron centrifugados durante 10 minutos a 5°C y 4000 r.p.m.

Montaje del bioensayo con extractos de músculo fortificado

En placas de agar previamente preparadas para la determinación de cada grupo antimicrobiano, se ubicaron seis cilindros por placa, identificando el inicial mediante una línea demarcada al reverso y al lado de cada caja.

Tres placas enteras fueron usadas para cada concentración probada, llenando tres cilindros alternos con 200 ± 4 μ l del extracto de la matriz de prueba correspondiente, y los otros tres con el estándar antibiótico de referencia. Las placas se incubaron a 29 ± 1 °C durante 16 a 18 horas. En total se hicieron tres lecturas por repetición a cada nivel de los antibióticos.

Después de la incubación de las placas se removieron los cilindros para leer los diámetros de las zonas de inhibición a la décima más cercana de un milímetro usando un calibrador.

Interpretación de la lectura

Tras la incubación se comprobó la aparición de zonas de inhibición del crecimiento de los microorganismos alrededor de los extractos de los tejidos y alrededor de los discos de control. Desde el punto de vista cualitativo, una zona de inhibición superior a 9 mm indicó un resultado positivo, considerando que corresponde a la medida del diámetro externo de los cilindros. De manera posterior se realizó la semi-cuantificación utilizando las curvas de calibración de los antimicrobianos, para calcular la concentración de los analitos en las matrices fortificadas.

2.2 Evaluación del cumplimiento de los LMR y de los tiempos de retiro en músculo bovino

Las muestras de músculo bovino tomadas en la planta de beneficio fueron analizadas mediante el bioensayo, y adicionalmente con los métodos microbiológicos del hisopo y la prueba comercial Premi® Test

2.2.1 Bioensayo en placas con muestras de músculo diafragmático de bovinos faenados

El muestreo se realizó en el Frigorífico Guadalupe EFEGE en Bogotá, a manera de un estudio piloto para la detección de residuos antimicrobianos en carne bovina como contribución al sistema MSF. El estudio se realizó entre los meses de abril y junio de 2011. Los animales fueron seleccionados aleatoriamente de treinta y ocho turnos sacrificados durante el día, se tomaron las porciones de

músculo diafragmático, en consideración a la disponibilidad presupuestal y a aspectos logísticos como la velocidad de la línea para la coordinación de la obtención de la información y de la toma de las muestras.

Los criterios de inclusión para tomar muestras de músculo diafragmático, consistieron en que histológicamente corresponde a músculo esquelético (células musculares esqueléticas que aparecen como fibras cilíndricas largas y paralelas de diámetro casi uniforme) (80). De hecho, el *Codex Alimentarius* define "músculo" como el tejido esquelético de una canal (36), por lo que la detección de residuos antimicrobianos en el diafragma, sugiere la presencia de residuos en otros músculos. Adicionalmente, el aprovechamiento de la canal bovina se ve menos afectado cuando se usa diafragma como matriz de prueba.

La toma de las muestras se realizó con la participación de seis operarios de la línea de sacrificio. El proceso empezó con el estudio de la "Planilla de Corrales", que relaciona fecha, hora de inicio y finalización, números de turnos o lotes (dígitos que corresponden a un dueño determinado), propietarios, cantidad de animales por lote y número total de bovinos a sacrificar.

La definición de los lotes a muestrear se realizó en función de la probabilidad de obtener información sobre la procedencia de los bovinos, coordinando en la zona de báscula de ingreso, con dos funcionarios del frigorífico con el fin de conocer los animales que pertenecían a un mismo propietario y turno y que serían sacrificados bajo igual turno y razón social, dado que la identificación podría variar de acuerdo con el proceso de compra y venta de animales al interior de la planta. Con éstos datos se establecieron los lotes y animales a muestrear, por ejemplo el primer vacuno de cada turno o muestras alternas de bovinos de un mismo lote.

En la zona de izado un operario indicaba el género del animal, y retiraba la cabeza que se identificaba con el número del turno y otro funcionario, una vez expuesto el árbol de vísceras rojas realizaba incisiones sobre la superficie del hígado señalando el turno. En ésta etapa el bazo, que forma parte del paquete con el hígado y el diafragma entre otros, fue identificado con una "X" para indicar la toma posterior de la muestra de diafragma por parte de otro funcionario.

En el área de cabezas con la ayuda de un trabajador de la planta, se realizó el registro fotográfico de la dentición de cada vacuno con el objeto de determinar la edad del animal.

Las muestras de músculo diafragmático (n=138) fueron obtenidas de bovinos machos y hembras sacrificados durante cuatro visitas a la planta de beneficio. De las ciento treinta y ocho muestras se seleccionaron ciento cuatro (n=104), de las cuales se obtuvo la información referida a género, edad y procedencia de los animales (Anexo I). Las dos primeras variables se determinaron por inspección

visual y la procedencia mediante la revisión de la "Guía sanitaria de movilización interna" expedida por el ICA. De cada uno de los animales se tomaron 500 g aproximadamente que fueron colectadas en bolsas estériles individuales, se rotularon y transportaron al Laboratorio de Residuos de Medicamentos Veterinarios (área de microbiología) del Laboratorio Nacional de Insumos Pecuarios del Instituto Colombiano Agropecuario, ubicado en Mosquera-Cundinamarca, donde fueron preparadas retirándoles la mayoría del tejido graso y peritoneo parietal, para luego ser procesadas mediante *screening* microbiológico.

Las muestras fueron homogenizadas y pesadas conservando una contra-muestra congelada a -70°C . Se usaron elementos limpios de corte, pesaje y mezclado para cada muestra garantizando la separación de las mismas. Posteriormente se pesaron cuatro porciones de 5 ± 0.2 g en bolsas estériles identificadas con los tipos de soluciones *buffer* pH 4.5, pH 6.0, pH 8.0-0.1M y pH 8.0-0.2 M (ver preparación en el Anexo F), a las que se les adicionaron 20 ± 0.5 ml del *buffer* correspondiente (Tabla 2).

Los tejidos y las soluciones *buffer* fueron mezclados en un homogenizador de alimentos (Stomacher[®] 400 Circulator Seward) durante sesenta (60) segundos a 592 r.p.m. Los extractos obtenidos se dejaron reposar por cuarenta y cinco (45) minutos y luego se transfirieron a tubos, los cuales fueron centrifugados durante 10 minutos a 5°C y 4000 r.p.m.

Montaje

Las placas se rotularon de acuerdo al código de la muestra y teniendo en cuenta los extractos que se analizarían.

Cuidadosamente se ubicaron seis cilindros (cilindros plásticos de 8 mm de diámetro interno, 9 mm de diámetro externo y 10 mm de altura) en cada placa, identificando el inicial mediante una línea demarcada al reverso y al lado de cada caja.

Tres cilindros alternados se llenaron con la dilución correspondiente a la concentración media del estándar antibiótico de referencia, establecida en la curva de calibración. Posteriormente se llenaron los cilindros restantes con 200 ± 4 μl del extracto de la muestra de prueba correspondiente. Los pozos fueron llenados en el sentido de las agujas del reloj, una placa entera fue usada para cada muestra.

Las placas 1 a la 6 se incubaron a $29\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 16 a 18 h y la placa 7 a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 16-18 horas. Después de la incubación de las placas y la remoción de los cilindros, las cajas se organizaron de acuerdo a una secuencia numérica. La zona de lectura fue alineada a "0" y se empezó a leer el resultado a la décima más próxima de cada zona de inhibición desde el primer pozo en el sentido de las manecillas del reloj, empleando para tal efecto un calibrador. Los resultados se registraron en un formato establecido para ese fin.

Interpretación de resultados

La concentración del estándar antibiótico de referencia o un residuo antimicrobiano detectable en una muestra, producirían zonas de inhibición en una o más de las placas de Petri. Tras la incubación, una zona de inhibición >9 mm indicaría un resultado positivo, considerando que corresponde a la medida del diámetro externo de los cilindros en los que se depositaron las diluciones antimicrobianas y los extractos de los tejidos.

Ciertos residuos antimicrobianos pueden ser identificados de acuerdo a sus patrones característicos de inhibición o perfiles de susceptibilidad. La Tabla 8 menciona las pautas para la interpretación de resultados. La presencia y/o ausencia de zonas de inhibición en cada una de las siete placas y los tamaños relativos de los halos son usados en la interpretación de resultados.

Tabla 8. Pautas para la identificación presuntiva de residuos antimicrobianos

Antimicrobiano	Placa						
	1 BC BF pH 4.5	2 KR BF pH 6.0	3 KR+penici- linasa BF pH 6.0	4 BS BF pH 8.0	5 KR BF pH 8.0	6 KRER BF pH 8.0	7 SE BF pH 8.0
Zonas de inhibición							
Tetraciclina	X						
Penicilina		X	No*				
Estreptomina				X			
Eritromicina					X	No*	
Aminoglucósidos				X			X

*Placas 3 y 6 son consideradas confirmatorias

2.2.2 Pruebas microbiológicas adicionales al bioensayo en placas con muestras de músculo diafragmático de bovinos faenados

La técnica microbiológica del bioensayo en placas tiene la capacidad de detectar residuos antimicrobianos, y además permite orientar sobre el tipo y concentración de los residuos encontrados preliminarmente por otras pruebas como el hisopo y Premi® Test. En este sentido, las muestras de músculo diafragmático de los bovinos faenados en la planta de sacrificio, fueron analizadas mediante el bioensayo, y adicionalmente con los métodos microbiológicos del hisopo y la prueba comercial Premi® Test.

Prueba del hisopo

El método del hisopo descrito en la Norma Oficial Mexicana NOM-032-ZOO-1996, es una prueba tamiz orientada a determinar preliminarmente la presencia de residuos de antimicrobianos, en la cual un hisopado procedente del músculo a evaluar es ubicado sobre una caja de agar adicionada previamente con una concentración conocida de esporas de *Bacillus subtilis* y llevada a incubar a $35\pm 1^{\circ}\text{C}$. La presencia de zonas de inhibición es la evidencia presuntiva de que el tejido puede contener residuos antimicrobianos (81).

Cepa de prueba

La prueba se realizó con esporas de la cepa *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Luego de la confirmación del microorganismo mediante pruebas bioquímicas convencionales, la cepa madre fue mantenida en congelación. Para su uso fue descongelada y sembrada en agar CASO y se incubó durante 18 a 24 horas a $35\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Preparación de la suspensión de esporas de *Bacillus subtilis* ATCC 6633

El microorganismo esporoformador fue activado y las esporas obtenidas en el agar esporulante fueron cosechadas y lavadas (Anexos B y C).

Las esporas fueron cuantificadas por recuento en superficie en agar *Plate count*. Una vez determinado el número de esporas/ml, la suspensión fue almacenada en refrigeración y rotulada indicando la concentración, fecha de producción y de caducidad. Para su uso la suspensión fue utilizada a una concentración final de 1×10^4 esporas por ml de agar (Anexo D).

Preparación de las placas

Para la prueba se utilizó Agar Antibiótico No. 5 en placas de Petri de 25x100 mm, dispensando 30 ml de agar, dejando solidificar y luego dispensando 4 ml de agar con una concentración final de esporas de BS de 1×10^4 esporas por ml de medio de cultivo.

Preparación de las muestras

Para la obtención de los hisopados de las muestras de músculo diafragmático se realizaron dos incisiones con bisturí en cada uno de los tejidos, y se introdujeron hisopos de algodón hasta que se impregnaran con las muestras a analizar (Figura 5),

moviéndolos de forma giratoria en el tejido. Los hisopos se mantuvieron en el tejido una hora, removiéndolos cada 15 minutos para facilitar la impregnación con el líquido tisular.

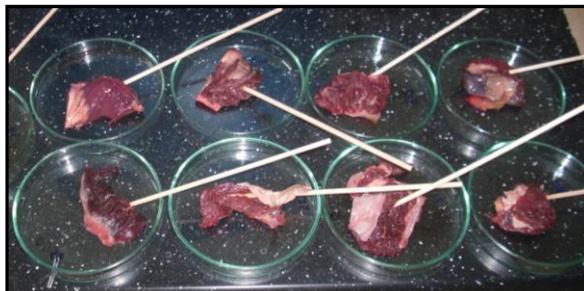


Figura 5. Hisopados de músculo diafragmático

Las muestras fueron procesadas por duplicado y se utilizaron controles negativos de tejido de animales no tratados con antibióticos. Se usaron controles positivos de tejido fortificado y de tejido dosificado, así mismo se incluyó un sensidisco de 5 µg de estreptomicina como control positivo.

Montaje

Los hisopados del tejido a evaluar fueron colocados en la superficie de una caja de agar adicionada con las esporas según fue descrito (Figura 6). Las placas fueron incubadas a $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas.

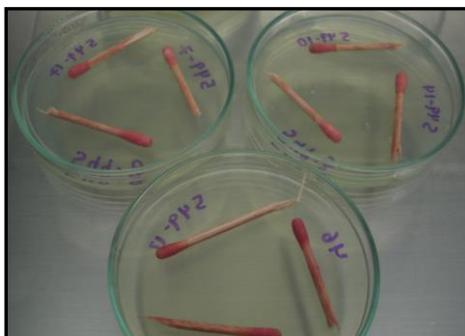


Figura 6. Montaje de hisopados de muestras

Interpretación de resultados

Las muestras consideradas positivas fueron aquellas donde se presentó un halo de inhibición alrededor del hisopo o negativas si no se observaba inhibición del crecimiento de la bacteria.

Prueba comercial

Paralelamente se utilizó Premi® Test (R-Biopharm AG) que es una prueba comercial que consiste en un vial que contiene un medio de

cultivo con esporas de *Geobacillus stearothermophilus* (antes *Bacillus stearothermophilus*), una bacteria sensible a beta-lactámicos, tetraciclinas, macrólidos y sulfonamidas. La prueba se basa en el principio de difusión en agar y es visualizada por el cambio de color del indicador de pH (púrpura de bromocresol), debido a la actividad metabólica del microorganismo de prueba. Al calentarlo a 64°C, las esporas germinan; si no se encuentran sustancias antimicrobianas, las esporas se multiplican produciendo ácido carbónico, y el indicador vira de violeta a amarillo. Si el crecimiento de la bacteria es inhibido por la presencia de residuos antimicrobianos el agar del tubo continúa siendo violeta (82).

Preparación de las muestras

Las muestras de diafragma bovino fueron descongeladas y se procedió a tomar aproximadamente dos centímetros cúbicos de músculo magro y se introdujo en una prensa de ajos para extraer alrededor de 250 µl de fluido de músculo.

Montaje

Premi® Test se usó de acuerdo a las instrucciones del fabricante. En resumen, 100 µl del fluido cárnico a evaluar fueron adicionados cuidadosamente en la superficie de cada ampolla dejándola reposar durante 20 minutos a temperatura ambiente para permitir la pre-difusión (Figura 7). Luego se eliminó el exceso de fluido por lavado doble con agua destilada que fue descartada. Las ampollas fueron cubiertas con la lámina y llevadas a baño serológico a 64°C durante tres horas, periodo durante el cual el control negativo viró a amarillo.

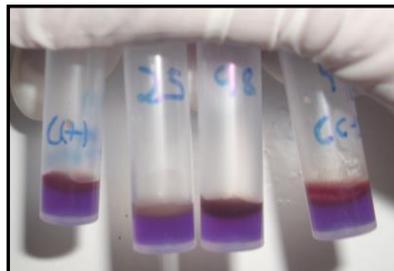


Figura 7. Viales de Premi® Test inoculados con fluido cárnico

Interpretación de resultados

Se evaluó el color del agar luego de la incubación del organismo de prueba. El viraje de violeta a amarillo, indicaba que la muestra no contenía sustancias antimicrobianas.

Si la esporulación de la bacteria era inhibida por la presencia de residuos antimicrobianos en las muestras de tejido muscular,

el color del indicador del tubo permanecía violeta, sugiriendo un resultado positivo.

2.3 Cálculo de la concentración de residuos antimicrobianos en tejidos dosificados

En las muestras incurridas de tejidos de un bovino dosificado, en las que se detectaron e identificaron residuos de los antimicrobianos, se realizó la semi-cuantificación de los mismos mediante la línea de regresión lineal de la curva de calibración de las diluciones antibióticas.

2.3.1 Tejido dosificado

A un ternero Holstein macho de 35 kg de peso, se le administró un medicamento veterinario registrado ante el ICA, a una dosis práctica de 1 ml por cada 15 kg de peso por vía intramuscular profunda (15.000 UI de penicilinas por kg de peso del animal y 20 mg de estreptomycinina por kg de peso vivo). Cada mililitro de la suspensión contenía 160.000 UI de penicilina G procaínica, 80.000 UI de penicilina G potásica y 0.32 g de estreptomycinina. El tiempo de retiro reportado y aprobado es de 30 días. Se usó material desechable para aplicar el producto cada 12 horas, alternando los puntos de inyección entre el glúteo profundo derecho y el izquierdo, hasta completar ocho inyecciones consecutivas.

Ocho horas después de la última administración del producto antibiótico, el ternero fue sacrificado y se tomaron muestras de los puntos de inyección (glúteo profundo izquierdo y derecho), así como de otros músculos de los miembros posteriores (semitendinoso y semimembranoso), músculos de los miembros anteriores (redondo mayor, subescapular y tríceps), dorsal largo, músculo diafragmático, hígado y riñones. De manera inmediata, los tejidos se almacenaron individualmente en bolsas plásticas estériles rotuladas, se refrigeraron y transportaron al laboratorio, en donde se congelaron a -20°C . Al día siguiente, todos los tejidos obtenidos fueron analizados de acuerdo a las pruebas o ensayos cuyas características están especificadas en la Tabla 9.

Tabla 9. Especificaciones de los ensayos microbiológicos con tejido dosificado

PRUEBA CARACTERÍSTICA	BIOENSAYO EXTRACTOS		BIOENSAYO LÍQUIDOS TISULARES DE DESCONGELACIÓN (LTD)			HISOPO
	Detección Betalactámicos	Detección Aminoglucósidos	PARTE A	PARTE B		
				B1	B2	
Muestra	Extracción en buffer fosfato	Extracción en buffer fosfato	LTD	LTD	LTD	Descongelada
Cantidad muestra	200 µl / 40 µl	200 µl / 40 µl	120 µl	200 µl	200 µl	Hisopado
Filtración muestra	Si / No	Si / No	No	No	No	No
Agar antibiótico	No. 4	No. 5	No. 5	No. 4	No. 5	No. 5
Volumen agar (ml) por caja	8-8,5	8-8,5	30	8-8,5	8-8,5	30
Penicilinasa	No	Si	No	No	Si	No
Organismo	<i>Kocuria rhizophila</i> 9341 ^a	<i>Bacillus subtilis</i> 6633	<i>Bacillus subtilis</i> 6633	<i>Kocuria rhizophila</i> 9341a	<i>Bacillus subtilis</i> 6633	<i>Bacillus subtilis</i> 6633
Concentración inóculo	8x10 ⁵ cél.veg/ml	1x10 ⁴ esporas/ml	1x10 ⁴ esporas/ml	8x10 ⁵ cél.veg/ml	1x10 ⁴ esporas/ml	1x10 ⁴ esporas/ml
Instrumento	Cilindros / Perforaciones agar	Cilindros / Perforaciones agar	Perforaciones agar	Cilindros	Cilindros	Hisopo
Incubación (°C)	29±1°C 16-18 horas	29±1°C 16-18 horas	35±1°C 24 horas	29±1°C 16-18 horas	29±1°C 16-18 horas	35±1°C 24 horas

2.3.2 Bioensayo para detección de penicilina y estreptomina en extractos

El bioensayo para la detección de residuos de penicilina y de estreptomina se realizó a los extractos de las muestras homogenizadas de hígado (5,037 g y 5,009 g), riñones (5,099 g y 5,060 g), glúteo profundo derecho (5,011 g y 5,014 g) y semitendinoso izquierdo (5,018 g y 5,098 g).

Para la determinación de residuos de cada uno de los antimicrobianos, se usaron ocho placas de Petri con 8-8,5 ml de medio de cultivo, en las que se dispusieron tres cilindros en los que se adicionaron 200 μ l de los extractos y se hicieron tres perforaciones para depositar 40 μ l de los extractos. En cuatro placas se añadieron extractos filtrados de los tejidos y en las otras cuatro cajas, extractos sin filtrar.

Para la preparación de las placas que se emplearon para la detección de residuos de penicilina, se usó agar antibiótico No. 4 inoculado con *Kocuria rhizophila* ATCC 9341a (8×10^5 células vegetativas/ml). Los tejidos fueron extraídos en 20 ml de buffer fosfato 0,1 M pH 6.0 y centrifugados para su uso.

Las ocho placas para la detección de estreptomina, se sirvieron con agar antibiótico No. 5 inoculado con esporas de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (1×10^4 esporas/ml), luego de la incubación en baño serológico a $48 \pm 2^\circ\text{C}$ por 75 minutos. Posteriormente se adicionó penicilinasa al medio a razón de 1ml/100 ml de agar. Los tejidos fueron extraídos en 20 ml de buffer fosfato 0,1 M pH 8.0 y centrifugados para su uso.

Los halos de inhibición se midieron luego de la incubación de todas las placas a $29 \pm 1^\circ\text{C}$ por 16 a 18 horas.

2.3.3 Pruebas microbiológicas adicionales al bioensayo en placas con muestras de tejido dosificado bovino

Algunas de las muestras de tejido dosificado del ternero fueron procesadas mediante el bioensayo. Adicionalmente varias matrices se analizaron con el método microbiológico del hisopo, y se realizaron pruebas con líquidos tisulares de descongelación bajo idénticas condiciones del bioensayo en placas, exceptuando la extracción de las muestras.

Bioensayos con líquidos tisulares de descongelación

Se consideran líquidos tisulares de descongelación LTD, aquellos que resultan del proceso espontáneo de descongelación de las matrices de prueba. Los LTD del hígado y de los músculos glúteo profundo izquierdo y derecho, semitendinoso izquierdo y derecho, redondo mayor, semimembranoso izquierdo y derecho, dorsal largo, subescapular, tríceps y diafragma, se utilizaron en los dos ensayos que se describen:

Parte A. La primera prueba usó dos placas de Petri. A cada una se adicionó 30 ml de agar antibiótico No. 5 inoculado previamente con *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (1×10^4 esporas/ml). Una vez solidificado, se hicieron seis perforaciones al agar de cada caja, dispensando 120 μ l de líquido de cada uno de los doce tejidos a probar (Figura 8). Se tomaron las medidas de las zonas de inhibición luego de la incubación de las placas durante 24 horas a $35 \pm 1^\circ\text{C}$.

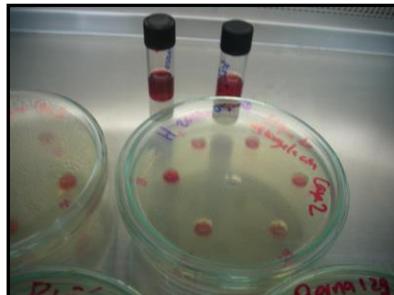


Figura 8. Prueba con líquidos tisulares de descongelación (Parte A)

Parte B. En seis placas de Petri se vertieron 8 ml de agar antibiótico No. 4. El agar se inoculó previamente con *Kocuria rhizophila* ATCC 9341a (8×10^5 células vegetativas/ml).

Seis cajas de Petri adicionales fueron servidas con 8 ml de agar antibiótico No. 5. El medio fue inoculado con esporas de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (1×10^4 esporas/ml), luego de la incubación en baño serológico a $48 \pm 2^\circ\text{C}$ por 75 minutos. Posteriormente se adicionó penicilinasa al medio, a razón de 1ml/100 ml de agar.

Se ubicaron seis cilindros en cada una de las placas y se sirvieron 200 μ l de los líquidos de descongelación correspondientes a los doce tejidos. El líquido de cada tejido se depositó al interior de tres cilindros. Los halos de inhibición se midieron luego de que las cajas se incubaron durante 16 a 18 horas a $29 \pm 1^\circ\text{C}$.

Prueba del hisopo

Se realizó la prueba del hisopo a los tejidos descongelados a temperatura ambiente. A las muestras de riñones, hígado, diafragma, glúteo profundo izquierdo (punto de inyección), glúteo profundo derecho (punto de inyección) y semitendinoso izquierdo, se les

hicieron incisiones con cuchillas individuales y estériles, en las que se introdujeron hisopos por duplicado en cada uno de los tejidos, que posteriormente se ubicaron en placas de Petri con 30 ml de agar antibiótico No. 5 inoculado previamente con *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (1×10^4 esporas/ml) (Figura 9). Los controles positivos fueron soluciones antimicrobianas preparadas en el laboratorio. Las placas se incubaron a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 horas.

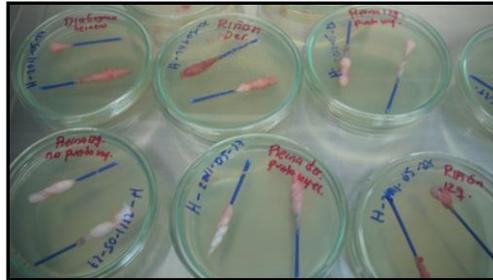


Figura 9. Prueba del hisopo a tejidos dosificados

3. Resultados

3.1 Adecuación del bioensayo en placas de agar

De acuerdo a los lineamientos establecidos en la guía del Servicio de Inspección de Inocuidad de Alimentos -FSIS por su sigla en inglés- de Estados Unidos, se adecuó el bioensayo de siete placas para la detección, identificación y semi-cuantificación de residuos antimicrobianos en músculo bovino. La pureza e identidad de los organismos fueron confirmadas, así como la viabilidad y la susceptibilidad de las cepas a los antimicrobianos. Los procedimientos relacionados con la preparación y montaje de las placas también fueron estandarizados. De otra parte, los controles con los sensidiscos y con tejidos blancos y fortificados se comportaron según lo esperado para la prueba.

En consideración a la importancia del bioensayo como prueba preliminar de *screening* para la detección y segundo nivel de tamizaje de residuos antimicrobianos, y de su valor para el sistema de gestión de inocuidad en el marco de aplicación de Medidas Sanitarias y Fitosanitarias, de manera adicional a la adecuación de la técnica del bioensayo del FSIS, se realizó la estandarización del método y se evaluaron preliminarmente los criterios de funcionamiento del bioensayo multiplacas, con el fin de contar con una herramienta analítica confiable para apoyar la aplicación de un "Programa de control de residuos de medicamentos veterinarios" y mejorar las condiciones sanitarias requeridas por el país para su adecuación a las reglas del comercio internacional de alimentos de origen animal.

3.1.1 Curvas de calibración

Los ejemplos de las curvas de calibración realizadas con diluciones de cada uno de los estándares antimicrobianos, pueden observarse en las tablas 10 a 14. Las diluciones designadas como concentraciones medias, correspondieron a: 0,4 ppm de eritromicina, 0,2 ppm de oxitetraciclina, 0,05 ppm de penicilina G potásica, 1,2 ppm de estreptomycin y 1,0 ppm de neomicina. Se presentan también las

gráficas correspondientes a la regresión lineal de cada una de las curvas de calibración (Figuras 10 a 14). Los diámetros corregidos de las zonas de inhibición se encuentran en el eje x y los logaritmos naturales de las concentraciones antibióticas en el eje y.

Tabla 10. Curva de calibración con soluciones de eritromicina

Concentración (ppm)	0,1	0,4	0,2	0,4	0,8	0,4	1,6	0,4
ZI (mm) PLATO I	20,50	25,60	23,10	25,00	28,40	25,10	30,90	23,80
	20,00	21,00	21,90	24,70	28,70	26,30	30,00	23,80
	19,90	26,30	22,00	23,20	26,90	25,00	30,10	23,50
ZI (mm) PLATO II	18,80	26,35	23,00	24,00	27,40	24,60	31,00	23,90
	21,50	25,70	24,00	23,50	28,20	24,70	31,20	24,10
	21,00	24,80	23,90	24,00	27,90	24,60	30,50	23,90
ZI (mm) PLATO III	21,00	25,70	22,80	25,40	27,00	24,70	29,00	23,90
	22,10	24,90	22,00	25,30	27,50	23,60	29,80	24,10
	21,30	23,60	22,30	26,20	27,90	23,60	30,10	24,50
Promedio	20,68	24,88	22,89	24,59	27,77	24,69	30,29	23,94
Promedio RE (36 pozos)	24,53							
Factor de corrección	-0,36		-0,06		-0,16		0,58	
Promedio corregido	20,32		22,83		27,60		30,87	

Figura 10. Regresión lineal curva de calibración de eritromicina

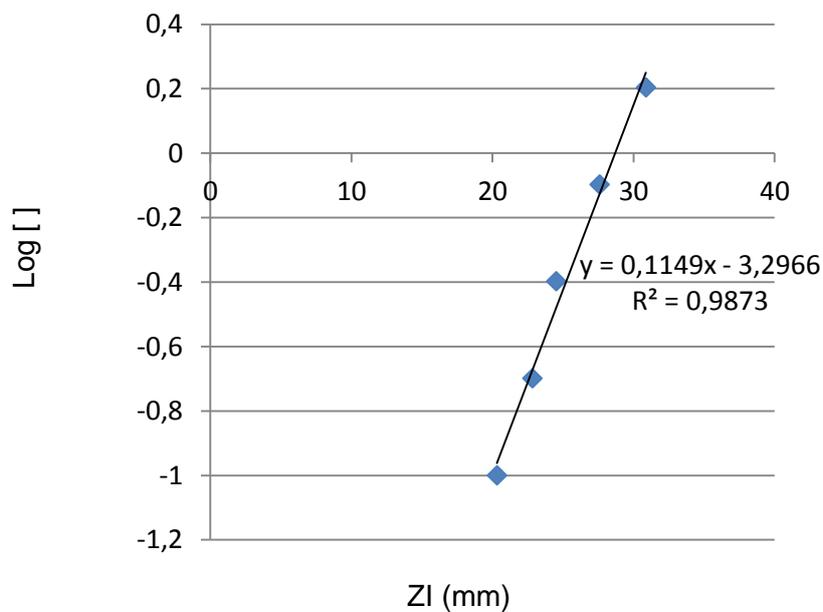


Tabla 11. Curva de calibración con soluciones de oxitetraciclina

Concentración (ppm)	0,05	0,2	0,1	0,2	0,4	0,2	0,8	0,2
ZI (mm) PLATO I	20,50	24,60	22,00	24,00	30,00	23,80	33,30	23,50
	21,00	24,90	22,60	24,00	30,00	23,80	34,00	23,50
	21,90	24,00	22,20	24,20	31,00	24,00	34,50	24,00
ZI (mm) PLATO II	18,50	23,60	22,05	25,00	29,60	25,00	36,00	24,60
	18,00	24,60	22,00	25,30	29,90	24,70	35,10	24,70
	18,70	24,00	20,80	25,90	30,50	24,60	35,00	24,30
ZI (mm) PLATO III	17,80	24,80	21,00	25,30	29,00	24,00	35,30	25,70
	18,20	25,00	19,80	26,10	28,90	25,00	35,00	25,70
	18,30	25,20	19,20	25,00	29,20	24,00	34,80	25,30
Promedio	19,21	24,52	21,29	24,98	29,79	24,32	34,78	24,59
Promedio RE (36 pozos)	24,60							
Factor de corrección	0,08		-0,38		0,28		0,01	
Promedio corregido	19,29		20,92		30,07		34,79	

Figura 11. Regresión lineal curva de calibración de oxitetraciclina

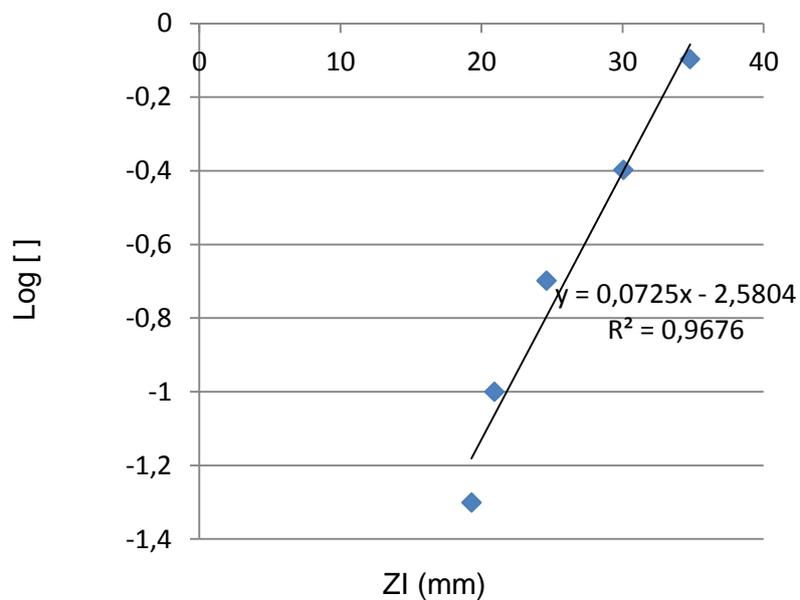


Tabla 12. Curva de calibración con soluciones de penicilina G potásica

Concentración (ppm)	0,0125	0,05	0,025	0,05	0,1	0,05	0,2	0,05
ZI (mm) PLATO I	21,50	32,40	28,60	32,00	39,00	34,60	41,60	33,90
	22,90	33,60	29,10	33,80	39,00	34,70	41,60	33,90
	21,70	35,00	29,70	33,50	39,50	34,00	42,00	34,00
ZI (mm) PLATO II	22,40	35,60	28,80	34,20	39,40	32,00	42,20	35,00
	23,00	36,00	28,80	34,20	37,30	33,30	42,00	36,00
	24,00	36,50	27,00	33,60	37,90	34,00	42,00	34,20
ZI (mm) PLATO III	22,70	33,00	28,70	34,00	37,80	35,00	43,00	33,60
	21,90	33,50	27,30	34,70	39,80	34,60	44,40	34,00
	23,80	34,00	27,00	34,00	40,00	34,60	43,00	34,00
Promedio	22,66	34,40	28,33	33,78	38,86	34,09	42,42	34,29
Promedio RE (36 pozos)	34,14							
Factor de corrección	-0,26		0,36		0,05		-0,15	
Promedio corregido	22,39		28,69		38,91		42,27	

Figura 12. Regresión lineal curva de calibración de penicilina G potásica

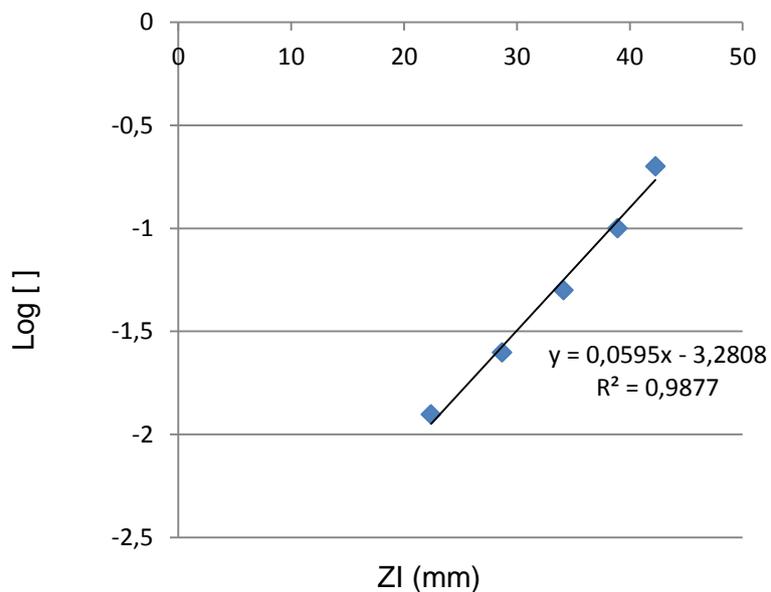


Tabla 13. Curva de calibración con soluciones de estreptomicina

Concentración (ppm)	0,45	1,2	0,6	1,2	2,4	1,2	4,8	1,2
ZI (mm) PLATO I	22,90	28,10	24,30	27,30	31,40	27,00	34,20	28,20
	22,00	28,10	24,60	27,80	30,00	28,30	34,20	28,50
	22,00	28,00	24,90	27,90	31,10	29,00	34,50	27,50
ZI (mm) PLATO II	20,35	28,00	24,60	27,90	31,00	27,00	36,00	28,45
	22,40	27,60	24,20	27,40	31,70	27,20	35,80	28,45
	23,00	27,90	24,90	27,40	31,60	28,40	34,00	29,20
ZI (mm) PLATO III	22,40	28,20	22,80	27,60	31,70	27,30	37,80	28,45
	22,70	28,20	23,70	28,00	32,00	28,80	35,60	28,45
	22,70	28,30	24,00	28,00	32,30	29,50	34,90	29,00
Promedio	22,27	28,04	24,22	27,70	31,42	28,06	35,22	28,47
Promedio RE (36 pozos)	28,07							
Factor de corrección	0,02		0,37		0,01		-0,40	
Promedio corregido	22,29		24,59		31,43		34,82	

Figura 13. Regresión lineal curva de calibración de estreptomicina

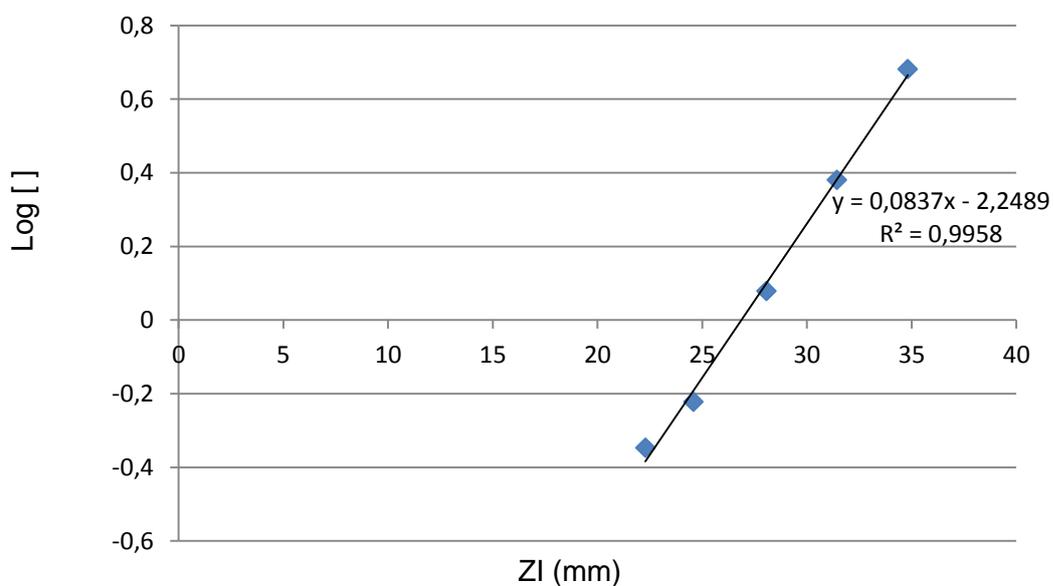
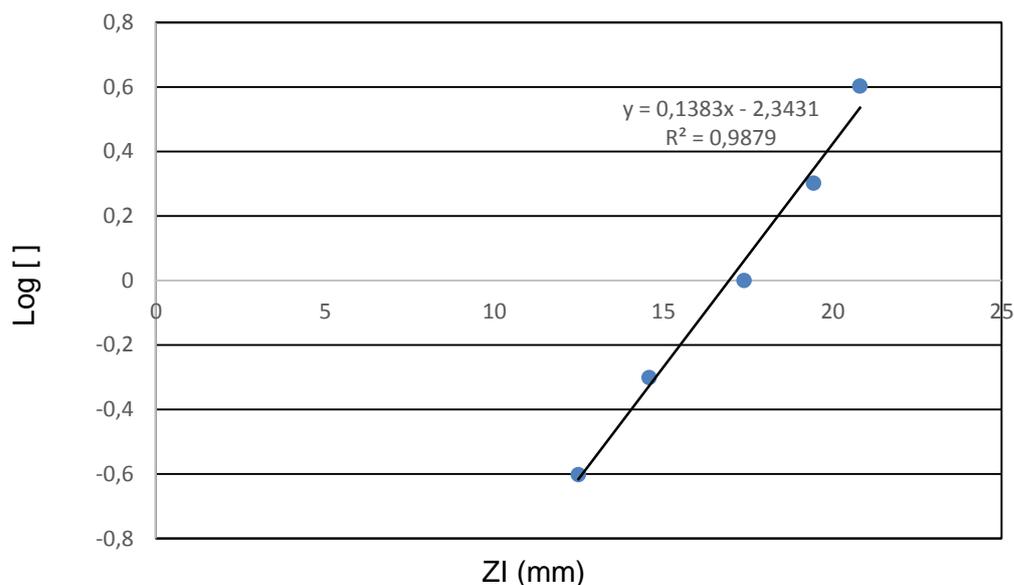


Tabla 14. Curva de calibración con soluciones de neomicina

Concentración (ppm)	0,25	1,0	0,5	1,0	2,0	1,0	4,0	1,0
ZI (mm) PLATO I	12,50	17,10	14,45	16,95	18,65	16,80	21,00	16,95
	12,75	17,40	15,00	17,40	19,00	17,15	20,90	17,20
	12,30	17,50	14,25	17,20	20,40	17,35	20,20	17,60
ZI (mm) PLATO II	13,10	17,95	15,05	17,60	18,65	17,40	21,40	17,50
	12,50	17,05	14,05	16,80	19,75	16,90	20,95	17,10
	13,20	17,20	13,75	17,00	18,85	17,15	21,00	17,40
ZI (mm) PLATO III	12,15	17,40	14,70	17,30	18,95	17,25	21,00	17,50
	11,85	17,55	14,35	17,65	19,70	17,45	21,25	18,40
	13,00	18,15	14,90	17,75	19,50	17,45	20,90	18,10
Promedio	12,59	17,48	14,50	17,29	19,27	17,21	20,96	17,53
Promedio RE (36 pozos)	17,38							
Factor de corrección	-0,10		0,08		0,17		-0,15	
Promedio corregido	12,49		14,58		19,44		20,81	

Figura 14. Regresión lineal curva de calibración de neomicina



3.1.2 Criterios de funcionamiento del bioensayo

Los criterios de funcionamiento establecidos para el bioensayo en placas de agar con tejido de control fortificado a diferentes niveles de antibióticos y comparados con tejido no fortificado, fueron la sensibilidad, la especificidad y la exactitud relativas. Adicionalmente se evaluaron la estabilidad y la recuperación.

Determinación de la sensibilidad, especificidad y exactitud relativas

Los resultados de la sensibilidad del bioensayo con diferentes concentraciones de diluciones antimicrobianas se muestran en la Tabla 15. Los LDD correspondieron a la concentración antibiótica más baja que dio como resultado positivo para cada una de las repeticiones.

Tabla 15. Sensibilidad y LDD de los antimicrobianos en músculo bovino

Concentración ppm	R	PENICILINA G POTÁSICA			OXITETRACICLINA			ESTREPTOMICINA			ERITROMICINA		
		Cajas											
		a	b	C	a	b	c	a	b	c	a	b	c
		Diámetros zonas de inhibición (mm)											
Nivel matriz sin fortificación 0 ppm	1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	3	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	4	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	5	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	6	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
Nivel fortificación 1 P: 0,025 O: 0,05 ES: 0,45 ER: 0,1	1	N	N	N	11,60	11,60	11,80	N	N	N	10,55	10,55	9,15
	2	N	N	N	11,60	9,60	9,20	N	N	N	10,60	11,40	9,55
	3	N	N	N	N	N	N	N	N	N	9,05	N	N
	4	N	N	N	N	N	N	N	N	N	10,50	9,65	10,25
	5	N	N	N	N	N	N	N	N	N	12,45	11,60	13,00
	6	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	9,05	N
Nivel fortificación 2 P: 0,05* O: 0,1 ES: 0,6 ER: 0,2*	1	<u>10,00</u>	<u>11,00</u>	<u>11,60</u>	11,40	11,40	11,80	N	N	N	<u>13,80</u>	<u>17,10</u>	<u>14,05</u>
	2	<u>10,90</u>	<u>10,90</u>	<u>10,90</u>	N	N	N	N	N	N	<u>15,25</u>	<u>16,60</u>	<u>14,75</u>
	3	<u>11,50</u>	<u>11,50</u>	<u>10,80</u>	12,70	12,40	11,70	N	N	N	<u>14,90</u>	<u>14,90</u>	<u>12,20</u>
	4	<u>10,90</u>	<u>10,70</u>	<u>9,35</u>	10,80	10,80	11,70	N	N	N	<u>15,70</u>	<u>14,60</u>	<u>15,15</u>
	5	<u>10,75</u>	<u>9,30</u>	<u>10,55</u>	12,00	12,00	11,70	N	N	N	<u>14,00</u>	<u>13,20</u>	<u>13,35</u>
	6	<u>11,60</u>	<u>11,60</u>	<u>10,50</u>	11,70	10,30	10,70	N	N	N	<u>13,50</u>	<u>12,40</u>	<u>14,65</u>
Nivel fortificación 3 P: 0,1 O: 0,2* ES: 1,2 ER: 0,4	1	17,40	17,40	17,60	<u>13,00</u>	<u>14,40</u>	<u>13,10</u>	N	N	N	15,45	16,00	18,00
	2	18,15	18,80	14,70	<u>13,70</u>	<u>13,70</u>	<u>12,90</u>	N	N	N	19,00	17,80	16,00
	3	15,40	14,70	14,70	<u>12,90</u>	<u>14,00</u>	<u>13,00</u>	N	N	N	16,25	17,70	16,60
	4	13,40	13,50	14,70	<u>13,00</u>	<u>12,00</u>	<u>15,00</u>	N	N	N	15,35	17,20	16,60
	5	13,00	12,45	13,60	<u>12,50</u>	<u>13,50</u>	<u>13,10</u>	N	N	N	16,00	16,60	16,00
	6	16,80	16,80	16,00	<u>11,90</u>	<u>14,10</u>	<u>14,70</u>	N	N	N	16,50	17,80	17,00
Nivel fortificación 4 P: 0,2 O: 0,4 ES: 2,4* ER: 0,8	1	20,40	20,40	21,00	16,40	16,40	16,40	<u>19,00</u>	<u>19,00</u>	<u>19,30</u>	18,70	19,20	19,00
	2	19,85	20,45	20,40	15,80	15,80	16,60	<u>19,00</u>	<u>19,20</u>	<u>18,50</u>	20,80	19,40	19,70
	3	20,40	20,85	19,60	14,40	16,80	17,90	<u>22,40</u>	<u>22,00</u>	<u>21,80</u>	21,60	19,80	20,70
	4	19,00	19,30	19,30	17,30	16,40	16,40	<u>18,20</u>	<u>18,40</u>	<u>19,40</u>	18,55	20,00	19,20
	5	20,20	20,75	21,30	16,00	16,10	16,20	<u>20,65</u>	<u>20,00</u>	<u>20,10</u>	20,70	21,70	19,00
	6	19,70	22,30	20,20	17,50	17,50	18,50	<u>20,35</u>	<u>19,00</u>	<u>19,20</u>	19,15	22,00	18,85
Nivel fortificación 5 P: 0,4 O: 0,8 ES: 4,8 ER: 1,6	1	27,00	27,00	26,20	24,00	24,10	24,00	22,45	22,00	23,20	21,60	21,60	21,60
	2	27,20	25,00	25,00	23,60	22,00	24,90	23,00	23,00	22,50	21,85	21,25	21,90
	3	25,05	25,05	26,20	23,30	22,70	23,00	23,70	22,00	22,00	25,80	23,50	22,65
	4	25,50	24,50	28,00	22,80	23,00	23,00	23,00	28,80	23,70	21,20	21,20	21,85
	5	28,00	26,55	25,55	22,70	22,70	23,00	22,70	23,00	22,00	24,25	24,20	23,30
	6	26,40	25,65	26,60	22,40	25,00	23,00	22,65	23,00	23,00	23,90	23,40	23,90

* LDD con 100% de resultados positivos (Zona de inhibición > 9 mm).

R: Repetición N: Negativo (Zona de inhibición ≤ 9 mm) P: Penicilina O: Oxitetraciclina ES: Estreptomycin ER: Eritromicina

Las porciones de músculo fortificadas con 0,05 ppm de penicilina G potásica, produjeron zonas de inhibición cuya medida promedio fue de 10,79 mm con una desviación estándar σ de 0,69. Para el caso de oxitetraciclina, el promedio de los halos de inhibición generados a la concentración de 0,2 ppm fue de 13,36 mm con una σ de 0,85. Las matrices adicionadas con 2,4 ppm de estreptomina formaron zonas de inhibición con una medida promedio de 20,30 mm y con una σ de 2,30. Finalmente, el promedio de los halos de inhibición producidos por las porciones de músculo fortificadas con 0,2 ppm de eritromicina, fue de 14,45 mm y la σ 1,29

Se evaluaron extractos obtenidos de 24 muestras de músculo bovino procedente de animales no tratados previamente con ningún antimicrobiano. El análisis de estos tejidos con el bioensayo en las cuatro placas, no mostró resultados falsos positivos.

Para cada una de las concentraciones antibióticas o niveles de fortificación, se calcularon tres parámetros diferentes: la sensibilidad relativa $SR = VP / (VP + FN) * 100$; la especificidad relativa $ER = VN / (VN + FP) * 100$ y la exactitud relativa $ExR = (VP + VN) / n * 100$. Los resultados se presentan en las Tablas 16 a 19.

Tabla 16. Parámetros del bioensayo en músculo bovino fortificado con Penicilina G potásica

Concentración Ppm	VP	FN	FP	VN	SR %	ER %	ExR %
0,025	0	6	0	6	0	100	50
0,05	6	0	0	6	100	100	100
0,1	6	0	0	6	100	100	100
0,2	6	0	0	6	100	100	100
0,4	6	0	0	6	100	100	100

Donde:

VP = Verdaderos Positivos
 FN = Falsos Negativos
 FP = Falsos Positivos
 VN = Verdaderos Negativos
 SR = Sensibilidad Relativa
 ER = Especificidad Relativa
 ExR = Exactitud Relativa

Tabla 17. Parámetros del bioensayo en músculo bovino fortificado con Oxitetraciclina

Concentración Ppm	VP	FN	FP	VN	SR %	ER %	ExR %
0,05	2	4	0	6	33,33	100	66,66
0,1	5	1	0	6	83,33	100	91,66
0,2	6	0	0	6	100	100	100
0,4	6	0	0	6	100	100	100
0,8	6	0	0	6	100	100	100

Tabla 18. Parámetros del bioensayo en músculo bovino fortificado con Estreptomicina

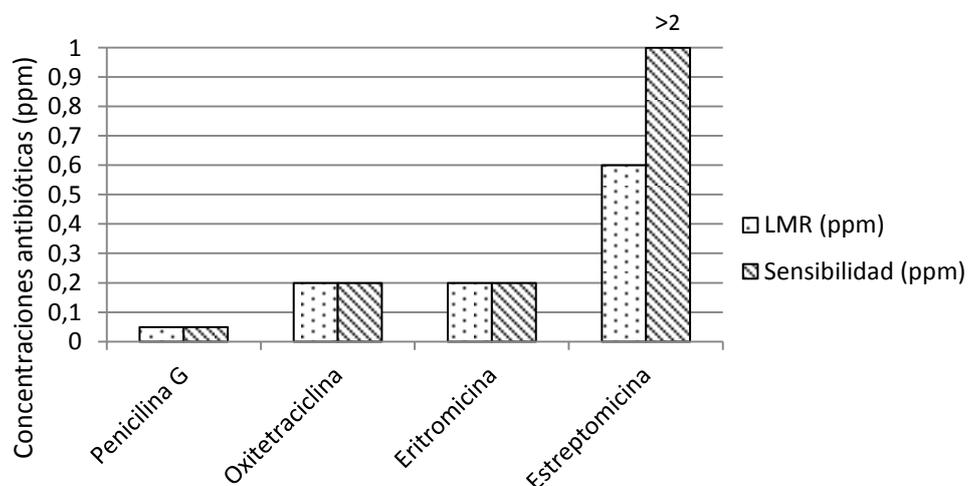
Concentración Ppm	VP	FN	FP	VN	SR %	ER %	ExR %
0,45	0	6	0	6	0	100	50
0,6	0	6	0	6	0	100	50
1,2	0	6	0	6	0	100	50
2,4	6	0	0	6	100	100	100
4,8	6	0	0	6	100	100	100

Tabla 19. Parámetros del bioensayo en músculo bovino fortificado con Eritromicina

Concentración Ppm	VP	FN	FP	VN	SR %	ER %	ExR %
0,1	4	2	0	6	66,66	100	83,33
0,2	6	0	0	6	100	100	100
0,4	6	0	0	6	100	100	100
0,8	6	0	0	6	100	100	100
1,6	6	0	0	6	100	100	100

La Figura 15 muestra la relación entre los LDD encontrados en el presente estudio para los cuatro antimicrobianos y sus respectivos LMRs en músculo. Se determinó que el bioensayo detectó penicilina G potásica, oxitetraciclina y eritromicina al nivel de los LMR en músculo bovino, establecidos por el *Codex Alimentarius* y Colombia para los dos primeros compuestos y por la Agencia Europea del Medicamento EMA para el caso de eritromicina, antibiótico para el cual el *Codex Alimentarius* y Colombia no han definido LMRs en la especie bovina. Sin embargo, la sensibilidad frente a estreptomicina (aminoglucósidos) se evidenció en un nivel correspondiente a cuatro veces el LMR fijado por el *Codex Alimentarius* y Colombia.

Figura 15. Comparación de los LMRs y los LDD de los antimicrobianos evaluados en el bioensayo



Análisis de la estabilidad

Las soluciones de antimicrobianos preparadas a los LDD establecidos, con las que se fortificaron cuatro porciones de $5 \pm 0,2$ g de tejido blanco por sustancia antibiótica, luego de realizarles el bioensayo a dos muestras el mismo día de la fortificación (día 0) y a los 30 días de congelación a -70°C , produjeron zonas de inhibición superiores a 9 mm para todos los extractos de los tejidos.

A los diámetros de las zonas de inhibición generadas el día cero y el día treinta por las concentraciones correspondientes al LDD de cada uno de los antibióticos en músculo bovino, se les realizó la "Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales", con el propósito de investigar si habían diferencias estadísticamente significativas en el tamaño de los halos, debidas al almacenamiento de las muestras durante un mes a la temperatura de -70°C . Los resultados pueden observarse en la Tabla 20.

Tabla 20. Estabilidad de los antimicrobianos en músculo bovino fortificado al LDD

Antibiótico	Muestra 1						Muestra 2					
	Día 0		Día 30				Día 0		Día 30			
Zonas de inhibición (mm)												
Penicilina G potásica 0,05 ppm	11,60	11,60	10,50	10,90	11,00	10,70	11,50	11,50	10,80	10,70	9,35	10,65
Promedio	11,23		10,87				11,27		10,23			
Varianza	0,403		0,023				0,163		0,586			
Estadístico t	0,972						2,068					
Valor crítico de t (dos colas)	4,303						3,182					
Oxitetrac. 0,2 ppm	11,90	14,10	14,70	11,70	12,50	13,00	12,90	14,00	13,00	12,00	13,10	12,50
Promedio	13,57		12,40				13,30		12,53			
Varianza	2,173		0,430				0,370		0,303			
Estadístico t	1,252						1,618					
Valor crítico de t (dos colas)	3,182						2,776					
Estreptom. 2,4 ppm	22,40	22,00	21,80	22,50	20,65	19,40	20,65	20,00	20,10	20,30	19,20	20,00
Promedio	22,07		20,85				20,25		19,83			
Varianza	0,093		2,432				0,123		0,323			
Estadístico t	1,326						1,081					
Valor crítico de t (dos colas)	4,303						3,182					
Eritromi. 0,2 ppm	15,70	14,60	15,15	13,80	14,75	13,35	15,25	16,60	14,75	13,60	13,90	14,35
Promedio	15,15		13,97				15,53		13,95			
Varianza	0,303		0,511				0,916		0,143			
Estadístico t	2,273						2,666					
Valor crítico de t (dos colas)	2,776						3,182					

Estudio de la recuperación

Los porcentajes de la recuperación aproximada de los antimicrobianos con los que se fortificó matriz en blanco de músculo bovino, se presentan en las Tablas 21 a 24.

Tabla 21. Recuperación de eritromicina en bioensayo con músculo bovino fortificado

Nivel de fortificación	Inhibición de crecimiento	ZI mm	Log C= 0.1149*D- 3,2966	Conc. [ppm]= Antilog.	Conc. estimada [ppm] con factor de dilución 5	% R
				C=10^ (0,1149*D- 3,2966)		
Nivel 0 (Control Negativo)	Negativo	NA	NA	NA	NA	NA
	Negativo	NA	NA	NA	NA	NA
	Negativo	NA	NA	NA	NA	NA
	Negativo	NA	NA	NA	NA	NA
	Negativo	NA	NA	NA	NA	NA
	Negativo	NA	NA	NA	NA	NA
Nivel 1 [0,1 ppm]	Positivo	10,08	-2,138408	0,00727096	0,03635482	36,35
	Positivo	10,52	-2,087852	0,00816861	0,04084303	40,84
	Negativo	NA	NA	NA	NA	0,00
	Positivo	10,13	-2,132663	0,00736779	0,03683893	36,84
	Positivo	12,35	-1,877585	0,01325608	0,06628038	66,28
	Negativo	NA	NA	NA	NA	0,00
Promedio						30,05
Nivel 2 [0,2 ppm]	Positivo	14,98	-1,575398	0,02658288	0,13291439	66,46
	Positivo	15,53	-1,512203	0,03074659	0,15373297	76,87
	Positivo	14,00	-1,688	0,02051162	0,10255811	51,28
	Positivo	15,15	-1,555865	0,02780577	0,13902887	69,51
	Positivo	13,52	-1,743152	0,01806542	0,09032709	45,16
	Positivo	13,52	-1,743152	0,01806542	0,09032709	45,16
Promedio						59,07
Nivel 3 [0,4 ppm]	Positivo	16,48	-1,403048	0,03953229	0,19766146	49,42
	Positivo	17,60	-1,27436	0,05316674	0,26583368	66,46
	Positivo	16,85	-1,360535	0,04359784	0,21798921	54,50
	Positivo	16,38	-1,414538	0,03850011	0,19250056	48,13
	Positivo	16,20	-1,43522	0,03670963	0,18354815	45,89
	Positivo	17,10	-1,33181	0,04657898	0,23289491	58,22
Promedio						53,77
Nivel 4 [0,8 ppm]	Positivo	18,97	-1,116947	0,0763929	0,3819645	47,75
	Positivo	19,97	-1,002047	0,09952977	0,49764885	62,21
	Positivo	20,70	-0,91817	0,12073411	0,60367057	75,46
	Positivo	19,25	-1,084775	0,08226687	0,41133437	51,42
	Positivo	20,47	-0,944597	0,11360645	0,56803226	71,00
	Positivo	20,00	-0,9986	0,10032288	0,50161441	62,70
Promedio						61,76
Nivel 5 [1,6 ppm]	Positivo	21,60	-0,81476	0,15319338	0,7659669	47,87
	Positivo	21,67	-0,806717	0,15605691	0,78028454	48,77
	Positivo	23,98	-0,541298	0,28754247	1,43771235	89,86
	Positivo	21,42	-0,835442	0,14606898	0,73034491	45,65
	Positivo	23,92	-0,548192	0,28301405	1,41507026	88,44
	Positivo	23,73	-0,570023	0,26913923	1,34569613	84,11
Promedio						67,45

NA: No aplica ZI: Zona de inhibición %R: Porcentaje de recuperación

Tabla 22. Recuperación de oxitetraciclina en bioensayo con músculo bovino fortificado

Nivel de fortificación	Inhibición de crecimiento	ZI mm	Log C= 0.0725*D-2,5804	Conc. [ppm]= Antilog.	Conc. estimada [ppm] con factor de dilución 5	% R
				C=10 [^] (0,0725*D-2,5804)		
Nivel 0 (Control Negativo)	Negativo	NA	NA	NA	NA	NA
	Negativo	NA	NA	NA	NA	NA
	Negativo	NA	NA	NA	NA	NA
	Negativo	NA	NA	NA	NA	NA
	Negativo	NA	NA	NA	NA	NA
	Negativo	NA	NA	NA	NA	NA
Nivel 1 [0,05 ppm]	Positivo	11,67	-1,734325	0,01843635	0,09218176	184,36
	Positivo	10,13	-1,845975	0,0142569	0,07128448	142,57
	Negativo	0	NA	NA	NA	0,00
	Negativo	0	NA	NA	NA	0,00
	Negativo	0	NA	NA	NA	0,00
	Negativo	0	NA	NA	NA	0,00
	Promedio 54,49					
Nivel 2 [0,1 ppm]	Positivo	11,53	-1,744475	0,01801047	0,09005234	90,05
	Negativo	0	NA	NA	NA	0,00
	Positivo	12,27	-1,690825	0,02037863	0,10189315	101,89
	Positivo	11,10	-1,77565	0,01676293	0,08381466	83,81
	Positivo	11,90	-1,71765	0,01915799	0,09578996	95,79
	Positivo	10,90	-1,79015	0,0162125	0,0810625	81,06
	Promedio 75,44					
Nivel 3 [0,2 ppm]	Positivo	13,50	-1,60165	0,02502361	0,12511806	62,56
	Positivo	13,43	-1,606725	0,0247329	0,12366449	61,83
	Positivo	13,30	-1,61615	0,02420193	0,12100965	60,50
	Positivo	13,33	-1,613975	0,02432344	0,1216172	60,81
	Positivo	13,03	-1,635725	0,02313529	0,11567646	57,84
	Positivo	13,57	-1,596575	0,02531774	0,12658872	63,29
	Promedio 61,14					
Nivel 4 [0,4 ppm]	Positivo	16,40	-1,3914	0,04060692	0,20303458	50,76
	Positivo	16,07	-1,415325	0,03843041	0,19215204	48,04
	Positivo	16,37	-1,393575	0,04040406	0,2020203	50,51
	Positivo	16,70	-1,36965	0,04269234	0,21346172	53,37
	Positivo	16,10	-1,41315	0,03862336	0,19311678	48,28
	Positivo	17,83	-1,287725	0,0515555	0,2577775	64,44
	Promedio 52,57					
Nivel 5 [0,8 ppm]	Positivo	24,03	-0,838225	0,14513595	0,72567975	90,71
	Positivo	23,50	-0,87665	0,13284646	0,66423232	83,03
	Positivo	23,00	-0,9129	0,1222081	0,61104051	76,38
	Positivo	22,93	-0,917975	0,12078834	0,60394168	75,49
	Positivo	22,80	-0,9274	0,11819524	0,59097622	73,87
	Positivo	23,47	-0,878825	0,13218282	0,66091408	82,61
	Promedio 80,35					

NA: No aplica NA: No aplica ZI: Zona de inhibición %R: Porcentaje de recuperación

Tabla 23. Recuperación de estreptomicina en bioensayo con músculo bovino fortificado

Nivel de fortificación	Inhibición de crecimiento	ZI mm	Log C= 0.0837*D-2,2489	Conc. [ppm]= Antilog.	Conc. estimada [ppm] con factor de dilución 5	% R
				C=10 [^] (0,0837*D-2,2489)		
Nivel 0 (Control Negativo)	Negativo	NA	NA	NA	NA	NA
	Negativo	NA	NA	NA	NA	NA
	Negativo	NA	NA	NA	NA	NA
	Negativo	NA	NA	NA	NA	NA
	Negativo	NA	NA	NA	NA	NA
	Negativo	NA	NA	NA	NA	NA
Nivel 1 [0,45 ppm]	Negativo	NA	NA	NA	NA	0,00
	Negativo	NA	NA	NA	NA	0,00
	Negativo	NA	NA	NA	NA	0,00
	Negativo	NA	NA	NA	NA	0,00
	Negativo	NA	NA	NA	NA	0,00
	Negativo	NA	NA	NA	NA	0,00
Nivel 2 [0,6 ppm]	Negativo	NA	NA	NA	NA	0,00
	Negativo	NA	NA	NA	NA	0,00
	Negativo	NA	NA	NA	NA	0,00
	Negativo	NA	NA	NA	NA	0,00
	Negativo	NA	NA	NA	NA	0,00
	Negativo	NA	NA	NA	NA	0,00
Nivel 3 [1,2 ppm]	Negativo	NA	NA	NA	NA	0,00
	Negativo	NA	NA	NA	NA	0,00
	Negativo	NA	NA	NA	NA	0,00
	Negativo	NA	NA	NA	NA	0,00
	Negativo	NA	NA	NA	NA	0,00
	Negativo	NA	NA	NA	NA	0,00
Nivel 4 [2,4 ppm]	Positivo	19,10	-0,65023	0,22375358	1,11876792	46,62
	Positivo	18,90	-0,66697	0,21529304	1,07646522	44,85
	Positivo	22,07	-0,401641	0,39660574	1,98302872	82,63
	Positivo	18,66	-0,687058	0,20556161	1,02780803	42,83
	Positivo	20,25	-0,553975	0,27927046	1,3963523	58,18
	Positivo	19,52	-0,615076	0,24261855	1,21309274	50,55
Promedio 54,27						
Nivel 5 [4,8 ppm]	Positivo	22,55	-0,361465	0,43504582	2,1752291	45,32
	Positivo	22,83	-0,338029	0,45916735	2,29583675	47,83
	Positivo	22,57	-0,359791	0,43672595	2,18362976	45,49
	Positivo	25,17	-0,142171	0,72082360	3,60411802	75,09
	Positivo	22,57	-0,359791	0,43672595	2,18362976	45,49
	Positivo	22,88	-0,333844	0,46361342	2,31806711	48,29
Promedio 51,25						

NA: No aplica NA: No aplica ZI: Zona de inhibición %R: Porcentaje de recuperación

Tabla 24. Recuperación de penicilina G potásica en bioensayo con músculo bovino fortificado

Nivel de fortificación	Inhibición de crecimiento	ZI mm	Log C= 0.0595*D- 3,2808	Conc. [ppm]= Antilog.	Conc. estimada [ppm] con factor de dilución 5	% R
				C=10 [^] (0,0595*D- 3,2804)		
Nivel 0 (Control Negativo)	Negativo	NA	NA	NA	NA	NA
	Negativo	NA	NA	NA	NA	NA
	Negativo	NA	NA	NA	NA	NA
	Negativo	NA	NA	NA	NA	NA
	Negativo	NA	NA	NA	NA	NA
	Negativo	NA	NA	NA	NA	NA
Nivel 1 [0,025 ppm]	Negativo	NA	NA	NA	NA	0,00
	Negativo	NA	NA	NA	NA	0,00
	Negativo	NA	NA	NA	NA	0,00
	Negativo	NA	NA	NA	NA	0,00
	Negativo	NA	NA	NA	NA	0,00
	Negativo	NA	NA	NA	NA	0,00
Nivel 2 [0,05 ppm]	Positivo	10,87	-2,634035	0,00232255	0,01161275	23,23
	Positivo	10,90	-2,63225	0,00233212	0,01166058	23,32
	Positivo	11,27	-2,610235	0,00245338	0,01226691	24,53
	Positivo	10,32	-2,66676	0,00215397	0,01076986	21,54
	Positivo	10,20	-2,6739	0,00211885	0,01059424	21,19
	Positivo	11,23	-2,612615	0,00243997	0,01219986	24,40
Promedio 23,03						
Nivel 3 [0,1 ppm]	Positivo	17,47	-2,241335	0,00573674	0,02868369	28,68
	Positivo	17,22	-2,25621	0,00554358	0,02771788	27,72
	Positivo	14,93	-2,392465	0,00405075	0,02025373	20,25
	Positivo	13,87	-2,455535	0,0035032	0,017516	17,52
	Positivo	13,02	-2,50611	0,0031181	0,0155905	15,59
	Positivo	16,53	-2,297265	0,00504353	0,02521767	25,22
Promedio 22,50						
Nivel 4 [0,2 ppm]	Positivo	20,60	-2,0551	0,00880846	0,0440423	22,02
	Positivo	20,23	-2,077115	0,00837308	0,04186538	20,93
	Positivo	20,28	-2,07414	0,00843063	0,04215315	21,08
	Positivo	19,20	-2,1384	0,0072711	0,03635549	18,18
	Positivo	20,75	-2,046175	0,00899135	0,04495676	22,48
	Positivo	20,73	-2,047365	0,00896675	0,04483374	22,42
Promedio 21,18						
Nivel 5 [0,4 ppm]	Positivo	26,73	-1,690365	0,02040023	0,10200114	25,50
	Positivo	25,73	-1,749865	0,01778832	0,08894161	22,24
	Positivo	25,43	-1,767715	0,01707202	0,08536012	21,34
	Positivo	26,00	-1,7338	0,01845865	0,09229326	23,07
	Positivo	26,70	-1,69215	0,02031655	0,10158276	25,40
	Positivo	26,22	-1,72071	0,01902348	0,09511741	23,78
Promedio 23,55						

NA: No aplica NA: No aplica ZI: Zona de inhibición %R: Porcentaje de recuperación

3.2 Evaluación del cumplimiento de los LMR y de los tiempos de retiro en músculo bovino

Las muestras de músculo diafragmático tomadas en la planta de beneficio correspondieron a setenta (70) hembras de edades entre 1.5 y 8 años y a treinta y cuatro (34) machos cuyas edades oscilaron entre 1.5 y 13 años. Los bovinos provenían de los departamentos de Cundinamarca, Meta, Casanare, Antioquia, Santander y Arauca (Anexo I).

Las ciento cuatro (104) muestras analizadas mediante las pruebas microbiológicas del hisopo, el bioensayo multiplacas y la prueba comercial Premi® Test, dieron como resultado de *screening* negativo para la inhibición de crecimiento bacteriano, indicando que las muestras evaluadas no contenían residuos que superaran los niveles de 0,05 ppm de penicilinas, 0,2 ppm de tetraciclinas, 0,2 ppm de macrólidos y 2,4 ppm de aminoglucósidos, lo cual sugiere el cumplimiento de los límites máximos de residuos y de los tiempos de retiro de antibióticos de uso veterinario probablemente usados en los bovinos beneficiados.

La Figura 16 ilustra a manera de ejemplo un resultado oficial del Laboratorio Nacional de Insumos Pecuarios LANIP, al respecto del análisis de residuos de medicamentos veterinarios efectuado en el área de microbiología analítica.

ANÁLISIS		MÉTODO		RESULTADO		LÍMITE DE DETECCIÓN	
DETECCION DE RESIDUOS DE ANTIMICROBIANOS EN TEJIDO BOVINO		Método interno de screening. Bioensayo de inhibición del crecimiento bacteriano con hisopo.		Negativo		-	
DETECCION DE RESIDUOS DE ANTIMICROBIANOS POR GRUPO DE ANTIBIOTICOS EN TEJIDO BOVINO		Método interno de screening. Bioensayo multiplaca de inhibición del crecimiento microbiano por difusión en Agar para:					
		1. Betalactámicos		Negativo		50 ppb	
		2. Macrólidos		Negativo		200 ppb	
		3. Aminoglucosidos		Negativo		2400 ppb	
		4. Tetraciclinas		Negativo		200 ppb	
CONCLUSIÓN							
LA MUESTRA ES CONFORME PARA LOS PARAMETROS EVALUADOS							
OBSERVACIONES							
A la muestra se le realizó adicionalmente el test PREMITEST el cual resulto: Negativo para residuos de antimicrobianos							
NOTA: Este reporte no se puede reproducir parcialmente, solo en forma total previa autorización por escrito del ICA. Los resultados de este reporte solo son aplicables a la (s) muestra(s) analizada(s).							
 LUIS ALBERTO PINEDA SOTO RESPONSABLE LABORATORIO NACIONAL DE INSUMOS PECUARIOS-LANIP FINAL DE ESTE REPORTE							

Figura 16. Reporte oficial de resultados de pruebas microbiológicas a muestra de músculo

3.3 Cálculo de la concentración de residuos antimicrobianos en tejidos dosificados

Los resultados de los ensayos microbiológicos (bioensayo con extractos y con líquidos tisulares de descongelación) realizados a las matrices incurridas, se resumen en las Tablas 25 y 26. La estimación de las concentraciones de penicilina y estreptomycin se realizó usando las curvas de calibración y la ecuación de la recta de la regresión lineal de los antibióticos.

3.3.1 Bioensayo para detección de penicilina y estreptomycin en extractos

Los resultados del bioensayo realizado a los extractos de las muestras de hígado, riñones, glúteo profundo derecho y semitendinoso izquierdo, usados para la detección de residuos de betalactámicos (penicilina G procaínica y potásica) y aminoglucósidos (estreptomycin), pueden observarse en la Tabla 25 y en las Figuras 18 a 20. Los extractos fueron dispensados en cilindros y/o en perforaciones, tanto para extractos sin filtrar como para extractos filtrados. Los controles realizados con los sensidiscos se evidencian en la Figura 17. El cálculo de la concentración se realizó por extrapolación de los diámetros de las zonas de inhibición (transformados a su logaritmo natural) en la curva de calibración, usando la ecuación de la línea de regresión y teniendo en cuenta los factores de dilución de las muestras y de corrección (en el caso de músculo) dada por la recuperación del analito.

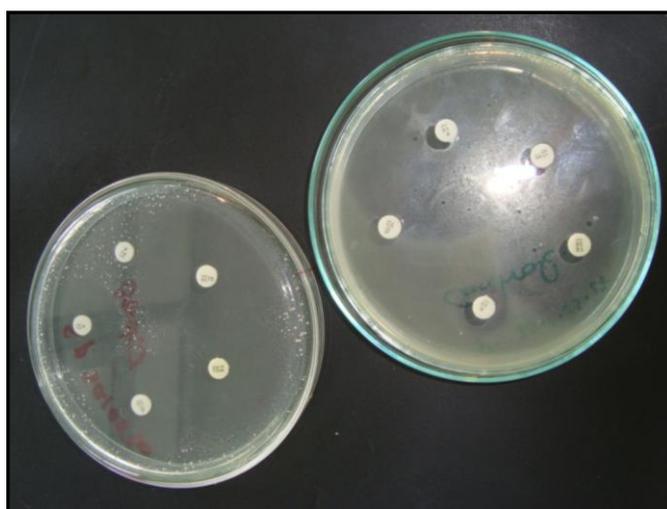


Figura 17. Control del bioensayo con sensidiscos: Caja izquierda BS 6633, caja derecha KR 9341a.

En los tejidos hepático y renal se identificaron residuos de las penicilinas. Todos los extractos formaron zonas de inhibición superiores a 40 mm.

En las muestras de tejido muscular incurrido o dosificado con penicilina G procaínica, potásica y estreptomocina, evaluadas con el bioensayo, se detectaron residuos de los antibióticos betalactámicos en la mayoría de las placas inoculadas con *Kocuria rhizophila*. La medida promedio de las zonas de inhibición fue de 10,51 mm en las muestras de glúteo profundo derecho cuyos extractos (filtrados y no filtrados) se sirvieron en cilindros. En el caso de los extractos del mismo músculo, depositados en las perforaciones, no se observaron zonas de inhibición. El bioensayo realizado a las muestras (extractos con y sin filtración) del músculo semitendinoso izquierdo permitió evidenciar halos de inhibición de 9.6 mm para el caso de las perforaciones, y zonas de inhibición de un promedio de 12.76 mm para los extractos en los cilindros.

Para el bioensayo en cilindros realizado a los extractos del músculo glúteo profundo derecho se efectuó la "Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales", con el propósito de analizar si habían diferencias debidas a la filtración y a la no filtración de los extractos, que afectaran la capacidad de detección de las penicilinas. Para este caso, el "Estadístico t" tuvo un valor de 0,1717 y el "Valor crítico de t (dos colas)" fue de 2,7764. (Anexo K). En el mismo sentido se evaluó el bioensayo de manera independiente en cilindros y en perforaciones del agar para el músculo semitendinoso izquierdo, para indagar si la filtración de los extractos influía en la detección. En ambas pruebas estadísticas, el "Estadístico t" fue inferior al "Valor crítico de t (dos colas)" (Anexo K). En consideración a los resultados, adicionalmente se realizó la "prueba t" para determinar si la detección de penicilinas en semitendinoso izquierdo se afectaba o no por el uso de cilindros o de perforaciones, encontrando que la hipótesis nula (H_0) fue rechazada porque el "Estadístico t" cuyo valor fue de 4,9144 resultó superior al valor crítico 2,4469 (Anexo K).



Figura 18. ZI promedio (mm) Bioensayo detección betalactámicos (penicilina). Arriba izquierda: Riñón (>40). Arriba derecha: Glúteo profundo derecho (Negativo con perforaciones y 10.51 con cilindros). Abajo izquierda: Semitendinoso izquierdo (9.6 con perforaciones y 12.76 con cilindros). Abajo derecha: Hígado (>40)

En relación a los resultados del bioensayo para la determinación de residuos de estreptomicina en las muestras incurridas, se encontró lo siguiente: los extractos (con y sin filtración) de las muestras de los músculos glúteo profundo derecho y semitendinoso izquierdo analizados con el método del bioensayo usando cilindros para depositar los extractos, no generaron halos de inhibición.

Por otra parte, los extractos filtrados del músculo glúteo profundo derecho no formaron halos alrededor de las perforaciones. En contraste, se presentó una zona de inhibición promedio de 10,7 mm para los extractos no filtrados de glúteo profundo derecho depositados en las perforaciones del agar.

El bioensayo realizado para la detección de estreptomicina en muestras de músculo semitendinoso izquierdo, con los extractos servidos en las perforaciones del agar, presentaron zonas de inhibición de 10.76 mm en promedio. Al aplicar la "Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales", con el fin de evaluar si habían diferencias debidas a la filtración y a la no filtración de los extractos, que afectaran la capacidad de detección de estreptomicina, se obtuvo un valor para el "Estadístico t" de 2,2337 y un "Valor crítico de t (dos colas)" de 2,7764. (Anexo K).

Las muestras de hígado evaluadas en la placa sembrada con *Bacillus subtilis* no contenían residuos detectables de estreptomicina. Por último, en las muestras de la matriz de riñón se evidenció la presencia de residuos de estreptomicina, midiendo zonas de inhibición de 26,54 mm en promedio para los extractos depositados en cilindros y en perforaciones del agar.

Se efectuó la "Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales", con el propósito de analizar si habían diferencias debidas a la filtración y a la no filtración de los extractos, que afectaran la capacidad de detección de estreptomicina en riñón. Tanto para los extractos servidos en cilindros como para los depositados en perforaciones del agar, las pruebas revelaron que el "Estadístico t" fue inferior al "Valor crítico de t (dos colas)" (Anexo K). Teniendo en cuenta estos resultados, adicionalmente se realizó la "prueba t" para determinar si la detección de estreptomicina en riñón podía ser influenciada o no por el uso de cilindros o de perforaciones, encontrando que la hipótesis nula (H_0) fue rechazada porque el "Estadístico t" cuyo valor fue de 3,1030 resultó superior al valor crítico 2,4469 (Anexo K).

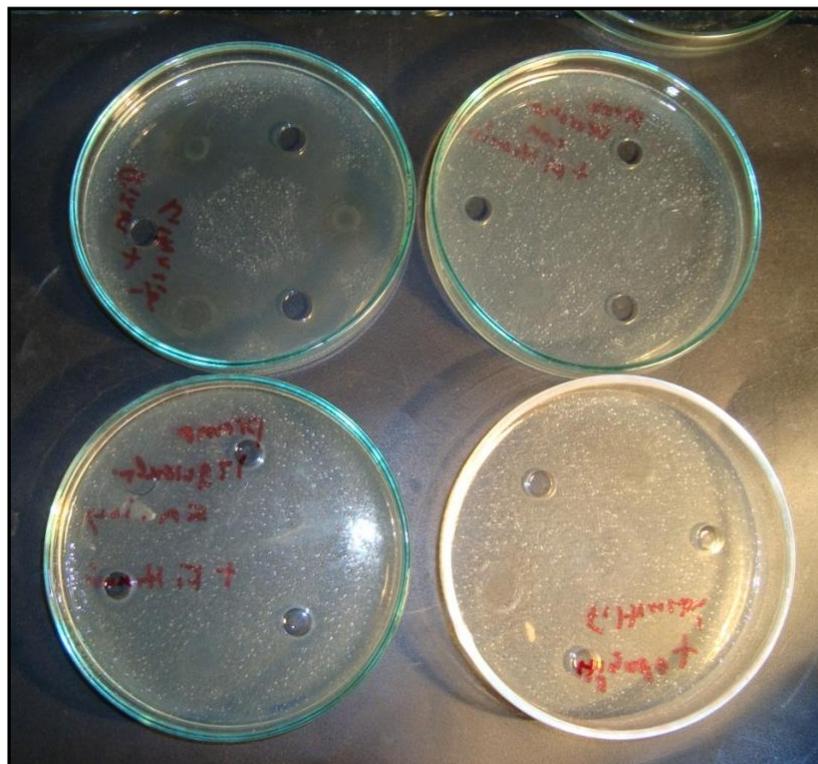


Figura 19. ZI promedio (mm) Bioensayo detección aminoglucósidos (estreptomicina). Arriba izquierda: Riñón (26.54). Arriba derecha: Glúteo profundo derecho (10,7 con extractos no filtrados en perforaciones. Negativos en los demás ensayos). Abajo izquierda: Semitendinoso izquierdo (10.76 con perforaciones. Negativo con cilindros). Abajo derecha: Hígado (negativos).

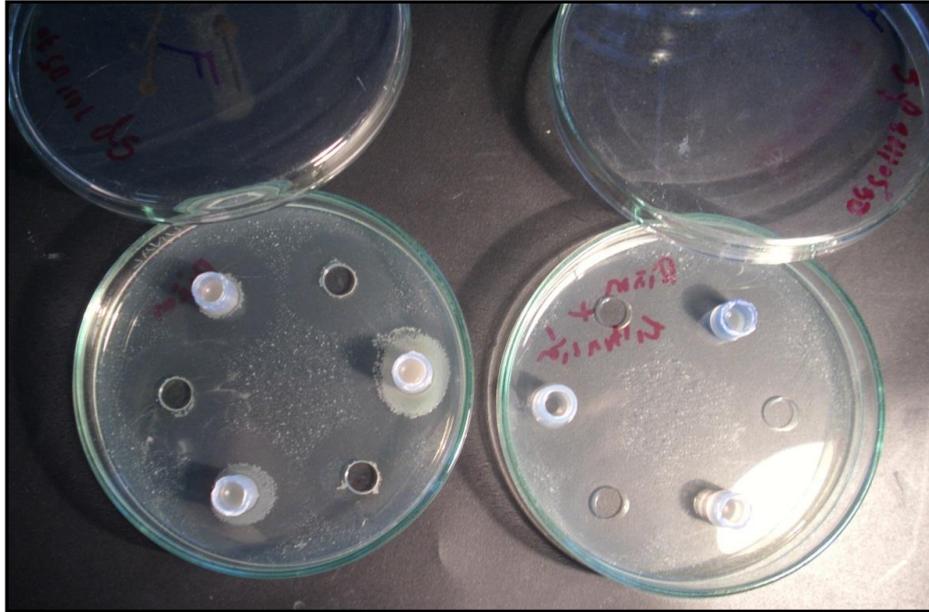


Figura 20. Bioensayo detección estreptomicina en riñón (extracto con y sin filtración): Caja izquierda: sin filtración. Caja derecha: con filtración.

Tabla 25. Resultados del bioensayo con extractos de tejido dosificado

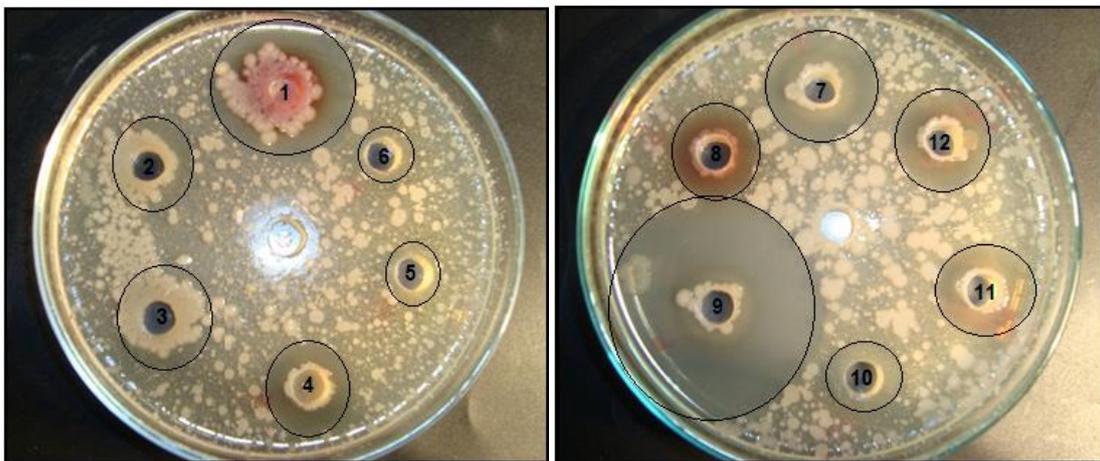
Tejido	Detección Betalactámicos				Detección Aminoglucósidos			
	Extracto filtrado		Extracto no filtrado		Extracto filtrado		Extracto no filtrado	
	C	P	C	P	C	P	C	P
	Promedios de las zonas de inhibición (mm) / (Concentración ppm)							
Glúteo profundo derecho	10,46 (0,05)	-	10,56 (0,05)	-	-	-	-	10,70
Semitendinoso izquierdo	12,16 (0,06)	9,96	13,36 (0,07)	9,25	-	10,40	-	11,13
Hígado	>40 (>0,63)	>40	>40 (>0,63)	>40	-	-	-	-
Riñones	>40 (>0,63)	>40	>40 (>0,63)	>40	27,40 (5,54)	26,10	27,46 (5,60)	25,20

C: Cilindros P: Perforaciones

3.3.2 Bioensayos con líquidos tisulares de descongelación

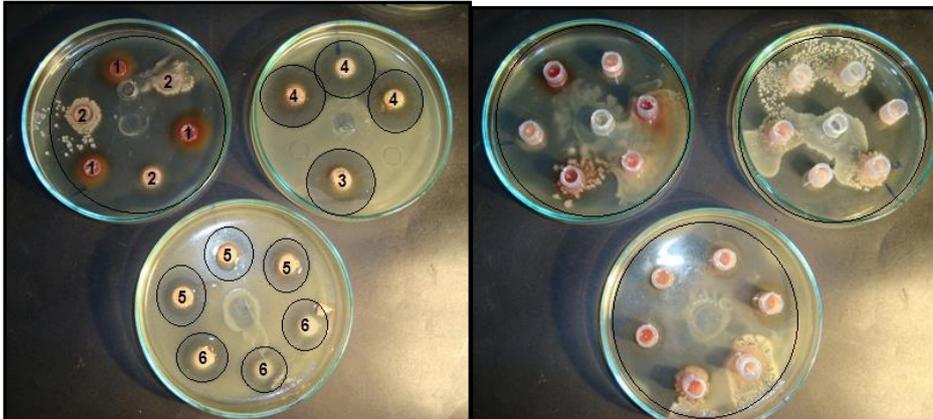
Para calcular la concentración se procedió de manera similar a la semi-cuantificación en los extractos, con la diferencia que en el caso de los LTD no se consideró el factor de dilución.

Parte A. Las medidas de las zonas de inhibición generadas por los residuos de antimicrobianos presentes en los doce tejidos, cuyos líquidos de descongelación fueron dispensados en perforaciones del agar inoculado con *BS ATCC 6633*, se observan en las Figuras 21a y 21b.

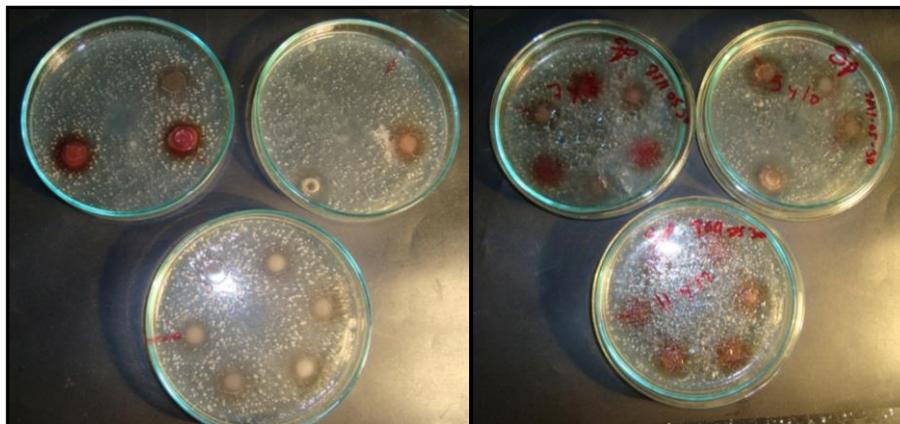


Figuras 21a y 21b. Prueba con LTD (Parte A). ZI (mm): 1. Hígado (29.6). 2. Semitendinoso derecho (17). 3. Semitendinoso izquierdo (17.5). 4. Redondo mayor (17). 5. Semimembranoso derecho (9.25). 6. Dorsal largo (10.2). 7. Semimembranoso izquierdo (21.5). 8. Subescapular (15.9). 9. Glúteo profundo izquierdo (41.55). 10. Tríceps (9.25). 11. Glúteo profundo derecho (18.2). 12. Diafragma (18).

Parte B. Los líquidos tisulares de descongelación provenientes de las muestras de hígado y de los músculos diafragmático, glúteo profundo izquierdo y derecho, semitendinoso izquierdo y derecho, redondo mayor, semimembranoso izquierdo y derecho, dorsal largo, subescapular y tríceps, servidos por triplicado en los cilindros ubicados sobre las cajas de agar inoculado con *KR ATCC 9341a* (8×10^5 células vegetativas/ml), y en el agar sembrado con *BS ATCC 6633* (1×10^4 esporas/ml) e inoculado con penicilinas, generaron los halos de inhibición que se evidencian en las Figuras 22a a 22d y en la Tabla 26.



Figuras 22a y 22b. Prueba con LTD (Parte B1). LTD agar KR 9341a. ZI (mm): Cajas
 Figura izquierda: Arriba izquierda: 1. Hígado (>40) y 2. Semitendinoso derecho (28.4). Arriba derecha: 3. Semitendinoso izquierdo (28, un solo pozo) y 4. Redondo mayor (29, 27.5, 28). Abajo: 5. Semimembranoso derecho (22.03, 22.10, 22.10) y 6. Dorsal largo (22.40, 22.55, 22.50). Cajas Figura derecha: Arriba izquierda: 7. Semimembranoso izquierdo (>40) y 8. Subescapular (>40). Arriba derecha: 9. Glúteo profundo izquierdo (>40) y 10. Tríceps (>40). Abajo: 11. Glúteo profundo derecho (>40) y 12. Diafragma (>40)



Figuras 22c y 22d. Prueba con LTD (Parte B2). LTD agar BS 6633. ZI (mm): Cajas
 Figura izquierda: Arriba izquierda: 1. Hígado (17.25, 15) y 2. Semitendinoso derecho (negativo en el único pozo en el que se ubicó). Arriba derecha: 3. Semitendinoso izquierdo (Negativos) y 4. Redondo mayor (Negativos). Abajo: 5. Semimembranoso derecho (Negativos) y 6. Dorsal largo (Negativos). Cajas Figura derecha: Arriba izquierda: 7. Semimembranoso izquierdo (12.55, 13.0, 9.8) y 8. Subescapular (9.6, 10.45, 9.0 mm). Arriba derecha: 9. Glúteo profundo izquierdo (22.0, 22.0, 22.0) y 10. Tríceps (9.6 se ubicó LTD en un solo pozo). Abajo: 11. Glúteo profundo derecho (9.7, 9.7, 11.55) y 12. Diafragma (Negativos).

Tabla 26. Resultados del bioensayo con LTD de tejido dosificado

Tejido	Parte A	Parte B	
		B1 Detección Betalactámicos	B2 Detección Aminoglucósidos
	Promedios de las zonas de inhibición (mm) / Concentración (ppm)		
Glúteo profundo derecho	18,20	>40 (>0,56)	10,31 (0,39)
Semitendinoso izquierdo	17,50	28,00 (0,11)	-
Hígado	29,60	>40 (>0,56)	16,12 (0,13)
Diafragma	18,00	>40 (>0,56)	-
Glúteo profundo izquierdo	41,55	>40 (>0,56)	22,00 (3,71)
Semitendinoso derecho	17,00	28,4 (0,11)	-
Semimembranoso izquierdo	21,50	>40 (>0,56)	11,78 (0,52)
Semimembranoso derecho	9,25	22,06 (0,05)	-
Redondo mayor	17,00	28,16 (0,11)	-
Subescapular	15,90	>40 (>0,56)	9,68 (0,35)
Tríceps	19,25	>40 (>0,56)	9,60 (0,34)
Dorsal largo	10,20	22,48 (0,05)	-

3.3.3 Prueba del hisopo

La prueba tamiz del hisopo se realizó a los tejidos incurridos con el propósito de determinar preliminarmente la presencia de residuos de los antimicrobianos administrados al ternero por vía intramuscular profunda.

Luego de 24 horas de incubación, se evaluó la presencia de zonas de inhibición alrededor de los hisopos como indicador de presencia de residuos de antimicrobianos en las matrices (Figuras 23 y 24). En riñón e hígado se observaron zonas de inhibición mayores a las visualizadas para los demás tejidos probados, correspondientes a músculos de los miembros posteriores (glúteo profundo derecho e izquierdo, semitendinoso izquierdo) y a diafragma.



Figura 23. Prueba del hisopo en riñones



Figura 24. Prueba del hisopo en hígado

4. Discusión

Los antimicrobianos se utilizan en el tratamiento y control de enfermedades infecciosas de los animales productores de alimentos (1). Se trata de un uso legal que requiere cesar antes del sacrificio de los animales porque los residuos pueden persistir en los alimentos destinados al consumo humano, y generar efectos adversos sobre la salud de los consumidores. La estrategia de análisis de residuos de antibióticos en estos productos alimenticios, debe fundamentarse en el cribado o *screening* y su posterior confirmación.

Los métodos de cribado son utilizados para detectar la presencia de residuos antimicrobianos al nivel de interés, que de acuerdo con la legislación corresponde a la concentración señalada como Límite Máximo de Residuos en una matriz particular. Dentro de los métodos de *screening* se incluyen las pruebas de inhibición microbiológicas, enzimáticas, de receptores, de biosensores, inmunoensayos (ELISA) y cromatografía de capa delgada.

Un método de *screening* eficiente requiere ser de bajo costo y alto rendimiento, capaz de identificar potenciales muestras no conformes a partir de una gran cantidad de muestras (11), (13). Las pruebas de inhibición microbiológicas fueron los primeros métodos desarrollados para la detección de residuos antibióticos, y aún son ampliamente usadas porque son muy costo-efectivas y en contraste por ejemplo con pruebas inmunológicas o basadas en receptores, tienen la posibilidad de cubrir una amplia gama de residuos antibióticos. Además, mediante la introducción de un procedimiento preliminar de identificación microbiológica, es posible realizar una caracterización *post-screening* del residuo que reducirá significativamente los costos y esfuerzos dedicados a la identificación y cuantificación por métodos químicos confirmatorios.

En el caso de un resultado sospechoso no conforme obtenido con pruebas de *screening* y *post-screening*, debe ser corroborado mediante un método confirmatorio. Los métodos de confirmación son aquellos que incluyen información sobre la estructura química del analito, permitiendo obtener información adicional para su cuantificación e identificación inequívoca. En consecuencia, los métodos basados exclusivamente en análisis cromatográficos que prescinden de la detección espectrométrica no convienen por sí solos como métodos de confirmación (11).

En los años recientes se han generado progresos considerables en el desarrollo de las técnicas confirmatorias cuantitativas para la detección de residuos de antimicrobianos. Sin embargo, los métodos microbiológicos conservan un papel vital en el análisis de residuos debido a que sus características de amplia gama de detección los constituyen en la opción más adecuada para la etapa de *screening*.

Además, las tres últimas décadas han mostrado un significativo desarrollo de los métodos de inhibición microbiológicos, en el que la tendencia más importante que puede ser observada es el reconocimiento del hecho de que la detección adecuada de varios grupos antibióticos, únicamente es posible usando pruebas multiplacas basadas en la combinación de diferentes microorganismos de prueba.

La posibilidad de la identificación preliminar de residuos antimicrobianos a partir de perfiles de susceptibilidad fue explorada por el FSIS -agencia de salud pública del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos-, que en el año 2007 presentó un método microbiológico denominado "bioensayo", para la detección, identificación presuntiva y semi-cuantificación de residuos de antibióticos de cuatro familias distintas en músculo de bovinos y aves. El método comprende siete placas con agares específicos inoculados con bacterias relativamente sensibles o resistentes a algunos grupos antimicrobianos o antibióticos en particular: *Bacillus cereus* ATCC 11778 para la detección de tetraciclinas, *Kocuria rhizophila* ATCC 9341a para la detección de β -lactámicos y macrólidos, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 1228 para la detección de aminoglucósidos, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 para la detección de estreptomycin y dos derivados de *Kocuria rhizophila*, ATCC 15957 y 9341a, resistentes a eritromicina y a estreptomycin respectivamente.

El bioensayo es empleado por las autoridades sanitarias de los Estados Unidos como un procedimiento microbiológico *post-screening* para las muestras que resultan positivas en las pruebas de *screening* iniciales realizadas en plantas de beneficio, tales como *Swab Test On Premises STOP*, *Calf Antibiotic and Sulfa Test CAST* y *Fast Antibiotic Screen Test FAST*.

Teniendo en cuenta las cualidades técnicas del método de cribado del bioensayo, como su alto rendimiento, que es una característica intrínseca de una prueba de inhibición microbiológica y, considerando las propiedades particulares como su capacidad de detección de una amplia gama de antibióticos y la posibilidad de realizar la identificación preliminar de residuos antimicrobianos a partir de los perfiles de susceptibilidad de diferentes especies bacterianas, sumado a la conveniencia en términos económicos, el bioensayo multiplacas se constituye en una opción muy apropiada para su implementación en Colombia con el fin de ser utilizado como herramienta analítica para el monitoreo de residuos de antibióticos en carne bovina destinada al consumo humano.

En este sentido, la evaluación de los criterios de funcionamiento del método del bioensayo multiplacas, resulta esencial para determinar su elección como componente de una estrategia analítica para la determinación de residuos (21). Para desarrollar la evaluación de los criterios de funcionamiento del método del bioensayo, se tuvo en cuenta la recomendación del uso de "tejidos simulados" o fortificados al tratarse de una matriz sólida como el

músculo, y se consideró que en la especie bovina por razones relacionadas con tiempo y costos, resulta casi imposible obtener tejidos incurridos para cada antibiótico a las concentraciones adecuadas (83). Por esta razón, empleando matrices de músculo fortificadas con diferentes concentraciones de penicilina G potásica, oxitetraciclina, eritromicina y estreptomina, como representantes de cuatro familias de antibióticos de uso veterinario, se establecieron los parámetros de sensibilidad, especificidad y exactitud relativas, así como la estabilidad y la recuperación, considerando algunos lineamientos de la guía de la Decisión Europea 2002/657/CE que se refiere al funcionamiento de los métodos analíticos.

Las determinaciones de la sensibilidad, especificidad y exactitud relativas calculadas para los LDD de los cuatro antimicrobianos, se consideran satisfactorias puesto que fueron del 100%. Con relación a penicilina G, oxitetraciclina y eritromicina, los resultados permiten evidenciar que el bioensayo es sensible, específico y exacto en muestras de músculo bovino que presenten niveles iguales o superiores a los LMR establecidos para Colombia, y que la prueba no es sensible, específica ni exacta para concentraciones por debajo de los LMR. Esto puede ser interpretado de manera favorable, en el sentido de que un LDD ajustado al LMR permitirá dar resultados de *screening* positivo a aquellas muestras que realmente contengan residuos violatorios, evitando así falsos resultados positivos a niveles inferiores a los LMR, que lleven a confirmar muestras que no deberían pasar la fase del cribado, y por tanto, orientar las pruebas de confirmación solo a muestras no conformes, sin que los laboratorios responsables del análisis de residuos deban incurrir en costos injustificados.

Particularmente al respecto de la determinación de la sensibilidad, se ha demostrado que los residuos antibióticos tienden a acumularse en el tejido renal, por lo que varias técnicas microbiológicas y *kits* comerciales de cribado como *Belgian Kidney Test BKT*, *New Dutch Kidney Test NDKT*, *Four Plate Test FPT*, *Swab Test On Premises STOP*, *Two Plate Test*, *Calf Antibiotic and Sulfa Test CAST*, *Fast Antibiotic Screen Test FAST* y *Premi® Test*, emplean de manera rutinaria esta matriz de prueba (21), (77), (82), (12), (84), (85). Sin embargo, teniendo en cuenta que la carne bovina es un producto calificado como potencial de exportación por el CONPES sobre la "Consolidación de la Política Sanitaria y de Inocuidad para las Cadenas Láctea y Cárnica" (86), y es el tejido que con más frecuencia es consumido, se seleccionó una técnica analítica que usara músculo como matriz de prueba.

Al comparar los LMR con los LDD en músculo bovino determinados para el bioensayo multiplacas, frente a los establecidos para otros métodos microbiológicos de *screening* como el protocolo STAR (87), la prueba de las cuatro placas modificada (cinco placas) (88) y la prueba comercial de tubo *Premi® Test* (82), (89), (90), se encontró que el LDD de oxitetraciclina con el bioensayo (0,2 ppm) fue equivalente al LMR, y mejor que los límites obtenidos con STAR (0,25

ppm) y las cinco placas (0,4 ppm), pruebas en las que el tejido congelado se ubica homogenizado con el antibiótico para el caso del protocolo *STAR*, e íntegro sobre discos de papel con el antibiótico en el método de las cinco placas. En contraste, para este compuesto la sensibilidad determinada con la prueba comercial correspondió a 0,1 ppm lo cual respalda la capacidad de *Geobacillus stearothermophilus* para la detección en jugo cárnico.

El bioensayo y *STAR* detectan penicilina G a la misma concentración del LMR (0,05 ppm). Para este analito el test de las cinco placas tiene un LDD de 0,02 ppm y Premi® Test de 0,0025 ppm. En este caso es importante anotar que cuando se utilizan pruebas de screening con una alta sensibilidad como la que confiere *Geobacillus stearothermophilus* a Premi® Test o pruebas comerciales similares, se pueden generar resultados positivos no violatorios para β -lactámicos, lo cual no es deseable desde el punto de vista operativo.

La detección de eritromicina en músculo se logró al nivel del LMR de 0,2 ppm, tanto con el bioensayo como con la prueba de las cinco placas; Premi® Test lo determinó a la mitad del LMR y el protocolo *STAR* en una concentración que duplica el límite permitido (0,4 ppm). En este punto es preciso anotar que las pruebas multiplacas coinciden en el uso de *Kocuria rhizophila* como microorganismo indicador de la presencia del macrólido.

Finalmente, el bioensayo se desempeña mejor para la detección de estreptomicina que los demás métodos, a pesar de que en todos los casos los LDD son muy superiores al LMR de 0,6 ppm (bioensayo 2,4 ppm; Premi® Test 3 ppm; *STAR* 4 ppm; cinco placas 10 ppm). De esta forma se corrobora la pobre capacidad de las técnicas microbiológicas para la determinación de los antibióticos aminoglucósidos en músculo. Considerando que la bacteria usada en los métodos multiplacas fue *Bacillus subtilis*, es posible señalar que el conjunto de las características de la placa empleada en el bioensayo y la extracción de la estreptomicina del tejido muscular, favorecen su detección.

El bioensayo detectó penicilina G potásica, oxitetraciclina y eritromicina al nivel de los LMRs en músculo bovino, establecidos en el *Codex Alimentarius* y en la normatividad nacional del Ministerio de Salud y Protección Social (Resolución 1382 de 2013), para los dos primeros compuestos, y por la Agencia Europea del Medicamento EMA para el caso de eritromicina, antibiótico para el cual el *Codex Alimentarius* y nuestro país no han definido LMRs en la especie bovina. El criterio fijado en la Decisión Europea 2002/657/CE con respecto al LDD consiste en que debería ser igual o inferior a los LMR establecidos para cada antibiótico, con un porcentaje de falsos resultados negativos inferior al 5%. Para estas concentraciones de antimicrobianos, una vez analizadas las muestras de músculo bovino, en su totalidad resultaron positivas al nivel del LMR. Por tanto se cumplió con la condición establecida dado que no se determinaron falsos negativos a estas concentraciones, por lo que se concluye que

la técnica se adecuó y es válida para el uso previsto de detección de residuos de antibióticos β -lactámicos, tetraciclinas y macrólidos al nivel de sus LMR.

Sin embargo, en éste estudio la sensibilidad frente a estreptomicina no fue satisfactoria, ya que la detección se evidenció en un nivel correspondiente a cuatro veces el LMR en músculo. Esto es concordante con los hallazgos de la validación del protocolo STAR que comprende cinco placas para el *screening* de residuos antibióticos en músculo de diferentes especies animales, en el que se determinó un LDD para estreptomicina, ocho veces superior al LMR correspondiente (87).

Otros estudios también evidencian que la sensibilidad de Premi® Test para la detección de residuos de compuestos aminoglucósidos en músculo es insuficiente (13). En el mismo sentido, la comparación de los métodos microbiológicos NAT, STAR y Premi® Test, con muestras de bovinos y porcinos procedentes de monitoreo de rutina (84), concluyó que con respecto a la detección de aminoglucósidos, la mayor diferencia se determinó entre NAT y STAR, y fue asociada principalmente a la matriz usada en las pruebas; NAT detectó muestras positivas en riñón, de las cuales en cuatro se confirmó por LC-MS-MS la presencia de residuos de neomicina, estreptomicina y gentamicina, a niveles de aproximadamente la mitad de los LMRs en riñón. No obstante, ni el método STAR ni la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas detectaron residuos en la carne de esos animales.

Ésta observación puede tener implicaciones importantes para los métodos de *screening* microbiológicos basados en el análisis de muestras de riñón, y que usan *Bacillus subtilis* como organismo de prueba. La sensibilidad de ésta bacteria a los aminoglucósidos, podría conducir a una condenación injusta de una canal bovina, fundamentada en un resultado positivo a la prueba en riñón. En general, el riñón se considera un buen indicador de la presencia de residuos en otras partes del organismo, pero debido al mecanismo de excreción renal de los aminoglucósidos, estos antimicrobianos representan una excepción a ésta regla. Sin embargo, en razón al LDD insuficiente de los aminoglucósidos en músculo, es importante estudiar una estrategia analítica alternativa, en caso que una evaluación del riesgo establezca que es de interés desde la perspectiva de su control.

Con relación a la evaluación de la capacidad de detección, sería ideal emplear pruebas que analizaran tejido intacto y calcular los LDD usando muestras provenientes de animales medicados experimentalmente (91), (73). Sin embargo, en la especie bovina, el uso de tejidos fortificados para la determinación de los LDD se constituye en una valiosa opción, considerando que la producción de materiales incurridos para cada antibiótico a las concentraciones adecuadas es una tarea que consumiría mucho tiempo y sería extremadamente costosa. Además, sería muy complejo obtener de manera exacta las concentraciones deseadas después del tratamiento de los animales (87). Alternativamente, algunos otros estudios del

desempeño de métodos microbiológicos de *screening* usan muestras provenientes de programas de monitoreo (92), (21), (85). La mayoría de acercamientos provechosos usaron animales sacrificados de emergencia, de los que se disponía información que indicaba que fueron sacrificados antes del final del periodo de retiro. Sin embargo, estos estudios arrojaron únicamente un número limitado de muestras positivas que representan solo un pequeño grupo de sustancias, planteando el cuestionamiento sobre si otros residuos estuvieron presentes y no fueron detectados debido a que el método fue insensible.

Parece difícil comprender la verdadera capacidad de detección de las técnicas microbiológicas. Debido a la imposibilidad de obtener un rango ajustado de tejidos incurridos a los niveles adecuados, los métodos de *screening* con frecuencia se validan usando únicamente soluciones de estándares antibióticos (92), (93), (94). De hecho, la guía de laboratorio de USDA/FSIS que describe el bioensayo para la detección, identificación y semi-cuantificación de residuos antimicrobianos en tejidos de bovinos y aves (12), establece que la concentración más baja de una solución estándar de referencia que produce una zona de inhibición de al menos 8 mm sobre una placa en particular, es señalada como la concentración mínima inhibitoria, y es la que define los LDD para los residuos antibióticos. Por ello en este estudio, mediante curvas de calibración con diluciones antimicrobianas se establecieron las concentraciones inhibitorias más bajas de los cuatro representantes antibióticos del bioensayo multiplacas, a saber: 0,1 ppm de eritromicina (LMR: 0,2 ppm), 0,05 ppm de oxitetraciclina (LMR: 0,2 ppm), 0,0125 ppm de penicilina G (LMR: 0,05 ppm) y 0,45 ppm de estreptomina (LMR: 0,6 ppm). En todos los casos, las concentraciones fueron inferiores a los respectivos LMRs en músculo bovino.

Así mismo, se describieron las fórmulas matemáticas de las curvas de calibración y la bondad del ajuste de los datos a las curvas, encontrando correlaciones lineales positivas con coeficientes de correlación entre 0,96 y 0,99, que sugieren una fuerte relación lineal entre las concentraciones de los antibióticos y los diámetros de las zonas de inhibición generadas. Sin embargo, la determinación de la sensibilidad con soluciones estándares es altamente cuestionable puesto que el alcance de la información obtenida no puede compararse con la evaluación del desempeño de una prueba sobre tejidos incurridos, dado que se omite el efecto potencial de la matriz (73).

Una cuarta posibilidad es trabajar "tejidos simulados o fortificados" como lo presenta éste documento. Bajo estas condiciones se tiene en cuenta el efecto de la matriz, aproximándose más a muestras de músculo incurridas (87), (83). La unión de los antibióticos al tejido muscular homogenizado es posible durante la inoculación (84) y esto fue evidenciado en la determinación de los límites de detección de oxitetraciclina, penicilina G potásica y eritromicina.

En este sentido se ha propuesto limitar el número de antimicrobianos para validar los métodos de amplia gama de detección señalando "compuestos representativos", ya que se asume que uno o dos miembros de un mismo grupo antibiótico pueden actuar como representantes para el grupo entero (87). No obstante, esto hay que tratarlo cuidadosamente en razón a que la bioactividad relativa de compuestos dentro de un grupo puede diferir cuando ellos son expuestos a diferentes bacterias de prueba (84).

Respecto a la evaluación de la especificidad, la Decisión Europea 2002/657/CE plantea que para métodos de cribado como el bioensayo, que está diseñado para detectar un amplio rango de sustancias antimicrobianas, es importante estudiar cualquier interferencia que pudiera resultar de los componentes de la matriz. En virtud de ello, se evaluaron extractos obtenidos de 24 muestras de músculo bovino procedentes de animales que no habían sido tratados con ningún antimicrobiano. El análisis de estos tejidos con el bioensayo multiplacas, no mostró resultados falsos positivos, indicando que los constituyentes de la matriz no afectan la especificidad del método analítico del bioensayo.

Sobre la valoración de la recuperación, la Decisión 2002/657/CE afirma que es obligatoria para la validación de los métodos cuantitativos confirmatorios. No obstante, a pesar de que el bioensayo multiplacas es un procedimiento por naturaleza cualitativo, pero con la posibilidad de identificar los residuos de manera presuntiva, y de estimar su concentración en la matriz, se procedió a evaluar la capacidad de recuperación en el tejido muscular fortificado con cantidades conocidas de antimicrobianos. Según la normatividad europea (11), cuando las concentraciones de los analitos son superiores a 0,01 ppm, el rango de la recuperación debe estar entre 80 y 110%. En los experimentos realizados, las recuperaciones promedio fueron del orden de 54% para eritromicina (recuperación de las concentraciones entre 30% y 67%); 65% para oxitetraciclina (entre 53% y 80%); 53% para estreptomina (entre 51% y 54%) y 23% para penicilina G (entre 21% y 24%). En todos los casos los porcentajes de recuperación no se consideran aceptables dado el criterio establecido por la regulación de la Comunidad Europea, ya que los datos de recuperación no entran en el margen del valor perseguido. Sin embargo, teniendo en cuenta que el intervalo expuesto aplica para métodos cuantitativos confirmatorios, los porcentajes de recuperación de los representantes antibióticos de las familias de macrólidos, tetraciclinas y aminoglucósidos, no estuvieron tan distantes del límite inferior del 80%, al tratarse de una técnica semi-cuantitativa.

Finalmente, en relación con el análisis de la estabilidad, a los diámetros de las zonas de inhibición generadas el día cero y el día treinta por las concentraciones correspondientes al LDD de cada uno de los antibióticos en músculo bovino, se les realizó la "Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales", con el propósito de investigar si habían diferencias estadísticamente significativas en el tamaño de los halos, debidas al almacenamiento de las muestras

durante un mes a la temperatura de -70°C . En todos los casos, el "Estadístico t" tuvo un valor inferior al "Valor crítico de t (dos colas)", por lo que la hipótesis nula no fue rechazada, encontrando igualdad en los diámetros de las zonas de inhibición producidas por las muestras analizadas el mismo día de la fortificación y treinta días después de la misma. En éste sentido, es posible afirmar que la capacidad de detección de los antimicrobianos en los extractos, no se ve afectada por las condiciones de tiempo (30 días) y temperatura ($-70^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$), y se concluye que los analitos son estables en la matriz inoculada con la concentración establecida como LDD.

Al respecto de la estabilidad de antibióticos betalactámicos en músculo, se encontraron coincidencias con los hallazgos de pruebas microbiológicas que demostraron la estabilidad de residuos de ampicilina en muestras incurridas de músculo porcino almacenadas durante 30 días a -75°C (95). También se ha verificado que residuos de tetraciclina y oxitetraciclina en muestras de músculo bovino incurridas y almacenadas a -22°C no presentan un decrecimiento significativo (96).

Una vez evaluados los criterios de funcionamiento del bioensayo estandarizado, se analizaron las ciento cuatro (104) muestras de músculo procedentes de los bovinos faenados en la planta de beneficio. El estudio realizado con el bioensayo multiplacas determinó que las muestras no contenían residuos que superaran los niveles de 0,05 ppm de penicilinas, 0,2 ppm de oxitetraciclina, 0,2 ppm de eritromicina y 2,4 ppm de estreptomina. Además, al procesar las muestras con las pruebas microbiológicas del hisopo y Premi® Test tampoco se detectaron residuos, indicando concordancia entre los resultados obtenidos por los tres métodos. Estos resultados sugieren el cumplimiento de los límites máximos de residuos y de los tiempos de retiro de los antibióticos de uso veterinario probablemente usados en los bovinos beneficiados. En relación con el análisis de tetraciclinas, los resultados obtenidos con el bioensayo concuerdan con el reporte oficial del Laboratorio de Residuos de Medicamentos Veterinarios del ICA, que después de examinar muestras de monitoreo de músculo bovino entre los años 2006 y 2007, indicó que las muestras no contenían residuos violatorios de esa familia de antimicrobianos (97).

En este sentido y considerando que no se detectaron residuos, no era posible realizar la identificación y cuantificación de residuos antibióticos, inicialmente propuesta, en las muestras de tejidos obtenidos en la planta de beneficio.

Aunque en el ámbito mundial se ha incrementado el uso de pruebas de *screening* para identificar rápidamente las muestras que podrían requerir pruebas adicionales, el hecho de que son empleados diferentes métodos analíticos y matrices, hace difícil comparar los resultados entre países. Sin embargo resulta pertinente reconocer que la utilización de los métodos microbiológicos de cribado ha permitido que los programas de monitoreo de residuos antibióticos en productos de origen animal operen de manera más eficiente.

El análisis mediante técnicas microbiológicas para la detección de residuos antibióticos en muestras de músculo y de otras matrices de bovinos como hígado y riñón tomadas en plantas de beneficio, indica que la mayoría de tejidos evaluados no contienen niveles violatorios de residuos antimicrobianos. Esto se evidencia en los reportes anuales de los resultados de los planes nacionales de monitoreo de residuos de antimicrobianos en países como Estados Unidos (98), (99), (100), Costa Rica (101), (102), (103), (104) y México (105), (106).

Entre los años 2009 y 2011 el "Programa Nacional de Residuos" de Estados Unidos desarrollado por el FSIS colectó 55.291 muestras de bovinos, porcinos, ovinos y aves entre otras especies, de las cuales 14.931 se analizaron con el método del bioensayo para la detección de antimicrobianos. De las muestras evaluadas con la prueba microbiológica, 5.551 procedían de bovinos (vacas de lechería, de carne, terneros, toros, becerros). Los resultados indicaron que solo 12 muestras (0,21%), principalmente de riñones de ocho terneros, contenían residuos violatorios de algunos aminoglucósidos (neomicina en cinco, gentamicina en uno) y macrólidos (tulatromicina en dos). De los bovinos adultos, únicamente en riñones de dos vacas se detectaron residuos de un aminoglucósido (neomicina en una vaca de lechería) y de un β -lactámico (penicilina en una vaca de carne). Por último, se hallaron residuos que excedían los niveles permitidos de tilmicosina en músculo y/o en hígado de dos terneros.

De los datos anteriormente expuestos es posible deducir que en las muestras de tejido muscular de bovinos adultos analizadas por el FSIS con el método del bioensayo multiplacas, no se detectaron residuos antimicrobianos que superaran los LMRs correspondientes. Los resultados mencionados son totalmente concordantes con los determinados en las muestras de músculo procedentes de bovinos adultos sacrificados en una planta de beneficio de la ciudad de Bogotá, objeto de la presente investigación. Adicionalmente éstos resultados son ratificados por la información publicada por USDA/FSIS en los reportes de los años 2009, 2010 y 2011 del "Programa Nacional de Residuos", al respecto de las reinspecciones realizadas a las muestras de carne fresca de bovino importadas de Australia, Canadá, Chile, Costa Rica, Dinamarca, Finlandia, Honduras, Japón, México, Nueva Zelanda, Nicaragua y Uruguay. Durante tres años consecutivos usando el bioensayo, no se detectaron residuos violatorios de antimicrobianos en la carne bovina importada de los referidos países (98), (99), (100).

Concretamente en Costa Rica, los resultados del "Programa Nacional de Residuos" desarrollado durante los años 2009 a 2012, indican que las setecientas ochenta (780) muestras bovinas de riñón analizadas por el método microbiológico *STOP* (hisopado de fluido de tejido renal), no contenían residuos de antimicrobianos. En el mismo sentido, en México el "Programa Nacional de Monitoreo y Control de Residuos Tóxicos y Contaminantes en Alimentos de Origen Animal" y, de manera específica el "Programa de Control de Residuos en

Bovinos”, que dispone el uso de las pruebas analíticas de la torunda y del bioensayo para la detección de antimicrobianos en hígado, músculo y riñón, reveló que en 2008 se analizaron 550 muestras y en el año 2011 se evaluaron 555, y no se determinaron residuos que excedieran las concentraciones permitidas en estas matrices. En este punto es importante destacar que la prueba de la torunda o hisopo, establecida por México como uno de sus métodos oficiales de referencia, fue usada también en el presente estudio como una de las herramientas analíticas que determinaron la ausencia de residuos antimicrobianos en las muestras de músculo bovino tomadas en la planta de beneficio.

En consideración a que la mayoría de muestras de origen bovino no contienen niveles violatorios de residuos antimicrobianos, son limitadas las investigaciones relacionadas con la determinación mediante pruebas de microbiología analítica de residuos de antibióticos en músculo bovino muestreado en plantas de beneficio. En el Reino Unido, se analizaron 1.830 muestras de músculo de bovinos y ovinos, por medio del método de las cuatro placas modificado. Las muestras fueron tomadas en inspecciones de rutina durante dos años consecutivos, encontrando niveles que superaban los LMRs respectivos, en 26 muestras de músculo que representan el 1,42% de las matrices analizadas (92).

En los Países Bajos, se llevó a cabo una comparación de tres métodos microbiológicos de *screening* de antibióticos usando muestras de monitoreo de rutina de bovinos y porcinos (84). Las pruebas empleadas para el análisis fueron NAT (*Nows Antibiotic Test*), que permite la evaluación de fluido cárnico y de fluido de pelvis renal, STAR (*Screening Test for Antibiotic Residues*), método que analiza láminas de músculo ubicadas sobre cinco placas y finalmente, Premi® Test en fluido cárnico. De las 591 muestras de plantas de beneficio, se identificaron 64 animales que resultaron positivos a una o más pruebas de *screening*. Después de la confirmación química con métodos completamente validados, se declararon dos violaciones en músculo bovino (0,34% del total de animales incluidos) que correspondieron a tetraciclinas [214 µg/kg] y [187 µg/kg]. En relación con la muestra de tejido muscular que contenía 187 µg/kg, es pertinente aclarar que se consideró como concentración violatoria bajo la perspectiva de la normatividad europea, que para tetraciclina en músculo bovino establece un LMR de 100 µg/kg. En el *Codex Alimentarius*, Estados Unidos y Colombia, el LMR permitido es de 200 µg/kg. Ésta observación tiene una especial relevancia en razón a que los métodos usados en el análisis de residuos antimicrobianos, deben cumplir con los LMRs fijados en la legislación nacional y/o internacional.

En atención a la necesidad de diseñar una estrategia analítica para la vigilancia de los residuos antibióticos en alimentos de origen animal, es importante reconocer el alcance de los métodos para su aplicación en las fases de cribado o *screening*, *post-screening* y de cuantificación.

En este orden de ideas y considerando que no se detectaron residuos en las muestras obtenidas en la planta de beneficio, se optó por analizar tejidos incurridos con penicilina G procaínica, penicilina G potásica y estreptomycin, procedentes de un ternero al que de manera controlada se le administró por inyección intramuscular un producto veterinario que contenía estos antimicrobianos, con el fin de realizar la identificación y cuantificación de los residuos. Conscientes de lo valiosa que puede ser cualquier información lograda con muestras reales incurridas o dosificadas, mediante las pruebas del bioensayo (con extractos de muestras filtradas y no filtradas y depositadas en cilindros o en perforaciones del agar), del hisopo y realizando adicionalmente el bioensayo con líquidos tisulares de descongelación (LTD), se analizaron los tejidos incurridos.

Desde el punto de vista cualitativo, todas las muestras de los tejidos incurridos evaluadas con las diferentes pruebas para la determinación de residuos antimicrobianos, se consideran positivas porque generaron halos de inhibición superiores a 9 mm. Bajo especificaciones comunes en la preparación de las placas, se demostró que la detección de residuos antimicrobianos es más evidente con el uso de LTD, frente a los hisopados de los tejidos analizados en común, que incluyeron hígado, glúteo profundo izquierdo y derecho, semitendinoso izquierdo y diafragma.

De acuerdo con estos resultados, si el uso previsto para los métodos es la detección de la presencia de inhibidores del crecimiento bacteriano, la utilidad se considera ideal. Sin embargo, en razón a que una de las características específicas del control sanitario de los residuos antibióticos en el marco de un plan de investigación de residuos, es la necesidad de verificar si el contenido del contaminante en el alimento supera el límite máximo permitido, y por ello es potencialmente peligroso para el consumidor, hay que identificarlo y establecer su concentración.

En este orden de ideas, se realizó una caracterización *post-screening* para la identificación de los residuos en los tejidos incurridos. Los residuos de las penicilinas en las muestras de músculo, hígado y riñón, fueron identificados porque generaron inhibición del crecimiento bacteriano en la placa diseñada para β -lactámicos, tanto en extractos como en LTD servidos en cilindros, ubicados en las placas con medio de cultivo de pH $6,5 \pm 0,05$ e inoculado con *Kocuria rhizophila* 9341a. Al respecto de la bacteria de prueba usada en los bioensayos, es pertinente señalar que se considera adecuada para la detección de β -lactámicos (84) y, resulta particularmente importante destacar que es un microorganismo selectivamente resistente a estreptomycin, razón por la cual es apropiado afirmar que las zonas de inhibición observadas fueron provocadas por los residuos de las penicilinas.

Se determinó adicionalmente que filtrar o no los extractos no genera diferencia estadísticamente significativa en el tamaño de las zonas de inhibición producidas por los residuos de los β -lactámicos

presentes en los músculos analizados. Sin embargo, la detección es marcadamente mejor con el uso de los cilindros (que corresponde al instrumento con el que evaluaron los criterios de funcionamiento del bioensayo) frente a las perforaciones del agar. Ahora bien, al comparar los resultados obtenidos con los bioensayos para la identificación de residuos de penicilinas empleando extractos y LTD, bajo características idénticas en relación con la cantidad de la muestra (200 µl) no filtrada, el medio de cultivo (agar antibiótico No. 4) sin adición de penicilinas, el volumen del agar por caja (8 ml), el microorganismo y su concentración (KR 9341a, 8×10^5 células vegetativas/ml), el uso de cilindros y las condiciones de incubación; se observaron en el tejido muscular, zonas de inhibición de diámetros superiores producidas por los LTD. No obstante, es necesario considerar el factor de dilución de las muestras procesadas con el bioensayo en extractos (12), producto de la adición del *buffer* fosfato que por su pH favorece la detección.

En contraste, *Bacillus subtilis* es un esporoformador con una sensibilidad conveniente para la detección de antimicrobianos del grupo de los aminoglucósidos (107), (84). Otras características especiales de las placas utilizadas para la identificación de residuos de estreptomina, consistieron en la adaptación del pH del medio de cultivo a $7,9 \pm 0,2$ que aumenta la actividad de los AMG y, en la suplementación con penicilinas, enzima que bloquea la acción de las penicilinas G procaínica y potásica, presentes en los tejidos dosificados. La adición del agente bloqueador, favoreció la revelación de los residuos de estreptomina.

Al realizar la comparación entre la determinación de los residuos de estreptomina mediante el bioensayo tradicional con la extracción de hígado y de los músculos glúteo profundo derecho y semitendinoso izquierdo, frente al reemplazo de extractos por LTD de las mismas matrices, se encontró que a pesar de mantener todas las especificaciones restantes respecto al agar, la penicilinas, el volumen de la muestra, la bacteria de prueba y su concentración, los cilindros y las condiciones de incubación, el bioensayo no detectó residuos del aminoglucósido en las muestras de músculos e hígado extraídas, pero sí detectó los residuos en LTD de hígado, de glúteo profundo derecho y de otros músculos de los miembros anteriores y posteriores. Es oportuno recordar que en la evaluación de la sensibilidad del bioensayo con extractos de músculo fortificado depositados en cilindros, el LDD de estreptomina no fue satisfactorio ya que se estableció en la concentración de 2,4 ppm. De esa forma se corroboró que el desempeño del método no es adecuado para la detección de este analito.

El hallazgo de estreptomina en LTD de muestras de músculos, puede obedecer a que algunos de ellos fueron puntos de inyección del producto administrado, y es bien sabido que los niveles de residuos en el sitio de inyección tienden a ser dramáticamente más altos que aquellos en músculos que no son sitios de inyección, grasa o hígado (108). Además, en consideración a que los AMG se distribuyen de forma relativamente libre en el espacio del líquido extracelular de

la mayoría de los tejidos, debido a su escasa unión a proteínas y alto nivel de solubilidad (25), es factible que el proceso de congelación y descongelación para la obtención de los LTD permita la liberación de estreptomina a partir del líquido intersticial. De otra parte, los residuos de estreptomina en hígado pueden ser difíciles de detectar debido a la distribución particular y a la escasa penetración de los antibióticos aminoglucósidos en la mayoría de los tejidos. En el reporte realizado por la EMA de un estudio de depleción de residuos de estreptomina en bovinos, en el que se empleó una técnica cromatográfica, pudo establecerse que las concentraciones en el tejido hepático son variables, ya que no todas las muestras analizadas al quinto día del tiempo de retiro contenían residuos cuantificables. De hecho, con un tiempo de retiro de siete días no fue posible cuantificarlos (108).

Paradójicamente, una variación adicional al método del bioensayo con extractos demostró la influencia de las perforaciones del agar sobre la detección de estreptomina, ya que las muestras de los músculos a pesar del factor de dilución, generaron halos de inhibición mayores a los producidos por los LTD correspondientes. Adicionalmente se determinó a través de la "prueba t" que no hay diferencia en la detección de estreptomina en los músculos cuyos extractos filtrados y no filtrados se depositaron en las perforaciones del agar.

Como era predecible, en razón a la acumulación de los AMG en la corteza renal y a la filtración glomerular que permite su eliminación inalterada (30), los residuos de estreptomina en riñón fueron identificados de manera apropiada por el bioensayo, independientemente de la filtración o de la no filtración de los extractos, pero se observó a través de la comparación con la "prueba t" que la detección se ve favorecida por el uso de cilindros frente a las perforaciones del agar.

En atención a los resultados expuestos, resulta pertinente señalar que la capacidad de detección de un método microbiológico para un antibiótico dado, se ve influenciada por la densidad celular inicial, la composición y especificaciones del medio de cultivo, así como de la difusión del residuo antimicrobiano a partir del tejido dentro del medio durante la incubación (21).

De otra parte, se ha demostrado que la velocidad de difusión a través del agar depende entre otros factores, de la concentración del fármaco en la muestra, del tamaño y la forma de la molécula antimicrobiana, de la viscosidad del agar y de la temperatura (109). Teniendo en cuenta las referidas variables, sería muy pertinente confirmar por medio de otros experimentos con tejidos incurridos, si la difusión a través del agar depende también del uso de cilindros o de perforaciones para depositar extractos de las muestras a analizar. Lo anterior considerando además que se ha señalado que el volumen de muestra depositado en los cilindros, ejerce influencia en el tamaño de los diámetros de las zonas de inhibición resultantes (110), (111).

Una vez se identificaron los residuos antimicrobianos, fue posible estimar su concentración, mediante la extrapolación de los diámetros de inhibición en curvas de calibración elaboradas para cada antibiótico (12).

Al efectuar la semi-cuantificación de las muestras de músculo que resultaron positivas a la detección de los antibióticos β -lactámicos con el bioensayo en extractos y en LTD, se pudo establecer que el tejido muscular (incluyendo sitios de inyección y diafragma) contenía niveles de residuos de penicilinas que superaban el LMR fijado. Las concentraciones de los analitos fluctuaron en un rango entre $\geq 0,05$ ppm y $\geq 0,56$ ppm. Ahora bien, al comparar las estimaciones realizadas en los extractos y en los LTD, se pudo establecer que son superiores las de los LTD. Probablemente esta situación se explica por el tratamiento de la matriz. Okerman et al. (91) observaron que al homogenizar muestras de músculo de pollo que contenían doxiciclina, se reducían los halos de inhibición respecto a los obtenidos con las mismas muestras sin homogenizar. La reducción puede deberse a la unión del antibiótico al tejido homogenizado, que conduce a una subestimación de los LDD de la técnica, al menos para ciertos grupos de antibióticos. De hecho, al cotejar la sensibilidad determinada para penicilina G en el proceso de evaluación de los criterios de funcionamiento del bioensayo usando extractos de músculo bovino fortificado, con los LDD de otras pruebas microbiológicas, se observó que cuando el tejido se ubica homogenizado con el antibiótico, el LDD es superior al establecido con tejido íntegro sobre discos de papel con penicilina G.

Con el bioensayo se valoraron las concentraciones de los residuos de las penicilinas en los extractos y LTD de las muestras de hígado, encontrando niveles que superaron por más de diez veces el LMR de 0,05 ppm, y en riñón se calcularon concentraciones superiores a 0,63 ppm, que también son violatorias del LMR de 0,05 ppm en ese tejido. La distribución de los residuos en estas matrices se ajusta a los resultados de estudios con penicilina marcada con azufre radiactivo, en los que se determinó que la concentración del fármaco es constantemente más alta en riñones, aunque en ocasiones se iguala con la del hígado (25).

En relación con la semi-cuantificación de los residuos de estreptomina en LTD de hígado y en algunos músculos incurridos, es preciso indicar que no todas las muestras contenían concentraciones violatorias. Se calculó para el tejido hepático una cantidad de 0,13 ppm que se juzga admisible por la regulación colombiana, que fijó un LMR de 0,6 ppm de estreptomina en hígado. En contraste, en glúteo profundo izquierdo la concentración estimada superó varias veces el LMR porque fue de 3,71 ppm, pero es importante considerar que ese músculo fue el sitio de inyección de la última administración previa al sacrificio del bovino, por lo que era previsible que la concentración encontrada excediera el nivel de residuos permitido.

Las concentraciones más altas de fármaco libre de la mayoría de los antimicrobianos se encuentran en riñón y en pelvis renal (112), (64). Sin embargo, una alta incidencia de resultados falsos positivos (113) y las diferencias en la relación entre las concentraciones de residuos en riñones y músculo de animales sanos y enfermos (114), (112), complican el uso de tejido renal como matriz de prueba. El tejido renal es la matriz de prueba de elección si el LDD de un método para cierto antimicrobiano es superior al LMR en músculo. No obstante, si el riñón es la matriz de prueba, la concentración de un antimicrobiano en tejido muscular puede ser difícil de estimar en el caso de un hallazgo positivo en riñón (21). Los aminoglucósidos se constituyen en un buen modelo de esta situación. Ellos se encuentran usualmente en tejidos en forma libre y en concentraciones bajas, excepto en la corteza renal donde tienden a concentrarse (115), (116), (117), (118). La acumulación es impredecible (119) debido a que la unión tisular es poco reversible, por lo que la excreción completa se retrasa notoriamente (120). En la experimentación desarrollada con el bovino para la producción de matrices incurridas, se calculó una concentración aproximada de 5,54 ppm de estreptomina en riñón, constituyendo a este tejido como violatorio del LMR de 1 ppm, lo cual es congruente con la farmacocinética de los AMG y con el irrespeto del tiempo de retiro del producto veterinario que contenía los antibióticos.

En el trabajo de Pikkemaat y su grupo, los riñones fueron analizados por análisis confirmatorio (LC-MS/MS) únicamente para determinar la presencia de aminoglucósidos. En riñones de cuatro animales se confirmaron residuos de neomicina, estreptomina y gentamicina, a niveles de aproximadamente la mitad de los LMRs. Sin embargo, resulta interesante el hecho que no se detectaron niveles de residuos en la carne de estos animales (84). Resultados similares se exponen en el "Summary report (4)" de estreptomina publicado por la Agencia Europea del Medicamento, en el que se describe un estudio con doce bovinos tratados con sulfato de estreptomina por inyección intramuscular profunda a una dosis de 10 mg/kg durante tres días consecutivos (108). Mediante HPLC con detector de fluorescencia se determinó que cinco días después de la última administración del producto, los residuos de estreptomina estuvieron por debajo del límite de cuantificación en músculo y grasa de los cuatro animales sacrificados. En contraste, se cuantificaron residuos en tres de las cuatro muestras de hígado y solo en tejido renal se detectaron residuos en todas las muestras. Por otra parte, se observó que en las muestras analizadas procedentes de los cuatro bovinos sacrificados luego de transcurridos siete días de la última inyección, los residuos de estreptomina estuvieron por debajo del límite de cuantificación en todas las muestras de músculo, hígado, grasa y sitio de inyección. De nuevo, los niveles cuantificables se registraron únicamente en las muestras de riñón.

Las pruebas microbiológicas realizadas a los tejidos incurridos con β -lactámicos y estreptomina revelaron información valiosa. Como era de esperarse luego del incumplimiento del tiempo de retiro, el

bioensayo detectó adecuadamente los residuos violatorios de las penicilinas y, al respecto de la detección de estreptomina se hallaron datos interesantes sobre la determinación en extracto de tejido muscular depositado sobre perforaciones del agar, por lo que se considera importante su verificación mediante experimentos adicionales.

Se encontró que los LTD pueden constituirse en una alternativa interesante frente a los extractos obtenidos de las muestras, que tienen un proceso más laborioso para su obtención. Por lo tanto, es conveniente desarrollar la evaluación de los criterios de funcionamiento del bioensayo con el uso de LTD.

En este estudio las muestras de músculo procedentes de bovinos faenados no presentaron residuos antimicrobianos, lo cual es un indicador del cumplimiento de las instrucciones de empleo oficialmente recomendadas para los antibióticos de uso veterinario, de conformidad con la información consignada en el rotulado de los productos aprobados, incluido el tiempo de retiro.

Los animales de los que se obtuvieron las muestras procedían de predios ubicados en departamentos que desde el año 2007 se encuentran en proceso de implementación de la reglamentación de las condiciones sanitarias y de inocuidad en la producción primaria de ganado bovino destinado al sacrificio para consumo humano, contempladas en la Resolución 2341 de 2007 (70). De hecho, una cantidad importante de predios localizados en esos departamentos, se encuentran certificados por el ICA en Buenas Prácticas Ganaderas. Esto se reflejó en los resultados de los métodos microbiológicos del bioensayo, del hisopo y de la prueba comercial Premi® Test, que fueron compatibles al indicar la ausencia de residuos antibióticos en los tejidos de los animales sacrificados en la planta de beneficio.

Por tanto, es pertinente resaltar que la utilidad de las técnicas debe valorarse de acuerdo al uso previsto, que en el caso del bioensayo multiplacas consistió en la determinación de criterios de funcionamiento para los antimicrobianos al nivel de los LMR de residuos de penicilina G, oxitetraciclina y eritromicina en músculo bovino, fijados por la legislación nacional y por el *Codex Alimentarius*.

En el mismo sentido, la capacidad de detección de Premi® Test también se ajusta para penicilina G, oxitetraciclina y eritromicina, en relación con los respectivos LMRs en músculo bovino. Premi® Test es considerada la única prueba microbiológica de tubo para la cual hay una cantidad sustancial de literatura disponible (73), ya que cuenta con la evaluación de los criterios de funcionamiento establecidos en la Decisión Europea 2002/657/CE (82), así como con validación AOAC (Association of Analytical Communities) (89) y con validación AFNOR (French Association for Normalisation), basada en la comparación con el protocolo STAR y con el método de referencia de las cuatro placas, el cual es oficial en Francia (90). De hecho, desde 2006 los laboratorios en Francia están autorizados para usar

Premi® Test como una prueba pre-screening; todas las muestras que resultan positivas con Premi® Test, obligatoriamente deben ser analizadas con el método de las cuatro placas y, las que resultan positivas con éste último, son confirmadas por el laboratorio nacional de referencia con LC-MS-MS (121).

Dado que hay que realizar el control de un gran número de compuestos en muchas muestras, es necesario diseñar una estrategia analítica semejante para la evaluación de cada residuo o grupo de residuos, que de manera secuencial incluya las fases de cribado o *screening*, post-cribado y confirmación. La principal utilidad de las técnicas microbiológicas está en las dos etapas iniciales, teniendo en cuenta su relativa inespecificidad. En virtud de los resultados presentados en este documento, para el cribado de residuos antimicrobianos es viable emplear pruebas netamente cualitativas como la del hisopo o los LTD en la placa inoculada con BS, o Premi® Test. Sin embargo, teniendo en cuenta las características particulares del bioensayo multiplacas, que se constituyen en ventajas y le confieren superioridad frente a las pruebas tipo *screening* microbiológico convencionales y *kits* comerciales que solo usan un microorganismo de prueba, sin orientar al analista sobre el grupo antibiótico, ni estimar la concentración del residuo, se considera conveniente poner en práctica el método del bioensayo multiplacas ya que permite realizar simultáneamente la detección, identificación presuntiva y semi-cuantificación, sin prescindir del empleo de los métodos físico-químicos para la identificación inequívoca y la confirmación definitiva de los residuos.

Ahora bien, desde el punto de vista operativo el método microbiológico del bioensayo está llamado a ser puesto en práctica en razón a lo establecido en el documento CONPES 3676 de 2010, concerniente a la política sanitaria y de inocuidad de la carne bovina en Colombia. En su momento, el CONPES 3376 de 2005 planteó que debido a las prioridades comerciales de exportación de carne a los Estados Unidos, una de las metas consistía en el reconocimiento del sistema nacional de control e inspección ante el FSIS (8), que es justamente la autoridad que desarrolló el bioensayo empleado en éste trabajo como la principal prueba para la detección de residuos antibióticos en músculo de bovinos sacrificados en una de las plantas de beneficio más importantes del país.

El bioensayo multiplacas puede ser usado como un método para el monitoreo y vigilancia de los residuos de antimicrobianos en carne bovina, con la ventaja de mejorar las posibilidades y precisión de la identificación presuntiva de los residuos orientada a los grupos de tetraciclinas, betalactámicos y macrólidos, lo cual puede reducir los esfuerzos y costos en la confirmación. Adicionalmente, permite lograr una estimación semi-cuantitativa de los residuos antibióticos. La evaluación del desempeño del método analítico microbiológico del bioensayo, que por primera vez se realizó en el país, apoyará a las autoridades sanitarias en la implementación del "Programa de Control de Residuos de Medicamentos Veterinarios" en Colombia, contribuyendo a garantizar la inocuidad alimentaria para

proteger la salud de los consumidores y mejorar las condiciones de competitividad y cumplir los requisitos del comercio internacional de alimentos de origen animal. La contribución al Plan Nacional de Residuos y a la garantía de la inocuidad alimentaria, se evidencia en el hecho de que el ICA documentó (Anexo H) y aprobó el método microbiológico del bioensayo en el sistema de gestión de la calidad, constituyéndolo en herramienta analítica para el monitoreo de residuos de antibióticos en carne bovina destinada al consumo humano.

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

La adecuación, estandarización y evaluación preliminar del método analítico microbiológico del bioensayo para la detección, identificación y semi-cuantificación de residuos de penicilina G, oxitetraciclina, estreptomina y eritromicina en músculo bovino, favorecerá la implementación del "Programa de Control de Residuos de Medicamentos Veterinarios" en Colombia, apoyando el sistema de gestión de inocuidad en el marco de aplicación de Medidas Sanitarias y Fitosanitarias para contribuir a garantizar la inocuidad alimentaria para los consumidores de alimentos de origen bovino.

La evaluación del desempeño del bioensayo, contribuirá al mejoramiento de las condiciones sanitarias y de inocuidad alimentaria requeridas por el país para su adecuación a las reglas del comercio internacional de alimentos de origen animal, como quiera que Europa y principalmente Estados Unidos se constituyen en las prioridades comerciales de exportación de carne.

Se evaluó el cumplimiento de los Límites Máximos de Residuos de antimicrobianos de uso en bovinos productores de carne para consumo humano, verificando el respeto de los tiempos de retiro.

El método del bioensayo multiplaca utilizado para la detección, identificación y semi-cuantificación de residuos de cuatro antimicrobianos en músculo bovino, mostró excelente especificidad para los niveles de interés (ningún falso-positivo); se determinaron los LDD para los cuatro representantes antibióticos con relación a sus respectivos Límites Máximos de Residuos: Betalactámicos (penicilina G =LMR), tetraciclinas (oxitetraciclina =LMR), macrólidos (eritromicina =LMR) y aminoglucósidos (estreptomina >4 LMR). La exactitud relativa calculada para los LDD de los cuatro antimicrobianos fue satisfactoria; la estabilidad de los analitos en la matriz fortificada al LDD, resultó adecuada durante el período de tiempo evaluado. El método del bioensayo es aplicable a la detección de una amplia gama de residuos antimicrobianos en músculo bovino.

Los resultados obtenidos en la evaluación preliminar de los criterios de funcionamiento del bioensayo en placas de agar, permitieron proyectar el método a un futuro ejercicio pleno de validación, con una optimización previa del LDD para la placa de aminoglucósidos, el cual aunque es mejor que el reportado para otros métodos microbiológicos cualitativos, se determinó superior al LMR

establecido por el *Codex Alimentarius* y por la normatividad nacional para la matriz de músculo de bovino.

En el caso de la especie bovina, el uso de matrices fortificadas se constituye en una buena alternativa frente al empleo de tejidos incurridos o dosificados, teniendo en cuenta la complejidad en términos de tiempo y costos para la producción de materiales incurridos para cada antibiótico a las concentraciones adecuadas.

5.2 Recomendaciones

Al tenor de los avances realizados en química analítica desde la adopción de la Directiva 96/23/CE, que ha dejado obsoleto el concepto de métodos de rutina y métodos de referencia y ha sido reemplazado por un planteamiento en el que se establecen criterios de funcionamiento y procedimientos de validación de los métodos de cribado y confirmación, se recomienda a las entidades del sistema MSF emprender la validación completa del bioensayo de acuerdo a lo establecido en la Decisión de la Comisión 2002/657/CE, y en la guía de los laboratorios de referencia de residuos de la Comunidad Europea 20/1/10 que trata sobre la validación de métodos de *screening* de residuos de medicamentos veterinarios. En éste sentido, es importante considerar que:

En el proceso de validación del bioensayo en placas de agar, sería interesante considerar la evaluación de más representantes por familia de antimicrobianos, para analizar de manera detallada los perfiles de identificación de acuerdo a sus patrones característicos de inhibición o perfiles de susceptibilidad.

A pesar de la dificultad de utilizar tejidos bovinos incurridos, sería muy importante evaluar con métodos microbiológicos y con técnicas fisicoquímicas matrices contaminadas de manera natural con diferentes antimicrobianos.

Con el propósito de establecer correlaciones entre las concentraciones de residuos antibióticos en músculo y en otros tejidos, es conveniente tomar muestras en planta de beneficio de otras matrices de prueba como hígado y riñón bovinos.

El bioensayo debe evaluarse en diversas condiciones experimentales que incluyan por ejemplo diferentes especies animales (porcinos, aves) o matrices como líquidos tisulares de descongelación, con el propósito de determinar la susceptibilidad o robustez del método analítico a estos cambios.

A. Anexo: Glosario

Beneficio de animales: Conjunto de actividades que comprenden el sacrificio y faenado de animales para consumo humano (19).

Buenas Prácticas en el Uso de Medicamentos Veterinarios (BPMV): Se define como el cumplimiento de los métodos de empleo oficialmente recomendados para los medicamentos de uso veterinario, de conformidad con la información consignada en el rotulado de los productos aprobados, incluido el tiempo de retiro, cuando los mismos se utilicen en condiciones prácticas (70).

Carne: Es la parte muscular y tejidos blandos que rodean al esqueleto de los animales de las diferentes especies, incluyendo su cobertura de grasa, tendones, vasos, nervios, aponeurosis y que ha sido declarada inocua y apta para el consumo humano (19).

Inocuidad: Característica o atributo de la calidad de un alimento, que determina que el consumo del mismo no causa riesgo para la salud del consumidor (70).

Medicamento veterinario: Todo fármaco o principio activo o mezcla de éstos, con o sin adición de sustancias auxiliares, presentada bajo una forma farmacéutica, en empaque o envase y rotulado listo para su distribución y uso, empleado con fines de diagnóstico, prevención, control o tratamiento de las enfermedades de los animales (70).

Planta de beneficio animal: Todo establecimiento en donde se benefician las especies de animales que han sido declarados como aptas para el consumo humano y que ha sido registrado y autorizado para este fin (19).

Tejido dosificado: Tejido proveniente de animales de la especie objeto de estudio, que se hayan tratado con el medicamento estudiado de acuerdo con el uso previsto (36).

Tejido fortificado: Tejido que contiene concentraciones conocidas del elemento analizado agregado a la muestra de tejido de control (36).

Tejido de control: Tejido proveniente de animales no tratados con medicamentos veterinarios, de especie, sexo, edad y condición fisiológica similares a los de la especie objeto de estudio (36).

B. Anexo: Preparación de inóculos de suspensiones de células vegetativas y de suspensiones de esporas

Suspensiones de células vegetativas

En un frasco Schott con 50 ml de caldo CASO se sembró el contenido de un criovial de una cepa de trabajo de cada bacteria de prueba previamente descongelada. Se incubó durante 18 horas \pm 2 horas a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$

Se inoculó 0.1 ml del cultivo bacteriano en una caja de Petri con agar nutritivo y con un asa de Digralsky se esparció el cultivo en forma masiva en la superficie del medio, para posteriormente incubar bajo las condiciones de temperatura y tiempo antes descritas.

Se realizó la cosecha con aproximadamente 2-3 ml de solución salina 0.85% estéril y se llevó a un tubo de centrifuga estéril para luego centrifugar a 5000 G por 30 minutos a $10 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Se efectuaron dos lavados de la suspensión de células vegetativas colectadas con solución salina isotónica estéril y se resuspendió el precipitado con solución salina 0.85% estéril. La suspensión se rotuló y almacenó a una temperatura de 2 a 8°C durante máximo 30 días.

Suspensiones de esporas

En un frasco Schott con 50 ml de caldo CASO se sembró el contenido de un criovial de una cepa de trabajo de cada bacteria de prueba previamente descongelada. Se incubó durante 18 horas \pm 2 horas a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Se inoculó 0.1 ml del cultivo bacteriano en una caja de Petri con agar nutritivo y con un asa de Digralsky se esparció el cultivo en forma masiva en la superficie del medio, para posteriormente incubar *Bacillus cereus* ATCC 11778 durante 18-24 horas \pm 2 horas a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ para el caso de *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

B. cereus fue cosechado mediante lavado con 3 ml de agua destilada estéril y con solución salina 0.85% estéril se cosechó *B. subtilis*. Luego se transfirieron a 250 ml del agar esporulante específico para cada microorganismo.

El cultivo de *B. cereus* se incubó a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 13 días y el de *B. subtilis* a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 7 días. Las esporas de *B. cereus* fueron cosechadas con agua destilada estéril y depositadas en un tubo para centrifuga estéril, para posteriormente realizar lavado por centrifugación ($27.000 \times G$ a 5°C por 20 minutos). Las esporas de *B. subtilis* se cosecharon con solución salina isotónica estéril y se transfirieron a un tubo de centrifuga estéril para centrifugarlo bajo las condiciones previamente descritas.

Al paquete celular se le realizaron como mínimo tres lavados con agua destilada estéril para *B. cereus* y con solución salina 0.85% estéril para *B. subtilis* hasta eliminar el medio de cultivo residual, separándolo por centrifugación y decantación, para después reconstituir el sedimento y resuspender con 50 ml de agua destilada estéril para *B. cereus* y con solución salina isotónica estéril en el caso de *B. subtilis*.

La suspensión se calentó durante 30 minutos en baño serológico (baño de María) a 65°C para destruir formas vegetativas. De nuevo se centrifugó y lavó con agua destilada o solución salina según correspondiera, y se repitió el calentamiento, lavado y resuspensión. La suspensión de esporas se rotuló y almacenó de 2 a 8°C durante máximo tres meses.

Recuento de células vegetativas o esporas / ml de suspensión

Se calculó el contenido de células vegetativas o esporas por mililitro de suspensión, realizando diluciones en base 10 con solución salina estéril hasta obtener 1×10^{-4} , 1×10^{-5} , 1×10^{-6} , 1×10^{-7} . Se depositó por superficie 100 μ l de cada dilución de la suspensión en cajas de Petri que contenían agar *plate count*. El contenido de cada dilución fue distribuido con un asa de Digralsky o rastrillo estéril por toda la superficie del medio de cultivo. Posteriormente se incubó durante 18-24 horas a $35 \pm 1^\circ\text{C}$. Se realizó la lectura del total de colonias de cada dilución sembrada y se calculó el número de células vegetativas o de esporas multiplicando el número total de UFC x 10 x el inverso de la dilución cultivada.

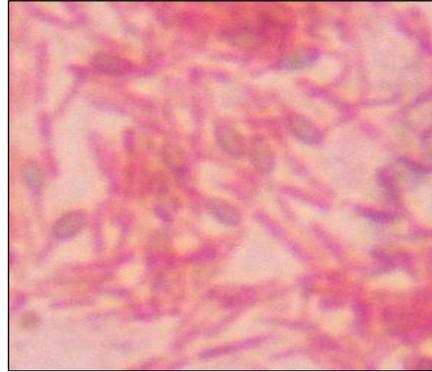
Se rotuló el recipiente que contenía la suspensión de células vegetativas o de esporas, indicando la concentración de células vegetativas o esporas por ml de suspensión según correspondía y se indicaba las fechas de preparación y de caducidad.

Con el número estimado de células vegetativas o esporas por ml de suspensión, se calculó la cantidad de suspensión de inóculo requerida según la cantidad de medio de agar base preparado de tal forma que se cumpliera con las especificaciones requeridas para las diversas pruebas microbiológicas.

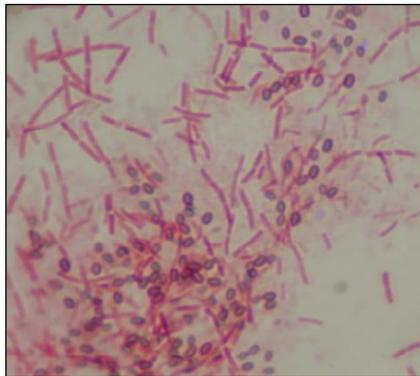
C. Anexo: Producción de esporas de *Bacillus cereus* ATCC 11778 (secuencia fotográfica)



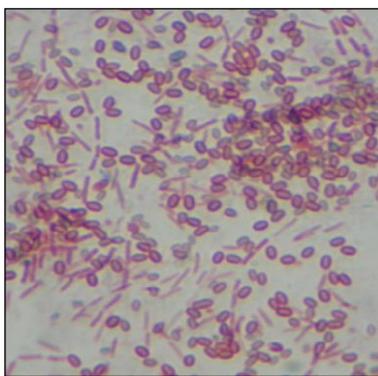
Aislamiento *B. cereus*



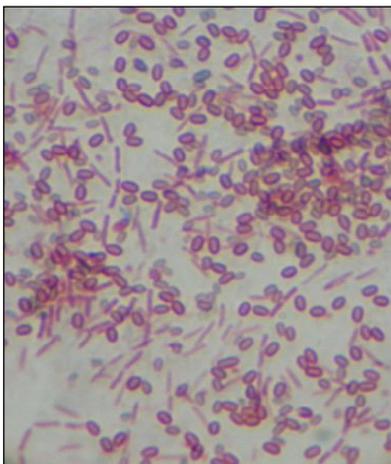
Esporulación día 7



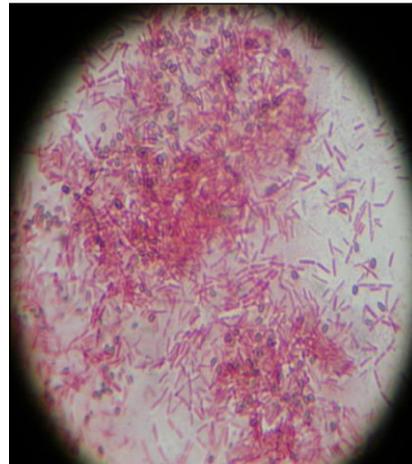
Esporulación día 11



Esporulación día 11



Esporulación día 13



Esporulación día 13

D. Anexo: Ajuste concentración de esporas de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 para inoculación en placas (Ejemplo)

Si la suspensión de esporas de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 contiene aproximadamente 1×10^7 esporas/ml, y el volumen de Agar Antibiótico No. 5 preparado es de 200 ml, entonces se aplica la siguiente ecuación:

$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$ donde:

V_1 es el volumen que se debe usar para adicionar al medio de cultivo.

C_1 es la concentración de esporas de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 por ml de suspensión.

V_2 es el volumen de medio de Agar antibiótico No. 5 que se tiene preparado.

C_2 es la concentración de esporas de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 por ml medio de cultivo para ser usado en una prueba que requiere 1×10^4 esporas/ml de medio de cultivo.

Reemplazando:

$$V_1 \times 1 \times 10^7 \text{ esporas/ml} = 200 \text{ ml} \times 1 \times 10^4 \text{ esporas/ml}$$

$$V_1 = 200 \text{ ml} \times 1 \times 10^4 / 1 \times 10^7$$

$$V_1 = 0.2 \text{ ml}$$

Se requiere 0.2 ml de la suspensión de esporas de *B. subtilis* ATCC 6633 para preparar 200 ml de Agar antibiótico No. 5 para que contenga una concentración de esporas de 1×10^4 esporas/ml.

E. Anexo: Especificaciones de medios antibióticos

Componente (g)	Agar Antibiótico No.			
	4	5	8	11
Extracto de carne	1.5	1.5	1.5	1.5
Extracto de levadura	3.0	3.0	3.0	3.0
Peptona de caseína	---	---	---	4.0
Peptona de carne	Peptona 6.0	6.0	Peptona 6.0	6.0
Dextrosa	1.0	---	---	1.0
Agar agar	15.0	15.0	15.0	15.0
pH	6.55±0.05	7.9±0.2	5.85±0.05	7.9±0.2
g/L agua destilada	26.5	25.5	25.5	30.5

La esterilización de los medios de cultivo se realizó por calor húmedo a 121°C durante 15 minutos.

F. Anexo: Preparación de soluciones amortiguadoras de fosfato o *Buffers* fosfato

<i>Buffer fosfato</i>	KH_2PO_4 (g)	K_2HPO_4 (g)
0,1 M pH 4,5 ($\pm 0,1$)	13,6	—
0,1 M pH 6,0 ($\pm 0,1$)	11,2	2,8
0,1 M pH 8,0 ($\pm 0,1$)	0,523	16,73
0,2 M pH 8,0 ($\pm 0,1$)	1,046	33,46

Para preparar cualquiera de las soluciones amortiguadoras, se disolvieron las cantidades de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) y/o de fosfato de potasio dibásico (K_2HPO_4) en aproximadamente 800 ml de agua destilada; se revisó el pH y si era necesario, se ajustó según el caso, con la adición gota a gota de ácido clorhídrico (HCl 0,1N)* ó con hidróxido de sodio (NaOH 1,0N)**. Con agua destilada, se llevó a volumen de un litro y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

* HCl 0,1N: Se disolvieron 8,5 ml de HCl concentrado en 1000 ml de agua destilada.

** NaOH 1,0N: Se disolvieron 40g de NaOH en 100 ml de agua destilada y se aforaron con la misma a 1000 ml.

G. Anexo: Preparación de soluciones antimicrobianas

Antimicrobiano	Potencia del estándar ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Pesar (g)	Balón aforado (ml)	Diluyente solución <i>stock</i>	Diluyente diluciones
Penicilina G potásica	1588	0,0566	50	BF 0,1M pH6,0 \pm 0.1	BF 0,1M pH6,0 \pm 0.1
Oxitetraciclina clorhidrato	970	0,0556	50	HCl 0,01N	BF 0,1M pH4,5 \pm 0.1
Eritromicina	952	0,0525	50	2-4ml metanol y BF 0,2M pH8,0 \pm 0.1	BF 0,2M pH8,0 \pm 0.1
Estreptomina sulfato	775	0,0596	50	Agua destilada	BF 0,1M pH 8,0 \pm 0.1
Neomicina tri sulfato	689	0,0726	50	BF 0,1M pH8,0 \pm 0.1	BF 0,1M pH8,0 \pm 0.1

Para preparar soluciones *stocks* de 1000 ppm, en la balanza analítica calibrada se ubicó el balón aforado sin tapa y se taró para seguidamente pesar el polvo antimicrobiano. Se adicionó el diluyente, se disolvió en el homogenizador ultrasónico y se prepararon las diluciones de las concentraciones deseadas usando la fórmula $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$

H. Anexo: Aprobación del bioensayo en el sistema de gestión de la calidad del ICA

DocManager © Integra Tecnología Ltda. (versión ASP.NET) - Windows Internet Explorer

Publicaciones Solicitudes Mejoramiento Gestión Recursos MECI

Mapa Índice **Consultas** Registros

Buscar Buscar sobre Todos



Convenções:

Código	Tipo	Título	Proceso	Elaborador	Responsable	Vigencia	F.Elab.
GR-FORMA 3-171	FORMA 3	HOJA DE RUTA BIOENSAYO MULTIPLACA EN AGAR PARA LA DETECCIÓN DE RESIDUOS DE ANTIMICROBIANOS EN TEJIDO	Z-GESTION DEL RIESGO (EN ACTUALIZACIÓN)	Sandra Lombana	Martha Patricia Vela Flórez	02/08/2011	13/05/2010 12:00:00 a.m.
GR-FORMA 3-204	FORMA 3	RESULTADOS DE PRUEBAS DE DETECCIÓN O SCREENING DE RESIDUOS DE ANTIMICROBIANOS EN MUESTRAS DE TEJIDO O FLUIDO ANIMAL	Z-GESTION DEL RIESGO (EN ACTUALIZACIÓN)	Sandra Lombana	Martha Patricia Vela Flórez	22/07/2013	15/05/2010 12:00:00 a.m.
GR-FORMA 3-531	FORMA 3	HOJA DE RUTA MÉTODO SCREENING SEMICUANTITATIVO PARA LA DETECCIÓN DE RESIDUOS DE TETRACICLINAS EN LECHE DE BOVINO	Z-GESTION DEL RIESGO (EN ACTUALIZACIÓN)	Sandra Lombana	Martha Patricia Vela Flórez	22/07/2013	08/07/2013 02:54:26 p.m.
GR-FORMA 3-709	FORMA 3	CURVAS DE BIOENSAYO MULTIPLACA PARA DETECCIÓN DE RESIDUOS DE MEDICAMENTOS	Z-GESTION DEL RIESGO (EN ACTUALIZACIÓN)	Sandra Lombana	Martha Patricia Vela Flórez	18/09/2011	02/08/2011 12:00:00 a.m.
GR-10-LANA-B-004	INSTRUCTIVO OPERATIVO LANIA BIOINSUMOS	BIOSEGURIDAD EN EL ÁREA DE BIOINSUMOS E INOCUIDAD AGRÍCOLA	Z-GESTION DEL RIESGO (EN ACTUALIZACIÓN)	Hugo Andrés Rodríguez Fajardo	Martha Patricia Vela Flórez	18/05/2010	15/02/2010 12:00:00 a.m.
GR-MA-LANP-R-010	METODO ANALITICO Y/O DE ENSAYO - LANIP - RESIDUOS DE MEDICAMENTOS	BIOENSAYO MULTIPLICA EN AGAR PARA LA DETECCIÓN DE RESIDUOS DE ANTIMICROBIANOS POR GRUPO DE ANTIBIÓTICO EN MÚSCULO BOVINO	Z-GESTION DEL RIESGO (EN ACTUALIZACIÓN)	Sandra Lombana	Martha Patricia Vela Flórez	03/10/2012	02/08/2011 12:00:00 a.m.
GR-MA-LANP-R-014	METODO ANALITICO Y/O DE ENSAYO - LANIP - RESIDUOS DE MEDICAMENTOS	DETECCIÓN DE TETRACICLINAS EN LECHE DE BOVINO POR ELISA SCREENING CUALITATIVO	Z-GESTION DEL RIESGO (EN ACTUALIZACIÓN)	Sandra Lombana	Martha Patricia Vela Flórez	07/03/2014	28/06/2013 10:44:53 a.m.

7 Registro(s) encontrado(s). Mostrando del 1 al 7

I. Anexo: Muestras de músculo diafragmático de planta de beneficio

No.	Fecha muestreo	Rótulo muestra en Planta de beneficio	Rótulo muestra en Laboratorio	Género	Edad (años)	Procedencia
1	01/04/2011	525	RMI-10-025	Macho	2-2,5	Meta
2	01/04/2011	515-1	RMI-10-030	Macho	2,5-3	Meta
3	01/04/2011	515-2	RMI-10-031	Macho	2,5-3	Meta
4	01/04/2011	515-3	RMI-10-029	Macho	3-3,5	Meta
5	01/04/2011	515-4	RMI-10-028	Hembra	3,5-4	Meta
6	01/04/2011	514	RMI-10-039	Macho	3,5-4	Casanare
7	01/04/2011	117	RMI-10-047	Macho	2,5-3	Meta
8	01/04/2011	80	RMI-10-040	Hembra	3,5-4	Casanare
9	01/04/2011	90	RMI-10-034	Macho	20 meses	Meta
10	01/04/2011	386	RMI-10-048	Macho	3,5-4	Meta
11	01/04/2011	19	RMI-10-038	Macho	2,5-3	Meta
12	01/04/2011	368	RMI-10-046	Hembra	2-2,5	Medina/Cmarca
13	01/04/2011	549-1	RMI-10-053	Hembra	5-5,5	Zipaquirá/Cmarca
14	01/04/2011	549-2	RMI-10-050	Hembra	4-4,5	Zipaquirá/Cmarca
15	01/04/2011	549-3	RMI-10-018	Hembra	4-4,5	Zipaquirá/Cmarca
16	01/04/2011	549-4	RMI-10-036	Hembra	12	Zipaquirá/Cmarca
17	01/04/2011	549-5	RMI-10-032	Hembra	8	Zipaquirá/Cmarca
18	01/04/2011	549-6	RMI-10-035	Hembra	7	Zipaquirá/Cmarca
19	01/04/2011	549-7	RMI-10-033	Hembra	10	Zipaquirá/Cmarca
20	01/04/2011	549-8	RMI-10-051	Hembra	10	Zipaquirá/Cmarca
21	01/04/2011	549-9	RMI-10-043	Hembra	8	Zipaquirá/Cmarca
22	01/04/2011	549-10	RMI-10-049	Hembra	>13	Zipaquirá/Cmarca
23	01/04/2011	549-11	RMI-10-020	Hembra	7	Zipaquirá/Cmarca
24	01/04/2011	549-12	RMI-10-055	Hembra	7	Zipaquirá/Cmarca
25	15/04/2011	503	RMI-10-091	Macho	3-3,5	Acacias/Meta
26	15/04/2011	93	RMI-10-090	Macho	2-2,5	Yopal/Casanare
27	15/04/2011	48	RMI-10-078	Macho	3,5-4	Paz de Ariporo/Casanare
28	15/04/2011	90	RMI-10-083	Macho	8	Medina/Cmarca
29	15/04/2011	23	RMI-10-095	Macho	4-4,5	San Martín/Meta
30	15/04/2011	539	RMI-10-097	Macho	3,5-4	Villavicencio/Meta
31	15/04/2011	61	RMI-10-085	Macho	4,5-5	San Juan de Arana/Meta
32	15/04/2011	87	RMI-10-098	Hembra	1,5-2	San Carlos de Guaroa/Meta

33	15/04/2011	539	RMI-10-097	Macho	2-2,5	Villavicencio/Meta
34	15/04/2011	386	RMI-10-082	Macho	4	San Carlos de Guaroa/Meta
35	15/04/2011	73	RMI-10-093	Macho	4,5-5	San Martín/Meta
36	15/04/2011	527	RMI-10-062	Macho	1,5	Chocontá/Cmarca
37	15/04/2011	549-1	RMI-10-065	Hembra	6	Zipaquirá/Cmarca
38	15/04/2011	549-2	RMI-10-086	Hembra	6	Zipaquirá/Cmarca
39	15/04/2011	549-3	RMI-10-073	Hembra	6,5	Zipaquirá/Cmarca
40	15/04/2011	549-4	RMI-10-087	Hembra	7	Zipaquirá/Cmarca
41	15/04/2011	549-5	RMI-10-079	Hembra	7	Zipaquirá/Cmarca
42	15/04/2011	549-6	RMI-10-075	Hembra	9	Zipaquirá/Cmarca
43	15/04/2011	549-7	RMI-10-070	Hembra	7	Zipaquirá/Cmarca
44	15/04/2011	549-8	RMI-10-077	Hembra	7	Zipaquirá/Cmarca
45	15/04/2011	549-9	RMI-10-099	Hembra	8	Zipaquirá/Cmarca
46	15/04/2011	549-10	RMI-10-066	Hembra	8	Zipaquirá/Cmarca
47	15/04/2011	549-1	RMI-10-065	Hembra	9	Zipaquirá/Cmarca
48	15/04/2011	549-12	RMI-10-074	Hembra	12	Zipaquirá/Cmarca
49	15/04/2011	549-13	RMI-10-096	Hembra	6	Zipaquirá/Cmarca
50	15/04/2011	549-14	RMI-10-069	Hembra	9	Zipaquirá/Cmarca
51	15/04/2011	549-15	RMI-10-063	Hembra	8	Zipaquirá/Cmarca
52	15/04/2011	549-16	RMI-10-092	Hembra	8	Zipaquirá/Cmarca
53	15/04/2011	549-17	RMI-10-076	Hembra	8	Zipaquirá/Cmarca
54	15/04/2011	549-18	RMI-10-089	Hembra	8	Zipaquirá/Cmarca
55	15/04/2011	549-19	RMI-10-067	Hembra	10	Zipaquirá/Cmarca
56	15/04/2011	549-20	RMI-10-084	Hembra	8	Zipaquirá/Cmarca
57	15/04/2011	549-21	RMI-10-058	Hembra	7	Zipaquirá/Cmarca
58	15/04/2011	549-22	RMI-10-088	Hembra	6-6,5	Zipaquirá/Cmarca
59	15/04/2011	549-23	RMI-10-064	Macho	4,5-5	Zipaquirá/Cmarca
60	15/04/2011	549-24	RMI-10-071	Macho	3,5-4	Zipaquirá/Cmarca
61	15/04/2011	549-25	RMI-10-061	Macho	4-4,5	Zipaquirá/Cmarca
62	16/06/2011	532 A	RMI-10-0326	Macho	4	Barranca de Upia/Meta
63	16/06/2011	532 B	RMI-10-0327	Macho	4	Barranca de Upia/Meta
64	16/06/2011	532 C	RMI-10-0328	Macho	4	Barranca de Upia/Meta
65	16/06/2011	525 A	RMI-10-0329	Macho	2	Yopal/Casanare
66	16/06/2011	525 B	RMI-10-0330	Macho	2	Yopal/Casanare
67	16/06/2011	368 A	RMI-10-0331	Macho	2,5	Paratebueno/Cmarca
68	16/06/2011	368 B	RMI-10-0332	Macho	2,5	Paratebueno/Cmarca
69	16/06/2011	57	RMI-10-0334	Macho	4	Puerto Triunfo/Antioquia
70	16/06/2011	512	RMI-10-0335	Macho	2,5	Cimitarra/Santander
71	29/06/2011	503	RMI-10-0348	Hembra	>10	Acacias/Meta
72	29/06/2011	384	RMI-10-0370	Macho	2,5-3	Fortul/Arauca
73	29/06/2011	387	RMI-10-0343	Hembra	>10	San Juan de Arana/Meta

74	29/06/2011	76	RMI-10-0369	Macho	2,5-3	San Martín/Meta
75	29/06/2011	544-1	RMI-10-0349	Hembra	>10	Zipaquirá/Cmarca
76	29/06/2011	544-2	RMI-10-0358	Hembra	>10	Zipaquirá/Cmarca
77	29/06/2011	544-3	RMI-10-0338	Hembra	>10	Zipaquirá/Cmarca
78	29/06/2011	544-4	RMI-10-0365	Hembra	>10	Zipaquirá/Cmarca
79	29/06/2011	544-5	RMI-10-0341	Hembra	>10	Zipaquirá/Cmarca
80	29/06/2011	544-6	RMI-10-0359	Hembra	>10	Zipaquirá/Cmarca
81	29/06/2011	544-7	RMI-10-0346	Hembra	>10	Zipaquirá/Cmarca
82	29/06/2011	544-8	RMI-10-0362	Hembra	>10	Zipaquirá/Cmarca
83	29/06/2011	544-9	RMI-10-0363	Hembra	>10	Zipaquirá/Cmarca
84	29/06/2011	544-10	RMI-10-0357	Hembra	>10	Zipaquirá/Cmarca
85	29/06/2011	544-11	RMI-10-0340	Hembra	>10	Zipaquirá/Cmarca
86	29/06/2011	544-12	RMI-10-0364	Hembra	>10	Zipaquirá/Cmarca
87	29/06/2011	544-13	RMI-10-0355	Hembra	>10	Zipaquirá/Cmarca
88	29/06/2011	544-14	RMI-10-0351	Hembra	>10	Zipaquirá/Cmarca
89	29/06/2011	544-15	RMI-10-0345	Hembra	>10	Zipaquirá/Cmarca
90	29/06/2011	545-1	RMI-10-0366	Hembra	>10	Zipaquirá/Cmarca
91	29/06/2011	545-2	RMI-10-0344	Hembra	>10	Zipaquirá/Cmarca
92	29/06/2011	545-3	RMI-10-0347	Hembra	>10	Zipaquirá/Cmarca
93	29/06/2011	545-4	RMI-10-0368	Hembra	>10	Zipaquirá/Cmarca
94	29/06/2011	545-5	RMI-10-0371	Hembra	>10	Zipaquirá/Cmarca
95	29/06/2011	545-6	RMI-10-0342	Hembra	>10	Zipaquirá/Cmarca
96	29/06/2011	545-7	RMI-10-0339	Hembra	>10	Zipaquirá/Cmarca
97	29/06/2011	545-8	RMI-10-0361	Hembra	>10	Zipaquirá/Cmarca
98	29/06/2011	545-9	RMI-10-0356	Hembra	>10	Zipaquirá/Cmarca
99	29/06/2011	545-10	RMI-10-0350	Hembra	>10	Zipaquirá/Cmarca
100	29/06/2011	545-11	RMI-10-0354	Hembra	>10	Zipaquirá/Cmarca
101	29/06/2011	545-12	RMI-10-0352	Hembra	>10	Zipaquirá/Cmarca
102	29/06/2011	545-13	RMI-10-0353	Hembra	>10	Zipaquirá/Cmarca
103	29/06/2011	545-14	RMI-10-0360	Hembra	>10	Zipaquirá/Cmarca
104	29/06/2011	545-15	RMI-10-0367	Hembra	>10	Zipaquirá/Cmarca

Cantidad aproximada muestra: 500 g.

J. Anexo: Muestras analizadas con Premi® Test

Caja No.	Identificación muestras músculo					Hora inoculación fluido cárnico	Hora lavado e Incubación ampollas	Resultado
1	338	326	327	356	50	11:00am a 11:20am	11:22am a 2:22pm	Negativo
2	95	82	78	98	48	11:40am a 12:00md	12:03md a 3:04pm	Negativo
3	38	55	99	20	53	12:30md a 12:50md	12:52md a 3:52pm	Negativo
4	91	90	96	75	97	1:53pm a 2:13pm	2:17pm a 5:17pm	Negativo
5	348	366	89	357	346	2:27pm a 2:47pm	2:55pm a 5:55pm	Negativo
6	Control +	70	332	347	Control -	3:03pm a 3:23pm	3:30pm a 6:30pm	Controles conformes
7	58	351	355	331	345	3:45pm a 4:05pm	4:07pm a 7:07pm	Negativo
8	370	362	73	371	364	8:42am a 9:02am	9:05am a 12:05md	Negativo
9	334	354	88	74	340	9:23am a 9:43am	9:48am a 12:48md	Negativo
10	51	69	25	87	30	10:00am a 10:20am	10:22am a 1:22pm	Negativo
11	86	343	339	93	98	10:30am a 10:50am	10:55am a 1:55pm	Negativo
12	66	92	77	32	67	11:10am a 11:30am	11:31am a 2:31pm	Negativo
13	359	369	64	329	365	11:43am a 12:03md	12:05md a 3:05pm	Negativo
14	28	34	85	61	83	12:20md a 12:40md	12:41md a 3:41pm	Negativo
15	29	31	36	62	65	1:22pm a 1:42pm	1:44pm a 4:44pm	Negativo
16	Control +	353	361	350	47	2:00pm a 2:20pm	2:25pm a 5:25pm	Controles conformes
17	76	40	368	328	341	2:32pm a 2:52pm	2:54pm a 5:54pm	Negativo
18	33	35	71	539	79	8:17am a 8:37am	8:42am a 11:42am	Negativo
19	84	342	43	344	367	8:50am a 9:10am	9:14am a 12:14md	Negativo
20	Control +	363	360	349	358	9:30am a 9:50am	9:53am a 12:53md	Controles conformes
21	352	330	46	63	335	10:00am a 10:20am	10:21am a 1:21pm	Negativo

K. Anexo: “Pruebas t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales” en el bioensayo a tejidos dosificados.

Bioensayo (cilindros) detección penicilinas en glúteo profundo derecho

Extracto			Variable 1	Variable 2
No filtrado	Filtrado	Media	10,5666667	10,4666667
11,2 mm	11,4 mm	Varianza	0,36333333	0,65333333
10,0 mm	10,0 mm	Observaciones	3	3
10,5 mm	10,0 mm	Diferencia hipotética de las medias	0	
		Grados de libertad	4	
		Estadístico t	0,1717795	
		P(T<=t) una cola	0,43597565	
		Valor crítico de t (una cola)	2,13184678	
		P(T<=t) dos colas	0,8719513	
		Valor crítico de t (dos colas)	2,77644511	

Bioensayo (cilindros) detección penicilinas en semitendinoso izquierdo

Extracto			Variable 1	Variable 2
No filtrado	Filtrado	Media	13,3666667	12,1666667
12,5 mm	11,0 mm	Varianza	0,56333333	4,08333333
13,8 mm	14,5 mm	Observaciones	3	3
13,8 mm	11,0 mm	Diferencia hipotética de las medias	0	
		Grados de libertad	3	
		Estadístico t	0,96420885	
		P(T<=t) una cola	0,20303406	
		Valor crítico de t (una cola)	2,35336343	
		P(T<=t) dos colas	0,40606812	
		Valor crítico de t (dos colas)	3,1824463	

Bioensayo (perforaciones) detección penicilinas en semitendinoso izquierdo

Extracto			Variable 1	Variable 2
No filtrado	Filtrado	Media	9,25	9,966666667
9,25 mm	10,3 mm	Varianza	0	0,083333333
9,25 mm	9,8 mm	Observaciones	3	3
9,25 mm	9,8 mm	Diferencia hipotética de las medias	0	
		Grados de libertad	2	
		Estadístico t	-4,3	
		P(T<=t) una cola	0,02502858	
		Valor crítico de t (una cola)	2,91998558	
		P(T<=t) dos colas	0,05005715	
		Valor crítico de t (dos colas)	4,30265273	

Bioensayo detección penicilinas en semitendinoso izquierdo

Instrumento			Variable 1	Variable 2
Cilindros	Perforaciones	Media	12,76666667	9,608333333
11,0 mm	10,3 mm	Varianza	2,290666667	0,187416667
14,5 mm	9,8 mm	Observaciones	6	6
11,0 mm	9,8 mm	Diferencia hipotética de las medias	0	
12,5 mm	9,25 mm	Grados de libertad	6	
13,8 mm	9,25 mm	Estadístico t	4,91445809	
13,8 mm	9,25 mm	P(T<=t) una cola	0,00133583	
		Valor crítico de t (una cola)	1,94318028	
		P(T<=t) dos colas	0,00267166	
		Valor crítico de t (dos colas)	2,44691185	

Bioensayo (perforaciones) detección estreptomycinina en semitendinoso izquierdo

Extracto			Variable 1	Variable 2
No filtrado	Filtrado	Media	11,13333333	10,4
10,9 mm	10,4 mm	Varianza	0,163333333	0,16
10,9 mm	10,0 mm	Observaciones	3	3
11,6 mm	10,8 mm	Diferencia hipotética de las medias	0	
		Grados de libertad	4	
		Estadístico t	2,23376156	
		P(T<=t) una cola	0,04461873	
		Valor crítico de t (una cola)	2,13184678	
		P(T<=t) dos colas	0,08923746	
		Valor crítico de t (dos colas)	2,77644511	

Bioensayo (cilindros) detección estreptomicina en riñón

Extracto			Variable 1	Variable 2
No filtrado	Filtrado	Media	27,4666667	27,4
27,9 mm	27,4 mm	Varianza	4,34333333	1,89327E-29
29,3 mm	27,4 mm	Observaciones	3	3
25,2 mm	27,4 mm	Diferencia hipotética de las medias	0	
		Grados de libertad	2	
		Estadístico t	0,05540613	
		P(T<=t) una cola	0,48042599	
		Valor crítico de t (una cola)	2,91998558	
		P(T<=t) dos colas	0,96085199	
		Valor crítico de t (dos colas)	4,30265273	

Bioensayo (perforaciones) detección estreptomicina en riñón

Extracto			Variable 1	Variable 2
No filtrado	Filtrado	Media	25,2	26,1
25,2 mm	26,1 mm	Varianza	0	1,89327E-29
25,2 mm	26,1 mm	Observaciones	3	3
25,2 mm	26,1 mm	Diferencia hipotética de las medias	0	
		Grados de libertad	2	
			-	
		Estadístico t	3,5826E+14	
		P(T<=t) una cola	3,8956E-30	
		Valor crítico de t (una cola)	2,91998558	
		P(T<=t) dos colas	7,7912E-30	
		Valor crítico de t (dos colas)	4,30265273	

Bioensayo detección estreptomicina en riñón

Instrumento			Variable 1	Variable 2
Cilindros	Perforaciones	Media	27,4333333	25,65
27,4	26,1	Varianza	1,73866667	0,243
27,4	26,1	Observaciones	6	6
27,4	26,1	Diferencia hipotética de las medias	0	
27,9	25,2	Grados de libertad	6	
29,3	25,2	Estadístico t	3,10307913	
25,2	25,2	P(T<=t) una cola	0,01051684	
		Valor crítico de t (una cola)	1,94318028	
		P(T<=t) dos colas	0,02103367	
		Valor crítico de t (dos colas)	2,44691185	

Bibliografía

1. Anadón A, Martínez-Larranaga M. Residues of antimicrobial drugs and feed additives in animal products: regulatory aspects. *Livestock Production Science*. 1999;59(2):183-98.
2. FAO. Proyecto TCP/RLA/2904 Fortalecimiento de la gestión de los Comités Nacionales del Codex Alimentarius en los países andinos. Informe del "Taller nacional sobre criterios del Codex para el establecimiento de límites máximos permitidos para aditivos, contaminantes y residuos de plaguicidas y medicamentos de uso veterinario en alimentos". 2004.
3. Pérez de Ciriza J, Huarte A, Saiz I, Ozcáriz M, Purroy M, editors. Residuos de sustancias inhibidoras en carnes. 3. *Anales Sis San Navarra*; 1999.
4. Gesche E, Emilfork C. Residuos de antimicrobianos en canales de vacas. *Archivos de medicina veterinaria*. 1998;30(2):137-43.
5. Stolker A, Brinkman U. Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals—a review. *Journal of Chromatography A*. 2005;1067(1):15-53.
6. Errecalde JO. Uso de antimicrobianos en animales de consumo: incidencia del desarrollo de resistencias en salud pública: FAO; 2004.
7. Popelka P, Nagy J, Germuška R, Marcinčák S, Jevinova P, De Rijk A. Comparison of various assays used for detection of beta-lactam antibiotics in poultry meat. *Food additives and contaminants*. 2005;22(6):557-62.
8. Colombia. Documento Consejo Nacional de Política Económica y Social CONPES 3376: Política sanitaria y de inocuidad para las cadenas de la carne bovina y de la leche. Bogotá 2005. p. 39.
9. Colombia. Resolución 1382 de 2013 Por la cual se establecen los límites máximos para residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal, destinados al consumo humano. Ministerio de Salud y Protección Social; 2013. p. 15.
10. Tafur M. Comunicación personal. In: Perdomo KLV, editor. Dirección Técnica de Inocuidad e Insumos Veterinarios. Instituto Colombiano Agropecuario 2010.
11. CCE. Decisión de la Comisión 2002/657/CE del 12 de agosto de 2002 Por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas* 2002. p. 8-36.
12. FSIS. Bioassay for the Detection, Identification and Quantitation of Antimicrobial Residues in Meat and Poultry Tissue MLG 34.02. United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service, Office of Public Health Science; 2007. p. 60.
13. Stead S, Sharman M, Tarbin J, Gibson E, Richmond S, Stark J, et al. Meeting maximum residue limits: an improved screening technique for the rapid detection of antimicrobial residues in animal food products. *Food additives and contaminants*. 2004;21(3):216-21.

14. Colombia. Ley 170 de 1994 Por medio de la cual se aprueba el Acuerdo por el que se establece la "Organización Munidal del Comercio (OMC)", suscrito en Marrakech (Marruecos) el 15 de abril de 1994, sus acuerdos multilaterales anexos y el Acuerdo Plurilateral anexo sobre la Carne de Bovino. 1994. p. 480.
15. OIE. <http://www.oie.int/es/para-los-periodistas/onehealth-es/> 2013 [25 de noviembre de 2013].
16. Colombia. Documento Consejo Nacional de Política Económica y Social Conpes 3375: Política nacional de sanidad agropecuaria e inocuidad de alimentos para el sistema de medidas sanitarias y fitosanitarias. Bogotá2005. p. 39.
17. Colombia. Decreto 2833 de 2006 Por el cual se crea la Comisión Intersectorial de Medidas Sanitarias y Fitosanitarias. Diario Oficial No. 46.369: Departamento Nacional de Planeación; 2006. p. 4.
18. Colombia. Documento Consejo Nacional de Política Económica y Social CONPES 3676 Consolidación de la política sanitaria y de inocuidad para las cadenas láctea y cárnica. Bogotá2010. p. 84.
19. Colombia. Decreto No. 1500 de 2007 Por el cual se establece el reglamento técnico a través del cual se crea el Sistema Oficial de Inspección, Vigilancia y Control de la Carne, Productos Cárnicos Comestibles y Derivados Cárnicos Destinados para el Consumo Humano y los requisitos sanitarios y de inocuidad que se deben cumplir en su producción primaria, beneficio, desposte, desprese, procesamiento, almacenamiento, transporte, comercialización, expendio, importación o exportación. Bogotá2007. p. 41.
20. Kennedy D, McCracken R, Cannavan A, Hewitt S. Use of liquid chromatography–mass spectrometry in the analysis of residues of antibiotics in meat and milk. *Journal of Chromatography A*. 1998;812(1):77-98.
21. Myllyniemi A-L. Development of microbiological methods for the detection and identification of antimicrobial residues in meat: Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki; 2004.
22. García L, Marín S. Ampicilina en pollos de engorde. Concentracion, en sangre, músculo y pulmón y residuos en músculo: Tesis químico farmacéutico, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 1985. 106p.
23. Mitchell J, Griffiths M, McEwen S, McNab W, Yee A. Antimicrobial drug residues in milk and meat: causes, concerns, prevalence, regulations, tests, and test performance. *Journal of Food Protection* 174;. 1998;61(6):742-56.
24. Phillips I, Casewell M, Cox T, De Groot B, Friis C, Jones R, et al. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *Journal of antimicrobial Chemotherapy*. 2004;53(1):28-52.
25. Sumano H, Ocampo L. Farmacología veterinaria. México: McGraw-Hill Interamericana; 2006.
26. Pérez JI. Ensayos de familiarización en la técnica de detección de residuos de antibióticos y sulfamidas en músculo esquelético animal por el método de las cuatro placas. 2005.
27. Ranheim B, Ween H, Egeli A, Hormazabal V, Yndestad M, Søli N. Benzathine penicillin G and procaine penicillin G in piglets: comparison of intramuscular and subcutaneous injection. *Veterinary research communications*. 2002;26(6):459-65.
28. Doyle E. Veterinary drug residues in processed meats-Potential health risk. A review of the scientific literature. *Fri Briefings, Food Research Institute, University of Wisconsin*2006.

29. Schito G. The importance of the development of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Clinical microbiology and infection*. 2006;12(s1):3-8.
30. Harold A, David A, James AS, L.B. J, Franklin L, Alice W. *El Manual Merck de Veterinaria*. 5 ed. Barcelona2000. 2558 p.
31. Berends B, Van den Bogaard A, Van Knapen F, Snijders J. Veterinary public health: Human health hazards associated with the administration of antimicrobials to slaughter animals: Part II. An assessment of the risks of resistant bacteria in pigs and pork. *Veterinary Quarterly*. 2001;23(1):10-21.
32. Marzo A, Dal Bo L. Chromatography as an analytical tool for selected antibiotic classes: a reappraisal addressed to pharmacokinetic applications. *Journal of Chromatography A*. 1998;812(1):17-34.
33. Shaikh B, Allen E. Overview of physical-chemical methods for determining aminoglycoside antibiotics in tissues and fluids of food-producing animals. *Journal-Association of Official Analytical Chemists*. 1985;68(5):1007.
34. Al-Mustafa ZH, Al-Ghamdi MS. Use of antibiotics in the poultry industry in Saudi Arabia: implications for public health. *Annals of Saudi Medicine*. 2002;22(1/2):4-7.
35. Paige J, Tollefson L, Miller M. Public health impact on drug residues in animal tissues. *Veterinary and human toxicology*. 1997;39(3):162.
36. Alimentarius C.
<http://www.codexalimentarius.net/vedrugs/data/reference/glossary.html?lang=es>
[cited 2012].
37. Gorbach S. Perturbation of intestinal microflora. *Veterinary and human toxicology*. 1993;35:15.
38. Waltner-Toews D, McEwen SA. Residues of antibacterial and antiparasitic drugs in foods of animal origin: a risk assessment. *Preventive Veterinary Medicine*. 1994;20(3):219-34.
39. Perrin-Guyomard A, Cottin S, Corpet DE, Boisseau J, Poul J-M. Evaluation of residual and therapeutic doses of tetracycline in the human-flora-associated (HFA) mice model. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2001;34(2):125-36.
40. Boisseau J. Basis for the evaluation of the microbiological risks due to veterinary drug residues in food. *Veterinary microbiology*. 1993;35(3):187-92.
41. Nord C, Edlund C. Impact of antimicrobial agents on human intestinal microflora. *Journal of chemotherapy (Florence, Italy)*. 1990;2(4):218.
42. Sullivan Å, Edlund C, Nord CE. Effect of antimicrobial agents on the ecological balance of human microflora. *The Lancet infectious diseases*. 2001;1(2):101-14.
43. Van den Bogaard AE, Stobberingh EE. Antibiotic usage in animals. *Drugs*. 1999;58(4):589-607.
44. Rollins LD, Gaines SA, Pocerull DW, Mercer HD. Animal model for determining the no-effect level of an antimicrobial drug on drug resistance in the lactose-fermenting enteric flora. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1975;7(5):661-5.
45. Mamber SW, Katz SE. Effects of antimicrobial agents fed to chickens on some gram-negative enteric bacilli. *Applied and environmental microbiology*. 1985;50(3):638-48.
46. Corpet DE. Antibiotic residues and drug resistance in human intestinal flora. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1987;31(4):587-93.

47. Meeting JFWCoFA. Residues of Some Veterinary Drugs in Animals and Foods: Monographs Prepared by the Fiftieth Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives: Rome, 17-26 February 1998: FAO; 1999.
48. Vázquez-Moreno L, Bermúdez A M, Langure A, Higuera-Ciapara I, Aguayo M, Flores E. Antibiotic Residues and Drug Resistant Bacteria in Beef, and Chicken Tissues. *Journal of Food Science*. 1990;55(3):632-4.
49. Dewdney J, Maes L, Raynaud J, Blanc F, Scheid J, Jackson T, et al. Risk assessment of antibiotic residues of β -lactams and macrolides in food products with regard to their immuno-allergic potential. *Food and chemical toxicology*. 1991;29(7):477-83.
50. Fein SB, Lin C-TJ, Levy AS. Foodborne illness: perceptions, experience, and preventive behaviors in the United States. *Journal of Food Protection*®. 1995;58(12):1405-11.
51. Kanny G, Puygrenier J, Beaudoin E, Moneret-Vautrin D. Choc anaphylactique alimentaire: implication des résidus de pénicilline. *Allergie et immunologie*. 1994;26(5):181-3.
52. Raison-Peyron N, Messaad D, Bousquet J, Demoly P. Anaphylaxis to beef in penicillin-allergic patient. *Allergy*. 2001;56(8):796-7.
53. Moats WA. The effect of processing on veterinary residues in foods. *Impact of processing on Food Safety*: Springer; 1999. p. 233-41.
54. Rose MD, Bygrave J, Farrington WH. The Effect of Cooking on Veterinary Drug Residues in Food. Part 8. Benzylpenicillin†. *Analyst*. 1997;122(10):1095-9.
55. Shakila RJ, Vyla S, Saravana Kumar R, Jeyasekaran G, Indra Jasmine G. Stability of chloramphenicol residues in shrimp subjected to heat processing treatments. *Food microbiology*. 2006;23(1):47-51.
56. Podhorniak LV, Leake S, Schenck FJ. Stability of tetracycline antibiotics in raw milk under laboratory storage conditions. *Journal of Food Protection*®. 1999;62(5):547-8.
57. Korner U, Kuhne M, Wenzel S. Tetracycline residues in meat and bone meals. Part 1: Methodology and examination of field samples. *Food Additives & Contaminants*. 2001;18(4):293-302.
58. Kühne M, Körner U, Wenzel S. Tetracycline residues in meat and bone meals. Part 2: The effect of heat treatments on bound tetracycline residues. *Food Additives & Contaminants*. 2001;18(7):593-600.
59. Smit LA, Hoogenboom LA, Berghmans MC, Haagsma N. Stability of sulphadimidine during raw fermented sausage preparation. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*. 1994;198(6):480-5.
60. Grunwald L, Petz M. Food processing effects on residues: penicillins in milk and yoghurt. *Analytica chimica acta*. 2003;483(1):73-9.
61. Gratacós Cubarsí M. Desarrollo de métodos rápidos para el análisis de residuos en producción animal. 2008.
62. Shea KM. Nontherapeutic use of antimicrobial agents in animal agriculture: implications for pediatrics. *Pediatrics*. 2004;114(3):862-8.
63. Casewell M, Friis C, Marco E, McMullin P, Phillips I. The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2003;52(2):159-61.

64. Aerts M, Hogenboom A, Brinkman U. Analytical strategies for the screening of veterinary drugs and their residues in edible products. *Journal of Chromatography B: Biomedical sciences and applications*. 1995;667(1):1-40.
65. Colombia. Decreto 1840 de 1994 Por el cual se reglamenta el Artículo 65 de la Ley 101 de 1993. 1994. p. 11.
66. Colombia. Ley 101 de 1993 Ley General de Desarrollo Agropecuario y Pesquero. Diario Oficial No. 41.1491993. p. 53.
67. Colombia. Decreto 4765 de 2008 Por el cual se modifica la estructura del Instituto Colombiano Agropecuario, ICA y se dictan otras disposiciones. 2008. p. 36.
68. Colombia. Plan de monitoreo para la vigilancia y control en el uso de medicamentos veterinarios en la producción primaria de carne bovina. Instituto Colombiano Agropecuario; 2012. p. 24.
69. Colombia. Resolución 1056 de 1996, por la cual se dictan disposiciones sobre el control técnico de los insumos pecuarios y se derogan las Resoluciones 710 de 1981, 2218 de 1980 y 444 de 1993. Bogotá: Instituto Colombiano Agropecuario; 1996.
70. Colombia. Resolución 2341 de 2007 Por la cual se reglamentan las condiciones sanitarias y de inocuidad en la producción primaria de ganado bovino y bufalino destinado al sacrificio para consumo humano. Instituto Colombiano Agropecuario; 2007. p. 19.
71. Fitzpatrick SC, Vilim A, Lambert G, Yong MS, Brynes SD. Dietary intake estimates as a means to the harmonization of maximum residue levels for veterinary drugs: II. Proposed application to the Free Trade Agreement between the United States and Canada. *Regulatory toxicology and pharmacology*. 1996;24(2):177-83.
72. Ferrini A, Mannoni V, Aureli P. Combined Plate Microbial Assay (CPMA): A 6-plate-method for simultaneous first and second level screening of antibacterial residues in meat. *Food additives and Contaminants*. 2006;23(1):16-24.
73. Pikkemaat MG. Microbial screening methods for detection of antibiotic residues in slaughter animals. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2009;395(4):893-905.
74. Anderson MdRP, Calderón V. *Microbiología alimentaria: metodología analítica para alimentos y bebidas*: Ediciones Diaz de Santos; 1999.
75. Nouws J, Ziv G. A critical evaluation of several microbiological test methods for residues of antimicrobial drugs in ruminants. *Archiv für Lebensmittelhygiene*. 1979;30.
76. Calderón V. *Control sanitario de residuos de antibióticos en carnes por métodos microbiológicos*. Madrid2000.
77. FSIS. *Bioassay for the Detection, Identification and Quantitation of Antimicrobial Residues in Meat and Poultry Tissue* MLG 34.03. 2011. p. 42.
78. NCCLS CaLSI. *Quality Control for Commercially Prepared Microbiological Culture Media; Approved Standard-Third Edition*. Wayne, Pennsylvania USA2004. p. 5.
79. Basu S, Pal A, Desai P. Quality control of culture media in a microbiology laboratory. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 2005;23(3):159.
80. Gartner L, Hiatt J. *Atlas color de histología*. 2 ed. Buenos Aires1995. 392 p.
81. México. Norma Oficial Mexicana NOM-032-ZOO-1996 Determinación de antibióticos en hígado, músculo y riñón de bovinos, ovinos, equinos, porcinos, aves,

caprinos y cérvidos por la prueba de la torunda y por bioensayo. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural; 1996. p. 14.

82. Cantwell H, O'keeffe M. Evaluation of the Premi® Test and comparison with the One-Plate Test for the detection of antimicrobials in kidney. *Food additives and contaminants*. 2006;23(2):120-5.

83. CRLs. Guidelines for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines (initial validation and transfer of method). *Community Reference Laboratories Residues*; 2010. p. 20.

84. Pikkemaat MG, Rapallini ML, Dijk SO-v, Elferink J. Comparison of three microbial screening methods for antibiotics using routine monitoring samples. *Analytica chimica acta*. 2009;637(1):298-304.

85. Pikkemaat MG, Rapallini ML, Zuidema T, Elferink JA, Oostra-van Dijk S, Driessen-van Lankveld WD. Screening methods for the detection of antibiotic residues in slaughter animals: comparison of the European Union Four-Plate Test, the Nouws Antibiotic Test and the Premi® Test (applied to muscle and kidney). *Food Additives and Contaminants*. 2011;28(1):26-34.

86. DNP DNdP. Documento Consejo Nacional de Política Económica y Social CONPES 3676 Consolidación de la política sanitaria y de inocuidad para las cadenas láctea y cárnica. 2010. p. 84.

87. Gaudin V, Hedou C, Rault A, Verdon E. Validation of a Five Plate Test, the STAR protocol, for the screening of antibiotic residues in muscle from different animal species according to European Decision 2002/657/EC. *Food Additives and Contaminants*. 2010;27(7):935-52.

88. Díez P, Medina E, Martín M, Calderón V. Validation of a five plate test for the screening of antibiotic residues in food. Estimation of the limit of detection. In: *Centro Nacional de Alimentación. Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Ministerio de Sanidad SSeI, editor. 16 ed: Revista del Comité Científico de la AESAN*; 2009.

89. AOAC. Premi Test AOAC Performance Tested Method. *Method Validation Study Report. The Netherlands*2006. p. 109.

90. Gaudin V, Juhel-Gaugain M, Morétain J-P, Sanders P. AFNOR validation of Premi® Test, a microbiological-based screening tube-test for the detection of antimicrobial residues in animal muscle tissue. *Food Additives and Contaminants*. 2008;25(12):1451-64.

91. Okerman L, Croubels S, Cherlet M, De Wasch K, De Backer P, Van Hoof J. Evaluation and establishing the performance of different screening tests for tetracycline residues in animal tissues. *Food additives and contaminants*. 2004;21(2):145-53.

92. Currie D, Lynas L, Kennedy DG, McCaughey WJ. Evaluation of a modified EC Four Plate Method to detect antimicrobial drugs. *Food Additives & Contaminants*. 1998;15(6):651-60.

93. Okerman L, Croubels S, De Baere S, Hoof JV, De Backer P, De Brabander H. Inhibition tests for detection and presumptive identification of tetracyclines, beta-lactam antibiotics and quinolones in poultry meat. *Food Additives & Contaminants*. 2001;18(5):385-93.

94. Cornet V, Govaert Y, Koenen-Dierick K, Okerman L, Degroodt J. Interlaboratory study based on a one-plate screening method for the detection of

- antibiotic residues in bovine kidney tissue. Food additives and contaminants. 2005;22(5):415-22.
95. Verdon E, Fuselier R, Hurtaud-Pessel D, Couëdor P, Cadieu N, Laurentie M. Stability of penicillin antibiotic residues in meat during storage: Ampicillin. Journal of Chromatography A. 2000;882(1):135-43.
 96. Honikel K, Schmidt U, Woltersdorf W, Leistner L. Effect of storage and processing on tetracycline residues in meat and bones. Journal-Association of Official Analytical Chemists. 1978;61(5):1222.
 97. Ramírez CE. In: Perdomo KLV, editor. Madrid-Cundinamarca: Laboratorio de residuos de medicamentos veterinarios Instituto Colombiano Agropecuario; 2013.
 98. FSIS. United States National Residue Program. 2009 residue sample results. 2011. p. 155.
 99. FSIS. United States National Residue Program for Meat, Poultry, and Egg Products. 2010 residue sample results. 2013. p. 111.
 100. FSIS. United States National Residue Program for Meat, Poultry, and Egg Products. 2011 residue sample results. 2011. p. 119.
 101. Senasa. Resultados Plan Nacional de Residuos 2009. Servicio Nacional de Salud Animal Costa Rica2009. p. 34.
 102. Senasa. Resultados Plan Nacional de Residuos 2010. Servicio Nacional de Salud Animal Costa Rica2010. p. 21.
 103. Senasa. Resultados Plan Nacional de Residuos 2011. Servicio Nacional de Salud Animal Costa Rica2011. p. 19.
 104. Senasa. Resultados Plan Nacional de Residuos 2012. Servicio Nacional de Salud Animal Costa Rica2012. p. 19.
 105. Sagarpa. Programa Nacional de Monitoreo y Control de Residuos Tóxicos y Contaminantes en Alimentos de Origen Animal Resultados del 2008. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación SAGARPA2009. p. 32.
 106. Sagarpa. Programa Nacional de Monitoreo y Control de Residuos Tóxicos y Contaminantes en Alimentos de Origen Animal 2011 y Resultados del 2010. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación SAGARPA2011. p. 29.
 107. Koenen-Dierick K, Okerman L, De Zutter L, Degroodt JM, Van Hoof J, Srebrnik S. Food Additives and Contaminants. 1995;12(null):77.
 108. EMA. Streptomycin (Extrapolation to all ruminants and rabbits) Summary report (4) EMEA/CVMP/506164/2006. In: Use CfMPfV, editor. London, UK2006. p. 6.
 109. Barry AL. Agar diffusion: general considerations: In: Barry, A.L. (ed) the antimicrobial susceptibility test: principles and practices. Philadelphia, PA, USA: Lea & Febiger; 1976. p. 163-79.
 110. Ragheb HS. Effect of volume of solution per cylinder on estimation of antibiotic potency in diffusion assay. J. Assoc. Off. Anal. Chem.; 1988. p. 1071-4.
 111. Brady MS, Katz SE. Factors influencing optimization of diffusion assay for antibiotics. J. Assoc. Off. Anal. Chem.; 1990. p. 202-5.
 112. Nouws J. Tolerances and detection of antimicrobial residues in slaughtered animals [Netherlands]. Archiv für lebensmittelhygiene. 1981;32.
 113. Engel HWB, Leusden FMv, Nouws JFM. Evaluation of the European Communities (EC) four-plate method for the detection of residues of antimicrobial drugs in slaughtered animals. Antimicrobial and Agriculture. Proceedings of 4

- International Symposium of antibiotics in agriculture: benefits and malefits. Butterworths, London, UK1983. p. 494-9.
114. Nouws JFM, Ziv G. Tissue distribution and residues of beta-lactam antibiotics in normal dairy cows. *Diergeneesk.* p. 1173-86.
115. Teske RH, Rollins LD, Carter GG. Penicillin and dihydrostreptomycin serum concentrations after administration in single and repeated doses to feeder steers. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*; 1972. p. 873-8.
116. Sande MA, Mandell GL. Antimicrobial agents: the aminoglycosides. In: Goodman, L. S. and Gilman, A. (eds.) *The pharmacological basis of therapeutics.* Macmillan, New York, USA. p. 1162-80.
117. Wilson DJ, Franti CE, Norman BB. Antibiotic and sulfonamide agents in bob veal calf muscle, liver, and kidney. *Am. J. Vet. Res.*; 1991. p. 1383-7.
118. Isoherranen N, Soback S. Chromatographic methods for analysis of aminoglycoside antibiotics. *J. AOAC.*; 1999. p. 1017-45.
119. Haasnoot W, Stouten P, Cazemier G, Lommen A, Nouws FM, Keukens HJ. Immunochemical detection of aminoglycosides in milk and kidney. *Analyst*; 1999. p. 301-5.
120. Bowen JM. The aminoglycosides: In: Steele, J. H. (ed.) *Antibiotics, sulfonamides and public health.* Boca Raton, FL, USA: CRC Press; 1979. p. 289-304.
121. peche Mdláedl. Note de service DGAL/SDRRCC/N2006-8240. Control plan for antimicrobial residues in slaughter meats, poultry, game, rabbits and breeding fish. In: *Direction générale de l'alimentation Sous-direction de la réglementation dlrelcdc*, editor. Paris2006. p. 3.