

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS E INGENIERIA
MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA SALUD**



**Identificación y cuantificación de residuos de penicilina G
en hígado de pollo de venta a granel en expendios no fijos
de la ciudad de Tijuana**

TESIS

**PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA SALUD**

PRESENTA

ETHEL COTA RUBIO

DIRECTORA DE TESIS

MSP. LILIA ANGELICA HURTADO AYALA

Tijuana, Baja California; Junio de 2013.

Universidad Autónoma de Baja California
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA
COORDINACIÓN DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

FOLIO No. 103
Tijuana, B. C., a 10 de junio de 2013

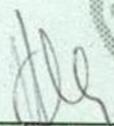
C. Ethel Cota Rubio
Pasante de: Maestro en Ciencias de la Salud
Presente

El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la
Opción TESIS

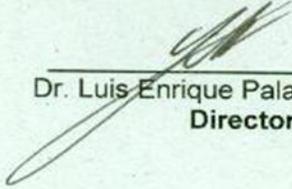
Es propuesto, por el C. MSP. Lilia Angélica Hurtado Ayala

Quien será el responsable de la calidad de trabajo que usted presente, referido al
tema Identificación y cuantificación de residuos de penicilina G en hígado de
pollo de venta a granel en expendios no fijos de la ciudad de Tijuana
el cual deberá usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

- I.- ANTECEDENTES
- II.- JUSTIFICACIÓN
- III.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA
- IV.- OBJETIVOS
- V.- METODOLOGÍA
- VI.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN
- VII.- CONCLUSIONES
- VIII.- REFERENCIAS
- IX.- BIBLIOGRAFÍA
- X.- ANEXOS


Q. Noemí Hernández Hernández
Sub-Director Secretario


MSP. Lilia Angélica Hurtado Ayala
Director de Tesis


Dr. Luis Enrique Palafox Maestre
Director

FACULTAD DE CIENCIAS
QUÍMICAS E INGENIERÍA

DEDICATORIA

A Dios, por darme la oportunidad de vivir y por estar conmigo en cada paso que doy,
por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente.

A mi esposo Josué,

Por su amor incondicional, por ser mí complemento,
por su gran apoyo y no dejarme caer en los momentos difíciles, y porque lo amo con
todo mi corazón.

A mi hija Valentina por llegar a mi vida, por ser mi luz y mi motivación para culminar
esta etapa en mi vida te amo corazoncito.

A mis padres Pedro y Ethel por haberme apoyado en todo momento, por sus
consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una
persona de bien, pero más que nada, por su amor.

AGRADECIMIENTOS

A mi Directora de tesis MSP. Lilia Angélica Hurtado Ayala por confiar en mí, por aceptarme como su alumna, deseo reconocer su trabajo y dedicación en mi tesis, así como sus sugerencias y observaciones, siempre inteligentes y oportunas. Agradezco su gran paciencia, gracias por compartir sus conocimientos y por demostrarme su amistad y cariño, siempre le estaré agradecida, porque sin su ayuda este trabajo de investigación no hubiera sido posible.

A la Dra. María Eugenia Pérez Morales por su valioso apoyo, por compartir su gran experiencia y conocimientos, gracias por sus consejos y atribuir al desarrollo exitoso de este trabajo, es un honor que forme parte de mi comité de tesis, mi más sincero agradecimiento.

A mi comité de Tesis Dr. José Ernesto Vélez y Dr. Samuel Meléndez por sus consejos y observaciones acertadas en cada evaluación, por su apoyo en la realización de este trabajo de investigación.

Al MSP. Luis Alberto Alcántara Jurado por sus consejos y enseñanza durante la maestría, por su amistad y por todo el apoyo brindado, muchas gracias.

A todos los chicos de servicio social del Laboratorio de análisis Microbiológicos en especial a Mariela, Paola, Mayra, Carmen por su gran ayuda en la realización de este trabajo.

A CONACYT por todo el apoyo económico brindado durante estos dos años.

A la Universidad Autónoma de Baja California (UABC) por adoptarme como alumna en la institución.

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a todos mis profesores de maestría, ya que de una u otra manera, me han ayudado, motivado y apoyado para concluir mis estudios.

A mis compañeros de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería que de alguna forma u otra brindaron su apoyo durante esta etapa.

A mi esposo Josué por todo su amor, su apoyo y compartir su conocimientos conmigo (estadística) gracias todos tus ánimos y gracias por ser mi compañero de vida y crecer junto conmigo.

Gracias a mis padres por todo su apoyo, por todo su amor, por creer en mi siempre. los amo.

Y por último pero no menos importante a mis hermanos Pedro y Carolina por siempre apoyarme, ser parte de ese motor que me impulsa a ser mejor cada día, gracias por ser parte de mi vida los quiero mucho.

RESUMEN

Antecedentes: El uso de fármacos en la producción animal ha sido una práctica no regularizada por lo que carece de control y supervisión, como consecuencia, favorece el uso inadecuado de medicamentos causando el desarrollo de cepas resistentes a los antimicrobianos. La utilización clínica de las penicilinas en veterinaria, especialmente penicilina G, supera los 30 años siendo esta la más usada.

Objetivo: Utilización de bioensayos para la identificación de penicilina G en hígado de pollo de venta a granel en establecimientos no fijos en la ciudad de Tijuana.

Metodología: Se tomaron muestras de hígado de pollo por triplicado de las 9 Delegaciones de la Ciudad de Tijuana con un total de 3 muestras de hígado de pollo por delegación. Las muestras se sometieron a un análisis para la búsqueda de coliformes totales, coliformes fecales, *Salmonella spp.* y *Staphylococcus aureus*. El aislamiento de microorganismos fue de acuerdo a Normas Oficiales Mexicanas. Los microorganismos aislados se sometieron a pruebas de susceptibilidad, antimicrobiana mediante el uso de multidiscos (BIO-RAD). Para la identificación y cuantificación de residuos de penicilina G, se utilizaron bioensayos mediante el Método de Difusión de las 4 Placas, con la preparación de un estándar de penicilina G que se utilizó a diferentes concentraciones para fortificar las muestras control. Se preparó una suspensión de esporas de *Bacillus subtilis* a una concentración de 10^7 esporas/ml. para la detección de residuos. Se colocaron de 3 a 6 discos de muestra problema, y un sensidisco control con antibiótico a concentración conocida, se incubaron a temperatura óptima y con la observación de halos de inhibición.

Resultados: Se detectó la presencia de *Staphylococcus aureus* en 33 % de las muestras siendo el de mayor porcentaje encontrado, *Escherichia coli* en un 27%, *Salmonella spp.* 18%, *Brucella spp.* 12% y *Pseudomonas aeruginosa* 10%. Las cepas mostraron resistencia a diferentes antibióticos, el 79% de los microorganismos Gram negativos presentaron mayor resistencia a ampicilina y a estreptomicina el 73% de los microorganismos Gram positivos siendo los de mayor porcentaje de resistencia. Se analizaron 27 muestras de las cuales 6 fueron positivas que representa un 22%, tomando como referencia que la FSIS (*Food Safety and Inspection Service*) y el USDA (*United States Department of Agriculture*) de los Estados Unidos considera una frecuencia del 4% de residuos como inaceptable.

Conclusiones: Se encontró que existe un problema de multirresistencia ya que las cepas encontradas demostraron ser resistentes a más de un antibiótico. Además las muestras positivas que se encontraron así como los obtenidos en otros estudios realizados en México hacen suponer que en nuestro medio, el envío al matadero de animales con residuos antimicrobianos es frecuente y constituye un problema que requiere atención.

Palabras clave: Residuos de antibióticos, residuos de penicilina G en animales, resistencia bacteriana, multirresistente.

ABSTRACT

Background: The use of drugs in animal production has been a not regular practice for what lacks of control and supervision, as a result, it promotes the inappropriate use of drugs causing the development of antimicrobial-resistant strains. The clinical use of penicillin in veterinary medicine, especially penicillin G, exceeds 30 years being the most used.

Objective: Use of bioassays for the identification of penicillin G in chicken liver bulk sale in non-stationary in the city of Tijuana.

Methodology: Chicken liver samples were taken in triplicate of the 9 delegations in the city of Tijuana with a total of 3 samples of chicken liver by delegation. Samples were subjected to an analysis for the search for total *coliforms*, *fecal coliforms*, *Salmonella spp.* and *Staphylococcus aureus*. The isolation of microorganisms was according to official Mexican standards. The microorganisms isolated were subjected to testing, antimicrobial susceptibility using multi-disc (BIO-RAD). Bioassays using 4 plates diffusion method were used for the identification and quantification of penicillin G residues, with the preparation of a standard of penicillin G which was used at different concentrations to fortify control samples.

We prepared a suspension of spores of *Bacillus subtilis* to a concentration of 10^7 spores/ml. for the detection of residues. We placed 3 to 6 discs of sample problem, and a known concentration sensidisc control with antibiotic, incubated at optimal temperature and observed inhibition halos.

Results: We detected the presence of *Staphylococcus aureus* in 33% of the samples being the highest percentage found, *Escherichia coli* in a 27%, *Salmonella spp.* 18%, *Brucella spp.* 12% and *Pseudomonas aeruginosa* 10%.

The strains showed resistance to different antibiotics, the 79% Gram negative microorganisms showed greater resistance to ampicillin and 73% to streptomycin of the microorganisms Gram positive with the highest percentage of resistance.

We analyzed 27 samples of which 6 were positive that it represents a 22%, with reference to the FSIS (Food Safety and Inspection Service) and USDA (United States Department of Agriculture) of the United States considers a frequency of 4% of waste as unacceptable.

Conclusions:

We found that there is a problem of multidrug resistance since the found strains proved to be resistant to more than one antibiotic. In addition, positive specimens that were found as well as those obtained in other studies carried out in Mexico make assume that in our midst, the shipping to the slaughter of animals with Antimicrobial residues is common and is a problem that requires attention.

Keywords: Antibiotic residues, residues of penicillin G in animals, bacterial multidrug resistance.

Índice

Resumen	i
Abstract	iii
Índice	v
Índice de tablas	vi
Índice de figuras	vii
Índice de graficas	viii
ANTECEDENTES	1
El pollo como Alimento	1
El uso de antibióticos en la industria agropecuaria	2
Revisión Sistemática: Estudios prospectivos sobre Resistencia antimicrobiana	6
Penicilina G en la industria veterinaria.	13
Características de los métodos de análisis de residuos de medicamentos	16
Método microbiológico de las 4 placas para la identificación de residuos de antibióticos (penicilina G).	17
JUSTIFICACIÓN	19
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
OBJETIVOS	21
Objetivo General	21
Objetivos Específicos	21
METODOLOGÍA	22
Diseño del estudio	22
Muestra	22
Variables	22
Sitio de Estudio	22
Procedimiento para la toma de las muestras.	23
Procedimiento para el análisis microbiológico de las muestras	24
Cuenta total de microorganismos.	25
Búsqueda de microorganismos patógenos.	26
Prueba de multirresistencia antimicrobiana.	29
Método de Difusión de las 4 placas para la búsqueda de residuos de penicilina G.	30
Procedimiento del método microbiológico de las 4 placas.	31
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
CONCLUSIONES	56
RECOMENDACIONES	57
REFERENCIAS	58
CIBERGRAFÍA	66
ANEXOS	67
ANEXO 1 Lista de los nombres y abreviatura de los	

	sensidiscos utilizados el análisis de susceptibilidad a los antibióticos de los microorganismos Gram positivo.	67
ANEXO 2	Lista de los nombres y abreviatura de los sensidiscos utilizados el análisis de susceptibilidad a los antibióticos de los microorganismos Gram negativos.	68
ANEXO 3	Tabla de antibióticos a los que presentan sensibilidad los microorganismos.	69
ANEXO 4	Formula del medio de cultivo utilizado para el método microbiológico de las cuatro placas	70
ANEXO 5	Formula del medio de cultivo utilizado para inoculación de <i>B. subtilis</i>	71

Índice de tablas

Tabla

1	Clasificación de los antibióticos betalactámicos.	14
2	Grupo de inhibidores detectados por el método de las 4 placas	18
3	Microorganismos presentes en muestras de hígado de pollo.	36
4	Solución patrón (estándar) de penicilina G	49
5	Residuos de penicilina G en muestras de hígado de pollo.	52

Índice de figuras

Figura		
1	Sitios de acción de los antibióticos a nivel celular	15
2	Sitios de muestreo en la ciudad de Tijuana Baja California.	23
3	Establecimiento no fijo en una de las delegaciones de la ciudad de Tijuana.	24
4	Campana de flujo laminar del laboratorio de Análisis Microbiológico de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, UABC.	24
5	Incubadora del laboratorio de del laboratorio de Análisis Microbiológico de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, UABC.	25
6	Método para la cuenta de UFC de mesófilos aerobios.	26
7	Colonia de <i>E. coli</i> en medio RVBA para aislamiento.	27
8	<i>Salmonella spp.</i> aislada de una muestra de hígado de pollo.	27
9	Prueba de coagulasa para <i>Staphylococcus aureus</i> .	28
10	Pruebas bioquímicas para la identificación de microorganismos aislados en muestras de hígado de pollo.	28
11	Prueba de susceptibilidad antimicrobiana.	30
12	Preparación del medio de cultivo agar antibiótico No. 11	31
13	Preparación de los estándares de penicilina G. Solución madre y soluciones hijas.	32
14	Obtención de sensidisco con ayuda de sacabocado.	33
15	<i>Bacillus subtilis</i> en agar TSA.	33
16	Centrifugación obtención de suspensión esporas <i>Bacillus subtilis</i> .	34
17	Preparación de medio agar antibiótico No. 11 en cajas Petri.	35
18	Discos de muestra problema en agar antibiótico No.11 con suspensión de <i>Bacillus subtilis</i> concentración conocida.	35
19	Resultados de la medición de los halos de inhibición de las muestras estándar.	50
20	Muestra 7	53
21	Muestra 8	53
22	Muestra 1	53
23	Muestra 3	53
24	Muestra 25	53

Índice de gráficas

Grafica

1	Microorganismos patógenos encontrados en las muestras de hígado de pollo.	37
2	Porcentaje de resistencia antimicrobiana de cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> aislado de muestras de hígado de pollo.	39
3	Porcentajes de tolerancia antimicrobiana que presentan cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> aislado de muestras de hígado de pollo.	41
4	Porcentaje de resistencia antimicrobiana de cepas de <i>Escherichia coli</i> aislada de muestras de hígado de pollo.	42
5	Porcentaje de tolerancia antimicrobiana de cepas de <i>Escherichia coli</i> aislado de muestras de hígado de pollo.	43
6	Porcentaje de resistencia antimicrobiana de cepas de <i>Salmonella spp.</i> aisladas de hígado de pollo.	44
7	Porcentaje de tolerancia antimicrobiana de cepas de <i>Salmonella spp.</i> aisladas de hígado de pollo.	45
8	Porcentaje de resistencia antimicrobiana de cepas de <i>Brucella ovis</i> aisladas de hígado de pollo.	46
9	Porcentaje de tolerancia antimicrobiana de cepas de <i>Brucella ovis</i> aisladas de hígado de pollo.	47
10	Porcentaje de resistencia antimicrobiana de cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aisladas de hígado de pollo.	48
11	Porcentaje de tolerancia de cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aisladas de hígado de pollo.	49

ANTECEDENTES

El pollo como Alimento

La carne de pollo es la segunda carne más producida y consumida en el mundo, después de la de cerdo. La evolución de su producción y exportación mundial ha seguido un ritmo creciente en los últimos años (USDA, 2010). La carne de pollo es un alimento de enorme importancia en la dieta de todos los pueblos del mundo, es rico en propiedades nutritivas y su precio es económico (Molero et al., 2006).

La actividad agropecuaria en México ha tenido una gran importancia durante muchos años, como parte elemental de la economía y de las actividades primarias en el campo mexicano. En particular, la actividad pecuaria en las últimas décadas se ha mantenido de una manera adecuada con un crecimiento sostenido. Sin embargo, la avicultura en el país ha tenido un repunte muy importante, al grado de desplazar a la carne de cerdo y bovino, siendo la carne de pollo la de mayor preferencia por la población consumidora de estos productos cárnicos (Quezada, 2011). A la fecha la avicultura aporta el 60% de la proteína de origen animal y una participación muy importante en el producto interno bruto total agrícola y pecuario (Chávez, 2011).

La producción de carne de pollo en México ha mantenido una tendencia constante de crecimiento, situación influida principalmente por una tendencia clara de la demanda por carne blanca, así como por su bajo precio lo cual resulta altamente competitivo con respecto a otros productos cárnicos. La importante producción de pollo en México lo ubica en el cuarto productor a nivel mundial. El consumo per-cápita de pollo en el país en el año 2011 tuvo un incremento del 62% respecto al año 1994, en 2012 el

consumo per-cápita fue de 25.70 kg con una tasa de incremento anual de 3.1% (SAGARPA, 2012).

El uso de antibióticos en la industria agropecuaria

La introducción de los agentes antimicrobianos en la medicina humana y animal ha sido uno de los logros más importantes del siglo 20 (Aarestrup et al., 2004). En la industria veterinaria los antibióticos administrados en niveles sub-terapéuticos se utilizan para la engorda de animales y para la prevención de enfermedades veterinarias (Doyle et al., 2006). En la década de los 50 los antimicrobianos se utilizaban con el fin de controlar las enfermedades en animales y humanos, sin embargo se observó que el uso de antibióticos no solo tenía efectos terapéuticos sino que también actuaban como promotores de crecimiento en animales sanos (Toro, 2011). A través del tiempo se ha ido detectando resistencia a diferentes antibióticos, en los años 60 fue resistencia a la penicilina y a partir de los 70 se ha observado multirresistencia a las ampicilinas (Mattar et al., 2009).

El uso de fármacos en la producción animal ha sido una práctica no regularizada por lo que carece de control y supervisión, como consecuencia, favorece el uso inadecuado de medicamentos causando el desarrollo de cepas resistentes a los antimicrobianos, tanto de bacterias patógenas como no patógenas. Los antibióticos como promotores de crecimiento se han empleado en dosis sub-terapéuticas durante largos períodos, sin embargo se han restringido cada vez más, ya que estos se emplean en la medicina humana con fines terapéuticos (Vázquez et al., 2012; Guerrero et al., 2009). El mecanismo por el cual los antibióticos favorecen el crecimiento no se conoce con exactitud, pero básicamente actúan modificando

cuantitativa y cualitativamente la flora microbiana intestinal, provocando una disminución de los microorganismos causantes de enfermedades sub-clínicas y actúan también reduciendo la flora normal que compite con el hospedero por los nutrientes. Todo ello conduce a una mejora en la productividad y reduce la mortalidad de los animales (Fajardo et al., 2011; Mimbrero et al., 2004).

En 1970, la Comunidad Europea eliminó como promotores de crecimiento aquellos antibióticos que también fueran utilizados en la medicina humana o animal. De este modo, se prohibió en Europa el empleo de tetraciclinas o betalactámicos como promotores del crecimiento en el alimento de animales, sin embargo, en Estados Unidos aún se emplean estos medicamentos (FAO/OMS, 2005). En México el uso de estos antibióticos está permitido, siempre y cuando se respeten los límites máximos permitidos establecidos en el Proyecto de modificación de la Norma Oficial Mexicana NOM-004-ZOO-1994.

Por otra parte según la NIDDK (*National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases*) del NIH (*National Institutes of Health of the U.S. Department of Health and Human Services*) anualmente en los Estados Unidos, 48 millones de personas se enferman por consumir alimentos contaminados con microorganismos (NIH, 2007). Entre las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), las enfermedades diarreicas han causado la muerte a más de 3 millones de personas al año, los agentes etiológicos más comunes en este tipo de infecciones son *Shigella dysenteriae*, *Campylobacter spp.*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* y *Salmonella spp.*, las cuales han demostrado adquirir resistencia a antibióticos y se sospecha que estas cepas están presentes en los animales de consumo humano (Ghering et al., 2006).

Los efectos generados por el uso inadecuado de antibióticos, son el fenómeno de multirresistencia microbiana, toxicidad aguda, carcinogenicidad, efectos reproductivos y reacciones alérgicas en individuos susceptibles, esto ha creado una gran preocupación en los organismos regulatorios, llegando a tener un control más riguroso en los fármacos empleados, en las dosis y el tiempo de aplicación. La de resistencia y multirresistencia antimicrobiana es uno de los principales problemas de salud pública que preocupan en la actualidad (Barthon et al, 2000).

A continuación se muestran una serie de revisiones sistemáticas, donde se evidencia el uso de antibióticos y la prevalencia de resistencia antimicrobiana realizados en diferentes países:

En Kansas en el 2004, Philips et al., realizaron una revisión de estudios para conocer el riesgo del uso de antibióticos en animales destinados al consumo humano. Donde se encontró el efecto de resistencia a antibióticos en especies de *Salmonella* y *Campylobacter* por el consumo de alimentos contaminados con residuos de estos. En esta revisión los autores encontraron que la tasa de enfermedades transmitidas por alimentos era mayor en países europeos en comparación con las tasas de morbilidad registrados en los Estados Unidos. La infección humana con *Salmonella* es común, la tasa de infección por esta cepa en Europa es de 54.5 casos por 100 000 habitantes en 2001, mientras que en los Estados Unidos la incidencia de infección documentada fue de 15.1/100 000 habitantes. Los principales patógenos en estos casos fueron *Salmonella enteritidis* y *Salmonella typhimurium* por lo que se consideró llevar a cabo mayor vigilancia epidemiológica del efecto de resistencia a antimicrobianos.

Sapkota et al. (2007), llevaron a cabo una revisión de estudios donde se analizó la producción animal, nutrición, prácticas biológicas, químicas y otros agentes etiológicos que se han detectado en alimentos para animales. Además, se evaluaron las prácticas de alimentación animal asociadas con riesgos para la salud humana. Los hallazgos enfatizan que las prácticas de alimentación de animales pueden dar lugar a la presencia de bacterias resistentes a antibióticos, priones, derivados de arsénico, y dioxinas en la alimentación animal. Aunque se considera un problema de salud pública, no existen métodos de evaluación completos que puedan asociar el riesgo para la salud humana por la alimentación animal. Los autores concluyen que en Estados Unidos, el uso de ingredientes de alimentos para animales, incluidos los productos reciclados de origen animal, residuos de antibióticos, metales y grasas, puede incrementar los niveles de bacterias resistentes a antibióticos en animales destinados a la alimentación de consumo humano.

En Alemania llevaron a cabo una revisión sistemática de estudios sobre la prevalencia de cepas resistentes de *E. coli* en diferentes partes del mundo. Se analizaron todos los estudios sobre la prevalencia de cepas de *E. coli* que se publicaron entre 1970 y 2006. Se encontró que son pocos los estudios epidemiológicos que han evaluado la prevalencia de la resistencia a antibióticos en poblaciones asintomáticas. La mayoría de los estudios que evaluaron la prevalencia de resistencia de *E. coli* a antibióticos se realizaron en poblaciones sintomáticas, en pacientes con infección en las vías urinarias o bacteriemia causada por *E. coli*. La prevalencia de la resistencia a ampicilina varió entre 3 y 60%, la prevalencia de la resistencia a trimetropim y cotrimoxazol osciló entre 11 y 33%, que es menor que el intervalo encontrado en los

estudios de poblaciones asintomáticas. Mientras que la prevalencia de la resistencia entre los aislados de *E. coli* a partir de pacientes hospitalizados en países de América Latina y España superó el 20%. La resistencia entre los aislados de pacientes hospitalizados con bacteriemia en Europa fue menor, con tasas de 8 y 11%. Las tasas de resistencia de estudios realizados entre 1995 y 2006 oscilaron entre 36 y 60%, con resistencia superior al 50% respecto a estudios realizados en países de América Latina y España (Erb et al., 2007).

En el Sudeste de Asia se realizó una revisión sistemática sobre la situación actual de la resistencia de *Salmonella spp.* a partir de animales destinados al consumo humano en esta región. Las cepas de *Salmonella* fueron aisladas de aves de corral y cerdos siendo resistentes a ampicilina, tetraciclina y sulfametazina y las tasas de resistencia fueron altas en países como Malasia, Tailandia y Vietnam, donde se registran tasas de 22-49%, 41-92% y 17-68% respectivamente. En países como Camboya se registraron efectos de resistencia a sulfametoxazol y ampicilina en *Salmonella enteritis* aisladas de canales de aves en un 60 y 90% respectivamente. En países como Tailandia el 100% de los aislamientos fueron resistentes a ampicilina y clortetraciclina, por lo que esta revisión da evidencia de la problemática de resistencia antimicrobiana en el Sudeste de Asia (Hao et al., 2012).

Revisión Sistemática: Estudios prospectivos sobre Resistencia antimicrobiana.

Recientemente realizamos una revisión sistemática de estudios prospectivos sobre resistencia antimicrobiana en animales de granja destinados al consumo humano, publicados en las bases de datos de MEDLINE/PubMed, SciELO, y EBSCO, de 2000

a 2012. Se encontraron 10 artículos que cumplieron los criterios de inclusión y que a continuación se describen:

1. Marinou et al. (2012), realizaron un estudio en Grecia para evaluar la resistencia de cepas de *Campylobacter spp.* en muestras de aves de corral y cerdos e informar por primera vez del aislamiento, la identificación y la resistencia de *Campylobacter spp.* a los antibióticos. Se tomaron 1080 muestras de granjas avícolas y porcinas de las cuales 980 fueron de aves y 100 muestras de cerdo. Aislándose 14 cepas de *Campylobacter coli* y dos cepas de *Campylobacter jejuni* de las muestras de aves, las cepas aisladas de cerdos resultaron negativas. Se les hicieron pruebas de susceptibilidad con diferentes antibióticos, 92.8% de las cepas de *C. coli* fueron resistentes a eritromicina y ampicilina, el 14.3% a ácido nalidíxico y gentamicina, de las cepas de *C. jejuni* solo una fue resistente a gentamicina. Es el primer estudio hecho en Grecia donde se muestra una baja prevalencia en el aislamiento de *Campylobacter spp.* En este estudio predominó la presencia de *Campylobacter coli*, y mostró una alta tasa de resistencia a los antibióticos como ampicilina y eritromicina hecho que representa la posibilidad del suministro indebido de este medicamento.
2. Mirzaagha et al. (2011), realizaron un estudio en Canadá para documentar la prevalencia de resistencia a antibióticos de *Escherichia coli* en ganado en engorda, con alimentos suplementados con antibióticos en dosis de niveles sub-terapéuticos, en dos periodos intermitentes, a lo largo de su crecimiento y en el periodo de engorde. Se analizaron 531 cepas de *E. coli* aisladas de 140

muestras de becerro. El objetivo fue describir la distribución de la resistencia antimicrobiana de cepas de *E. coli* aisladas de animales alimentados con dietas diferentes. Los antibióticos utilizados para el análisis de sensibilidad fueron del grupo de betalactámicos y aminoglucósidos, las cepas control utilizadas fueron *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Los antibióticos utilizados para el análisis fueron amikacina, ampicilina, ceftriaxona, cefalotina, cefoxitina, gentamicina, cloranfenicol, ácido nalidíxico, estreptomina, sulfametoxazol y tetraciclina a diferentes concentraciones. No hubo diferencia en los patrones de resistencia de las cepas aisladas en los grupos de bovinos con dietas suplementadas con antibióticos y sin antibióticos, además se obtuvo *E. coli* resistente a sulfametoxazol, cloranfenicol, tetraciclina y ampicilina aisladas de bovinos que fueron alimentados sin suplementos de antibióticos.

3. Camacho et al. (2010), llevaron a cabo en México un estudio para la detección de *Salmonella spp.* aislada de vísceras de pollo, así como evaluar su perfil y resistencia a 18 antibióticos diferentes. Se analizaron 82 muestras en las cuales se aislaron 152 cepas de *Salmonella spp.* Los antibióticos frente a los cuales se presentó mayor número de aislamientos resistentes fueron cefalotina (41%), amoxicilina (38%), ácido clavulánico (38%), cefoxitina (36%), y ampicilina (26%), todos ellos pertenecientes al grupo de los betalactámicos. Además fueron al grupo de los aminoglucósidos y tetraciclinas con un 15% de los aislamientos fueron resistentes a estreptomina y el 12% a tetraciclina.

4. Ibar et al. (2009), realizaron un estudio prospectivo en Argentina para determinar la prevalencia de especies de *Salmonella* en cerdos, encontrándose 13 serotipos en 93 cepas aisladas de 386 muestras de porcinos. Se evaluaron los perfiles de resistencia a 15 antibióticos diferentes, amikacina, gentamicina, ciprofloxacina, cefalotina, cefotaxima, enrofloxacin, fosfomicina, polimixina-B, tetraciclina, cloranfenicol, estreptomicina, trimetoprim-sulfametoxazol, ampicilina, nitrofurantoína y ácido nalidíxico. La mayoría de uso veterinario y el 73% de las cepas de *Salmonella* fueron resistentes a todos los antibióticos utilizados, tetraciclina en 24 cepas (25.8%), cloranfenicol en 22 (23.7%), estreptomicina en 22 (23,7%), trimetoprim-sulfametoxazol en 20 (21.5%), ampicilina en 18 (19.4%), nitrofurantoína en 3 (3.2%) y ácido nalidíxico en 3 (3.2%) lo que demuestra el riesgo que implica el fenómeno de resistencia antimicrobiana.
5. Mejía et al. (2008), en Venezuela realizaron un estudio para determinar los patrones de resistencia a los antibióticos de diferentes cepas de *Salmonella* aisladas en granjas de cerdos. Se analizaron 126 cepas de *Salmonella* de 22 granjas porcinas. Todas las cepas de *Salmonella* aisladas se analizaron mediante la técnica de Bauer-Kirby, para determinar sus patrones de sensibilidad frente a 12 antibióticos comúnmente utilizados en medicina humana y/o veterinaria, como son: ampicilina, ceftiofur, ceftriaxona, ácido nalidíxico, apramicina, sulfamida, cloranfenicol, florfenicol, tetraciclina, colistina, enrofloxacin y gentamicina. De los análisis de sensibilidad a los antibióticos se obtuvieron los siguientes resultados de resistencia: sulfamida en un 54%,

tetraciclina 40%, ácido nalidíxico 29% y ampicilina 23%. Asimismo, se detectó una sensibilidad superior al 95% para ceftriaxona, gentamicina, apramicina y colistina, sin embargo, ninguno de los antimicrobianos probados mostró una sensibilidad del 100%.

6. Hao T et al (2007), en Vietnam realizaron un estudio para examinar los niveles de contaminación por *Salmonella spp.* en muestras de alimentos crudos y evaluar sus características de resistencia hacia diferentes antibióticos. Se analizaron un total de 180 muestras, de las cuales 50 fueron de carne de res, 30 de pollo, 50 de carne de cerdo y 50 de mariscos. Se aislaron 91 cepas de *Salmonella*, el 71% de las cepas fueron aisladas de carne de res y pollo y el 18% de mariscos. Todos los aislamientos se sometieron a pruebas de susceptibilidad con varios antibióticos. El 40.7% de las cepas fueron resistentes a tetraciclina, 22.0% a ampicilina y amoxicilina, 18.7% a ácido nalidíxico, 16.5% a sulfafurazol, 14.3% a estreptomina y los antibióticos con menor porcentaje de resistencia fueron la enrofloxacina, trimetoprim, cloranfenicol, kanamicina y gentamicina con un 2.2 a 8.8% de resistencia. Alrededor de la mitad de las cepas mostraron el fenómeno de resistencia antimicrobiana debido a que por lo menos fueron resistentes a un antibiótico, también se detectó multirresistencia de las cepas de *Salmonella spp.*, ya que presentaron resistencia por lo menos a tres antibióticos. Los resultados son significativos debido a que muestran la resistencia a antibióticos de *Salmonella* aislada de alimentos crudos en Vietnam.

7. Novais et al. (2005), llevaron cabo un estudio de 1999 a 2001 en Portugal, se determinó la presencia de *Enterococcus* resistentes a diferentes antibióticos, además se analizó su diversidad clonal y la resistencia de las cepas. Se analizaron 99 muestras de aves de corral, 93 de pollo y 6 de pavo. Las muestras se sembraron en medios selectivos con y sin antibióticos. La susceptibilidad antibiótica se estableció siguiendo los criterios estándares, la identificación y detección de los genes que codifican para la resistencia se determinaron por PCR y la relación clonal por electroforesis en gel. Se encontraron 409 cepas de *Enterococcus* de las cuales el 48% fueron resistentes a vancomicina, el 34% altamente resistente a gentamicina, el 32% a estreptomicina y el 30% a kanamicina. En la mayoría de las muestras se observó resistencia a la tetraciclina, eritromicina, ciprofloxacina y quinupristina. La alta incidencia de *Enterococcus* resistentes indica la falta de control en la selección y administración del antibiótico a las aves de corral en Portugal.
8. Yang et al. (2004), realizaron un estudio en China para caracterizar cepas de *Escherichia coli* multirresistentes a los antibióticos. Estas cepas fueron aisladas de cerdos y pollos enfermos, se aislaron 160 cepas de 89 muestras de carne de cerdo y 71 muestras de pollo, se caracterizó por serotipos, genes de virulencia, la susceptibilidad antimicrobiana y los mecanismos de resistencia a las fluoroquinolonas. En las pruebas de susceptibilidad se muestra un 100% de resistencia al ácido nalidíxico, 98% a tetraciclina, 84% a sulfametoxazol, 79% a ampicilina, 77% a estreptomicina y el 76% a trimetoprim con sulfametoxazol. En las fluoroquinolonas la resistencia fue de 64% a la levofloxacina, 79% a

ciprofloxacina y 95% a la difloxacina. Estos estudios dan evidencia de que estas cepas multirresistentes de *Escherichia coli* están presentes en carne de cerdo y pollo en China.

9. Nayak et al (2004), realizaron un estudio en Estados Unidos, en el que evaluaron la diversidad molecular de 29 cepas de *Salmonella spp.* aisladas de muestras de pavo. Se realizaron pruebas de susceptibilidad con diferentes tipos de antibióticos y obtuvieron los siguientes resultados: el 100% de las cepas fueron resistentes a bacitracina, eritromicina y novobiocina, el 62% a estreptomina, el 52% gentamicina, el 48% espectinomicina, el 31% a tetraciclina, y el 3% a sulfametoxazol/trimetoprim y tobramicina. Mostrando sensibilidad a la ampicilina, ofloxacino, cloranfenicol, kanamicina, ácido nalidíxico, ciprofloxacina, polimixina-B, ceftriaxona, cefalotina y cefoxitina.
10. Fallon et al. (2003), en Irlanda realizaron un estudio para determinar la susceptibilidad a antibióticos en *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* aisladas de pollo para determinar el nivel de resistencia de las especies de *Campylobacter* en la industria avícola. Las cepas fueron aisladas en una planta de procesamiento de pollos durante un período de 10 meses y se aislaron 78 cepas de *C. jejuni* y 22 de *C. coli*. El nivel más alto de resistencia fue para *C. jejuni*, el 35.9% de las cepas aisladas presentaron resistencia a ampicilina, el 20.5 % a tetraciclina, el 20.5% a ácido nalidíxico, 17.9% de las cepas a ciprofloxacina, el 10.2 % a eritromicina, el 2.5% a estreptomina y 1.2% a kanamicina. Además *C. jejuni* presentó multirresistencia en el 30.7% de las

cepas aisladas. En cuanto a la resistencia en *C. coli* se observó en las cepas aisladas que el 9% fueron resistentes a ampicilina y el 18.2% a tetraciclina.

Penicilina G en la industria veterinaria

Los betalactámicos, que actúan inhibiendo la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana, constituyen la familia más numerosa de antimicrobianos y la más utilizada en la práctica clínica y veterinaria (Tabla 1). Se trata de compuestos de acción bactericida lenta, relativamente independiente de la concentración plasmática, que presentan escasa toxicidad y poseen un amplio margen terapéutico (Martin, 2003). El mecanismo de acción de los antibióticos betalactámicos (Figura 1) es que inhibe la síntesis de la pared celular bacteriana e inducen además un efecto autolítico. La destrucción de la pared celular bacteriana se produce como consecuencia de la inhibición de la última etapa de la síntesis del peptidoglucano. En las bacterias Gram positivas, la pared celular es gruesa y su componente principal es dicha proteína (Martin, et al 2002; Davis et al 1982). Las bacterias Gram negativas tienen una pared más fina y compleja que consta de una membrana externa formada por lípidos y proteínas y de una delgada capa interna de peptidoglucano (Vázquez et al., 2012). La penicilina es un antibiótico betalactámico bactericida de amplio espectro, que inhibe la formación de la pared bacteriana y es bactericida durante la fase de crecimiento de las mismas. La penicilina sigue siendo el antibiótico más ampliamente utilizado con fines terapéuticos generales (Martin et al, 2003).

Tabla No. 1. Clasificación de los Antibióticos Betalactámicos.

Grupo	Vía de administración	
	Parenteral	Oral
PENICILINAS		
Sensibles a las Betalactamasas		
Espectro reducido	Bencilpenicilina	Fenoxibencilpenicilina
Activas frente a enterobacterias	Ampicilina	Amoxicilina, ampicilina
Activas frente a enterobacterias y Pseudomonas	Carbencilina, ticarcilina, Mezlocilina, alcalina y piperacilina.	
Resistentes a las Betalactamasas		
Antiestafilocócicas	Meticilina, oxacilina, nafcilina,	Cloxacilina, dicloxacilina, amoxicilina
Combinadas con inhibidores de las Betalactamasas	Ticarcilina-ácido clavulánico, ampicilina-Sulbactam, piperacilina-tazobactam, Amoxicilina-ácido clavulánico.	Ácido clavulánico.
CEFALOSPORINAS		
Primera generación	Cefazolina, cefalotina, cefradina	Cefalexina, cefradina, cefadroxilo
Segunda generación		
Activas frente a Haemophilus	Cefamandol, cefuroxima, cefonicida Ceforanida	Cefaclor, axetil cefuroxima, cefprozilo
Activas frente a Bacteroides	Cefoxitina, cefotetan, cefmetazol	
Tercera generación		
Espectro ampliado	Ceftriaxona, cefotaxima, ceftizoxima	Ceftibuteno, cefdinir, cefixima, Cefpodoxima
Espectro ampliado y anti-Pseudomonas	Ceftazidima, cefoperazona, cefepima	Ninguno
CARBAPENEMICOS		
	Imipenem-cilastatina, meropenem	Ninguno
	Ertapenem	
MONOBACTÁMICOS		
	Aztreonam	Ninguno

Marín M, Francesc Gudio. Antibióticos betalactámicos., Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica 2003; 21(1):42-55.

A partir de su obtención ha sido manipulada químicamente y se han producido congéneres naturales y sintéticos. La utilización clínica de las penicilinas en veterinaria, supera los 30 años, especialmente penicilina G siendo esta la más usada. El espectro antimicrobiano de la penicilina G abarca cocos gram positivos y gram negativos y bacilos gram positivos, tanto facultativos como anaerobios, así como

espiroquetas y algunos bacilos gram negativos anaerobios (Linares et al, 1992; Vázquez et al, 2012). Desde la década de los cincuenta, la adición de antibióticos en pequeñas dosis al alimento de los animales de abasto ha sido una práctica habitual para mejorar las producciones. Las bacterias pueden desarrollar resistencia a los betalactámicos por varios mecanismos, que en ocasiones se asocian. El control genético de estos mecanismos puede ser cromosómico, plasmídico o por transposones. La resistencia cromosómica aparece por mutación, mientras que los plásmidos y los transposones pueden ser autotransferibles entre bacterias (Medina et al., 2008; Vázquez et al., 2012).

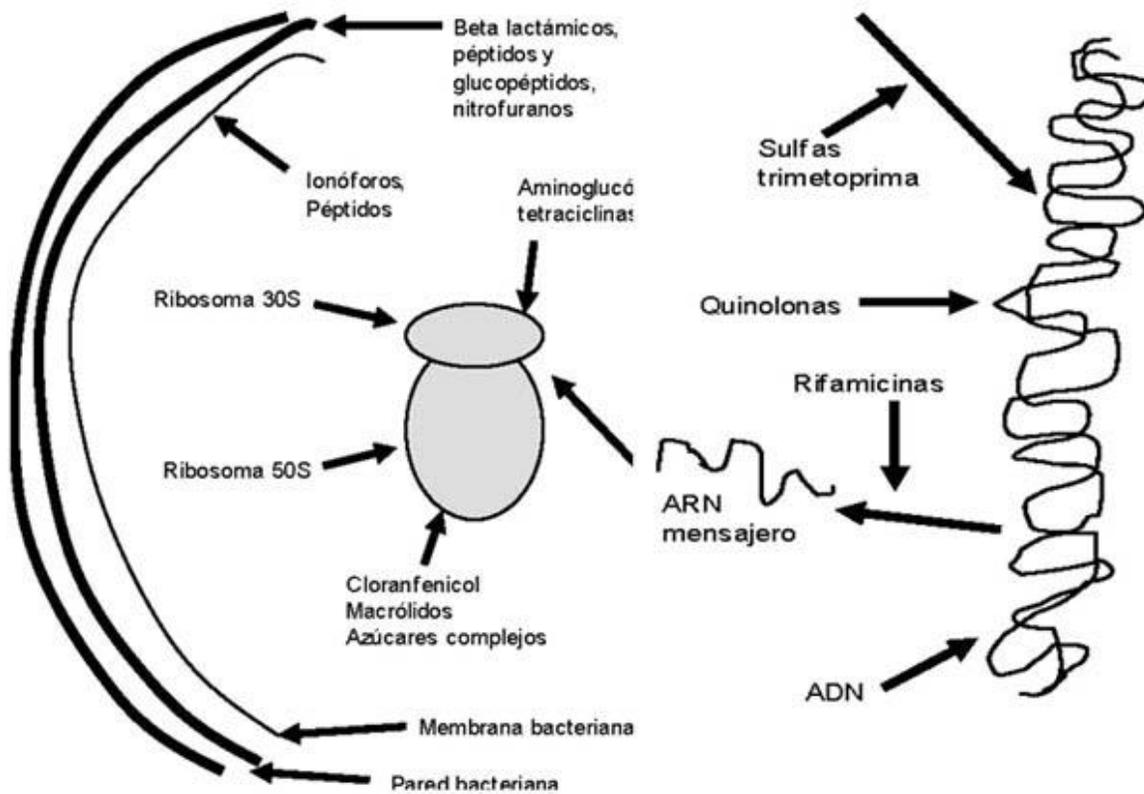


Figura 1. Sitios de acción de los antibióticos a nivel celular.

FAO. 2004 *Estudio sobre uso de antimicrobianos en animales de consumo humano.* Universidad Nacional de la plata, Argentina. Sitio web: <http://www.fao.org/docrep/007/y5468s/y5468s05.htm>

En la Unión Europea (UE) desde 1975 los betalactámicos están prohibidos como promotores del crecimiento. En los años 60 se descubren unos agentes infecciosos llamados estafilococos resistentes a penicilinas y en los años 90 aparecen cepas resistentes a las ampicilinas como los enterococos. En México redes regionales de vigilancia epidemiológica estiman que la tasa nacional de resistencia a penicilina del *Streptococcus pneumoniae* es de alrededor de 60%, cifra superior a otros países de Latinoamérica (Martin et al, 2003; Davis et al., 1982).

Características de los métodos de análisis de residuos de medicamentos Veterinarios.

Según el Codex Alimentarius: los métodos se pueden clasificar según la información y detalles analíticos facilitados con respecto a la cuantificación y al carácter del analito o analitos de interés, son de tres tipos:

Tipo I: Cuantifican el volumen de un analito específico o una clase de analitos e identifican positivamente el analito, por lo que ofrece el mayor grado de fiabilidad en lo que respecta a la cuantificación e identificación de la estructura del analito en el tipo de interés. Estos métodos pueden constituir un procedimiento único por el que se determinan tanto la concentración como la identidad del analito o ser una combinación de métodos para cuantificar y confirmar la estructura del residuo de un medicamento veterinario. Por ejemplo: Técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

Tipo II: Determinan la concentración de un analito de interés, pero no permiten una identificación inequívoca de la estructura. Estos métodos pueden emplearse también para verificar la presencia de un compuesto o clase de compuestos.

Tipo III: Proporcionan una información menos definitiva pero útil. Estos procedimientos de ensayo determinan por lo general la presencia o ausencia de un compuesto o clase de compuestos en un tipo de interés especificado. Con frecuencia se basan en técnicas no instrumentales. En esta categoría se incluyen muchos de los procedimientos microbiológicos de ensayo con placas de agar, ensayos de inhibición de enzimas y sistemas basados en la inmunología. Son útiles en los programas de control de residuos debido a su gran capacidad de muestra, su comodidad y su posible adecuación en los distintos laboratorios (*Método microbiológico de las cuatro placas*).

Método microbiológico de las 4 placas para la identificación de residuos de antibióticos (penicilina G)

Este método fue desarrollado por el equipo de trabajo de la Comisión Científica de Veterinaria de la Comisión de las Comunidades Europeas (CCE) en colaboración con expertos de nueve estados miembros de la misma comunidad, aproximadamente en el año 1980. El resultado de este equipo de trabajo fue un método microbiológico estandarizado altamente sensible. El método propuesto es un test de difusión de agar de cuatro placas (Tabla 2), en el cual se utilizan dos microorganismos de prueba, *Bacillus subtilis* ATCC 6333 o *Micrococcus luteus* ATCC 9341 (Manger et al, 2009).

Este método está basado en otros ya existentes, siendo el nuevo elemento la placa que contiene trimetoprim y *Bacillus subtilis*, con el fin de detectar los residuos de sulfamidas. Básicamente, el método de residuos de antibióticos de la CCE es una combinación del Test alemán: AH-Test, del test *Sarcina lutea* modificado a pH 8.0 y una variante del test existente para sulfonamida (Mattar et al, 2009).

El método de las cuatro placas se basa en el cultivo en agar de un microorganismo que tiene sensibilidad frente a un antimicrobiano o grupos de antimicrobianos que se encuentran como residuos en los tejidos de origen animal o en sus productos (Mattar, et al 2009; Kiling et al, 2007). Esta técnica puede ser modificada, para conseguir un amplio espectro de identificación, aumentando una placa con otro grupo de antimicrobianos para ello se realizan siembras en agares de distinta composición y pH diferentes, por ejemplo para quinolonas adicionando *Escherichia coli* como bacteria a ser inhibida y el medio nutritivo a pH 7.2, en el presente estudio se realizará la identificación para penicilina G por lo que se utilizará el microorganismo *Bacillus subtilis* a un pH de 6.0 (Kiling et al., 2007).

Tabla No. 2 Grupo de inhibidores detectados por el método de las 4 placas

Grupo de Inhibidores	Microorganismos	pH del medio (a 37° C)
Penicilinas y tetraciclinas	<i>Bacillus subtilis</i> BGA ATCC 6633	6.0
Sulfonamidas	<i>Bacillus subtilis</i> BGA ATCC 6633	7.2
Aminoglucósidos	<i>Bacillus subtilis</i> BGA ATCC 6633	8.0
Macrólidos	<i>Micrococcus luteus</i> BGA ATCC 9341	8.0

Rodríguez et al., 2010. Detección y cuantificación de residuos antimicrobianos en tejido muscular de pollo en cuatro mercados de Lima Cercado.

JUSTIFICACIÓN

El uso de antibióticos para tratamiento veterinario o promotor de crecimiento en pollo ha aumentado en los últimos años, los residuos de estas sustancias se encuentran presentes en los animales sacrificados que son tratados durante el periodo de engorda, la concentración de estos residuos farmacológicos, como son el uso de antibióticos y hormonas se encuentran en las vísceras, ya que en estos tejidos se concentran más la cantidad de estas sustancias. En Tijuana el consumo de carne de pollo se ha incrementado con el paso del tiempo, su venta se comercializa más en establecimientos no fijos, como son los denominados “mercados sobre-ruedas”. Por lo tanto, es necesario un control efectivo sobre el uso de antibióticos en animales destinados al consumo humano ya que ponen en riesgo la salud de la población exponiéndolos a contraer enfermedades. Muchas veces el problema viene desde las granjas avícolas, las cuales al igual que el establecimiento donde se comercializa el alimento, no cumplen con las normas sanitarias.

En nuestro país los trabajos al respecto de este tema están aún en un nivel inicial, por lo que es importante continuar este tipo de investigaciones, por ello el presente estudio busca de evidenciar la presencia de residuos de antimicrobianos en vísceras de pollo de consumo masivo en nuestra población. Es por todo esto, que se pretende establecer una línea de investigación aplicada en el campo de la salud en términos microbiológicos y analíticos, estableciendo una metodología para la identificación y cuantificación de antibióticos en vísceras de pollo de venta a granel en expendios no fijos de Tijuana.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El uso de antibióticos en el campo de la veterinaria ha contribuido al control y erradicación de enfermedades infecciosas de origen bacteriano en animales de producción y compañía. Así mismo, en el campo de la producción de alimentos proporciona innegables ventajas al promover el crecimiento y por tanto, mejorar la producción.

Sin embargo, dependiendo del tiempo transcurrido entre la administración de un antibiótico y el beneficio del animal o uso de sus subproductos, pueden quedar residuos de estas sustancias en los distintos tejidos utilizados como alimento o destinados a la obtención de estos. Estos compuestos o sus metabolitos son eliminados en las heces u orina de los animales tratados dispersándose en el medioambiente. Además de estas consecuencias, la presencia de residuos de antibióticos en los productos de origen animal puede conllevar a la aparición de problemas de tipo tecnológico o económico.

En el campo de la salud, estos residuos pueden provocar en el consumidor efectos adversos como: reacciones tóxico-alérgicas a los residuos, efectos crónicos tóxicos debido a la exposición prolongada a niveles bajos de antibióticos, desarrollo de resistencia antimicrobiana en bacterias patógenas, o interrupción de la microbiota normal del intestino humano.

OBJETIVOS

Objetivo General

Utilización de bioensayos para la identificación de Penicilina G en hígado de pollo de venta a granel en establecimientos no fijos en la ciudad de Tijuana.

Objetivos Específicos

- Determinar el recuento total de microorganismos presentes en el hígado de pollo de venta a granel en la ciudad de Tijuana.
- Caracterización de microorganismos patógenos aislados de las muestras de hígado de pollo, utilizando métodos normalizados.
- Demostrar el fenómeno de resistencia microbiana desarrollado por los microorganismos aislados del hígado de pollo.
- Identificar residuos de penicilina G por el método microbiológicos de las 4 placas.

METODOLOGÍA

Diseño del estudio

Experimental y transversal.

Muestra

El diseño del muestreo se basó en datos tomados de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), el cual considera un aumento significativo del consumo de pollo y su consumo *per cápita* de 58 kilos. Por esta razón se estimó conveniente realizar un muestreo no probabilístico de la población, tomando para ello 3 muestras de cada delegación obteniendo un total de 27 muestras.

Variables

Carga microbiana en la muestra.

pH del medio de cultivo .

Temperaturas de transporte, conservación e incubación de las muestras.

Procedencia de la muestra.

Sitio de Estudio

Se seleccionaron las 9 Delegaciones de la Ciudad de Tijuana: Centenario, Cerro Colorado, La Mesa, La Presa, Mesa de Otay, Playas de Tijuana, San Antonio de Los Buenos, Sánchez Taboada y Zona Centro, con un Total de 3 muestras por delegación (Figura 2).

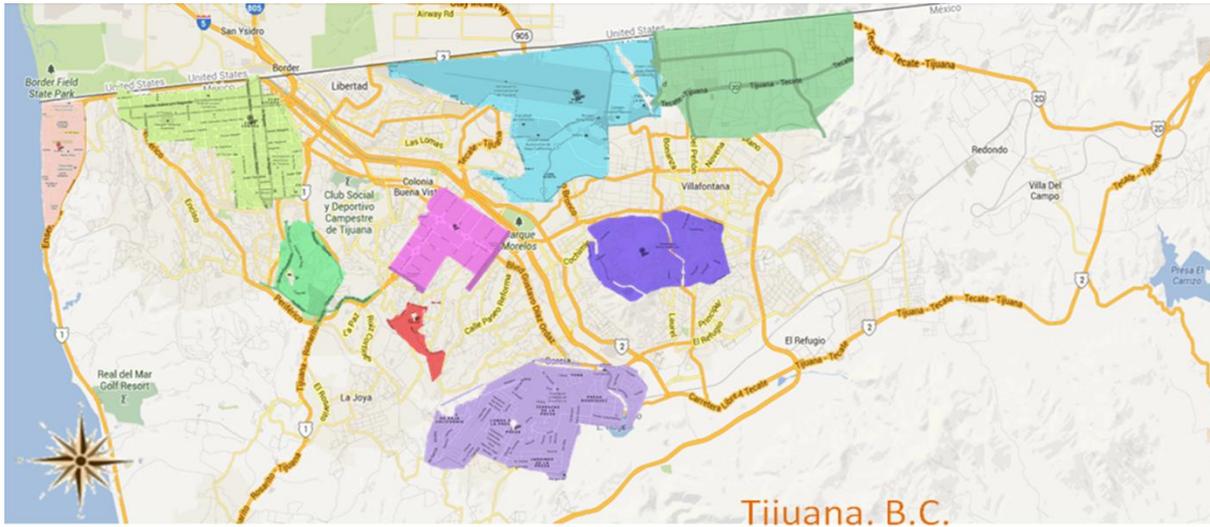


Figura No.2. Sitios de muestreo en la ciudad de Tijuana Baja California. En la Figura No 2 se señalan las 9 delegaciones:

- | | | | |
|-----------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| ● Zona 1 Playas de Tijuana | ● Zona 2 Centenario | ● Zona 3 Cerro Colorado | ● Zona 4 La Mesa |
| ● Zona 5 Mesa de Otay | ● Zona 6 San Antonio de los Buenos | ● Zona 7 Centro | ● Zona 8 La presa |
| ● Zona 9 Sánchez Taboada | | | |

Procedimiento para la toma de las muestras.

1. La toma de muestras se realizó de acuerdo al manual de toma de muestras del laboratorio de análisis microbiológico DC-N2-033, en la figura No. 3 se observa uno de los establecimientos no fijos donde se comercializa pollo a granel.
2. Para la toma de muestra, no se requirieron precauciones estrictamente asépticas.
3. Se abrió la bolsa estéril solo en el momento de depositar la muestra
4. Se etiquetó con fecha, lugar, hora de muestreo, nombre de establecimiento y número de muestra.
5. Se transportaron en hieleras a una temperatura de entre 2 y 8 °C.
6. Se conservó en congelación hasta su análisis.



Figura No.3 Establecimiento no fijo en una de las delegaciones de la ciudad de Tijuana.

Procedimiento para el análisis microbiológico de las muestras

Para el análisis microbiológico de las muestras se trabajó con todas las medidas de seguridad e higiene que marcan las normas de bioseguridad en el laboratorio de análisis microbiológico, en la figura No. 4 se observa el lugar de trabajo donde se realizaron los aislamientos y las diferentes pruebas durante el estudio.



Figura No 4.Campana de flujo laminar del laboratorio de análisis microbiológico de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, UABC.

1. Cuenta total de microorganismos

- 1.1. Las muestras se procesaron para su análisis por diluciones como lo marca la Norma Oficial Mexicana *NOM-110-SSA1-1994*, Bienes y Servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.
- 1.2. Se realizó el análisis de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana *NOM-092-SSA1-1994*, Bienes y servicios. *Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa*, inoculando 1 ml de cada dilución en agar cuenta estándar (marca DIFCO), con incubación por 24 horas a 37°C (Figura 5). Después de transcurrido este tiempo, se realizaba el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) (Figura 6).



Figura No. 5 Incubadora del laboratorio de análisis microbiológico de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, UABC.



Figura No. 6 Método para la cuenta de UFC de Mesofílicos aerobios

2. Búsqueda de microorganismos patógenos.

- 2.1.** Las muestras se sometieron a un análisis para la búsqueda de coliformes totales, coliformes fecales, *Salmonella spp.* y *Staphylococcus aureus*.
- 2.2.** El aislamiento de microorganismos fue de acuerdo a Normas Oficiales Mexicanas. Para coliformes totales y fecales se analizaron bajo la Norma Oficial mexicana *NOM-113-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa.* Utilizando Agar Rojo Violeta Bilis (RVBA) marca DIFCO, donde se inoculó 1 ml de cada dilución, con incubación por 24 horas a 37°C. Después de transcurrido este tiempo, se realizó el conteo de UFC características para coliformes y se realizó la confirmación para coliformes fecales.

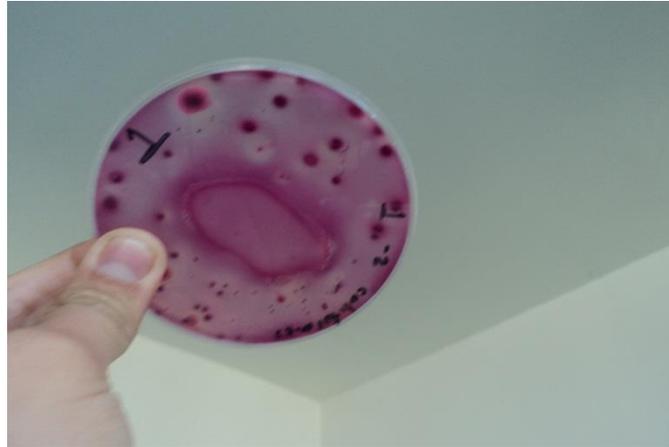


Figura No. 7 Colonia de *E. coli* en medio RVBA para aislamiento

- 2.3.** Para la determinación de *Salmonella* en alimentos utilizó Norma Oficial Mexicana *NOM-114-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para la determinación de Salmonella en alimentos*. Con pre-enriquecimiento de las muestras en Caldo selenito cistina (marca DIFCO) y su inoculación posterior en medios selectivos, las colonias sospechosas para *Salmonella*, se sometieron a pruebas metabólicas para su confirmación.



Figura No. 8. *Salmonella spp.* aislada de una muestra de hígado de pollo

2.4. El análisis para la búsqueda de *Staphylococcus aureus* se realizó bajo la Norma Oficial Mexicana *NOM-115-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Para la determinación de Staphylococcus aureus en alimentos.* En medio de cultivo Baird Parker (marca DIFCO) y pruebas confirmatorias de las UFC sospechosas, como coagulasa (Figura 9).



Figura 9 Prueba de coagulasa para *Staphylococcus aureus*

2.5. Para la identificación de los microorganismos patógenos, se realizaron diversas pruebas bioquímicas.



Figura No. 10 Pruebas bioquímicas para la identificación de microorganismos aislados en muestras de hígado de pollo.

- 2.6. Los microorganismos que no fueron identificados como Coliformes, Salmonella o *Staphylococcus aureus*, pero sospechosos como patógenos, fueron sometidos a diversas pruebas para su identificación.
- 2.7. Para la prueba presuntiva de Brucella se realizó la tinción de Gram y de acuerdo a la morfología de las colonias se realizaron pruebas específicas como es el crecimiento en presencia de colorantes como Fuscina, crecimiento en presencia de CO₂, producción de SH₂ y ureasa.
- 2.8. Para *Pseudomonas aeruginosa*, de igual manera se realizó tinción de Gram, y se empleó agar cetrimida posteriormente se realizaron pruebas de biotipo como Oxidación de la glucosa en medio OF, catalasa +, oxidasa +, producción de piocianina y fluoresceína.

3. Prueba de multirresistencia antimicrobiana.

- 3.1. Los microorganismos aislados se sometieron a pruebas de susceptibilidad antimicrobiana mediante el uso de multidiscos (BIO-RAD).
- 3.2. La capa de inóculo fue con una concentración de 1.5×10^8 UFC/ml (25% de Transmitancia) medido en Espectrofotómetro UV GENESYS 20. Se utilizaron cultivos de 24 horas para la capa de inóculo.
- 3.3. El medio de cultivo para la prueba fue Mueller Hinton, una vez depositada la capa de inóculo, se procedió a colocar los multidiscos, incubó 35°C por 24 horas para luego medir los halos de inhibición para interpretar los resultados.
- 3.4. Los halos de inhibición se midieron en milímetros (mm).



Figura No. 11 Prueba de susceptibilidad antimicrobiana.

Método de Difusión de las 4 placas para la búsqueda de residuos de penicilina G.

Se coloca en una placa petri un medio nutritivo un microorganismo sensible a los antimicrobianos, sobre este medio se coloca un trozo de muestra y la placa se incuba a la temperatura de desarrollo óptimo del microorganismo. Si la muestra contiene residuos de antimicrobianos en cantidades detectables, éstos inhiben el desarrollo de los microorganismos con lo cual se observa una zona de inhibición alrededor de la muestra. Como control, en cada placa se coloca un disco con un determinado inhibidor en una cantidad predeterminada, dependiendo de la placa; estos discos deben producir alrededor de los mismos una zona de inhibición del microorganismo. Se utilizan 4 placas con dos tipos de microorganismos (*Bacillus subtilis* y *Micrococcus luteus* se siembra en tres placas a pH diferentes), como se indica en la tabla No. 1, también se observa el grupo de inhibidores que detecta particularmente cada placa. En este ensayo como solo analizó residuos de penicilina G, se trabajó con *Bacillus subtilis*; en la figura 8 se observa el diagrama de flujo del procedimiento del método de las 4 placas.

4. Procedimiento del método microbiológico de las 4 placas.

- 4.1. Preparación de medios de cultivo agar antibiótico No.11 marca Bioxon (composición descrita en Anexo 1) ajustado a pH 6.0, como se observa en la figura No. 12



Figura. No. 12 Preparación del medio de cultivo agar antibiótico No. 11

- 4.2. Preparación de estándar de penicilina G a diferentes concentraciones. Se pesó aproximadamente $30.0 \text{ mg} \pm 0.1 \text{ mg}$ de penicilina G sódica con una potencia de 1678.2 UI/mg en un matraz volumétrico de 50 ml Aforando a 50 ml con agua destilada (solución madre). En el momento de empleo se preparó una dilución 1/1000 v/v de la solución madre realizando dos diluciones sucesivas, 1/50 v/v y 1/25 v/v (soluciones hijas). Las soluciones obtenidas a partir de la solución madre tenían concentraciones de 0.02 y 0.0008 UI de penicilina por ml.

respectivamente (Figura No. 13). La solución madre de penicilina se conservó en refrigeración (entre 2 a 8 °C) por un máximo de 2 días.



Figura No. 13. Preparación de los estándares de penicilina G. solución madre y soluciones hijas.

- 4.3.** Fortificación de las muestras: Se extrajo la muestra con ayuda de un sacabocado estéril obteniéndose una muestra de 8 mm de diámetro y 2 mm de espesor, como se observa en la figura No. 14, luego se fortificaron las muestras con las solución madre y sus respectivas diluciones de penicilina G, se utilizó para ello una jeringa de 10 μ L con el objetivo de tener una referencia del halo de inhibición.



Figura No.14. Obtención de sensidisco con ayuda de sacabocado.

- 4.4.** Preparación de la muestra: En agar tripticasa de soya (TSA) con la composición descrita en el Anexo 2, se siembra abundantemente la cepa de *Bacillus subtilis* (Figura No. 15) y se incuba por 24 horas. Después de la incubación se cosecha la biomasa con 3 ml de solución salina fisiológica estéril.



Figura 15 *Bacillus subtilis* en agar TSA

- 4.5.** Este producto se centrifuga por 5 min. a 3,000 RPM (Figura No. 16) se desecha el sobrenadante y se realiza un segundo lavado de la misma manera. Esta suspensión de esporas se ajusta a una concentración de 10^7 esporas/ml y se guarda en refrigeración pudiendo durar hasta dos semanas. La comprobación de la concentración se realiza por recuento bacteriano en placa empleando el mismo medio de cultivo mencionado.

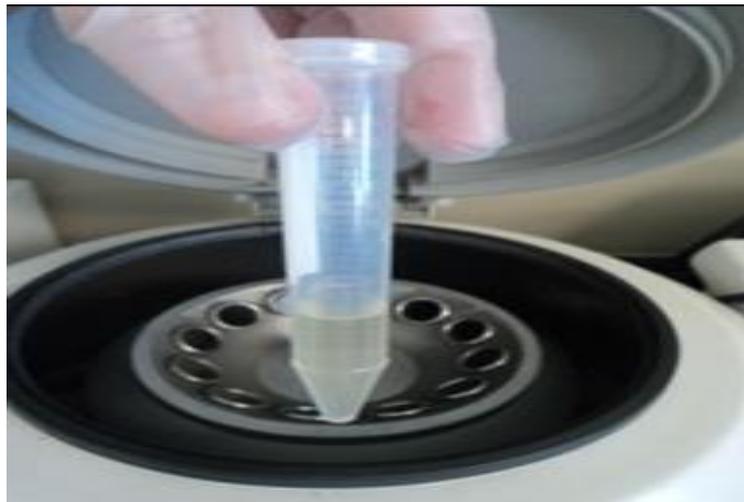


Figura No. 16. Centrifugación obtención de suspensión de esporas *Bacillus subtilis*.

- 4.6.** Detección de antibióticos. Para la detección de residuos se prepararon cajas petri con suspensión de *Bacillus subtilis* a concentración conocida en medio agar antibiótico No. 11 (Figura 17).



Figura No. 17. Preparación de medio agar antibiótico No. 11 en cajas petri.

- 4.7.** Técnica de difusión. Se colocaron de 3 a 6 discos de muestra y un disco control de un antibiótico de referencia a concentración conocida y se llevó a incubar. (Figura No. 18)

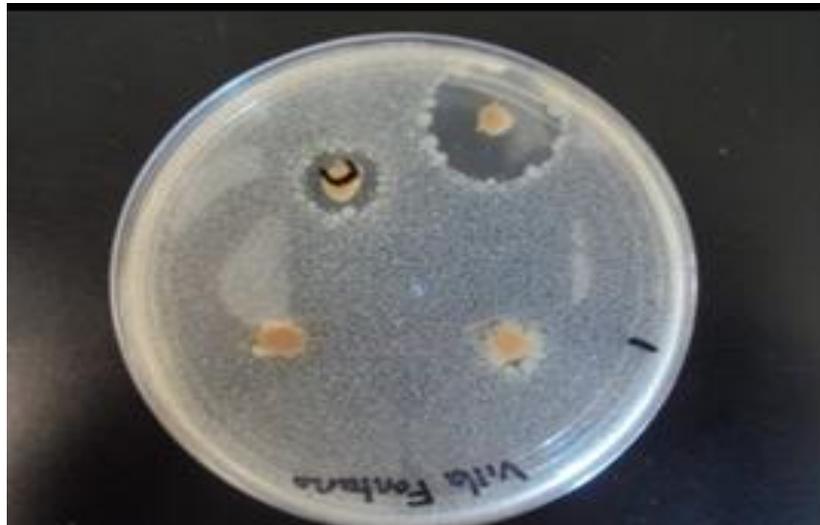


Figura No. 18. Discos de muestra problema en agar antibiótico No.11, con suspensión de *Bacillus subtilis* a concentración conocida.

- 4.8.** Terminada la incubación se procede a la observación y medición de los halos de inhibición.

RESULTADOS Y DISCUSION

Cuenta total de microorganismos

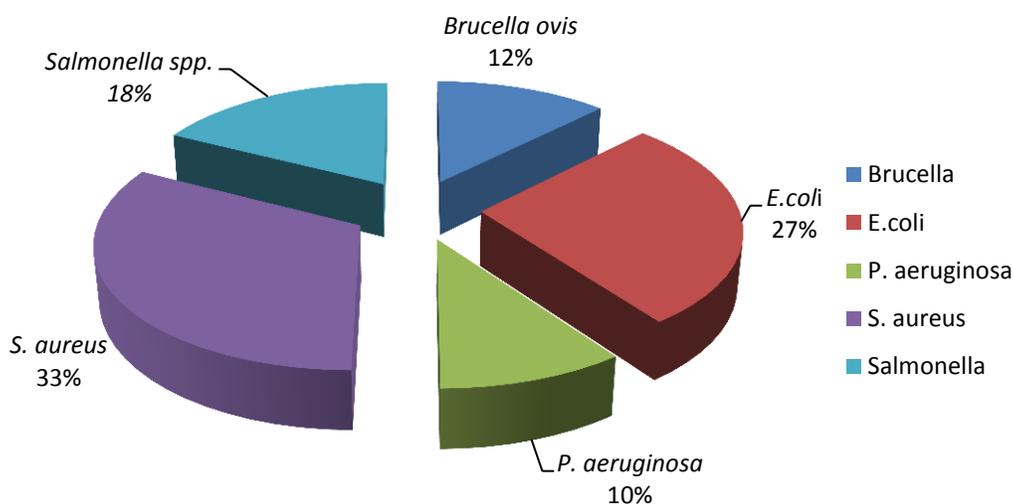
En la Tabla No. 3 se muestran los resultados obtenidos en la calidad microbiana de las vísceras de pollo de las muestras analizadas de las diferentes delegaciones de la Ciudad. No se han reportados estudios de la calidad microbiológica de las vísceras de pollo, solo en músculo. Se puede ver que las muestras de tres establecimientos analizados tanto de la Zona 1 como de la Zona 3 se observa la presencia de la mayoría de los microorganismos aislados en este estudio.

Tabla No. 3 Microorganismos presentes en muestras de hígado de pollo.

NÚMERO DE ZONA	NÚMERO DE MUESTRA	Mesofílicos aerobios	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella spp.</i>	<i>Brucella spp.</i>	<i>P. aeruginosa</i>
		UFC/gr de muestra			Ausencia/Presencia		
Zona 1	1	99,200	-	>10	Presencia	Ausencia	Presencia
	2	228,800	>100	-	Ausencia	Ausencia	Ausencia
	3	191,600	>100	-	Presencia	Ausencia	Ausencia
Zona 2	4	2,104	-	-	Ausencia	Ausencia	Presencia
	5	230,400	-	-	Ausencia	Ausencia	Ausencia
	6	130,000	-	>10	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Zona 3	7	223,500	>100	>10	Presencia	Presencia	Ausencia
	8	170,000	>100	-	Presencia	Ausencia	Ausencia
	9	2,300	>100	-	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Zona 4	10	300	-	-	Ausencia	Ausencia	Presencia
	11	205,400	>100	>10	Presencia	Ausencia	Ausencia
	12	250	-	-	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Zona 5	13	3,200	-	-	Ausencia	Ausencia	Ausencia
	14	520	-	-	Ausencia	Ausencia	Ausencia
	14	125,000	-	>10	Presencia	Ausencia	Ausencia
Zona 6	15	4,100	-	-	Ausencia	Presencia	Ausencia
	17	225	-	-	Ausencia	Ausencia	Ausencia
	18	4,170	>100	>10	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Zona 7	19	202,563	>100	>10	Presencia	Presencia	Presencia
	20	470	-	-	Ausencia	Ausencia	Ausencia
	21	140	-	-	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Zona 8	22	208,200	>100	>10	Ausencia	Presencia	Ausencia
	23	295,000	>100	>10	Presencia	Presencia	Ausencia
	24	134,000	>100	>10	Presencia	Ausencia	Ausencia
Zona 9	25	520	>100	-	Ausencia	Ausencia	Ausencia
	26	60,000	>100	>10	Ausencia	Ausencia	Ausencia
	27	7,000	-	-	Ausencia	Presencia	Ausencia

En las muestras de vísceras de pollo analizadas se aislaron diferentes microorganismos potencialmente patógenos, como *Staphylococcus aureus* que fue el microorganismo con mayor porcentaje de hallazgos, con un 33% de las muestras positivas y el único microorganismo Gram positivo, de los microorganismos Gram negativos se obtuvo *Escherichia coli* en un 27% de las muestras, *Salmonella spp.* 18%, *Brucella spp* 12% y *Pseudomonas aeruginosa* 10%. (Gráfica No. 1).

Gráfica No.1. Microorganismos patógenos encontrados en las muestras de hígado de pollo.



Resultados de Resistencia y Tolerancia antimicrobiana

En cuanto a los resultados para *Staphylococcus aureus*, coincide con los reportados por Muñoz et al. (2008), Hurtado et al. (2002) y Reddi et al. (1988), ya que este microorganismo es normalmente un indicador de contaminación cruzada, debido a la incorrecta manipulación de los alimentos, cualquier alimento que requiera una

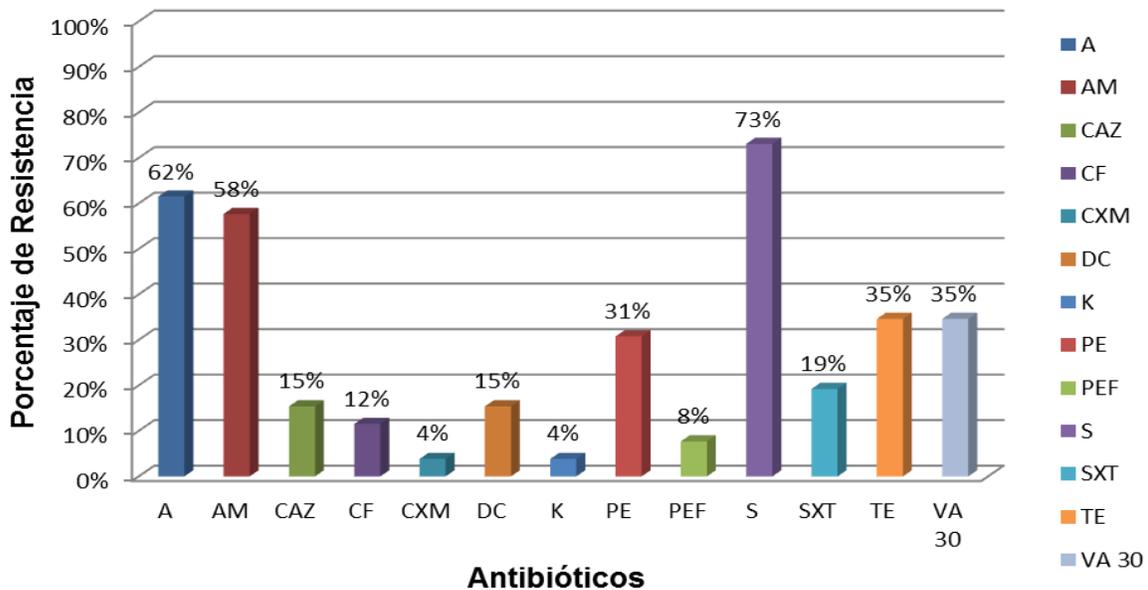
manipulación puede ser fácilmente contaminado por este microorganismo, es por ello que en este caso el hígado de pollo que se comercializa en establecimientos no fijos presentan esta contaminación. De igual manera la presencia de *Escherichia coli* en el 27% de la muestras se considera un grave problema de salud pública lo que indican autores como Michanie et al. (2003) y Marzocca et al. (2006), que coinciden con la presencia de esta bacteria en alimentos, además se demuestra que la carne es un buen reservorio de este tipo de microorganismos, la *Escherichia coli* es considerada un patógeno emergente asociado a enfermedades transmitidas por alimentos, que pueden ser severas en el hombre. Otro microorganismo patógeno encontrado fue *Salmonella spp.* con un 18% de la muestras positivas, estudios como el de Pérez et al.(1990) realizado en Guerrero comprueba la presencia de esta cepa en carnes crudas, encontrando gran positividad de muestras, al igual que en el presente estudio representa un grave problema de salud al que se tiene que prestar atención, debido a que es un patógeno del cual la normatividad nacional e internacional no permite su presencia en los alimentos ya que se considera de gran poder patógeno.

Las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana a la que fueron sometidas todas las cepas de microorganismos patógenos encontrados en las muestras de hígado de pollo, se realizaron con sensidiscos con antibióticos a concentraciones estandarizadas (Anexo 1 Y 2).

En la Gráfica No. 2 se muestra el porcentaje de cepas de *Staphylococcus aureus* que demostraron resistencia antimicrobiana, donde se observa el 73% de las cepas de *S. aureus* resistente a estreptomycin (S), así mismo se observa un 62% a clortetracilina (A), y 58% a ampicilina (AM) siendo los antibióticos a los cuales se obtuvo el mayor

porcentaje de resistencia. Esto representa un riesgo para la salud de la población ya que todas las cepas aisladas mostraron resistencia a más de un antibiótico. *Staphylococcus aureus* mostró el mayor porcentaje de resistencia a estreptomycin, resultado consistente con el estudio de Martin et al. (2002) donde aislaron este microorganismo y también obtuvieron un alto porcentaje de resistencia a este antibiótico por cepas de *S. aureus* aisladas de leche vacuna. Así mismo en el estudio de Aponte et al. (2007) muestran en sus resultados la multiresistencia de esta cepa de *S. aureus* frente a antibióticos de varios grupos como los aminoglucósidos y betalactámicos.

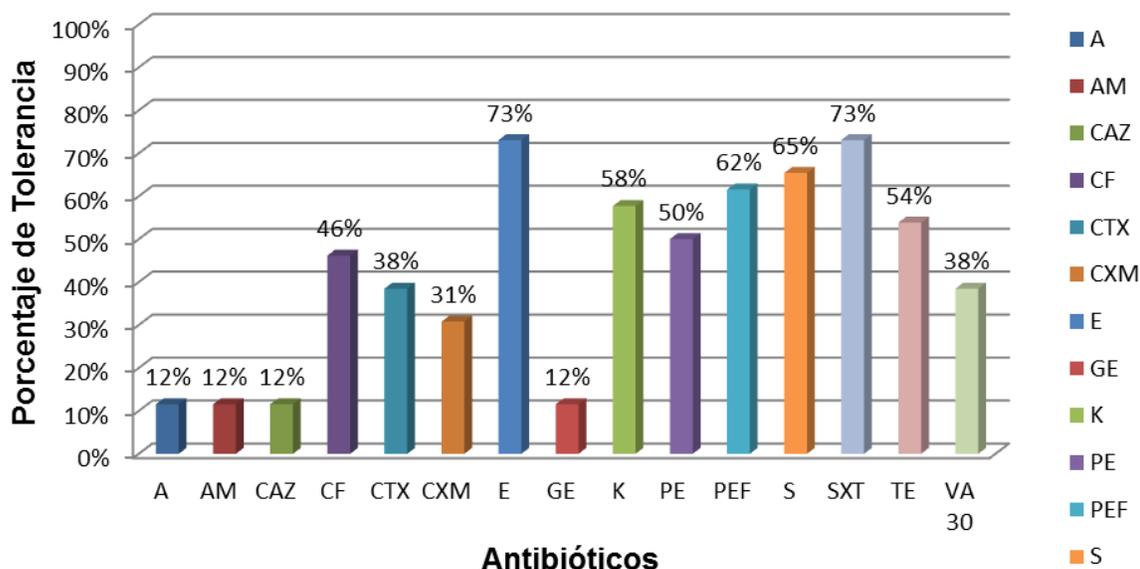
Gráfica No. 2. Porcentaje de resistencia antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus aureus* aislado de muestras de hígado de pollo.



En la gráfica No. 3 se observa el porcentaje de cepas de *Staphylococcus aureus* que mostraron tolerancia a los antibióticos, para trimetoprim con sulfametoxazol (SXT) y

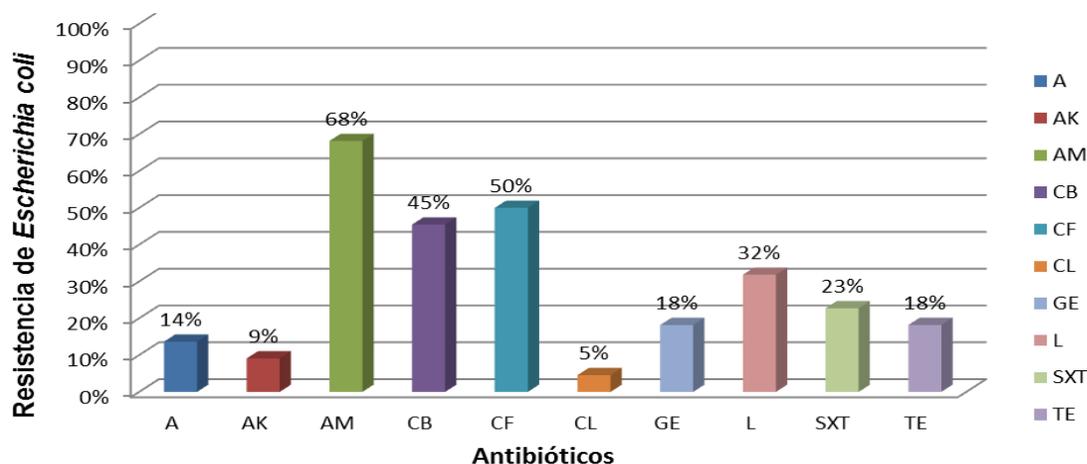
eritromicina (E) el 73 % de las cepas mostraron tolerancia, estreptomina (S) con 65% y difloxacina (PEF) con 62%. La tolerancia es la capacidad de un microorganismo de dejarse inhibir en su crecimiento, pero sin ser eliminado, algunas especies toleran ciertos antimicrobianos, las inhiben por un periodo de tiempo, pero no las eliminan (Cordies et al., 1998). En la actualidad existen escasos estudios sobre tolerancia antimicrobiana, y en México se están realizando algunos proyectos como es el caso de esta Universidad y la Universidad Autónoma de Nuevo León en esta última se hicieron estudios sobre la susceptibilidad antimicrobiana de *S. aureus* y en su análisis reportan un 12% de las cepas como tolerantes a antibióticos como la vancomicina y teicoplanina, coincidiendo con el presente estudio en el que se obtuvo un 38% de tolerancia a vancomicina (VA), aunque se observó mayor tolerancia hacia trimetoprim con sulfametoxazol (SXT), eritromicina (E), estreptomina (S) y defloxacina (PEF)

Gráfica No. 3 Porcentajes de tolerancia antimicrobiana que presentan cepas de *Staphylococcus aureus* aislado de muestras de hígado de pollo.



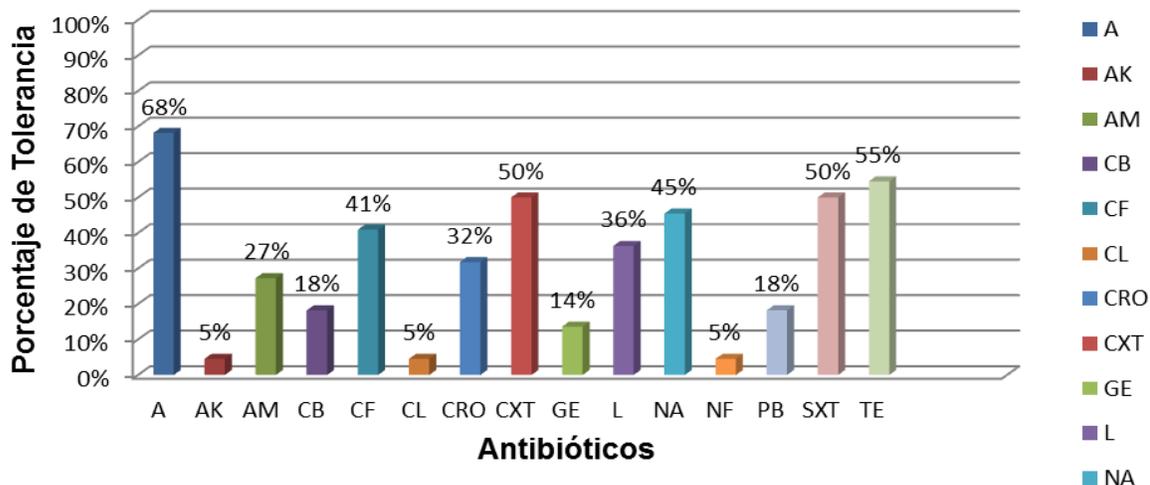
En la gráfica No. 4 se observa el porcentaje de cepas de *Escherichia coli* que mostraron resistencia a los antibióticos, se tiene el mas alto porcentaje de resistencia a ampicilina (AM) con 68%, cefalotina 50%, carbenicilina (CB) 45%, y lincomicina (L) 32%, resultados consistentes con el estudio de Hernández et al. (2000) en el cual aislaron esta cepa de aves de corral y obtuvieron resistencia antimicrobiana a estos mismos antibióticos. Asimismo, con el estudio de Moredo et al. (2007) en Argentina en el cual aislaron 69 cepas de *E. coli* donde el 69% mostró multiresistencia a algunos antibióticos entre ellos ampicilina, tetraciclina y trimetoprim con sulfametoxazol, lo que también evidencia el problema que hay en otros países con esta bacteria.

Gráfica No. 4 Porcentaje de resistencia antimicrobiana de cepas de *Escherichia coli* aislada de muestras de hígado de pollo.



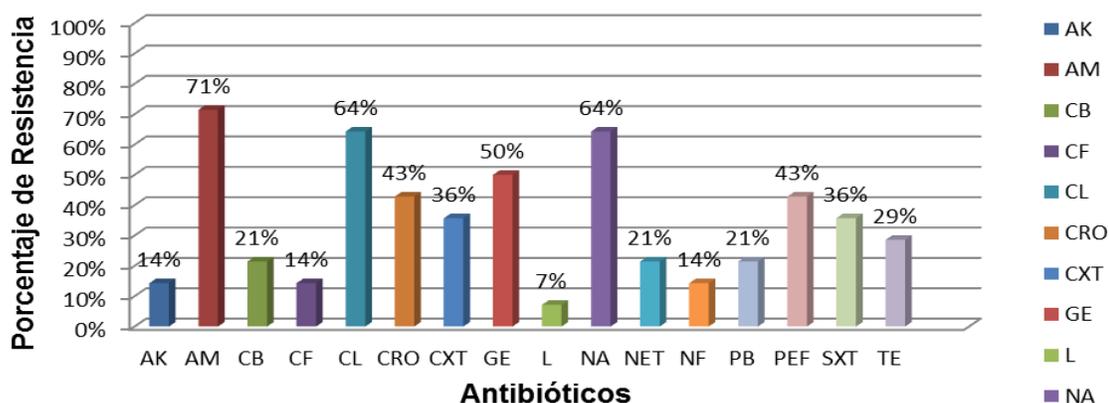
La Gráfica No.5 muestra el porcentaje de tolerancia de *Escherichia coli*, en la que se observa un 68% de tolerancia a clortetraciclina (A), un 55% a tetraciclina (TE) y 50% a trimetoprim con sulfametoxazol (SXT). No hay estudios que reporten resultados sobre tolerancia en grupos antimicrobianos en cepas aisladas de aves de *E. coli*. En los resultados obtenidos se observa que clortetraciclina fue el antibiótico al que el mayor porcentaje de cepas presentó tolerancia, este fármaco es muy utilizado en la industria veterinaria sobre todo en aves de corral, indicada para el tratamiento de bacterias Gram positivas y negativas, así mismo para mantener la ganancia de peso, es evidente que el suministro de este antibiótico no fue el correcto durante el tratamiento terapéutico y profiláctico a estos animales, al igual que el tiempo de retiro del mismo, otro factor es la combinación con otros antibióticos como penicilinas, cefalosporinas y aminoglucósidos, ya que puede contrarrestar la eficacia antibacteriana.

Gráfica No. 5 Porcentaje de tolerancia antimicrobiana de cepas de *Escherichia coli* aislado de muestras de hígado de pollo.



El comportamiento de la resistencia antimicrobiana en las cepas aisladas de *Salmonella spp.* se puede observar en la gráfica No. 6, los antibióticos a los cuales se mostró mayor resistencia fueron ampicilina con 71%, seguido de cloranfenicol, y ácido nalidíxico 64% para ambos y gentamicina 50%. En este estudio, se puede considerar que la resistencia encontrada fue alta, coincidiendo con los obtenidos en estudios realizados por Margaret et al. (1997) y Paz et al. (2001). Así mismo se observó multiresistencia en las cepas aisladas de *Salmonella spp.*, siendo estos resultados similares a los encontrados por otros investigadores, como Puig et al. (2008) y Bonachea et al. (2006), este último determinó diferentes niveles de resistencia a antibióticos como ceftriaxona, tetraciclina y ácido nalidíxico por parte de diferentes serovariedades de *Salmonella* aisladas de alimentos importados.

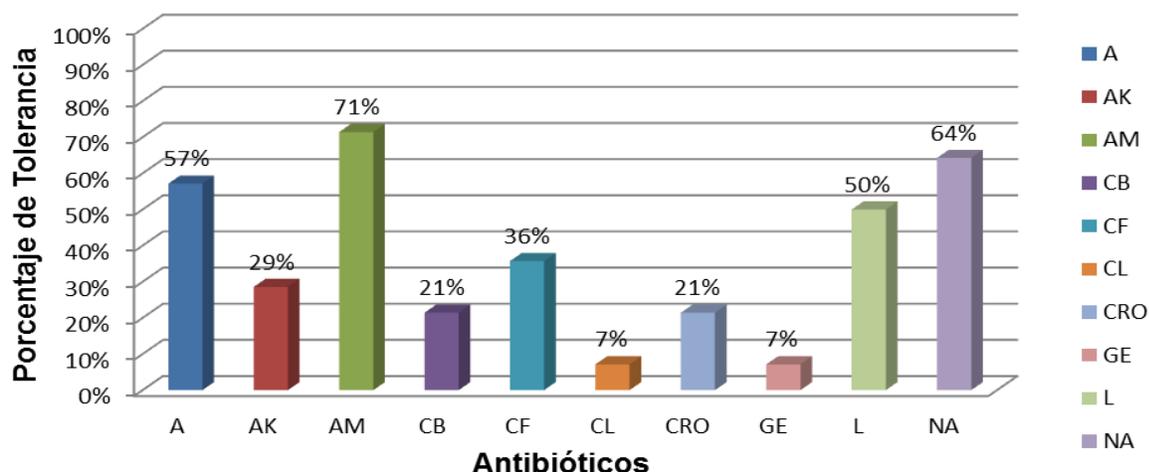
Gráfica No. 6 Porcentaje de resistencia antimicrobiana de cepas de *Salmonella spp.* aisladas de hígado de pollo.



En la gráfica No. 7 se observa el porcentaje de cepas de *Salmonella spp.* con tolerancia antimicrobiana, en donde se observa un mayor porcentaje a ampicilina (AM) 71%, ácido nalidixico (NA) 64%, clortetraciclina (A) 57% y lincomicina (L) 50%.

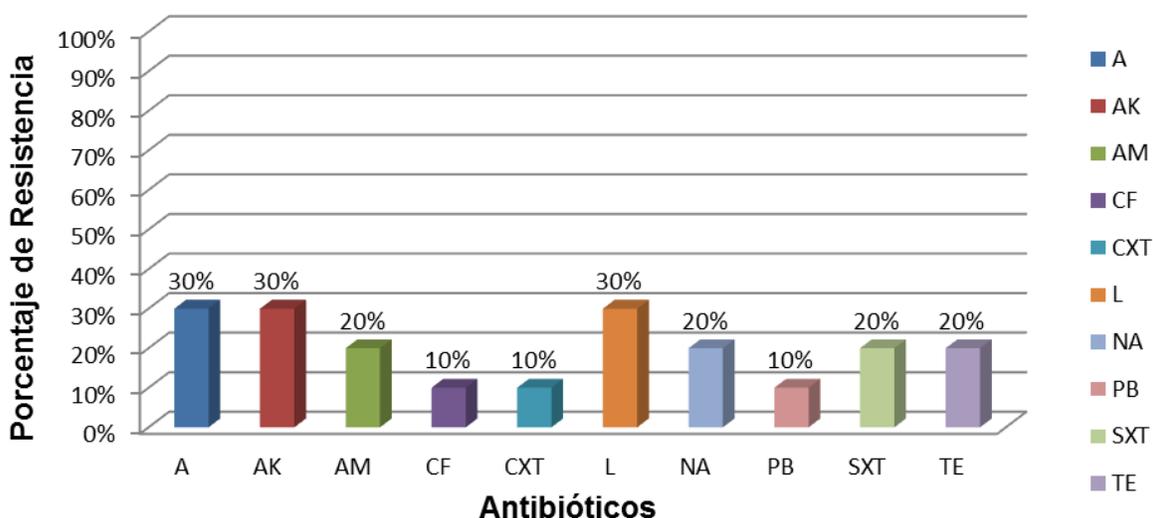
No se encontraron estudios que muestren resultados sobre tolerancia antimicrobiana de cepas de *Salmonella spp.* En el presente estudio se muestra el mayor porcentaje a ampicilina como se mencionó anteriormente, el cual es utilizado para tratamiento de enfermedades causadas por este microorganismo patógeno, otro antibiótico utilizado actualmente para tratamiento terapéutico es la ceftriaxona, donde se tuvo un 21% de tolerancia.

Gráfica No. 7 Porcentaje de tolerancia antimicrobiana de cepas de *Salmonella spp.* aisladas de hígado de pollo.



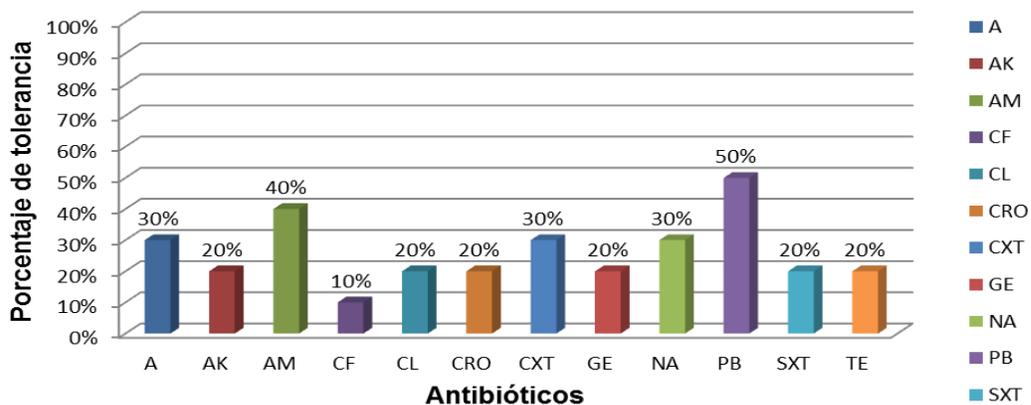
En la Gráfica 8 se observa el porcentaje de cepas de *Brucella ovis* que mostraron resistencia antimicrobiana, donde se observa que el 30 % de las cepas aisladas fueron resistentes a lincomicina(L), amikacina (AK), y clortetraciclina (A), el 20% a ampicilina (AM), ácido nalidixico (NA), trimetoprim con sulfametoxazol (SXT), tetraciclina (TE) respectivamente. *Brucella ovis* es susceptible a la mayoría de los antibióticos, como lo muestran los trabajos publicados por Young (1990) y Robertson (1999), en la mayoría se realizaron ensayos in vitro empleando diferentes métodos: las sulfonamidas, y los aminoglucósidos como la estreptomina, gentamicina, kanamicina, y amikacina. Los antibióticos betalactámicos son los menos efectivos (Young, 1990) por lo que se puede observar el problema de resistencia de esta cepa aislada en el presente estudio, debido al tratamiento equivocado de los antibióticos y la falta de observancia con las normas nacionales e internacionales sobre este tema.

Gráfica No. 8 Porcentaje de resistencia antimicrobiana de cepas de *Brucella ovis* aisladas de hígado de pollo.



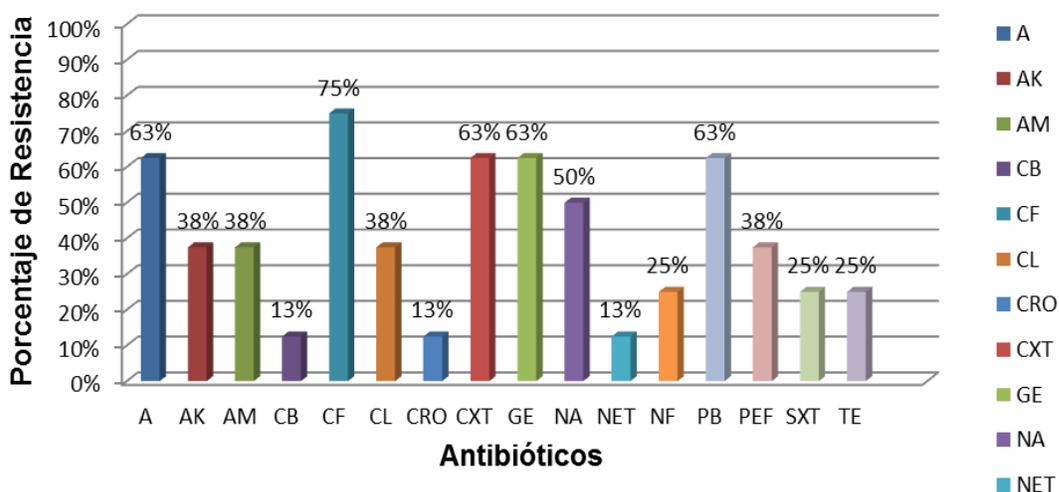
En la gráfica No. 9 se observa la tolerancia creada por *Brucella ovis* donde se muestra un 50% de tolerancia a polimixina (PB), 40% a ampicilina (AM) y 30% a clortetracilina (A). No se encontraron estudios donde se reporte tolerancia antimicrobiana de *Brucella spp.* el tratamiento antibiótico es poco practicado en veterinaria ya que el tratamiento es muy caro y a veces resulta poco efectivo, a principios de los 1950 se utilizaba aureomicina combinada con estreptomocina, era efectiva para eliminar la infección por *Brucella spp.*, actualmente se utilizan las tetraciclinas, ya que han demostrado ser igualmente efectivas para detener la eliminación de *B. ovis*. En este estudio se observa un alto porcentaje de tolerancia a varios grupos antimicrobianos, entre ellos las tetraciclinas (A, TE) y se puede evidenciar el uso inadecuado de antibióticos en el tratamiento veterinario de las aves resultando estos porcentajes de tolerancia en nuestra región; las alternativas más eficaces para controlar la infección por *Brucella spp.* es la vacunación ya que es un método más económico y práctico.

Gráfica No. 9 Porcentaje de tolerancia antimicrobiana de cepas de *Brucella ovis*, aisladas de hígado de pollo.



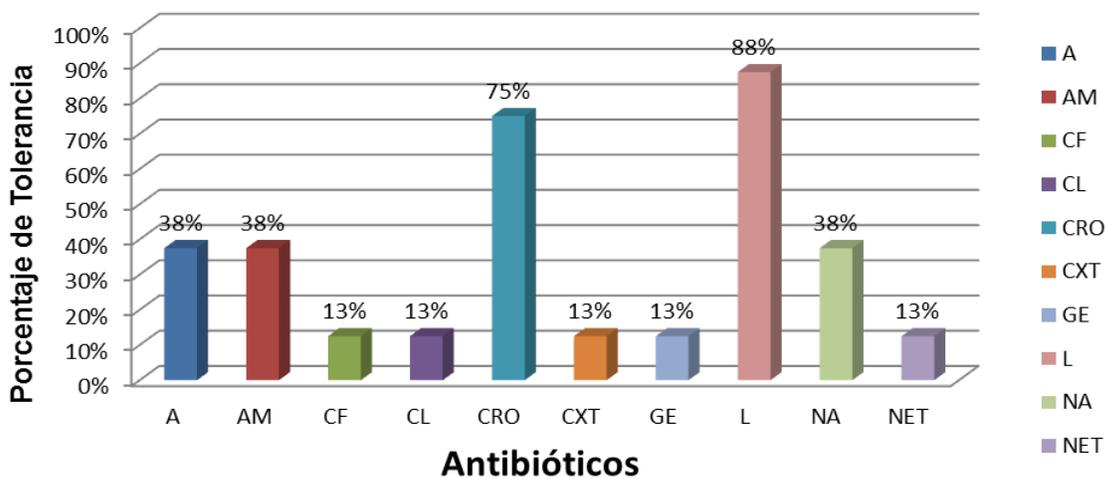
En la gráfica No. 10 se observa el porcentaje de resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* en donde se muestra el alto porcentaje de resistencia a cefalotina (CF) con un 75% de resistencia siendo este el de mayor porcentaje, seguido de y cefotaxima (CXT), gentamicina (GE), clortetracilina (A), polimixina (PB) con un 63% respectivamente, y ácido nalidíxico (NA) con un 50%. Se muestra un alto porcentaje de multirresistencia de *Pseudomonas aeruginosa* al igual que a las demás cepas analizadas en este trabajo. El estudio De Freitas et al. (2002) muestra resultados similares respecto a la resistencia a cefalosporinas, donde también destaca que estos medicamentos son empleados para tratar infecciones por esta cepa, al igual que autores como Farías et al. (1999) donde también obtuvieron resistencia de esta cepa a gentamicina, un antibiótico que ha venido desarrollando resistencia en los últimos años.

Gráfica No. 10 Porcentaje de resistencia antimicrobiana de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de hígado de pollo.



En la gráfica No. 11 se observa el porcentaje de tolerancia de *Pseudomonas aeruginosa* donde se muestra un 88% de resistencia a lincomicina (L), 75% a ceftriaxona, y un 38 % clortetracilina (A), ampicilina (AM) y ácido nalidíxico (NA) respectivamente. No se encontraron estudios que reporten tolerancia de cepas de *P. aeruginosa*, como se observa esta cepa fue tolerante a varios grupos antimicrobianos, como se mencionó anteriormente, el uso inadecuado de los antibióticos en el tratamiento profiláctico, el no respetar las dosis recomendadas, el tiempo de retiro de estos fármacos, y la combinación con otros antibióticos, resalta estos problemas de tolerancia antimicrobiana.

Gráfica No. 11 Porcentaje de Tolerancia de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de hígado de pollo.



Resultados método microbiológico de las 4 placas

En la tabla No. 4 podemos observar la lectura de los estándares donde se pudo comprobar su eficacia.

Tabla 4. Solución patrón (estándar) de penicilina G

PENICILINA G				
Concentración	S.M (1000UI/mL)	1/1000 (1UI/mL)	1/50 (0.02UI/mL)	1/25 (0.0008UI/mL)
Halos de inhibición	15 mm	10 mm	5mm	3 mm

En la figura No. 19 se observa la zona de inhibición de solución madre y de las diferentes disoluciones. En la tabla No. 5 se observa el resultado de las muestras que fueron positivas, con presencia de penicilina, se colocaron de 3 a 6 sensibilizadores y un disco control con concentración conocida, se considera positivo cuando el halo de

inhibición es ≥ 2 mm. Donde se observa que 6 muestras distribuidas en 3 delegaciones de la ciudad presentaron residuos de penicilina el cual fue comprobado por el método microbiológico de las cuatro placas, en la delegación de Cerro Colorado, en el fraccionamiento Villa Fontana, en la delegación Playas de Tijuana en el fraccionamiento del mismo nombre y en la delegación Sánchez Taboada en la colonia llamada de la misma manera. Se obtuvieron dos muestras positivas a penicilina G en cada delegación representada por los halos de inhibición frente al disco control, en las figuras 21 a 25 se puede apreciar que halo de inhibición es más grande que el estándar.



Figura No.19 Resultados de la medición de los halos de inhibición de las muestras estándar.

En los resultados del método microbiológico de las cuatro placas se analizaron 27 muestras de las cuales 6 fueron positivas que representa un 22% como se observa en la Tabla No. 5 tomando como referencia que el FSIS (*Food Safety and Inspection Service*) y el USDA (*United States Department of Agriculture*) de los Estados Unidos considera una frecuencia del 4% de residuos como inaceptable.

No hay estudios realizados sobre la identificación de residuos de penicilina G, en vísceras de pollo, por el método de las 4 placas. En el 2010 en Lima Perú, Rodríguez et al. realizaron un estudio para la detección de penicilina G en músculo de pollo, donde se obtuvieron solo 2 muestras positivas de este antibiótico de un total de 25 muestras. En México solo se encontró un estudio donde se utilizó este método microbiológico para la detección de residuos de tetraciclinas, en muestras de hueso, músculo e hígado de cerdo, resultando con mayor porcentaje de muestras positivas el hígado (Medina, 2008). En 2006 Molero et al., detectaron la presencia de residuos de enrofloxacin en tejido hepático y muscular de pollo por un método analítico (HPLC), encontrándose residuos de este fármaco a razón de 3.5 mg/kg en muslo y 3.62 mg/kg en hígado. Existen otros autores que reportan residuos de penicilina G, pero en muestras de leche, como el estudio de Guerrero et al. (2009) donde identificaron residuos de betalactámicos en leche cruda entre ellos penicilina G, encontrándose 40% de las muestras positivas de un total de 40 muestras. En los resultados obtenidos en el presente estudio podemos observar (Figura 22 y 23) que el uso de penicilinas en la industria avícola es evidente, ya que el halo de inhibición de la muestra problema es mayor que la concentración del disco control. Observándose que la mayor frecuencia y porcentajes más altos de muestras positivas para residuos de antimicrobianos, corresponden a muestras de vísceras, en este caso el hígado de pollo, en el cual se metabolizan la mayoría de las sustancias tóxicas, es de esperar concentraciones altas de estos fármacos, lo que hace suponer que es frecuente el envío de animales al matadero sin respetar los tiempos de espera para la eliminación de los medicamentos. El consumo de vísceras representa una opción nutricional más

barata que las porciones musculares, sin embargo, su consumo puede implicar una exposición frecuente a niveles de residuos por arriba de los límites máximos permitidos. La concentración de un antibiótico expresada en una zona de inhibición de los discos de muestra, no puede ser calculada con precisión. Por tanto el resultado positivo obtenido con los métodos de inhibición debería ser confirmada con un posterior método analítico.

Tabla No. 5 Residuos de Penicilina G en muestras de hígado de pollo.

NÚMERO DE ZONA	NÚMERO DE MUESTRA	RESULTADO	PROMEDIO DEL DIAMETRO DEL HALO DE INHIBICIÓN (mm)
Zona 1	1	Positivo	8
	2	Negativo	-
	3	Positivo	7
Zona 2	4	Negativo	-
	5	Negativo	-
	6	Negativo	-
Zona 3	7	Positivo	8
	8	Positivo	5
	9	Negativo	-
Zona 4	10	Negativo	-
	11	Negativo	-
	12	Negativo	-
Zona 5	13	Negativo	-
	14	Negativo	-
	14	Negativo	-
Zona 6	15	Negativo	-
	17	Negativo	-
	18	Negativo	-
Zona 7	19	Negativo	-
	20	Negativo	-
	21	Negativo	-
Zona 8	22	Negativo	-
	23	Negativo	-
	24	Negativo	-
Zona 9	25	Positivo	4
	26	Negativo	-
	27	Positivo	6

Las Zonas por delegación se describen en la Figura No. 2.

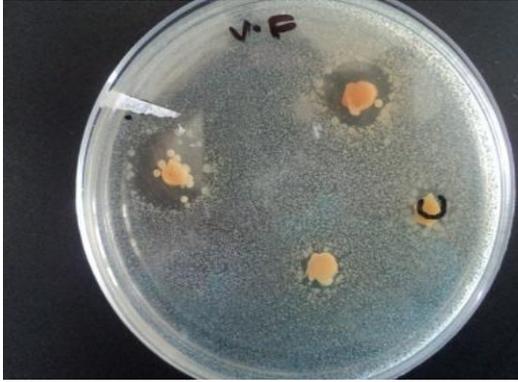


Figura 20. Muestra 7

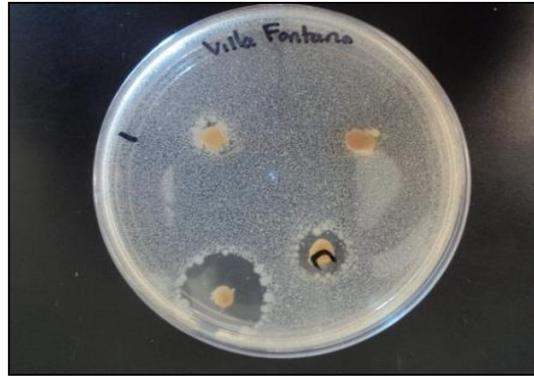


Figura 21. Muestra 8

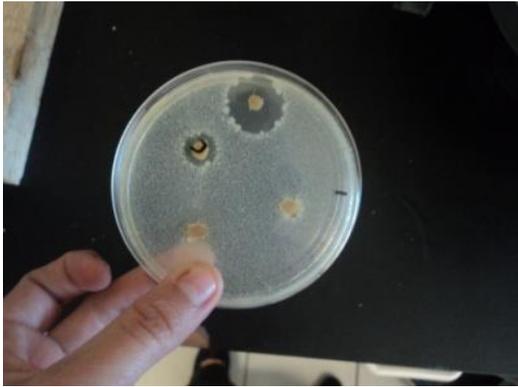


Figura 22. Muestra 1

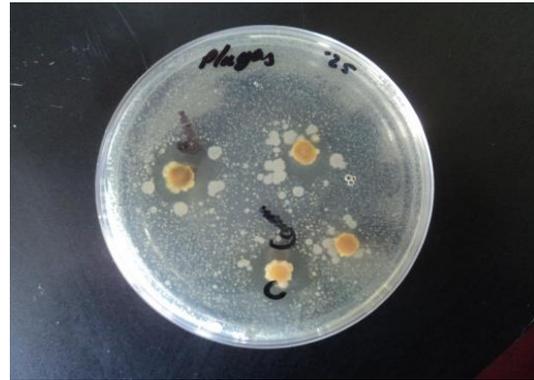


Figura 23. Muestra 3



Figura 24. Muestra 25

CONCLUSIONES

- Se encontró *S. aureus* en 33% de las muestras siendo el de mayor porcentaje, *Escherichia coli* en un 27%, *Salmonella spp.* 18%, *Brucella* 12% y *Pseudomonas aeruginosa* 10%.
- Se demostró el fenómeno de resistencia microbiana ya que todas las cepas aisladas mostraron resistencia a más de un antibiótico lo que se puede considerar como una multirresistencia.
- Se puede observar que el antibiótico con más frecuencia de porcentaje alto de resistencia y tolerancia fue clortetracilina (A).
- Se comprobó la presencia de residuos de penicilina G en hígado de pollo por medio del método microbiológico de difusión de las cuatro placas encontrándose un 22% de muestras positivas (6 muestras positivas).
- Las muestras analizadas de la Zona 1 y Zona 3, fueron las muestras con menor calidad microbiana, en la evaluación presentaron la mayor cantidad de microorganismos patógenos. También estas dos zonas (Delegación Playas de Tijuana y Cerro Colorado) coinciden con la presencia de residuos de penicilina G.
- Los porcentajes de positividad encontrados así como los obtenidos en otros estudios realizados en México hacen suponer que en nuestro medio, el envío al matadero de animales con residuos antimicrobianos es frecuente y constituye un problema que requiere atención.
- El inadecuado uso de los antibióticos en la producción pecuaria es una problemática a nivel mundial, que trae como consecuencia una serie de

problemas que afectan directamente la salud humana, a este problema se debe dar una solución pronta y bien estructurada que mitigue los problemas ya mencionados.

- Finalmente se comprueba que el tiempo de espera para la eliminación de antimicrobianos no se cumple en las avícolas que proveen pollo en la región de Tijuana.

RECOMENDACIONES

- El estudio de residuos antimicrobianos en carnes de consumo masivo debe realizarse utilizando métodos recomendados por libros oficiales como el *Codex alimentarius*, el cual cuenta con una relación de métodos validados para este tipo de análisis.
- En análisis futuros de residuos antimicrobianos es necesario tener en cuenta los tratamientos térmicos a los que son sometidos las carnes antes de ser consumidas para saber si dichos residuos sufren algún cambio en su estructura y concentración.
- Conociendo que en México las costumbres alimenticias permiten aprovechar no solo la masa muscular del pollo, sino también las vísceras como lo es hígado, sería recomendable continuar realizando estudios de detección de residuos en este órgano.
- Es necesario que los médicos veterinarios y empresas privadas mejoren las medidas de bioseguridad en las diferentes avícolas, prestando especial énfasis al uso adecuado de los antimicrobianos y al cumplimiento de los tiempos de espera.

REFERENCIAS

1. Aarestrup F. Veterinary Drug Usage and Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin. *Pharmacology and Toxicology*. 2004. 96:271-281
2. Allara M, Izquierdo P, Torres G. Penicilina G en leche Pasteurizada producida en el estado de Zulia, Venezuela. *Revista Científica*. 2002; 12(6):683-687.
3. Aponte F. Perfil de resistencia in vitro a antimicrobianos de cepas causantes de mastitis aisladas de leche cruda bovina en establecimientos de pequeña y mediana producción. *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud*. 2007;5(1), 19-25.
4. Barthon M. Antibiotic use in animal feed and its impact on human health. *Nutrition research reviews*. 2000; 13: 279-299.
5. Bonachea M. Determinación de la sensibilidad a antimicrobianos en cepas de *Salmonella enterica* sub especie enterica, aisladas en alimentos. VI Congreso Internacional de Ciencias Veterinarias y V Seminario Internacional de Salud Animal. Ciudad Habana. 2006.
6. Camacho O, Acedo L, Moreno G, Sánchez R, Castellón L, Navarro M. Detección de Salmonella resistente a los antibióticos en vísceras de pollo. *Biotecnia*. 2010;12(1).
7. Chávez G.S. La avicultura mexicana actual. *Tecnología avipecuaria en Latinoamérica*. 2011;14(159):3-9
8. Cordies J, Machado L. Principios generales de la terapéutica antimicrobiana. *Acta médica*.1998;8(1):13-27.
9. Davis BD. Bactericidal synergism between beta-lactams aminoglycosides: Mechanisms and possible therapeutic implications. *Rev Infect Dis*. 1982; 4:23745.

10. De Freitas A, Barth A. Antibiotic resistance and molecular typing of *Pseudomonas aeruginosa*: focus on imipenem. *Braz J Infect Dis.* 2002;6:1-7
11. Erb A, Sturner R, Marre H. Prevalence of antibiotic resistance in *Escherichia coli*: overview of geographical, temporal, and methodological variation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2007; 26: 83-90
12. Fajardo A, Méndez F, Molina L. Residuos de fármacos anabolizantes en carnes destinadas al consumo humano: Revisión. *Universitas Scientiarum.* 2011; 16(1):77-91.
13. Fallon R, Osullivan N, Maher M, Carrol C. Antimicrobial resistance of *Campylobacter Jejuni* and *Campylobacter coli*, isolates from broiler chicken isolated at an Irish poultry processing plant. *Letters in Applied Microbiology.* 2003; 36:227-281.
14. FAO/OMS. Conferencia Regional sobre Inocuidad de los Alimentos para las Américas y el Caribe San José, Costa Rica. La necesidad de fortalecer los programas nacionales de monitoreo del uso de los antimicrobianos en medicina veterinaria en la región. 2005; 6(9).
15. Farías R, Rivero R, Gallegos B. Resistencia a los antimicrobianos y concentración inhibitoria mínima (CIM) de BGNNFG aislados de leche cruda (II). *Revista Científica.* 1999;9(1).
16. Gehring R, Baynes R, Riviere J. Application of risk assessment and management principles to the extra label use of drugs in food-producing animals. *Journal Veterinary Pharmacology Therap.* 2006; 29:5–14.

17. Giamarellou H. Prescribing guidelines for severe *Pseudomonas* infections. *J Antimicrob Chemother.* 2002; 49:229-33.
18. Greig J, Waddell L, Wilhelm B, Wilkins W, Bucher O, Parker S, Racijs A. The efficacy of interventions applied primary processing on contamination of beef carcasses with *Escherichia coli*: A systematic review – meta-analysis of the published research. *Food Control.* 2012; 2(2): 385-397.
19. Guerrero D, Motta R. Detección de residuos de antibióticos betalactámicos y tetraciclinas de leche cruda comercializada en el Callao. *Ciencias e Investigación.* 2009; 12:79-82.
20. Hammerum A, Heuer O. Human health hazards from antimicrobial resistant *Escherichia coli* of animal origin. *Oxford Journals.* 2009; 48(1):916-921.
21. Hao T, Hoang K, Smooker P, Coloe P. The antibiotic resistance characteristics of non-typhoidal *Salmonella enterica* isolated from food-producing animals, retail meat and humans in South East Asia. *International Journal of Food Microbiology.* 2012; 154, (4): 90-106.
22. Hao T, Moutafis G, Istivar T, Thuoc L, Coloe P. Detection of *Salmonella spp.* in retail raw food samples from Vietnam a characterization of their antibiotic resistance. *Applied and Environmental Microbiology.* 2007; 73(21): 6885-6890.
23. Hernández J, Pascual A, Cantón R, Martínez L. *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productores de betalactamasas de espectro extendido en hospitales españoles. *Enfer. Infecc. Microbiol. Clin.* 2002; 21(2): 77-82.

24. Hurtado M, La Parte D., Brito AL. *Staphylococcus aureus*: revisión de los mecanismos de patogenicidad y la fisiopatología de la infección estafilocócica. Rev. Soc. Venez. Microbiol. 2002; 22(2):12-118.
25. Ibar M, Vigo G, Pineyro P, Caffer M, Quiroga P, Perfumo C, Centron C, Giacoboni G. Serovariedades de *Salmonella entérica* subespecie entérica en porcinos y su resistencia a los antimicrobianos. Revista Argentina de Microbiología. 2009; 41: 156-162
26. Kiling B, Meyer C, Hilge V. Evaluation of the EEC four-plate test and premi test for screening antibiotic residues in trout (*Salmo trutta*). International Journal of Food Science & Technology. 2007; 42(5):625-28.
27. Linares J, Alonso T, Pérez JL, Ayats J, Domínguez MA, Pallares R, et al. Decreased susceptibility of penicillin-resistant pneumococci to twenty-four betalactam antibiotics. J Antimicrob Chemother. 1992; 30:279-88.
28. Linton A, Howe K, Bennet P, Richard M, Whiteside E. The colonization of the Human gut by antibiotic resistant *Escherichia coli* from chicken. Journal of Applied Microbiology. 2008; 43(3): 465-469.
29. Manger J., Asbury C. Colwell R, Bravo R, Braden L, Brater K. Farmacopea de los Estados Unidos N°32. USP 32. Estados Unidos: 2009.
30. Marinou I, Bersimis S, Loannidis A, Nicolaou C, Ziouva A, Legakis N, Chatzipanagiotou S. Identification and antimicrobial resistance of *Campylobacter species* isolated from animal sources. Frontier in Microbiology. 2012; 3(58):1-6.
31. Martín B, Kruze J, Morales, Agüero H, Espinoza S. Resistencia bacteriana en cepas patógenas aisladas de mastitis en vacas lecheras de la V Región

- Metropolitana y X^a Región, Chile. Archivos de Medicina Veterinaria. 2002; 34(2):221-234.
32. Martín M, Francesc G. Antibióticos betalactámicos. Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica. 2003; 21(1):42-55.
33. Marzocca M, Marucci P, Sica M, Álvarez E. Detección de *Escherichia coli* O157:H7 en carne picada fresca y hamburguesas congeladas. Revista Argentina de Microbiología. 2006; 38(1):38-40.
34. Mattar S, Calderón A, Soltero D, Tordesillas G. Detección de antibióticos en leche un problema en salud pública. Revista Salud Pública. 2009; 11(4): 579-590.
35. Medina M, Gonzáles D Y Ramírez A. Detección de residuos antimicrobianos en tejidos comestibles y tetraciclinas en hueso de cerdo. Rev. Salud Anim. 2008; 30(2): 110-15.
36. Mejía W, Márquez C, Zapata D, Quintero D, Sánchez A, Matéu D. Sensibilidad a los antimicrobianos de cepas de *Salmonella* aisladas de granjas de porcinos del estado de Zulia. Revista científica. 2008; 13(6):674-681.
37. Mercado M, Jenny A, Marcela R, Montoya M, Gamboa A, Carrascal A, Correa D. Brotes de *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* asociados al consumo de pollo: Revisión sistemática de la literatura. Revista Instituto Nacional de Salud. 2012; 32(3).
38. Michanie S. *Escherichia Coli* 0157: H7 la bacteria que disparó el HACCP en la industria de la carne. Ganados & Carnes. 2003;4(17);40-42.

39. Mimbbrero G, Oré L, Santos J, Artalejo A. Análisis del riesgo de los medicamentos veterinarios presentes en los alimentos y terapéutica. Actualidad en Farmacología y Terapéutica. 2004; 2(3):153-227.
40. Mirinou I, Bersimis S, Loannidis A, Nikolaou C, Ziouva A, Legakis N, Chatzipanagiotou S. Identification and antimicrobial resistance of *Campylobacter* species isolated from animal sources. Frontier in Microbiology. 2012;3(58):1-6
41. Mirzaagha P, Louie M, Sharima R, Yanke, Topp E, McAllister T. Distribution and characterization of ampicillin and tetracycline-resistant *Escherichia coli* from feedlot cattle fed sub therapeutic antimicrobials. BMC Microbiology. 2011; 11(78):1-15
42. Molero-Saras G, Pérez M, Sánchez A, Mavárez De Serrano M, Ascanio E, Oviedo De Vale M. Residuos de enrofloxacin en tejido hepático y muscular de pollos beneficiados en el municipio San Francisco del Estado Zulia, Venezuela. Rev. Científica. 2006; 16(6): 629-33.
43. Moredo F, Cappuccio J, Piñeyro P, Perfumo C, Giacoboni G. I. Resistencia a los antimicrobianos de aislamientos de *Escherichia coli* obtenidos de cerdos de la República Argentina. Revista Argentina de Microbiología. 2007; 39(4):227-229.
44. Muñoz D, Martínez C., Marval H, Zerpa, A. Prevalencia de *Staphylococcus aureus*, *Vibrio spp.* y enterobacterias en carne de pepitona, arca zebra, comercializada en Cumaná, Venezuela. Zoot. Trop. 2008; 26(4):505-513.
45. Nayak R, Stewart T, Wang R, Lin J, Cerniglia C, Kenney P. Genetic diversity and virulence gene determinants of antibiotic-resistant *Salmonella* isolated from

- preharvest turkey production sources. *International Journal of food Microbiology*. 2004; 91:51-62.
46. Novais C, Coque T, Costa M, Baquero F, Peiye L. High occurrence and persistence of antibiotic-resistant enterococci in poultry food samples in Portugal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2005; 56(6):1139-1143.
47. Pérez B, Ortíz D, Memije E, Castro D. *Salmonella* en carnes crudas: un estudio en localidades del estado de Guerrero. *Salud pública Méx.* 1990; 32(1):74-9.
48. Phillips I, Casewell M, Cox T, Groot B, Jones R, Rodney P, Waddel J. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A reply to critics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2004; 54(1):276-278.
49. Quezada T. La avicultura: su crecimiento, importancia, economía, retos y perspectivas. Conferencia Magistral dentro del octavo simposium de investigación y de desarrollo y tecnología. 2011.
50. Raddi M, Leite C, Mendonca C. *Staphylococcus aureus*: portadores entre manipuladores de alimentos. *Rev. Salud Pública*. 1988; 22(1).
51. Ramírez A, Gutiérrez R, González C, Escobar I, Castro G, Díaz G, Noa M. Detección de antibióticos en leche comercializada en la ciudad de México. *Rev. Salud Anim.* 2001;23:37-41.
52. Robertson, G. The *Brucella abortus* host factor I (HF-I) protein contributes to stress resistance during stationary phase and is a major determinant of virulence in mice. *Mol. Microbiol.* 1999; 34:690-700.

53. Rodríguez, A. Detección y cuantificación de residuos antimicrobianos en tejido muscular de pollo en cuatro mercados de Lima Cercado. Tesis. Venezuela, 2010.
54. Sapkota A, Lefferts L, Mackenzie S, Walker P. What do we feed to food-production animal? A review of animal feed ingredients and their potential impact health. *Environmental Health Perspectives*. 2007; 115 (5) 663-670.
55. Toro F. Uso de antibióticos en la nutrición animal. *Rev. Sist. Prod. agroecol*. 2011; 1(2): 2.
56. Treviño L. Actividad In Vitro de agentes antimicrobianos sobre *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA): evaluación comparativa del método e-test y dilución en tubo. Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL). Proyecto de Investigación. 2012.
57. Vázquez J, Olvera M. Residuos de antimicrobianos en leche cruda y factores asociados a su presentación. *Revista de Actualidad y Divulgación Científica*. 2012; 15 (1):157-165.
58. Weldhagen G, Poirel L, Nordmann P. Ambler class A extended spectrum β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003; 47:2385.
59. Wilson J et al., *Antibioticoterapia Mayo Clinic Guía rápida, Manual moderno*. 2008.
60. Yang H, Chen S, While D, Zhao S, McDermantt P, Walker R, Merig J. Characterization of Multiple- Antimicrobial- Resistant *Escherichia coli* isolates from diseased chicken and swine in China. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004; 42(8):3483-3489.

61. Young, J. Serologic diagnosis of human brucellosis: Analysis of 214 cases by agglutination tests and review of the literature. *Rev. Infect. Dis.* 1990; 13:359-372.

CIBERGRAFIA

1. CODEX ALIMENTARIUS. 2012. Límites Máximos de Residuos para Medicamentos Veterinarios en los Alimentos. (En Línea). Roma, IT, FAO-OMS. P.4-9. Consultado 2 mayo 2013. Formato pdf. Disponible en: http://www.codexalimentarius.net/vetdrugs/data/MRL2_s_2011.pdf.
2. Doyle M. Veterinary Drug Residues in Processed meats-potential health risk. Food Research Institute 2006 (FRI Briefings. Disponible en internet, http://fri.wisc.edu/docs/pdf/t-RIBrief_vetDrgres.pdf. Consultado 12 de abril del 2013.
3. FAO, 2010. Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la Alimentación. Base de Datos México. <http://www.fao.org> Consultado el 16 de marzo del 2013.
4. Margaret A, Clive Gay, Lynne G. Changes in Antimicrobial resistance among *Salmonella enterica*, serovar typhimurium isolates from humans and cattle in the North-western United States, 1982–1997. Washington State University, Pullman, Washington, USA. Disponible en: <http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol5no6/davis.htm>. Consultado el 10 de marzo del 2013.
5. NIH Publication. 2007. <http://www.digestive.niddk.nih.gov/>

Consultado el 9 de mayo del 2013.

6. Proyecto de Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-004-ZOO-1994, grasa, migado, músculo y riñón en aves, bovinos, caprinos, cérvidos, equinos, ovinos y porcinos. Residuos tóxicos. límites máximos permisibles y procedimientos de muestreo.

http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5189138&fecha=12/05/2011.

Consultado el 13 de abril del 2013.

7. Sagarpa 2012. Secretaría de Agricultura y Ganadería Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México. <http://www.sagarpa.gob.mx>.

Consultado el 15 de febrero del 2013.

8. USDA, 2010. United States Department of Agriculture Database. USA <http://www.usda.gov/wsp/portal/usdahom>. Consultado el 15 de febrero del 2013.

ANEXOS

ANEXO 1 Lista de antibióticos de los sensidiscos utilizados en el análisis de susceptibilidad a los antibióticos de los microorganismos Gram positivos.

Nombre y abreviatura de los antibióticos para microorganismos Gram positivos		Concentración del sensidisco
Nombre	Abreviatura	
Ampicilina	AM	10 µg
Cefalotina	CF	30 µg
Cefotaxima	CTX	30 µg
Ceptazidima	CAZ	30 µg
Cefuroxima	CXM	30 µg
Clortetraciclina	A	30 µg
Dicloxacilina	DC	30 µg
Eritromicina	E	15 µg
Gentamicina	GE	10 µg
Defloxacina	PEF	15 µg
Penicilina	PE	10 IU
Tetraciclina	TE	30 µg
Trimetropin con sulfametoxazol	SXT	1.25 + 23.75 µg
Cefepime	FEP	30 µg
Kanamicina	K	30 µg
Vancomicina	VA	30 µg

Información disponible: Estudio de la susceptibilidad a los antibióticos.
www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/inserts/.../66098_01_2011_ES.pdf

ANEXO 2 Lista de los nombres y abreviatura de los sensibilizadores utilizados en el análisis de susceptibilidad a los antibióticos de los microorganismos Gram negativos

Nombre y abreviatura de los antibióticos para microorganismos Gram negativos		Concentración del sensibilizador
Nombre	Abreviatura	
Amikacina	AK	30 µg
Ampicilina	AM	10 µg
Carbenicilina	CB	100 µg
Cefalotina	CF	30 µg
Cefotaxina	CTX	30 µg
Ceftriaxona	CRO	30 µg
Cloranfenicol	CL	10 µg
Gentamicina	GE	30 µg
Estreptomisina	S	10 µg
Netilmicina	NET	30 µg
Nitrofurantoina	NF	100 µg
Pefloxacina	PEF	30 µg
Trimetopin con sulfametoxazol	SXT	1.25 + 23.75 µg
Tetraciclina	TE	30 µg
Ácido nalidixico	NA	30 µg
Polimixina B	PB	50 µg
Lincomicina	L	15 µg
Eritromicina	E	15 µg

Información disponible: Estudio de la susceptibilidad a los antibióticos. www.bioparis.org/webroot/web/pdf/inserts/.../66098_01_2011_ES.pdf

ANEXO 3 Tabla de antibióticos a los que presentan sensibilidad los microorganismos.

Microorganismos Aislados en Hígado de pollo	Antibióticos a los que presentan sensibilidad
<i>Staphylococcus aureus</i>	Penicilina G, eritromicina, azitromicina, ciprofloxacino, levofloxacino, tetraciclina, tigeciclina, trimetoprim con sulfametoxazol, metronidazol, vancomicina
<i>Escherichia coli</i>	Amikacina, gentamicina, tobramicina, ertapenem, cefazolina, cefalotina, cefuroxima, cefoxitina ceftazidima, ciprofloxacino, levofloxacino
<i>Salmonella spp</i>	Amoxicilina, ampicilina, azitromicina, tetraciclinas, trimetoprim con sulfametoxazol, ertapenem, imipenem, cefuroxima
<i>Brucella spp.</i>	Estreptomina, gentamicina, netilmicina amikacina
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Amikacina, gentamicina, tobramicina, imipenem, ceftazidima, cefalotina, ciprofloxacino, levofloxacino, ticarcilina.

Wilson J et al., Antibioticoterapia Mayo Clinic. Guía rápida, Manual moderno. 2008

ANEXO 4: Formula del medio de cultivo utilizado para el método microbiológico de las cuatro placas

MEDIOS PARA ANTIBIÓTICOS No. 11 BD BIOXON

Medio de cultivo para realizar el ensayo de difusión en placa con *B. subtilis*.
Fórmula para 1000 ml

Peptona de Gelatina	6.0 g
Peptona de Caseína	4.0 g
Extracto de Levadura	3.0 g
Extracto de Carne	1.5 g
Glucosa	15.0 g
Agar	15.0 g
pH final	7.9 ±0.2

ANEXO 5: Formula del medio de cultivo utilizado para la inoculación de B.

subtilis

TRIPTICASA SOYA AGAR (TSA)

- Fórmula para 1000 ml

Digerido pancreático de caseína	15.0 g
Digerido papaíco de harina de soya	5.0 g
Cloruro sódico	5.0 g
Agar	15.0 g
pH	7.3 ± 0.2