



UNIVERSIDAD DE BELGRANO

Las tesinas de Belgrano

**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Carrera de Licenciatura en Tecnología de Alimentos**

**Ensayos de familiarización en la técnica de
detección de residuos de antibióticos y sulfamidas
en músculo esquelético animal por el método de
las cuatro placas**

Nº 146

Julia Isabel Pérez

Tutor: Victoriano Tolosa Duhalde

Departamento de Investigación
Agosto 2005

Objetivos

- **Objetivo principal:** Familiarización con la técnica de detección de residuos de antibióticos y sulfamidas en músculo esquelético animal mediante el método de las cuatro placas del Centro Nacional de Estudios Veterinarios y Alimentarios (CNEVA) de Francia (Documento UCM 90/01).
- **Objetivo específico:** Satisfacer las exigencias que sobre el tema estipula el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA).
- **Objetivo personal:** Alcanzar los objetivos mencionados y además llegar a comprender, evaluar y aplicar la necesidad del control de éstas sustancias logrando afianzar mi conocimiento como profesional.

A mis padres
por ayudarme y apoyarme siempre

Agradecimientos

- A la Lic. Nora Lavalle por haberme dado la posibilidad de escribir y trabajar sobre el tema en el Laboratorio LYCA S.A.
- Al personal del laboratorio por haber sido parte de mi proyecto.
- A la Lic. Corina Meier por su gran dedicación y paciencia, por ayudarme y confortarme constantemente. También le agradezco por la revisión crítica de este trabajo.
- Al Dr. Victoriano Tolosa Duhalde por sus valiosos consejos y revisión crítica de este trabajo. También le agradezco su excelente trato y dedicación.
- A mi hermana y mi esposo por ayudarme.

Índice

Objetivos	3
Abreviaturas	10
Resumen	11
Abstract	11
Introducción	12
Teoría	13
1- Antibióticos	13
1.1- Generalidades.	13
1.2- Clasificación de los antibióticos.	13
1.2.1- Según su espectro de acción (rango de eficacia).	13
1.2.2- Según sus fines de utilización	14
1.2.3- Según si eliminan las bacterias o inhiben el crecimiento de las mismas	14
1.3- Presentación de los grupos de antibióticos que detecta el método	14
1.3.1- Penicilinas	15
1.3.2- Aminoglucósidos.	15
1.3.3- Tetraciclinas.	16
1.3.4- Macrólidos.	16
1.3.5- Sulfamidas o sulfonamidas	17
2- Residuos de medicamentos veterinarios en alimentos de origen animal	18
2.1- Definición	18
2.2- Clasificación toxicológica.	18
2.3- Efectos toxicológicos	18
2.3.1- Alergias	18
2.3.2- Resistencia bacteriana.	19
2.4- Aspectos toxicológicos.	19
3- Unidades de medidas.	20
4- Características de los métodos de análisis de residuos de medicamentos veterinarios	20
Materiales y métodos	21
Principio del ensayo.	21
1- Medios y reactivos.	21
2- Equipamiento y material.	24
3- Metodología	24
4- Procedimientos analíticos.	24
5- Expresión de resultados.	27
6- Puntos críticos de control	27
7- Coste del ensayo	28
Resultados	29
Discusión	33
Anexo I: Referencias	34
Anexo II: Glosario de términos	35
Anexo III: Material complementario	39
Anexo IV: Regulaciones Nacionales e Internacionales vigentes	44

Abreviaturas

ATCC	Colección americana de cultivos tipo
BS	Bacillus subtilis
CCE	Comisión de las Comunidades Europeas
CE	Comisión Europea
CEE	Comunidad Económica Europea
CNEVA	Centro Nacional de Estudios Veterinarios y Alimentarios
CREHA	Control de Residuos e Higiene de los Alimentos
FS	Factor de seguridad
IDA	Ingesta diaria admisible
LMR	Límite máximo de residuo
ML	<i>Micrococcus luteus</i>
NOEL	Nivel Sin Efectos Adversos Observables
OMS	Organización Mundial de la Salud
SENASA	Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria
TSA	Agar tripticosa soja
UE	Unión Europea

Resumen

La aplicación de antibióticos y sulfamidas para el control de enfermedades en animales es una práctica habitual desde que se descubrieron estos antimicrobianos, contribuyendo significativamente en el control de enfermedades del ganado. Posteriormente se han descubierto otros usos de los antibióticos, entre los que se destaca su aplicación como promotores del crecimiento, especialmente en la crianza intensiva de animales.

El uso masivo e indiscriminado de antimicrobianos trae consigo algunas consecuencias negativas como es la generación de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos y la presencia de residuos en los productos destinados a consumo humano, especialmente: huevos, leche y carne.

Al ser consumidas por el ser humano pequeñas dosis de antimicrobianos presentes en los alimentos, puede producir hipersensibilidad, de manera que al tratar a las personas sensibles con el antibiótico respectivo se presentan reacciones adversas que van desde un simple prurito hasta el shock anafiláctico. La detección de residuos de antimicrobianos en alimentos de origen animal ha motivado en varios países, incluida Argentina (Plan CREHA-SENASA: Planes anuales de Residuos y Toxinas en alimentos de origen animal), la necesidad de desarrollar planes específicos de control.

Si bien existen diversas metodologías de análisis cuantitativo para la detección de inhibidores bacterianos en alimentos, como método de control de rutina se prefiere la aplicación de técnicas microbiológicas de tipo cualitativo que no pretenden más que indicar la presencia o ausencia de algún inhibidor bacteriano; siendo más eficaces en función del costo y la rapidez. Éstas técnicas se han perfeccionado constantemente con el fin de aumentar la sensibilidad.

En éste trabajo se describe una serie de ensayos de familiarización con la técnica de detección de residuos de antibióticos y sulfamidas en músculo esquelético animal mediante el método de las cuatro placas del Centro Nacional de Estudios Veterinarios y Alimentarios (CNEVA) de Francia (Documento UCM 90/01). La familiarización se realizó mediante el análisis de muestras de músculo esquelético animal fortificadas en el laboratorio con cantidades conocidas de antibióticos o sulfamidas.

Abstract

The application of antibiotics and sulfadimidines for the control of illnesses in animals is a common practice since they were discovered. These anti-bacterial substances, contributed significantly in the control of illnesses of the livestock. Later on, other uses of the antibiotics have been discovered such as to be promoters of the growth, especially in the intensive upbringing of animals.

The massive and indiscriminate use of anti-bacterial substances causes some negative consequences as it is the generation of resistant bacterial strains to the antibiotics and the presence of residuals in the products for human consumption, especially: eggs, milk and meat.

When small doses of antibacterial substances are consumed by human beings in the foods, it can produce hypersensitivity, so that when treating sensitive people with the respective antibiotic adverse reactions are observed. They go from a simple pruritus to an anaphylactic shock. The detection of anti-bacterial residuals in foods of animal origin has motivated in several countries, included Argentina (Plan CREHA-SENASA: Annual plans of Residuals and Toxins in foods of animal origin), the necessity to develop specific plans to control them.

Although there are diverse methodologies of quantitative analysis for the detection of bacterial inhibitors in foods, it is preferred as method of routine to control, the application of qualitative microbiological techniques, to indicate the presence or absence of some bacterial inhibitor; being more effective in matters of cost and speed. These techniques have constantly been perfected with the purpose of increasing the sensibility.

In this work they are described a series of familiarization tests with the technique of detection of residuals of antibiotics and sulfadimidine in animal skeletal muscle using the method of the four plates of the National Center of Veterinary and Alimentary Studies (CNEVA) of France (Document UCM 90/01). The familiarization was carried out analyzing samples of muscle skeletal animal fortified in the laboratory with well-known quantities of antibiotics or sulfadimidines.

Introducción

El método de las cuatro placas ha sido desarrollado con el fin de detectar residuos de sustancias antibacteriales en productos de origen animal y es aplicado como método de control en los países que exportan a la Unión Europea. Es importante aclarar que no existe un método de referencia oficial. Este método fue desarrollado por el equipo de trabajo de la Comisión Científica de Veterinaria de la Comisión de las Comunidades Europeas 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, en el cual se utilizan dos microorganismos diferentes (*Bacillus subtilis* BGA y *Micrococcus luteus* ATCC 9341).

En realidad el test se basa en otros tests ya existentes, siendo el nuevo elemento la placa que contiene Trimetoprima y *Bacillus subtilis*, con el fin de detectar los residuos de sulfamidas. Básicamente, el test de residuos de antibióticos de la CCE es una combinación del Test alemán: «AH-Test», del test «*Sarcina lutea*» (modificado a pH 8) y una variante del test existente para sulfonamida (Bogaerts, 1980).

El test Alemán «AH-Test» fue ideado por Levetzow, R. en 1978 (única información encontrada sobre el mismo).

En el test de «*Sarcina lutea*» por van Schothorst, M. en 1970; se dispensa una placa con *Sarcina lutea* ATCC 9341, ajustada a pH 6,0; luego se coloca un papel de filtro de diámetro de 1,2 cm sobre el riñón cortado por unos 30 a 60 minutos, se extrae el papel con una pinza y se coloca sobre la placa. Se incuba 18 a 20 h a 37°C y se lee el diámetro de inhibición. También este trabajo incluye una forma de identificación de antibióticos.

El test de sulfonamida de Gudding, R. en 1976; método bacteriológico para la detección de residuos de sulfonamidas en alimentos; se basaba en la adición de trimetoprima al medio Mueller-Hinton. La cantidad de trimetoprima adicionada va a depender de la bacteria utilizada *Micrococcus luteus*, *Bacillus stearothermophilus* o *Bacillus megaterium*. Este trabajo tuvo la finalidad de comprobar que los efectos de sinergia de las sulfonamidas y la trimetoprima aumenta la sensibilidad del test.

Por el momento, el método de las cuatro placas está propuesto para músculo esquelético animal. Sin embargo, no significa que los riñones o hígados no puedan ser examinados. No obstante, al interpretar los resultados ciertos factores deberán ser tenidos en cuenta. Por ejemplo, los riñones de cerdo sólo pueden ser examinados si no han sido congelados, ya que es sabido que los riñones de cerdo congelados dan resultado falsos positivos en placas de *Bacillus subtilis*. Este efecto puede ser evitado aplicando una membrana semipermeable (Bogaerts, 1980).

Esta familiarización del ensayo se inició debido a la necesidad de implementar el método requerido por el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) para el control principalmente de plantas faenadoras que exportan a la Unión Europea.

Los desafíos que formaron parte del trabajo:

- Llegar a tener dominio del método.
- Poder llevar a la práctica el método con los materiales disponibles.
- No perder a los clientes que exportan a la UE.

Los problemas que se intentaron resolver:

- Estar dentro de los laboratorios habilitados por el SENASA para éstos ensayos.
- Explicar la importancia que presenta la detección de estas sustancias.

El SENASA presenta ante la Comisión de la UE el plan anual (CREHA) de monitoreo y vigilancia para la detección y control de residuos en productos y especies exportados al bloque comunitario: bovinos, ovinos, caprinos, porcinos, equinos, aves de corral, acuicultura, leche, huevos, conejos, caza silvestre, caza de cría y miel.

El año pasado fue aprobado por la Comunidad Económica Europea (CEE) a través de la Decisión 2003/485/CE. La Comisión Europea evaluó dicho plan y afirmó que brinda «suficientes garantías con relación a los productos o especies indicados».

La Decisión 2003/485/CE de la Unión Europea, que modifica su similar 2000/159/CE (ver: Anexo III), enumera los países extracomunitarios: Argentina, Estados Unidos, Chile y Bulgaria entre otros, a los que la Comisión Europea les aprobó los planes relativos a las garantías que ofrecen respecto al control de los grupos de residuos y sustancias en productos de exportación hacia ese destino.

El SENASA también aplica dicho programa de control en los productos que certifica para el consumo interno (aunque el número de muestras es menor).

Teoría

1- Antibióticos

1.1- Generalidades.

Muchas sustancias químicas son demasiado tóxicas para ser utilizadas en organismos vivos. Sin embargo, los agentes quimioterapéuticos tienen la propiedad de una toxicidad selectiva, ya que afectan a las células microbianas invasoras sin afectar significativamente las células del organismo. Los antibióticos constituyen una clase de agentes quimioterapéuticos producidos a partir de diferentes especies de microorganismos que suprimen el crecimiento de otros, llegando, a veces, a destruirlos, siendo una clase especial que se distinguen por ser sustancias naturales (productos de la actividad microbiana), más que sustancias químicas sintéticas (productos de la actividad humana). Pero en algunos casos, los antibióticos incrementaron su eficacia por medio de las modificaciones químicas (semisintéticos)

En la actualidad, varios autores emplean el término de antibiótico para cualquier compuesto químico utilizado para eliminar o inhibir el crecimiento de organismos infecciosos; siendo la propiedad en común la toxicidad selectiva hacia los organismos invasores superior a la toxicidad frente a los animales o seres humanos. Quedan englobados con este nombre: los compuestos orgánicos producidos por bacterias u hongos, los compuestos sintéticos y los semisintéticos. La principal categoría de antibióticos son los antibacterianos, pero se incluyen los fármacos antipalúdicos, antivirales y antiprotozoos.

El anuncio del descubrimiento del primer antibiótico sulfamídico en el año 1935, dio punto de partida a la era moderna de la terapéutica antimicrobiana, cuya característica saliente fue la disminución de la morbilidad y de la mortalidad de gran cantidad de enfermedades infecciosas. La distinción de este período por sobre el resto fue porque el impacto de este tipo de sustancias sobre factores médicos, veterinarios, de sanidad pública y económicos, relacionado con los estados patológicos, no tiene paralelo en la historia de la terapéutica de los medicamentos. No obstante a pesar de los beneficios descritos, los antibióticos constituyen uno de los agentes farmacológicos peor usados, tanto a nivel médico como veterinario, principalmente por la administración, en muchas ocasiones, de forma irracional y en dosis inadecuadas. El empleo indiscriminado de estos productos trae aparejado complicaciones tales como reacciones alérgicas, infecciones graves, retrasos en la identificación del germen causal, entre otras. Pero una de las complicaciones más importantes es la aparición de gérmenes antibiótico-resistentes que a su vez, crea la necesidad cada vez mayor, de nuevas drogas para combatir estas especies, creando un círculo vicioso.

1.2- Clasificación de los antibióticos.

Existen muchas formas de clasificar a los antibióticos. A continuación sólo se describirán algunas de ellas.

1.2.1- Según su espectro de acción (rango de eficacia)

Algunas especies de bacterias tienen una pared celular gruesa compuesta de peptidoglicanos. Otras especies bacterianas tienen una pared celular mucho más delgada y una membrana externa. Cuando las bacterias se someten a la tinción de Gram, estas diferencias estructurales se traducen en una tinción diferencial con el producto denominado violeta de genciana y otros líquidos de tinción. Así, las bacterias gram-positivas, aparecen de color púrpura, y las bacterias gram-negativas son incoloras o rojizas, dependiendo del proceso empleado para su tinción. Esta es la base de la clasificación que diferencia las bacterias gram-positivas (con gruesa pared de peptidoglicanos) y gram-negativas (con fina pared de peptidoglicanos y membrana externa); las propiedades de tinción se correlacionan con otras propiedades bacterianas.

Las bacterias gram-positivas son más sensibles a los antibióticos que las gram-negativas, aunque algunos antibióticos actúan solamente sobre las bacterias gram-negativas.

Se denominan:

- **Antibióticos de amplio espectro:** a aquellos que actúan sobre ambas bacterias (gram-positivas y gram-negativas). Por ejemplo: las tetraciclinas.
- **Antibióticos de espectro reducido (restringido):** a los que actúan solo sobre un grupo de organismos, llegando a veces a tener un espectro de acción sumamente limitado; siendo tóxico tan solo para una especie bacteriana o para muy pocas especies. Por ejemplo: las penicilinas, actúan frente a una multitud de bacterias gram-positivas. Los aminoglucósidos, son eficaces frente a bacterias gram-negativas.

En general un antibiótico de amplio espectro tiene una utilización médica más amplia; sin embargo un antibiótico de espectro reducido puede ser de gran valor para el control de microorganismos que no responden a otros antibióticos.

1.2.2- Según sus fines de utilización.

Los agentes antimicrobianos deberían utilizarse exclusivamente con dos fines:

- Con fines profilácticos: sólo para aquellos casos en que esté demostrado su importancia para prevenir una infección; por ejemplo, en los ciclos iniciales de crecimiento de animales, especialmente sensibles a agentes infecciosos muy particulares. En estos casos no deberían emplearse antibióticos de adquisición reciente ya que en general son menos eficaces como preventivos de infección que los ya existentes y podrían favorecer además, la aparición de resistencias.
- Con fines terapéuticos: para casos de infecciones documentadas. Esta es la forma ideal de tratamiento antimicrobiano, conociendo el germen causal. Muchas veces se comienza a utilizar de forma empírica en casos de sospecha de infección cuando se considera urgente la necesidad del mismo. Siempre que sea posible es importante realizar previamente cultivos pertinentes, antes de instaurar el tratamiento, para poder valorar a *posteriori* la eficacia de los antibióticos utilizados. Es preferible además recurrir siempre a antibióticos de espectro reducido para poder aumentar la eficacia del tratamiento y reducir el eventual trastorno que el antibiótico ejercerá sobre la flora comensal. Se recomienda únicamente la asociación de antibióticos cuando éstos presentan efectos aditivos o sinérgicos. Las dosis deben ser siempre terapéuticas puesto que los laboratorios farmacéuticos realizan los ensayos clínicos y los estudios cinéticos pertinentes que garantizan, para la dosis propuesta, los niveles del fármaco adecuados para eliminar la bacteria.

La vía de administración preferida por los profesionales veterinarios, varía en función de las especies animales, aunque cabe destacar que la alimentación mediante piensos adicionados con medicamentos es una de las más usadas a la hora de medicar en los sectores zootécnicos; (las otras vías son: intramuscular, subcutánea, tópica o intravenosa).

El uso de antibióticos con fines terapéuticos o profilácticos no siempre sigue la pauta comentada anteriormente, demostrándose en muchas ocasiones que los animales a los que se prescriben estos agentes no tienen evidencia de infección, no requieren antimicrobianos o reciben dosis inadecuadas.

Aparte de la prescripción incorrecta de antimicrobianos por parte del facultativo, hay otra serie de factores que contribuyen al mal uso terapéutico de estos agentes como son: la venta de medicamentos veterinarios en establecimientos no autorizados (tiendas de animales de compañía, explotaciones ganaderas, etc.), la venta de antimicrobianos sin necesidad de presentar la receta veterinaria o el empleo de antimicrobianos no autorizados en el sector veterinario (Cancho Grande y col., 2000).

1.2.3- Según si eliminan las bacterias o inhiben el crecimiento de las mismas.

Los antibióticos también se pueden dividir en:

- Bactericidas (capaces de eliminar las bacterias). Los antibióticos que lesionan la membrana celular producen una liberación de los metabolitos celulares al exterior, y por tanto su muerte. Por ejemplo: las penicilinas (pero también se las considera bacteriostáticos; ver: 1.3.1).
- Bacteriostáticos (bloquean el crecimiento y multiplicación celular). Estos fármacos resultan eficaces debido a que las bacterias inhibidas en su crecimiento morirán con el tiempo o serán atacadas por los mecanismos de defensa del huésped. Son el caso de las tetraciclinas y las sulfonamidas.

1.3- Presentación de los grupos de antibióticos que detecta el método.



1.3.1- Penicilinas (*penicillin*).

Grupo de sustancias antibacterianas naturales o semisintéticas, que derivan, directa o indirectamente, de cepas de hongos del género *Penicillium* y otros hongos del suelo, cultivados en medios especiales. Las penicilinas ejercen un efecto tanto bactericida como bacteriostático en las bacterias sensibles, ya que interfieren en los últimos pasos de la síntesis del peptidoglicano, una sustancia de la pared celular de la bacteria. A pesar de su toxicidad relativamente baja para el huésped, son activas frente a muchas bacterias, especialmente gram-positivas patógenas (estreptococos, estafilococos), clostridios, ciertas formas gram-negativas, algunas espiroquetas y algunos hongos.

Alexander Fleming observó en 1928/29 la acción bacteriostática de un moho sobre un cultivo bacteriano en placa, y designó el principio activo de la solución nutritiva con el nombre de «penicilina» (Trolldenier, 1980).

Primeramente se obtuvo de la fermentación del hongo *Penicillium notatum*, más tarde a partir de mutantes de *Penicillium chrysogenum*.

Existen cuatro tipos de penicilinas:

- Las penicilinas-G de espectro restringido, eficaces contra estreptococos gram-positivos, estafilococos, enterococos y meningococos.
- La ampicilina y derivados, tienen un rango de acción similar a la penicilina-G, con un espectro de acción algo mayor, que incluye a las bacterias gram-negativas.
- Las penicilinas resistentes a la penicilinasasa, son efectivas frente a las bacterias que han desarrollado resistencia a la penicilina G.
- Las penicilinas antipseudomonas, permiten el tratamiento de las infecciones provocadas por la bacteria gram-negativa *Pseudomonas*.

Los efectos colaterales de las penicilinas son poco frecuentes. Cuando aparecen, consisten en hipersensibilidad inmediata o retardada, erupciones cutáneas, fiebre y *shock* anafiláctico (reacciones anormales al fármaco). La ampicilina puede producir más efectos colaterales que las penicilinas; consisten en náuseas, vómitos y diarrea.

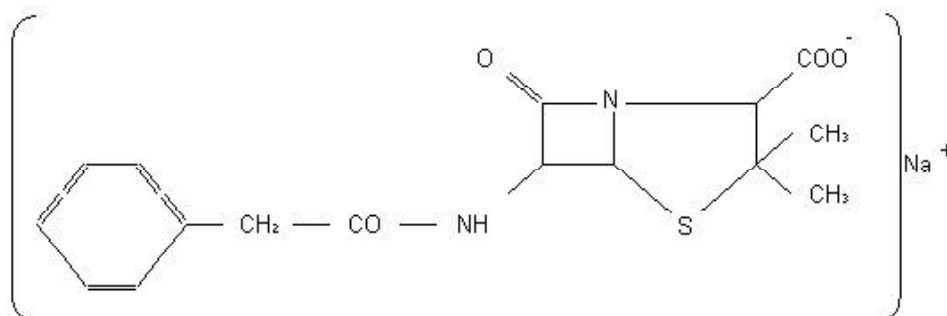
Características de la sustancia inhibidora utilizada en el método:

Sinónimos: Bencilpenicilina, Cristaciclina, Leopenicilina, Licuacilina, Penicilina Na, Penicilina II, Penicilina G, Veticilina, etc.

Fórmula empírica: $C_{16}H_{17}N_2NaO_4S$ (Bencilpenicilina sódica).

Peso molecular: 356,4 (Bencilpenicilina sódica).

Fórmula estructural:



Las sales alcalinas de la bencilpenicilina son polvos blancos, microcristalinos e higroscópicos, se disuelven bien en agua y alcohol, pero son casi insolubles en las grasas. La estabilidad en la solución depende del pH y la temperatura. La penicilina G se inactiva rápidamente a un pH inferior a 4 o superior a 8.

1.3.2-Aminoglucósidos.

Los aminoglucósidos son antibióticos de espectro restringido que inhiben la síntesis de proteínas bacterianas en bacilos gram-negativos y estafilococos. En ocasiones se utilizan en combinación con la penicilina. Todos los miembros de esta familia —en especial la neomicina— tienen mayor toxicidad que la mayor parte del resto de los antibióticos. Los efectos adversos asociados con la utilización prolongada de aminoglucósidos son infrecuentes e incluyen lesión de la región vestibular del oído interno, pérdida auditiva y lesiones en el riñón.

Características de la sustancia inhibidora utilizada en el método:

La estreptomomicina (*streptomycin*) es uno de los antibióticos aminoglucósidos más antiguos y, después de la penicilina, es el antibiótico más utilizado. Debido a su uso muy extendido, muchas bacterias gramnegativas, previamente susceptibles, han desarrollado resistencia y por consiguiente perdió en gran parte su efectividad y popularidad.

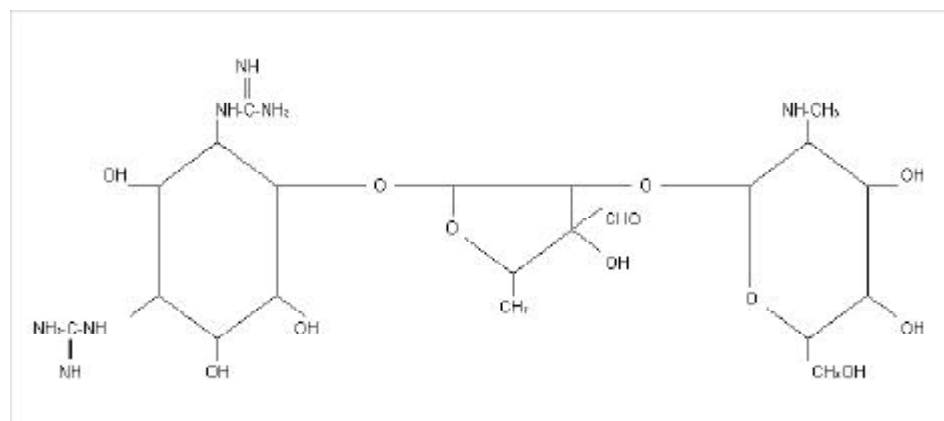
Como todos los demás miembros del grupo, la estreptomomicina tiene mala absorción a nivel del tubo digestivo y debe ser administrada parenteralmente, normalmente por inyección intramuscular. Se utiliza mucho en terapéutica veterinaria, contrariamente a lo que ocurre en medicina humana.

Fue obtenida y descrita en 1944 por Waksman, Schatz y Bugie de la fermentación del actinomiceto *Streptomyces griseus*. En 1945 se obtuvo en estado de pureza. La estreptomomicina se encuentra en el comercio en forma de sulfato o pantotenato.

Sinónimos: Estreptomomicina A, Streptomomicina, Sulfato de estreptomomicina, Diplostrep, Strep-sulfat, Streptoliquin, Streptomyzin Jenapharm.

Fórmula empírica: $C_{21}H_{39}N_7O_{12}$ (Estreptomomicina base).

Peso molecular: 581,6 (Estreptomomicina base).

Fórmula estructural:

El Sulfato de estreptomomicina es un polvo blanco o casi blanco, escasamente higroscópico, poco soluble en agua y casi insoluble en disolventes orgánicos. La actividad biológica óptima se desarrolla en medio básico a pH 8,0 - 8,2.

Este antibiótico permanece por bastante tiempo en los riñones luego de la administración parenteral y en el lugar de la inyección. En cambio, si la vía utilizada es la oral, permanece poco tiempo en los órganos por ser muy escasa su absorción.

1.3.3- Tetraciclinas

Las tetraciclinas son antibióticos bacteriostáticos que inhiben la síntesis de proteínas bacterianas. Son antibióticos de amplio espectro eficaces frente a cepas de estreptococos, bacilos gram-negativos, las bacterias del género *Rickettsia* (las bacterias que producen el tifus) y espiroquetas (las bacterias que producen la sífilis).

Debido a su amplio espectro, las tetraciclinas pueden, en ocasiones, alterar el equilibrio de la flora bacteriana interna que normalmente es controlada por el sistema inmunológico del organismo; esto puede producir infecciones secundarias en el tracto gastrointestinal o la vagina, por ejemplo. Las tetraciclinas se emplean cada vez menos debido a la aparición de gran número de cepas bacterianas resistentes.

1.3.4- Macrólidos.

Los macrólidos son bacteriostáticos. Se unen a los ribosomas bacterianos para inhibir la síntesis de proteínas. Los efectos secundarios incluyen náuseas, vómitos y diarrea; pueden producir, de forma excepcional, alteraciones auditivas transitorias.

Características de la sustancia inhibidora utilizada en el método:

La Eritromicina (*erythromycin*) es un antibiótico de amplio espectro, producido por una cepa de *Streptomyces erythreus*. Es el representante más importante del grupo de los macrólidos. Fue aislada por McGuire et al. en 1952. Eficaz contra una amplia variedad de organismos, incluyendo bacterias gram-negativas y

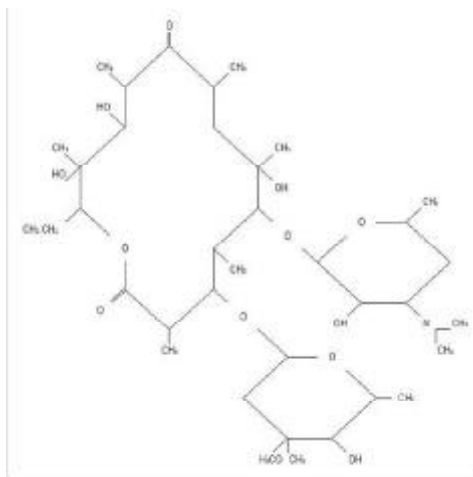
gram-positivas. Tiene un amplio margen de seguridad y mínimos efectos adversos. Se puede administrar por vía oral o parenteral.

Sinónimos: EMU, Eritrano, Ertrax, Eritromicin (a), Ericina, Ericinum, Eritrocina, Etromicina e Iloticina.

Fórmula empírica: Eritromicina A: $C_{37}H_{67}NO_{13}$; Eritromicina B: $C_{37}H_{67}NO_{12}$; Eritromicina C: $C_{36}H_{65}NO_{13}$

Peso molecular: 733,9 (Eritromicina B: 730; Eritromicina C: 730+5).

Formula estructural:



La eritromicina es una base débil, cristalina y blanca. Se disuelve con dificultad en el agua (2 mg/mL), pero lo hace bien en alcohol, acetona y cloroformo. Forma sales hidrosolubles con los ácidos débiles. La actividad óptima se desarrolla a un pH comprendido entre 7,5 y 8,0.

Las soluciones neutras son estables a 5°C durante varias semanas. Es débilmente higroscópica. Debe conservarse protegida del aire, luz y humedad.

1.3.5-Sulfamidas o sulfonamidas.

Nombre genérico aplicado a un grupo de agentes quimioterápicos eficaces frente a diversas enfermedades infecciosas. En 1935 el químico alemán, Gerhard Domagk descubrió que un colorante azoico, el prontosil, curaba las infecciones producidas por estreptococos en los ratones. Se determinó que el principio activo del prontosil era la p-aminobenceno-sulfonamida, conocida por sulfanilamida. Los ensayos clínicos con sulfanilamida demostraron su eficacia frente a varias enfermedades bacterianas. Son antibióticos bacteriostáticos sintéticos de amplio espectro, eficaces contra la mayor parte de bacterias gram-positivas y muchas bacterias gram-negativas. Sin embargo, la aparición de resistencias entre las bacterias gram-negativas a las sulfonamidas, hacen que estos antibióticos se empleen hoy en día en situaciones muy concretas. Todas las sulfamidas tienen cierto carácter tóxico y cuando se emplean de forma indiscriminada producen anomalías sanguíneas y lesiones renales. La penicilina, es tan eficaz como las sulfamidas pero mucho menos tóxica. Sin embargo, debido a que las bacterias desarrollan con frecuencia resistencia a un tipo determinado de tratamiento, las sulfamidas se utilizan cuando se ha desarrollado tolerancia bacteriana a la penicilina. Los efectos colaterales incluyen alteraciones del tracto gastrointestinal e hipersensibilidad.

Las sulfonamidas unidas a la trimetoprima aumentan su acción antibacteriana de forma tal que dicha acción es mayor que la suma de las acciones de las dos por separado (sinergismo de potenciación).

La trimetoprima es capaz de provocar resistencia bacteriana especialmente de los bacilos gram-negativos, aunque también en los estafilococos, pero como el mecanismo de acción de la trimetoprima y las sulfonamidas es de tipo diferente, la unión de ambas clases de drogas hace que la aparición de la resistencia se reduzca.

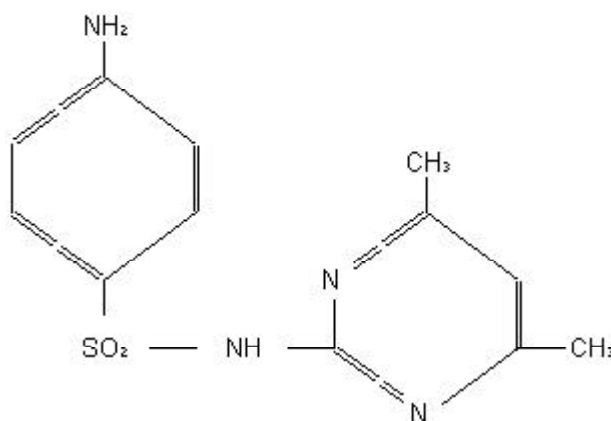
Características de la sustancia inhibidora utilizada en el método:

La Sulfametazina (*sulphamethazine*) se absorbe rápidamente en el tubo digestivo, se elimina lentamente y tiene una precipitación mínima en los túbulos renales. Es un fármaco eficaz y seguro con amplio espectro antibacteriano.

Sinónimos: Sulfadimidina, Sulfamezatina.

Fórmula empírica: $C_{12}H_{14}N_4O_2S$

Peso molecular: 278,27

Fórmula estructural:

2- Residuos de medicamentos veterinarios en alimentos de origen animal.

2.1- Definición.

Son los compuestos que permanecen en el organismo animal como consecuencia de un tratamiento, incluyendo el principio activo original y/o los productos de biotransformación (metabolitos). La presencia de estos residuos, en mayor o menor proporción, está relacionada con: la naturaleza del producto, la dosis utilizada, la forma de aplicación y el tiempo transcurrido desde su aplicación hasta la faena (en el caso de la carne y las vísceras) o hasta la recolección del producto (cuando se trata de leche y huevos) (Fernández Suárez, 2003).

Además de los antibióticos, esta posibilidad está abierta para los anabólicos y los antiparasitarios.

Los efectos de estos residuos pueden, desde ser nulos, si sus cantidades son ínfimas y son consumidos ocasionalmente, hasta tener consecuencias graves, si se ingieren diariamente y se acumulan en nuestros tejidos (Silvestre, 2001).

2.2- Clasificación toxicológica.

Según Alejandro Silvestre: a los residuos de antibióticos se los clasifica como tóxicos antropogénicos intencionales.

2.3- Efectos toxicológicos.

Los efectos de los residuos no se manifiestan con un problema de toxicidad aguda, nadie se enfermará por consumir «algunas veces» un alimento animal con residuos de medicamentos. La manifestación es a largo plazo, por la ingestión de pequeñas cantidades de residuos en forma continua y por períodos prolongados (Silvestre, 2001).

Pueden englobarse en dos grandes grupos:

- Efectos directos. Son aquellos producidos por la utilización de antibióticos en condiciones terapéuticas. Se manifiestan dentro de amplias y por demás variadas formas clínicas: toxicidad en riñón, hígado, sangre, médula, oído, efectos teratogénicos, carcinogénicos y alergias graves. No existe información sobre toxicidad por efecto directo por ingestión.
- Efectos indirectos. Están representados por las formas de alergia y los fenómenos de resistencia bacteriana (González Silvano, 1995). A continuación se describirán los mismos.

2.3.1- Alergias.

Los antibióticos son haptenos, es decir, necesitan estar acoplados a una proteína para comportarse como antígenos capaces de inducir la formación de anticuerpos específicos. La sensibilización no suele depender de la dosis administrada. Los antibióticos que se eliminan sin sufrir transformación (por ejemplo, eritromicina, tetraciclinas), aparentan tener escaso poder antigénico. En cambio, los que se desdoblan parcialmente (por ejemplo, penicilinas, estreptomina, sulfamidas), desempeñan, a menudo, el papel de alérgenos (Trolldenier, 1980).

Se entiende por efectos alergénicos: a la reacción clínica de un individuo sensibilizado a una sustancia inocua para algunos, pero que produce un efecto alergénico en su caso personal.

Se puede distinguir dos tipos de alergia alimentaria:

- alergia digestiva: clínicamente manifestada por vómitos, diarrea y diferentes trastornos digestivos en la cual no estarían involucrados tejidos conteniendo residuos de antibióticos.
- alergia alimentaria específica: de características clínicas de poca gravedad como el edema de Quincke y dermatosis. Posiblemente sean éstas las manifestaciones producidas por residuos penicílicos. La penicilina es posiblemente el menos tóxico de los antibióticos, sin embargo es el más propenso a provocar reacciones de sensibilidad (González Silvano, 1995).

2.3.2- Resistencia bacteriana.

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

La resistencia puede desarrollarse casi en todos los fármacos, y se sabe que tiene lugar tanto in vivo como in vitro. La cepa resistente puede ser tan virulenta como la parental, y puede no ser controlable por otros agentes quimioterapéuticos y pasarse de un individuo a otro.

El uso incontrolado de los medicamentos está ocasionando un rápido desarrollo de resistencia a los antibióticos en los microorganismos causantes de enfermedades. A medida que se fueron descubriendo y utilizando muchos de los antibióticos conocidos, ha ocurrido en paralelo el surgimiento de las bacterias que resisten a su acción. Por lo general, cuanto más se haya utilizado un antibiótico, hay más bacterias resistentes a él. Por éste motivo, continuamente se buscan nuevos antibióticos y se intenta modificar los ya existentes mediante alteraciones químicas.

Un organismo debe desarrollar resistencia a un antibiótico para poder crecer en presencia del mismo. Al sobrecargar con antibióticos, el resultado puede ser un desarrollo rápido de resistencia al fármaco. La resistencia se puede minimizar si solamente se utilizan los fármacos para enfermedades serias y se dan en dosis suficientes de modo que se reduzca el nivel de la población antes que los mutantes tengan la posibilidad de aparecer. Otra manera en que se puede reducir al mínimo la resistencia es combinando dos agentes quimioterapéuticos no relacionados, de modo que haya un eventual mutante resistente a uno y que sea sensible al otro.

Es conveniente aclarar que a pesar de los muchos años en que se aplican los antibióticos en la alimentación animal es difícil determinar los efectos debidos a la aplicación subterapéutica de antibióticos. Es un tema complicado de tratar por las conclusiones dispares existentes.

2.4- Aspectos toxicológicos.

Para la evaluación del riesgo de los residuos de medicamentos animales se toman en cuenta los siguientes parámetros:

- Los estudios de toxicidad llevados a cabo en animales de laboratorio y especialmente por los estudios a largo plazo por ingestión regular del producto, definiéndose así el Nivel Sin Efectos Adversos Observables (NOEL), que es la dosis más alta que no produce efectos adversos observables en la especie más sensible estudiada.
- La Ingestión Diaria Admisible (IDA), que es la cantidad diaria de un determinado residuo que puede ingerir el hombre durante su vida sin riesgo para la salud. Se calcula dividiendo el NOEL por un Factor de Seguridad (FS), que se fija arbitrariamente, teniendo en cuenta el grado de certeza con los resultados toxicológicos pueden extrapolarse a los humanos (Fernández Suárez, 2003).

Teniendo en cuenta los dos parámetros anteriormente mencionados se define un Límite Máximo de Residuos (LMR), que es la concentración máxima de un residuo aceptable en un alimento y se calcula tomando la IDA, multiplicándola por un peso persona promedio de 60 kg y dividiendo esa cifra por la ingesta media diaria del alimento considerado. Cuando se establece un LMR para una sustancia, se especifica en qué tejido deben cuantificarse los residuos y cuáles son los compuestos que deben analizarse. Se define como tejido/s marcador/es (músculo, hígado, riñón, grasa) a aquel para el cual se fija el LMR y que debe ser analizado a los fines de control de residuos. Frecuentemente es el tejido en donde los metabolitos permanecen un tiempo prolongado (Fernández Suárez, 2003).

Para garantizar la concentración residual de los antibióticos no sea superior a su correspondiente LMR, se hace necesario establecer un tiempo de espera. Este tiempo de espera es el plazo de tiempo que debe transcurrir, y ser respetado, desde el último tratamiento farmacológico hasta el sacrificio de los animales para poder consumir la carne o recoger sus productos (leche, huevos) para su comercialización e ingestión. Estos tiempos se determinan en función del perfil cinético de la eliminación tisular de los fármacos (inalte-

rado y/o metabolitos) en los animales. Cada antibiótico debe ir acompañado de un prospecto en donde conste el valor del tiempo de espera. No obedecer estas indicaciones supone un riesgo para la salud de los consumidores (Cancho Grande y col., 2000).

(Ver: Anexo III, lista de sustancias farmacológicamente activas cuyos LMR se han establecido).

3- Unidades de medida.

Inicialmente se expresó la potencia farmacológica en unidades biológicas o animales; por ejemplo, la unidad rata, ratón, gato, rana, conejo. Así, se definió la unidad de insulina como la cantidad necesaria para provocar el descenso de la glucemia de un conejo normal hasta un cierto valor convencional, pero muy pronto se advirtió que existía una amplia variación individual en la respuesta hipoglucémica de los animales a la insulina.

Actualmente la actividad de una sustancia que se ensaya se compara con algo que es constante y que se refiere a los preparados tipo, patrones o estándares establecidos por el Comité de Expertos para la Estandarización Biológica o en Patrones Biológicos de la OMS desde 1952 hasta el presente. Estos preparados consisten en polvos secos, estables, de calidad uniforme, que se encuentran depositados en los Laboratorios Internacionales de Patrones Biológicos, como el Instituto Nacional de Patrones Biológicos y de Control de Londres y el Instituto Serológico del Estado de Copenhague.

Se define la unidad internacional (UI) como la actividad de un peso determinado de un preparado estándar internacional. Los métodos de valoración biológica se realizan comparando la actividad del preparado desconocido con la del preparado patrón, por medio de la respuesta biológica producida por ambas sustancias en condiciones estrictamente comparativas. De esta manera se obtiene una relación de potencia entre ambos preparados que es independiente de las condiciones experimentales y del procedimiento de valoración empleado, dependiendo el error de la estimación únicamente de la variabilidad de los animales. De esta manera es posible asegurar la uniformidad de la dosificación clínica en todo el mundo.

Una regla fundamental de la valoración biológica es que el principio activo del preparado estándar sea idéntico al principio activo del desconocido.

4- 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 cuantía 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 cromatográfica combinada con un procedimiento de espectrometría de masas.
- Tipo II: suelen determinar la concentración del un analito en el tipo 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. Dos métodos de éste tipo pueden facilitar información oportuna para un método del Tipo I cuando aplican procedimientos químicos diferentes.
- 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 muestral, su comodidad y su posible adecuación en los distintos laboratorios. Por ejemplo: Método de las cuatro placas.

Materiales y métodos

Principio del ENSAYO

Este método es aplicable a músculos esqueléticos de animales de carnicería y tiene el objetivo de evidenciar la presencia de residuos de antibióticos y sulfamidas.

El método no permite determinar la identidad del residuo inhibidor.

Se basa en una técnica en agar. Se coloca en una placa de Petri un medio nutritivo sólido con un microorganismo sensible a antibióticos o a sulfamidas. Sobre este medio se coloca un trozo de muestra y la placa se incuba a la temperatura de desarrollo óptima del microorganismo. Si la muestra contiene residuos de antibióticos o sulfamidas 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 especies de microorganismos y medios a pH diferentes como se indica en el cuadro siguiente, también se indica el grupo de inhibidores que detecta particularmente cada placa.

Grupo de inhibidores	Microorganismo	pH del medio (a 30°C)
Penicilinas y tetraciclinas	<i>Bacillus subtilis</i>	6,0
Sulfamidas	<i>Bacillus subtilis</i>	7,2
Aminoglucósidos	<i>Bacillus subtilis</i>	8,0
Macrólidos	<i>Micrococcus luteus</i>	8,0

En la placa con *B. subtilis* a pH 7,2 (a 30°C), se adiciona trimetoprima con el fin de permitir la detección de sulfamidas debido a la sinergia de ambas sustancias.

1. MEDIOS Y REACTIVOS

1.1. Solución fisiológica

Fórmula:

Cloruro de sodio p.a.	8,5 g
Agua destilada c.s.p.	1000 mL

Preparación:

Se pesó $5,0 \pm 0,1$ g de cloruro de sodio y se disolvió en agua destilada. Se llevó a volumen de 1000 mL. Se dispensó en porciones convenientes y se esterilizó en autoclave durante 15 minutos a $121 \pm 1^\circ\text{C}$.

1.2. Agar tripticasa soja (TSA)

Fórmula:

Peptona pancreática de caseína p.a.	15,0 g
Peptona papaínica de soja p.a.	5,0 g
Cloruro de sodio p.a.	5,0 g
Agar p.a.	15,0 g
Agua destilada c.s.p.	1000 mL

Preparación:

Los componentes se pesaron (al decigramo más próximo) y se disolvieron en el agua. Se llevó a volumen de 1000 mL. Se transfirió la solución a un Erlenmeyer y se calentó hasta ebullición. Se verificó el pH a 45°C y se corrigió con HCl 1N o NaOH 1N en los casos necesarios. El pH a 25°C debió ser $7,3 \pm 0,2$. Se dispensó en tubos de 10 mL y se esterilizó a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 15 minutos. Los tubos luego se inclinaron para obtener un pico de flauta de unos 10 cm.

Nota: el medio se encuentra comercialmente disponible.

1.3. Agar a pH 6 (a 30 °C)**Fórmula:**

Peptona pancreática de caseína p.a.	3,45 g
Peptona pancreática de carne p.a.	3,45 g
Cloruro de sodio p.a.	5,1 g
Agar p.a.	13,0 g
Agua destilada c.s.p.	1000 mL

Preparación:

Los componentes se pesaron (al decigramo/centigramo más cercano) y se disolvieron en el agua. Se llevó a volumen de 1000 mL. Se transfirió la solución a un Erlenmeyer y se calentó hasta ebullición. Se verificó el pH a 45°C y se corrigió con HCl 1N o NaOH 1N en los casos necesarios. El pH a 30°C debió ser $6,0 \pm 0,1$. Se dispensó y se esterilizó a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 15 minutos.

Nota: el medio se encuentra comercialmente disponible (Art. Merck 10664).

1.4. Agar a pH 7,2 (a 30°C)**Fórmula:**

Peptona pancreática de caseína p.a.	3,45 g
Peptona pancreática de carne p.a.	3,45 g
Cloruro de sodio p.a.	5,0 g
Fosfato de trisodico dodecahidratado p.a.	0,80 g
Agar p.a.	13,0 g
Agua destilada c.s.p.	1000 mL

Preparación:

Los componentes se pesaron (al decigramo/centigramo más próximo) y se disolvieron en el agua. Se llevó a volumen de 1000 mL. Se transfirió la solución a un Erlenmeyer y se calentó hasta ebullición. Se verificó el pH a 45°C y se corrigió con HCl 1N o NaOH 1N en los casos que fueron necesarios. El pH a 30°C debió ser de $7,2 \pm 0,1$. Se dispensó y se esterilizó a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 15 minutos.

Nota: el medio se encuentra comercialmente disponible (Art. Merck 15787).

1.5. Agar a pH 8 (a 30°C)**Fórmula:**

Peptona pancreática de caseína p.a.	3,45 g
Peptona pancreática de carne p.a.	3,45 g
Cloruro de sodio p.a.	5,10 g
Fosfato de trisodico dodecahidratado p.a.	2,40 g
Agar p.a.	13,0 g
Agua destilada c.s.p.	1000 mL

Preparación:

Los componentes se pesaron (al decigramo/centigramo más próximo) y se disolvieron en el agua. Se llevó a volumen de 1000 mL. Se transfirió la solución a un Erlenmeyer y se calentó hasta ebullición. Se verificó el pH a 45°C y se corrigió con HCl 1N o NaOH 1N en los casos que fueron necesarios. El pH a 30°C debió ser de $8,0 \pm 0,1$. Se dispensó y se esterilizó a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 15 minutos.

Nota: el medio se encuentra comercialmente disponible (Art. Merck 15787).

1.6. Solución de trimetoprima

Se utilizó un estándar de trimetoprima conforme a la Farmacopea Europea, es decir con un título mínimo de 98,5% p/p (Sigma T 7883 o similar).

Fórmula:

Trimetoprima p.a.	50,00 mg
Acido acético 5% v/v	5 mL
Agua destilada c.s.p.	500 mL

Preparación:

Se pesó la trimetoprima $50,0 \pm 0,1$ mg, se disolvió con la ayuda del ácido acético y se completó el volumen con el agua destilada en un matraz aforado de 500 mL (solución madre). En el momento de utilización se realizó una dilución 1/20 v/v (solución hija). Se esterilizó por filtración. La solución madre de trimetoprima se conservó en refrigeración (entre 2 a 8°C) un máximo de dos semanas.

1.7. Solución patrón de penicilina

Se disolvió una cantidad de penicilina G sódica (Sigma S6256 o similar) correspondiente a 50000 UI (aproximadamente $30,0 \pm 0,1$ mg) en un matraz de 50 mL. Se llevó 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 1/20 v/v (soluciones hijas). La solución obtenida contenía una concentración de 1 UI de penicilina por mL. La solución madre de penicilina se conservó en refrigeración (entre 2 a 8°C) un máximo de 2 días.

1.8. Solución patrón de sulfametazina

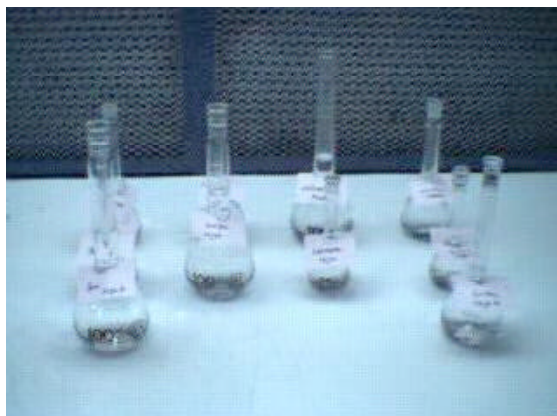
Se pesó $50,0 \pm 0,1$ mg de sulfametazina (Sigma S6256 o similar) en un matraz de 50 mL, se disolvió con 2 mL de NaOH 0,2 N. Se llevó a 50 mL con agua destilada (solución madre). En el momento de empleo se preparó una dilución 1/20 v/v (solución hija). La solución obtenida contenía una concentración de 0,05 mg de sulfametazina por mL. La solución madre de sulfametazina se conservó en refrigeración (entre 2 a 8°C) un máximo de 2 semanas.

1.9. Solución patrón de estreptomina

Se pesó una cantidad de estreptomina (Sigma S6501 o similar) correspondiente a 25000UI (aproximadamente $30,0 \pm 0,1$ mg). Se disolvió con agua destilada y se llevó a volumen en un matraz aforado de 100 mL con agua destilada (solución madre). En el momento de empleo se preparó una dilución 1/25 v/v de la solución madre. La solución obtenida contenía una concentración de 10 UI de estreptomina por mL. La solución madre de estreptomina se conservó en refrigeración (entre 2 a 8°C) un máximo de 2 semanas.

1.10. Solución patrón de eritromicina

Se pesó una cantidad de eritromicina (Sigma E6376) correspondiente a 50000 UI (aproximadamente $54,0 \pm 0,1$ mg), se disolvió con 1 mL de metanol. Se llevó a volumen con el agua destilada en un matraz aforado de 50 mL (solución madre). En el momento de empleo se diluyó la solución madre mediante dos diluciones sucesivas, 1/25 v/v y 1/50 v/v (soluciones hijas). La solución obtenida contenía una concentración 0,8 UI de eritromicina por mL. La solución madre de eritromicina se conservó en refrigeración (entre 2 a 8°C) un máximo de 2 semanas.



2. EQUIPAMIENTO Y MATERIAL.

- 2.1. Estufas de incubación a $30 \pm 1^\circ \text{C}$ y a $37 \pm 1^\circ \text{C}$
- 2.2. Congelador con temperatura igual o menor a $-18^\circ \text{C} \pm 1^\circ \text{C}$
- 2.3. Heladera comercial con temperatura entre $2 - 8^\circ \text{C}$
- 2.4. Agitador tipo vortex
- 2.5. Balanza analítica al 0,1mg
- 2.6. Sacabocados de 8 mm de diámetro
- 2.7. Bisturí
- 2.8. Ansa de rulo de cromo-níquel o acero inoxidable
- 2.9. Pinzas
- 2.10. Bandeja de acero inoxidable
- 2.11. Unidad de filtración con membrana de 0,22 micrones de poro
- 2.12. Discos de papel de filtro de 6 mm de diámetro
- 2.13. Placas de Petri de 90 mm de diámetro
- 2.14. Erlenmeyers de 125, 250 y 500 mL de capacidad
- 2.15. Matraces de 20, 25, 50, 100 y 500 mL de capacidad
- 2.16. Botella de Roux de 1000 mL de capacidad
- 2.17. Tubos de ensayo de 16 x 160 mm
- 2.18. Pipetas de 10 μL y 1, 2 y 10 mL
- 2.19. Perlas de vidrio de 3-5 mm de diámetro
- 2.20. Tubos de Eppendorf
- 2.21. *Bacillus subtilis* BGA. Ampollas de Merck (Art. 1.10649)
- 2.22. *Micrococcus luteus* ATCC 9341
- 2.23. pHmetro
- 2.24. Pipeta automática regulable de 10 a 100 μL y tips

3. METODOLOGÍA

3.1. Fortificación de muestras

Se pesó $50 \pm 0,1$ g de músculo esquelético bovino triturado y se adicionó cantidades conocidas de antibióticos y sulfamidas. Se calculó la concentración de la sustancia expresándola en μg de sustancia por g de músculo o UI por g de músculo. Se trabajó en primer lugar con un rango amplio de concentraciones para determinar el límite de detección de la técnica para cada sustancia; luego se trabajó cerca de este límite.

3.1.1. Conservación de la muestra

Las muestras fortificadas se conservaron a menos de $-18 \pm 1^\circ \text{C}$.

3.1.2. Preparación de la muestra de ensayo

Las muestras se extrajeron del congelador unos minutos antes de realizar el ensayo.

Éstas se colocaron sobre una bandeja de acero inoxidable. Mediante un sacabocados se extrajo un trozo de muestra de 8 mm de diámetro y 2 cm de largo. Con un bisturí se cortó este trozo en 8 discos de 2 mm de espesor.

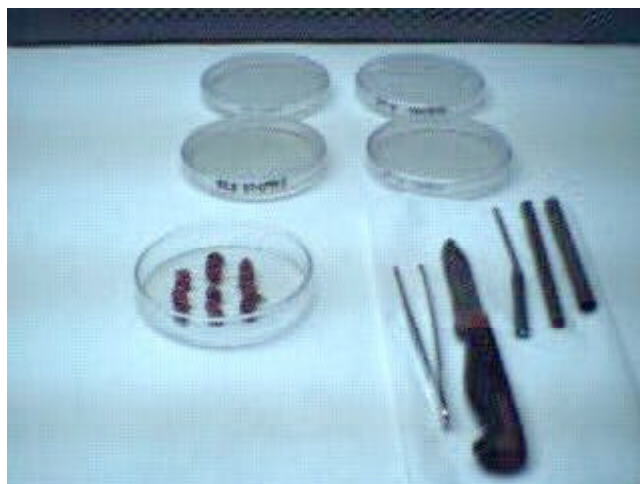
4. Procedimientos analíticos

4.1. PREPARACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS SENSIBLES Y PLACAS

4.1.1. *Bacillus subtilis*

El microorganismo utilizado *Bacillus subtilis*, se utilizó a partir de ampollas disponibles comercialmente.

Se preparó una dilución 1/10 en solución fisiológica; luego se tomó 100 μL de esta solución para preparar diluciones decimales y cuantificar el contenido de la ampolla.



4.1.1.1. Recuento de la suspensión de esporas

Se realizó el recuento de cada lote de ampollas con el fin de determinar la concentración de esporas.

- Se prepararon diluciones decimales sucesivas (hasta 10⁻¹⁰) en tubos con 9 mL de solución fisiológica.
- Se sembró por duplicado 1 mL de las diluciones 10⁻⁶ a 10⁻¹⁰ en placas con el agregado de agar TSA.
- Luego de incubar las placas a 30°C durante 24 horas, se realizaron los recuentos y se calculó la concentración de esporas por mL en la suspensión inicial.
- Se utilizó una dilución 1/10 v/v de la suspensión de esporas.

4.1.1.2. Preparación de las placas

Se prepararon placas de agar a pH 6, 7,2 y 8 (a 30°C).

- Cada medio previamente atemperado a unos 45°C se inoculó con la suspensión de esporas de manera de obtener una concentración de 10⁴ esporas por mL de medio.
- Cada medio se distribuyó en placas de Petri a razón de 11 mL por placa de manera de obtener un espesor de agar de 2 mm. Las placas debieron permanecer en una superficie horizontal hasta que el agar se solidificó.
- Si las placas no son utilizadas en el mismo día, se conservarán en refrigeración (entre 2 a 8°C) hasta una semana.
- En el caso de la placa de pH 7,2 (a 30°C) se agregó la solución de trimetoprima estéril de manera de obtener una concentración final de 1%(v/v).

4.1.2. *Micrococcus luteus*

El microorganismo utilizado es *Micrococcus luteus* ATCC 9341

4.1.2.1 Cultivos de reserva

Se realizó una siembra por estría en un tubo con agar TSA.

Se incubó a 37 ± 1°C durante 24 horas.

Estos cultivos se almacenaron en refrigeración (entre 2 a 8°C) y son repicados una vez al mes.

4.1.2.2. Preparación de la suspensión de microorganismos.

Se realizaron 2 repiques sucesivos de *M. luteus* a partir de un cultivo de reserva.

Los tubos se incubaron a 37 ± 1°C durante 24 horas.

Se cosechó el cultivo del último repique con la ayuda de unas perlas de vidrio y 2 mL de solución fisiológica.

El cultivo en forma de suspensión se distribuyó sobre la superficie de agar TSA (200 mL) contenido en un frasco de Roux.

El cultivo se incubó a 37 ± 1,0°C durante 24 horas.

El cultivo se cosechó con la ayuda de unas 20 perlas de vidrio y 10 ml de solución fisiológica.

Se llevó a 50 mL con solución fisiológica.

Esta suspensión se conservó en refrigeración (entre 2 a 8°C) hasta 1 mes.

4.1.2.3. Recuento de la suspensión de microorganismos.

Se realizó el recuento de cada suspensión preparada con el fin de determinar la concentración de microorganismos de cada lote.

- Se prepararon diluciones decimales sucesivas (hasta 10⁻¹⁰) en tubos con 9 mL de solución fisiológica.
- Se sembró por duplicado 1 mL de las diluciones 10⁻⁶ a 10⁻¹⁰ en placas con el agregado de agar TSA.
- Se incubaron las placas a 37 ± 1°C durante 24 horas, luego se realizaron los recuentos y se calculó la concentración de microorganismos por mL en la suspensión inicial.
- La suspensión inicial se diluyó a fin de obtener una concentración de 10⁶ microorganismos por mL.
- Esta dilución luego se fraccionó en tubos Eppendorf a razón de 1,2 mL por tubo u otro volumen conveniente.
- La suspensión así fraccionada se conservó en congelación (a - 18 ± 1°C) durante 1 año como máximo.

4.1.2.4. Preparación de las placas.

- El medio a pH 8 (a 30°C) previamente se atemperó a unos 45°C se inoculó con 1 mL de la suspensión de *M.luteus* cada 100 mL de medio.
- El medio se distribuyó en placas de Petri a razón de 11 mL por placa de manera de obtener un espesor del agar de 2 mm. Las placas debieron permanecer en una superficie horizontal para permitir que el agar solidifique.
- Si las placas no eran utilizadas en el mismo día, se conservaron en refrigeración (entre 2 a 8°C) hasta una semana.

4.2. TÉCNICA DE DIFUSIÓN

4.2.1. En cada una de las 4 placas se colocaron dos discos de cada muestra, a una distancia de 1 cm del borde de la placa. En cada placa se pueden colocar hasta 6 discos (correspondientes a 3 muestras).

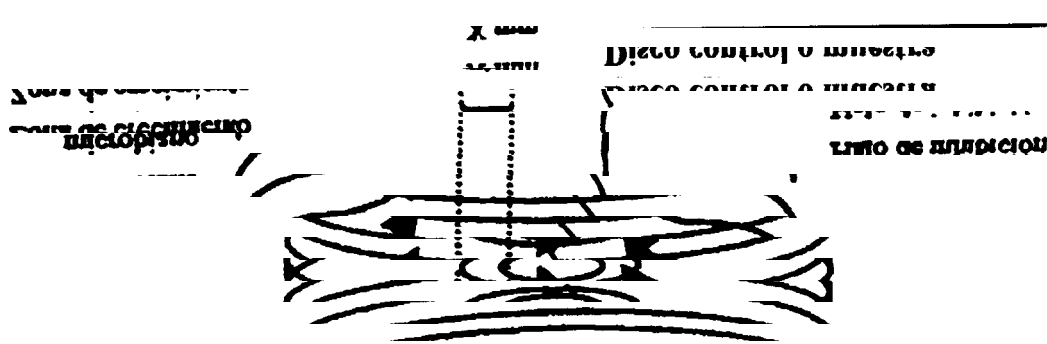
4.2.2. En cada una de las placas se colocó un disco control con la sustancia inhibidora y concentración que figuran en el cuadro.

4.2.3. Las placas se incubaron durante los tiempos y las temperaturas que figuran en el cuadro.

Microorganismo	pH del medio (a 30°C)	Disco control (sustancia: volumen que se coloca sobre el disco por la concentración de la solución =cantidad final en el disco)	Temperatura de incubación (± 1°C)	Tiempo de Incubación
<i>B. subtilis</i>	6	Penicilina: 10µL x 1UI/mL =0,01 UI	30 °C	18 horas
<i>B. subtilis</i>	7,2	Sulfametazina: 10 µL x 0,05 mg/mL = 0,5 µg	30°C	18 horas
<i>B. subtilis</i>	8	Estreptomicina: 10 µL x 10 UI/mL = 0,1 UI	30°C	18 horas
<i>M. luteus</i>	8	Eritromicina: 10 µL x 0,8 UI/mL = 0,008 UI	37°C	24 horas

4.2.4. Lectura de los discos control: Luego de la incubación los discos deberían presentar una zona de inhibición (desde el borde del disco hasta el borde de la zona de inhibición) de al menos 6 mm.

4.2.5. Lectura de las placas: En cada una de las placas se verificó si existe una zona de inhibición alrededor de las muestras. Se consideró un resultado positivo si esta zona es mayor o igual a 2 mm medidos desde el borde de la muestra hasta el borde de la zona de inhibición. Si el resultado es ambiguo, por ejemplo al observarse colonias esparcidas en la zona de inhibición, el ensayo es repetido; si en la repetición no se observa un resultado positivo unívoco, la muestra en la placa correspondiente es considerada negativa. Los dos discos pertenecientes a la misma muestra deben presentar el mismo resultado. El desarrollo de colonias individuales dentro de la zona de inhibición no fue considerado. Si la contaminación bacteriana de la muestra influyó la lectura del resultado el ensayo se repitió.



4.2.6. Resultado final: Se consideró una muestra positiva para la presencia de residuos de antibióticos y/o sulfamidas si se obtuvo un resultado positivo en alguna de las cuatro placas.

5. EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Si se obtuvo un resultado negativo en la planilla de los resultados se informa con un signo negativo (-); si se obtuvo un resultado positivo se informa con un signo positivo (+).

6. PUNTOS CRITICOS DE CONTROL CONSIDERADOS EN EL ENSAYO

6.1. Verificación de placas con soluciones patrones.

En cada una de las placas que se utilizó se sembraron discos con una determinada cantidad de solución testigo. Luego de la incubación de las placas, se verificó la zona de inhibición de los discos.

6.2. Tiempos de duración de las placas y de las soluciones.

Se registraron las fechas de preparación y las fechas de vencimiento sobre bolsas que contienen las placas y sobre los frascos que contienen las soluciones.

7. COSTE DEL ENSAYO

Se considera que por placa se realizan 3 muestras.

a) Drogas y otros insumos: (los precios se encuentran en \$ argentinos)

Insumo	Observación	Consumo	Coste insumo	Coste (\$)
Triptona	150 mL para 10 muestras	0,2 g	0,11 \$/g	0,02
Peptona		0,2 g	0,12 \$/u	0,02
Agar		0,78 g	0,18 \$/u	0,14
Placas		4 u	0,09 \$/u	0,36
Discos sin carga		4 u	0,08 \$/u	0,32
Trimetoprima	1 preparación para 10 muestras	0,005 g	21,00 \$/g	0,11
Penicilina	1 preparación para 10 muestras	5000 UI	0,00 \$/u	0,01
Sulfametazina	1 preparación para 10 muestras	0,005 g	1,38 \$/g	0,01
Estreptomina	1 preparación para 10 muestras	0,003 g	1,51 \$/g	0,00
Eritromicina	1 preparación para 10 muestras	0,0054 g	11,64 \$/g	0,06
<i>Bacillus subtilis</i>	10 ⁴ / mL; 150 mL * 4placas (para 10 muestras) Se usa: 600000 esporas: 0,06 mL Cada ampolla contiene: 10 ⁷ esporas / mL	0,06 mL	27,00 \$/u	1,62
Tips amarillos	4 / 10 muestras	0,4 u	0,01 \$/u	0,01

Total insumos ▶ \$ 2,68

b) Personal

Tarea	minutos/muestra
Preparación de medios para 10 placas	12
Preparación soluciones madres e hijas para 10 placas	4
Largada + lectura	18

Total personal ▶ 28 minutos/muestra

c) Equipamiento

Sin tener en cuenta la amortización del aparato

Equipo	Tiempo de uso
Autoclave	1 hora/ 50 muestras
Estufa 37°C	1 día
Estufa 30°C	1 día

Resultados

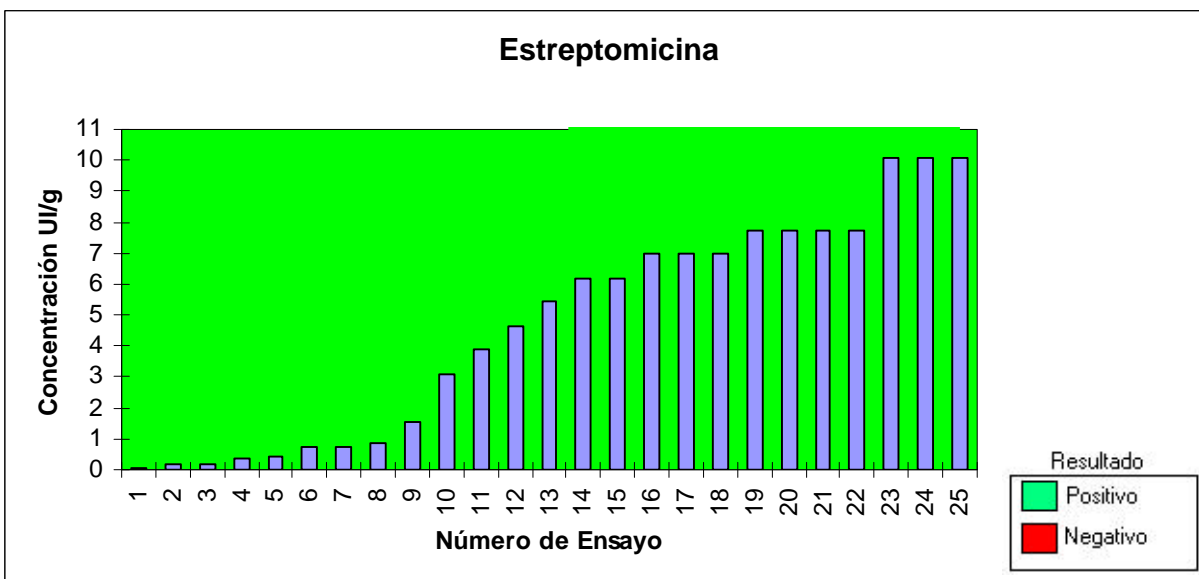
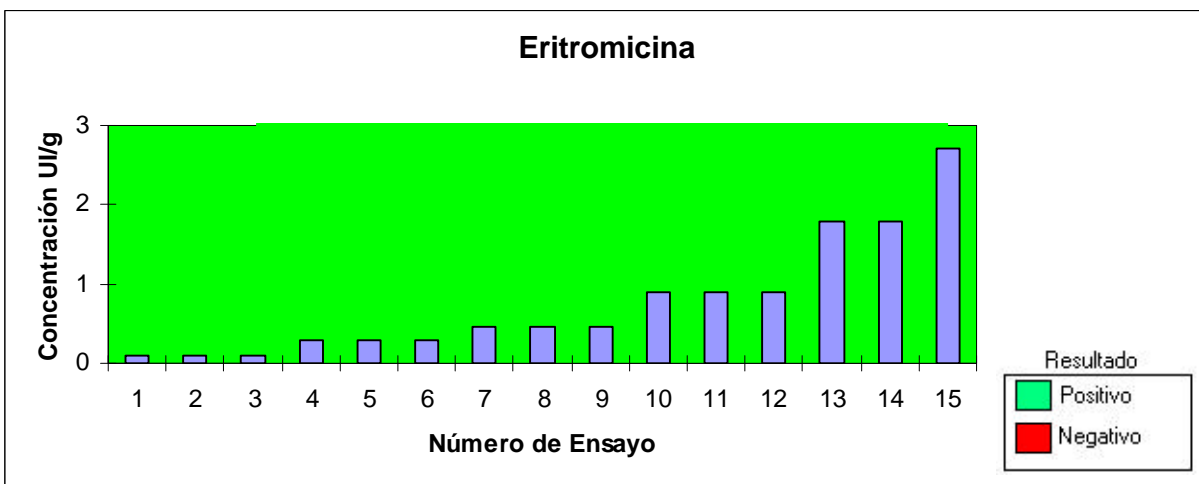
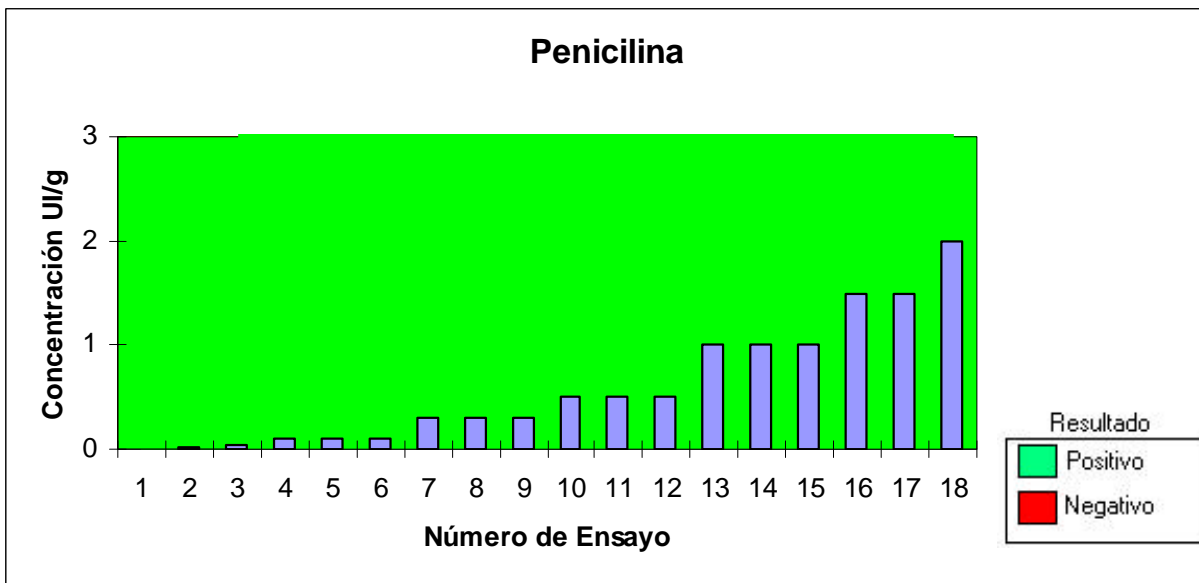
En la siguiente tabla figuran los resultados obtenidos en los ensayos realizados con el detalle de la sustancia con la cual se fortificó, la concentración de esta sustancia en la muestra, el volumen de solución incluido en la muestra y la concentración de la solución utilizada, el resultado final obtenido. Los resultados se encuentran ordenados por sustancia y orden creciente de concentración en la muestra.

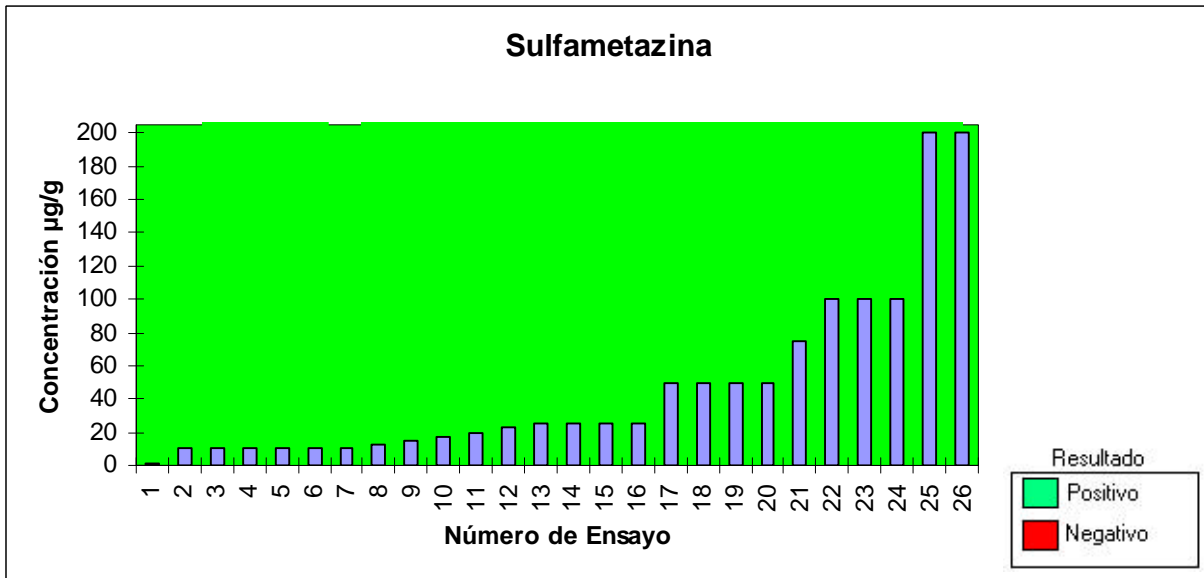
Las unidades que se utilizaron en la concentración de la muestra fueron las dispuestas en la técnica.

Con fines prácticos se asignaron los números de ensayo, en relación a la concentración del patrón en la muestra. No significa que sea el orden en que se efectuaron las determinaciones.

Patrón	Nº de ensayo	Concentración del patrón en la muestra	Peso de la muestra	Fortificación (mL de solución x concentración de la misma)	Resultado final
Penicilina	1	0,01 UI/g	50 g	0,5 mL x 1 UI/mL	-
Penicilina	2	0,02 UI/g	50 g	1 mL x 1 UI/mL	-
Penicilina	3	0,05 UI/g	50 g	2,5 mL x 1 UI/mL	-
Penicilina	4	0,1 UI/g	50 g	0,25 mL x 20 UI/mL	+
Penicilina	5	0,1 UI/g	50 g	0,25 mL x 20 UI/mL	+
Penicilina	6	0,1 UI/g	50 g	0,25 mL x 20 UI/mL	+
Penicilina	7	0,3 UI/g	50 g	0,75 mL x 20 UI/mL	+
Penicilina	8	0,3 UI/g	50 g	0,75 mL x 20 UI/mL	+
Penicilina	9	0,3 UI/g	50 g	0,75 mL x 20 UI/mL	+
Penicilina	10	0,5 UI/g	50 g	1,25 mL x 20 UI/mL	+
Penicilina	11	0,5 UI/g	50 g	1,25 mL x 20 UI/mL	+
Penicilina	12	0,5 UI/g	50 g	1,25 mL x 20 UI/mL	+
Penicilina	13	1 UI/g	50 g	2,5 mL x 20 UI/mL	+
Penicilina	14	1 UI/g	50 g	2,5 mL x 20 UI/mL	+
Penicilina	15	1 UI/g	50 g	2,5 mL x 20 UI/mL	+
Penicilina	16	1,5 UI/g	50 g	3,75 mL x 20 UI/mL	+
Penicilina	17	1,5 UI/g	50 g	3,75 mL x 20 UI/mL	+
Penicilina	18	2 UI/g	50 g	2 mL x 20 UI/mL	+
Patrón	Nº de ensayo	Concentración del patrón en la muestra	Peso de la muestra	Fortificación (mL de solución x concentración de la misma)	Resultado final
Eritromicina	1	0,09 UI/g	50 g	0,12 mL x 43,2 µg/mL	-
Eritromicina	2	0,09 UI/g	50 g	0,12 mL x 43,2 µg/mL	-
Eritromicina	3	0,09 UI/g	50 g	0,12 mL x 43,2 µg/mL	-
Eritromicina	4	0,28 UI/g	50 g	0,35 mL x 43,2 µg/mL	+
Eritromicina	5	0,28 UI/g	50 g	0,35 mL x 43,2 µg/mL	+
Eritromicina	6	0,28 UI/g	50 g	0,35 mL x 43,2 µg/mL	+
Eritromicina	7	0,47 UI/g	50 g	0,58 mL x 43,2 µg/mL	+
Eritromicina	8	0,47 UI/g	50 g	0,58 mL x 43,2 µg/mL	+
Eritromicina	9	0,47 UI/g	50 g	0,58 mL x 43,2 µg/mL	+
Eritromicina	10	0,9 UI/g	50 g	1,15 mL x 43,2 µg/mL	+

Con éstos datos se realizaron los siguientes gráficos:





La siguiente tabla muestra los resultados de las lecturas de las placas. Nota: el (*) significa que se obtuvo sólo una inhibición parcial en la placa.

Nº de ensayo	Resultado de la lectura de placas (mm)				Resultado de discos de control (mm)				Resultado final / Observaciones
	BS 6	BS 7,2	BS 8	ML 8	Penicilina BS-6	Sulfameta-zina BS-7,2	Estrepto-micina BS-8	Eritromi-cina ML-8	
Penicilina									
1	0/0	0/0	0/0	0/0	9		6	6	-
2	0/0	0/0	0/0	0/0	9		5,5	6	-
3	0/0	0/0	0/0	0/0	9		6	6	-
4	5/5	3/4	3/3	3/3	7		5,5		+
5	6/5	4/3	3/2	5/2	7			6	+
6	4/5	3/2	3/3	3/2*	6			7	+
7	9/9	5/4	4/3	8/8	7		6		+
8	9/9	7/8	6/6	7/7	9			7	+
9	8/8	6/6	4/4	8/10	6			7	+
10	12/10	7/7	6/5	9/9	7		6		+
11	9/10	8/10	8/6	10/10	7			6	+
12	10/11	9/9	7/7	11/12	9			7	+
13	12/12	8/8	6/7	8/10	9		6	6	+
14	10/11	8/9	7/8	11/14	9			7	+
15	10/11	8/9	7/7	10/9	6			7	+
16	14/14	8/9	9/9	8/10	9		6	6	+
17	11/13	9/11	10/10	11/14	7			6	+
18	15/15	10/8	10/10	11/11	9		6	6	+ + En BS-6 el halo fue mayor a 15
Eritromi-cina									
1	0/0	0/0	0/0	0/0			6	6	-
2	0/0	0/0	0/0	0/0	9			7,5	-
3	0/0	0/0	0/0	0/0	6			6	-
4	0/0	0/0	0/0	2/3			6	6	+
5	0/0	0/0	0/0	4/4	9			7	+
6	0/0	0/0	0/0	2/2	9			7,5	+
7	0/0	0/0	2/3	4/5			6	6	+
8	0/0	0/0	0/0	9/8	9			7	+
9	0/0	0/0	3/3	8/8	6			6	+
10	0/0	2/2	5/6	8/8	9		6	5,5	+
11	0/0	4/0	5/9	10/9	9			7	+
12	0/0	3/5	6/6	9/9	9			7,5	+
13	0/0	3/4	7/7	11/11	9		6	5,5	+
14	0/0	3/4	7/8	11/12	6			6	+
15	0/0	4/4	6/8	12/12	9		6	5,5	+
Estrepto-micina									
1	0/0	0/0	0/0	0/0	9		5,5	6	-
2	0/0	0/0	0/0	0/0	9		5,5	6	-
3	0/0	0/0	0/0	0/0	9		5,5	6	-
4	0/0	0/0	0/0	0/0	9	2	5,5	6	-

Discusión

Actualmente en zootecnia se utilizan medicamentos de uso veterinario con fines no sólo terapéuticos, sino también en gran medida profilácticos y económicos (por ejemplo: acelerar el crecimiento animal o el tiempo de engorde). Los residuos de estos productos son ingeridos por los seres humanos con los alimentos, aunque en cantidades bajas de modo continuo. Un consumo constante de antibióticos es un riesgo para la salud humana, porque como consecuencia de la ingestión constante de pequeñas dosis pueden desarrollarse resistencias y también reacciones alérgicas.

Al buscar bibliografía sobre el tema, se hace muy evidente que gran parte de los estudios de antibióticos presentes en los alimentos se realizaron en leche y esto se debe principalmente a un interés netamente económico debido a que la presencia de antibióticos es un factor que afecta a la tecnología, interfiriendo con el crecimiento de los cultivos iniciadores que se utilizan en la fabricación de yogurt, requesón y otros quesos.

Discusión de los resultados obtenidos en los ensayos:

En algunos casos se comenzó a trabajar con concentraciones bajas de patrones, que no eran detectadas, por lo que se realizaron nuevos ensayos en los que se trabajó con concentraciones mayores. En otros casos se comenzó a trabajar con concentraciones que eran detectadas, por lo tanto se redujo el nivel de concentración hasta llegar al límite de detección.

En los primeros ensayos no se realizaron los controles de sulfametazina y estreptomina ya que aún no contábamos con estos patrones.

En el caso de la sulfametazina no se logró obtener una zona de inhibición completa de 6 mm alrededor del disco control en repetidos ensayos; si se obtuvo una zona de inhibición parcial mayor a 6 mm con bordes definidos. En los primeros ensayos se consideró para los discos control la zona de inhibición completa; luego de observar la presencia de estas zonas de inhibición parciales se consideró como resultado positivo cuando se observaba una zona de inhibición parcial.

Lo mismo ocurrió con las zonas de inhibición obtenidas con las muestras fortificadas con sulfametazina, en algunos ensayos la zona de inhibición era completa y en otros parcial.

Al acercarnos al límite de detección se obtuvieron en algunos casos para un mismo nivel de fortificación resultados negativos y positivos.

Con estos ensayos de familiarización el laboratorio logró la habilitación ante SENASA, de la determinación de residuos de antibióticos mediante el método de las cuatro placas, para el control de frigoríficos faenadores que exportan a la Unión Europea.

El método fue:

- eficaz en función del costo dado que se emplearon reactivos e instrumentos y equipos disponibles en el laboratorio; a pesar de que requiere abundante mano de obra.
- sencillo ya que se aplicaron procedimientos mecánicos u operacionales claros y simples desde el principio hasta el final.
- eficiente debido a la capacidad para analizar simultáneamente un conjunto de muestras. Esta característica reduce el tiempo necesario para el análisis de las muestras. Esto es importante cuando se debe analizar un gran número de muestras en un plazo fijo breve.

Este método también podría llegar a ser utilizado en situaciones en que no se puede establecer ni existe un LMR, y se podrían adoptar medidas reglamentarias en caso de que se encontrara cualquier cantidad de residuo de medicamentos.

Si bien hasta el momento se utiliza el método de 4 placas la UE está recomendando la utilización del método de 5 placas para la detección de residuos antibacterianos (ver: Anexo III, comparación entre el método de 4 placas y el de 5 placas).

Las técnicas microbiológicas como el método de las cuatro placas no alcanzan la sensibilidad de los métodos cuantitativos; sin embargo, son de gran utilidad debido a la baja incidencia de residuos de sustancias inhibitoras en carnes y al hecho de que permiten el análisis de una gran cantidad de muestras a un bajo costo.

Anexo I: Referencias

- Anónimo. Residuos de medicamentos de uso veterinario. (Información otorgada por el Centro de Información y Documentación del SENASA el 3/8/03). www.euskadi.net/sanidad/publicaciones/datos/vigila9516.pdf
- Belitz H. D., Grosch W. Química de los alimentos. 2ª edición. Zaragoza: Editorial Acribia, 1997: 489, 523-528, 659.
- Blood D. C., Studdert V. P. Diccionario de veterinaria. México D. F.: Editorial Interoamericana McGraw-Hill, 1994: 75, 76, 373, 402, 818, 1025, 1087.
- Bogaerts R., Wolf F. «A standardized method for the detection of residues of anti-bacterial substances in fresh meat». *Fleischwirtsch* 1980; N° 60 (4): 671-673.
- Bogaerts R., Wolf F. «Une méthode standardisée de recherche des résidus de substances antimicrobiennes dans la viande fraîche». *Fleischwirtsch* 1980; N° 60 (4): 674-675.
- Brock T. D., Madigan M. T. Microbiología. 6ª edición. México D. F.: Editorial Prentice Hall Hispanoamericana, 1993: 15, 177, 178, 180, 182, 251, 253, 274, 276, 360, 361, 363-394, 423, 447-453, 513-515, 544, 839, 855, 856.
- Cancho Grande B., García Falcón M. S., Simal Gándara J. El uso de los antibióticos en la alimentación animal: perspectiva actual, *Cienc. Tecnol. Aliment.* 2000; Vol. 3, N°1: 39-47. www.uvigo.es/webs/altaga/default/cyta/cyta-3-2000-39-47.pdt
- Cercos A. P. El uso no médico de los antibióticos. Buenos Aires: Editorial Albatros. 1985:45-48, 55-65, 73-106.
- Codex Alimentarius. Residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos. 2ª edición. Volumen 3. Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación, Organización Mundial de la Salud Roma, 1993: 3-74.
- Chefftel J. C., Chefftel H. Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos. Zaragoza: Editorial Acribia, 1992: 160, 161, 252.
- Decreto N°4238/68. Reglamento de inspección de productos, subproductos y derivados de origen animal. Secretaría de Agricultura y Ganadería, Servicio Nacional de Sanidad Animal. Buenos Aires, 1984: 11.
- Derache R., «*et al.*». Toxicología y seguridad de los alimentos. Barcelona: Editorial Omega, 1990: 326-329.
- Doyle M.P., Beuchat L.R., Montville T.J. Microbiología de los alimentos, fundamentos y fronteras. Zaragoza: Editorial Acribia, 2001.
- Dyce K.M., Shack W.O., Wensing C.J.G. Anatomía Veterinaria. 2ª edición. México D.F.: Editorial McGraw-Hill Interamericana, 2002: 23.
- Ernstlinder. Toxicología de los alimentos. Zaragoza: Editorial Acribia, 1978.
- Fehlhaber K., Janetschke P. Higiene veterinaria de los alimentos. Zaragoza: Editorial Acribia, 1995: 104, 105.
- Fennema O. W., «*et al.*». Química de los Alimentos. Zaragoza: Editorial Acribia, 1993: 735-737.
- Fernández Suárez A. Residuos de medicamentos veterinarios en alimentos de origen animal. Énfasis alimentación. Año IX, N°1 febrero-marzo 2003: 40-47.
- Frazier W. C., Westhoff D. C. Microbiología de los Alimentos. 4ª edición. Zaragoza: Editorial Acribia, 1993: 206-208.
- Frimmer M. Farmacología y toxicología veterinaria. Zaragoza: Editorial Acribia, 1973: 60-63.
- Froger C. «Detection des residus d'antibiotiques et sulfamides dans le muscle methode des quatre boites». Centre National d'études vétérinaires et alimentaires. (Document: UCM 90/01) 1990: 2-17.
- Fuselier R. «Star muscle screening test for antibiotic residues in muscle». Agence française de securite sanitaire des aliments 2000: 1-14.
- Gatica C., Gesche E. Método de 5 placas para la detección de residuos de antibacterianos en la leche. Poster presentado en el VII Congreso Latinoamericano de Microbiología e Higiene de los Alimentos 2002.
- Gesche E., Emilfork C. Residuos de antimicrobianos en canales de vacas. Archivos de medicina veterinaria. Instituto de medicina preventiva veterinaria. Universidad Austral de Chile, Valdivia 1998; V.30 N°2.: 1-8. www.scielo.cl
- González Silvano S. Antibióticos. En: Silvestre, A. A. Toxicología de los alimentos, Buenos Aires: Editorial Hemisferio Sur, 1995: 391-398.

- Gudding R. «An improved bacteriological method for the detection of sulfonamide residues in food». Acta Veterinaria Scandinavica 1976; N°17: 458-464.
- Heesch W. Antibióticos, sulfonamidas y agentes antimicrobianos en leche. Entro de Investigaciones Tecnológicas de la Industria Láctea del Sistema INTI 1999; N°31: 29-47.
- Lawrie R.A. Ciencia de la carne. Zaragoza: Editorial Acribia, 1967: 181-183, 273-278.
- Litter M. Compendio de Farmacología. 4ª edición. Buenos Aires: Editorial Ateneo, 1992: 50, 756-759.
- Loor J.J., Jones G.M. Prevención de los residuos de medicamentos en la leche y vacas de entresaque. Virginia Cooperative Extension - Guías del ordeño 2001; N°404-403: 1-3.
www.ext.vt.edu/pubs/dairy/404-403/404-403w.pdf
- Lubert Stryer. Bioquímica. 4ª edición. Barcelona: Editorial Reverté, 1995: 201-204, 902, 903.
- McMurry J. Química Orgánica. 3ª edición. México D. F.: Editorial Iberoamericana, 1992: 309.
- Ministerio y Sanidad de Consumo. Información de medicamentos. Tomo I. Madrid: Editorial Einsa, 1989.
- Multon J. L., «et al.». Aditivos y auxiliares de fabricación en las industrias agroalimentarias. 2ª edición. Zaragoza: Editorial Acribia, 2000: 148, 149, 628.
- Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación. Residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos. Informe de una consulta de expertos FAO/OMS Roma 1984; N° 32: 37-53.
- Pérez de Ciriza J. A., Huarte A., Saiz I., Ozcáriz M. T., Purroy M.T. Residuos de sustancias inhibitoras en carnes. Navarra: Anales del sistema sanitario de Navarra: 1-9.
(Información otorgada por el Centro de Información y Documentación del SENASA el 3/8/03).
www.cfnararra.es/salud/anales/textos/vol22/suple3/suple26.html
- Price J.F., Schweigert B.S. Ciencia de la carne y de los productos cárnicos. Zaragoza: Editorial Acribia, 1976.
- Ranken M. D. Manual de Industrias de los alimentos. 2ª edición. Zaragoza: Editorial Acribia, 1993: 5.
- Rey A. M., Silvestre A. A. Comer sin riesgo 2. Las enfermedades transmitidas por alimentos. Buenos Aires: Editorial Hemisferio Sur, 2001: 235-242.
- Sanz Egaña C. Enciclopedia de la carne. 2ª edición. Madrid: Espasa calpe, 1967: 423-424.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación. Plan anual 2004 de Residuos y Toxinas en alimentos de origen animal: 1-5.
- Sumano López H. Farmacología clínica en bovinos. México D. F.: Editorial Trillas, 1996: 220-223, 371-395.
- Tessi M.A., Salsi M.S., Gasparotti F., Moguilevsky M.A. Factores de resistencia a los antibióticos y sulfamidas de cepas de *Salmonella spp.* y *Escherichia coli* aisladas de canales de pollo. La industria cárnica Latinoamericana. Año 27, N° 96 Junio 1994: 36-44.
- The International Commission on Microbiological Specifications for Foods. «Microbial ecology of foods». Volume I. Orlando: Academic Press, 1980: 160-169.
- Trolldenier H. Antibióticos en medicina veterinaria. Zaragoza: Editorial Acribia, 1980: 33-44, 95-98, 108, 109, 115-118, 124, 206-208.
- van Schothorst M. «Nachweis und identifizierung einiger antibiotika bei schlachttieren». Die Fleischwirtschaft 1970; N°8: 1085-1087.
- Voet D., Voet J.G. Bioquímica. Barcelona: Editorial Omega, 1992: 524, 525, 997, 998.

Anexo II: Glosario de Términos

actinomiceto (*actinomycete*) hongos con forma alargada, con células filamentosas y con tendencia a ramificarse.

aminoglucósido cualquiera de un grupo de antibióticos bacterianos derivados de diversas especies de *Streptomyces*, que interfieren la función de los ribosomas bacterianos. **análisis cualitativo** revela la presencia o la identidad química de los analitos.

análisis cuantitativo proporciona la cantidad, en términos numéricos, de uno o más analitos.

analito componente de la muestra.

antibiótico agente químico producido por un organismo que es dañino para otros organismos.

anticuerpo proteína que existe en el suero o en otro fluido orgánico que se combina específicamente con un antígeno.

antígeno sustancia, usualmente macromolecular, que induce la formación de anticuerpos específicos.

antropogénico derivan del hombre. Puede ser de tipo intencional o accidental.

Bacillus género de bacterias aerobias, gram-positivas, formadoras de esporas.

Gram, método de tinción de bacterias con cristal violeta, tratadas con una solución de yodo fuerte, decoloradas con etanol o con etanol-acetona y teñidas posteriormente con un colorante de contraste que suele ser la safranina. El yodo altera la estructura de la pared celular en las bacterias gram-positivas de tal forma que el cristal violeta queda atrapado en la célula. Los organismos que retienen la tinción cristal violeta son de color púrpura fuerte y se clasifican como gram-positivos y aquellos que pierden esta tinción se clasifican como gram-negativos, siendo de color rojo.

gram-negativo dicese de las bacterias que pierden la coloración cristal violeta debido a la decoloración con alcohol en el método de tinción de Gram. Las bacterias gram-negativas presentan una pared celular de composición química más compleja que las bacterias gram-positivas.

gram-positivo dicese de las bacterias que retienen la tinción cristal violeta, es decir resistentes a la decoloración por alcohol en el método de tinción de Gram, una característica de las bacterias cuyas paredes celulares están compuestas por péptidoglicano y ácido teicóico.

bactericida capaz de matar bacterias.

bacteriostático capaz de inhibir el crecimiento bacteriano sin matar a las bacterias.

clostridio nombre común de un género de bacterias que se caracterizan por producir esporas terminales que deforman los bacilos. Son anaerobias. Estos microorganismos son importantes por los daños que pueden provocar en las personas y por los beneficios económicos que reportan. Algunas especies producen las toxinas más potentes que se conocen.

colorante azoico compuesto estable y fuertemente coloreado que deriva de la mezcla de compuestos de diazonio (compuesto orgánico que contiene un grupo de dos átomos de nitrógeno unidos entre sí) con una disolución de fenol o una amina aromática. Las dos moléculas se acoplan formando una molécula grande en la que los dos núcleos aromáticos están unidos por un grupo diazo -N=N-.

crianza intensiva supone la concentración de un gran número de animales en pequeños corrales o jaulas, alimentándolos con piensos enriquecidos, estimulando su crecimiento por diferentes medios e inmunizándolos para protegerlos de las enfermedades.

dermatosis cualquier trastorno cutáneo, especialmente aquél que no se caracteriza por inflamación.

Escherichia género ampliamente distribuido de bacterias gram-negativas de la familia Enterobacteriaceae.

edema de Quincke síndrome que implica la piel y los tejidos subcutáneos y submucosos que se presentan esporádicamente pero que también tiene un carácter hereditario. Se caracteriza por la aparición de inflamaciones indoloras circunscritas en la cara, lengua, pies, genitales y tronco, parecidas a una urticaria, que persisten 2 o 3 días y luego desaparecen.

enterococos grupo de streptococos. Incluye bacterias que se parecen al *Streptococcus faecalis*.

eritromicina antibiótico de amplio espectro producido por una cepa de *Streptomyces erythreus*.

espectrometría de masas utiliza un aparato que convierte moléculas en iones, y que separa estos iones en función de su proporción de masa y carga. Los espectrómetros de masas se utilizan para identificar átomos e isótopos, y determinar la composición química de una muestra.

espiroqueta bacteria muy enrollada; término general que se aplica a cualquier organismo del orden Spirochaetales, que abarca a los organismos causantes de la sífilis humana, de la espiroquetosis aviar y del conejo.

espora término general para las estructuras latentes resistentes, formadas por muchas bacterias y hongos.

estafilococo (*staphylococcus*) cualquier microorganismo del género *Staphylococcus*.

estreptococos bacterias del género *Streptococcus*.

estreptomomicina es uno de los antibióticos aminoglicósidos más antiguos. Debido a su uso muy extendido, muchas bacterias gram-negativas, previamente susceptibles, han desarrollado resistencia y han perdido mucha de su efectividad y popularidad.

familiarización serie de ensayos repetidos que permiten al técnico/laboratorista adquirir confianza en el seguimiento de una técnica.

fortificación agregado de concentraciones conocidas del elemento a analizar en la muestra.

frasco de Roux frasco de vidrio aplanado con boca ancha.

hapteno molécula orgánica o inorgánica de bajo peso molecular que, no siendo antigénica por sí misma, sí lo es al unirse a una proteína transportadora.

higroscópico que retiene fácilmente la humedad.

hipersensibilidad estado de reactividad alterada inmunitaria en el que el cuerpo reacciona con una respuesta exagerada a un agente extraño. Alergia es un sinónimo de hipersensibilidad.

in vitro en vidrio, en cultivo.

in vivo en el cuerpo, en un organismo vivo.

inocuidad calidad de inocuo. Véase inocuo.

inocuo no nocivo.

insulina hormona segregada por el páncreas.

límite de detección es la menor concentración medida de un analito de la que es posible deducir, con una certeza aceptable, la presencia de éste en la muestra objeto de ensayo.

macrólido antibióticos con varios anillos lactónicos formando parte de sus moléculas, por ejemplo, eritromicina, espiramicina, tilosina.

membrana semipermeable capa fina que permite el paso de algunas sustancias y no de otras.

meningococos agentes responsables de la meningitis.

metabolismo suma de procesos físicos y químicos por los cuales se construye y mantiene la sustancia viva organizado, y por el que las macromoléculas se rompen en moléculas más pequeñas, aportando energía al organismo.

metabolito cualquier sustancia producida durante el metabolismo. Véase metabolismo.

Micrococcus género de bacterias gram-positivas de la familia Micrococcaceae, que se encuentran en el suelo, agua, etc.

microcristalino constituido por cristales minúsculos.

morbilidad incidencia de la enfermedad en una población, incluyendo los casos fatales y no fatales.

mortalidad incidencia de muertes en una población.

muestras fortificadas muestras que contiene concentraciones conocidas del elemento analizado.

músculo esquelético órgano formado por fibras cuya contracción produce el movimiento y asegura la resistencia a las fuerzas exteriores. También denominado: estriado, somático o voluntario. Es la carne de la carnicería.

neomicina antibiótico de amplio espectro producido por *Streptomyces fradiae*, empleado como antiséptico intestinal y en el tratamiento de infecciones sistémicas debidas a bacterias gram-negativas.

parenteral por otra vía distinta a la alimentaria, por ejemplo, por inyección subcutánea.

penicilina cualquier antibiótico de los pertenecientes a un gran grupo de sustancias antibacterianas naturales o semisintéticas, que derivan, directa o indirectamente, de cepa de hongos del género *Penicillium* y otros hongos del suelo, cultivados en medios especiales.

péptido cualquier tipo de compuesto de bajo peso molecular que da dos o más aminoácidos en su hidrólisis.

peptidoglicano glicano (polisacárido) unido a péptidos entrecruzado de pequeño tamaño; se encuentra en la pared celular de las bacterias.

pienso porción de alimento seco que se da a diario al animal.

profilaxis prevención de la enfermedad; tratamiento preventivo.

prurito enfermedad cutánea que causa picor. El prurito es enteramente epidérmico en origen y no ocurre en ulceraciones profundas, aunque puede ser doloroso. Es más intenso en las uniones mucocutáneas.

Pseudomonas género de bacterias gram-negativas estrictamente anaerobias, algunas de cuyas especies son patógenas para plantas y vertebrados.

requesón masa de leche cuajada.

residuo de medicamentos veterinarios incluyen los compuestos de origen y/o sus metabolitos presentes en cualquier porción comestible de un producto animal, así como los residuos de impurezas relacionados con el medicamento veterinario correspondiente.

Rickettsia género de pequeños microorganismos, entre redondos y rhabdiformes, de la familia Rickettsiaceae. Son verdaderas bacterias, gram-negativas.

shock o **choque** en fisiología, situación de insuficiencia circulatoria aguda de la sangre. Es el resultado de la incapacidad del corazón de bombear un volumen adecuado de sangre a la presión necesaria para que pueda llegar a los principales órganos del cuerpo. Las reacciones alérgicas producen cuadros similares al shock. El shock se caracteriza por estupor, debilidad, respiración rápida y superficial, pulso cardíaco acelerado y débil, disminución de la presión arterial y piel fría y húmeda. Durante las primeras fases el paciente está consciente, pero disminuye el estado de alerta. Sin embargo, el fracaso brusco de la circulación periférica puede afectar al cerebro y producir desvanecimiento.

shock anafiláctico shock producido por reacciones alérgicas, precisa la inyección inmediata de adrenalina.

sinergismo de potenciación acción conjunta de agentes de forma que su efecto combinado es mayor a la suma algebraica de sus efectos individuales.

Streptomyces género de bacterias, normalmente del suelo, pero ocasionalmente parasitan plantas y animales, y que se destaca por ser la fuente de varios antibióticos, por ejemplo, tetraciclinas.

sulfamidas grupo de compuestos químicos usados como agentes antibacterianos.

terapéutico perteneciente a la terapéutica o tratamiento de una enfermedad. Curativo.

teratogénico perteneciente a un teratógeno o que deriva de él. Véase teratógeno.

teratógeno agente o influencia que causa defectos físicos en el embrión en el desarrollo.

tetraciclinas sustancia antibiótica que es efectiva contra muchos microorganismos diferentes incluyendo rickettsias, algunos virus y bacterias gram-positivas y gram-negativas.

tilosina antibiótico producido por cultivos de *Streptomyces fradsae*, con una estructura similar a la eritromicina. Es efectivo contra bacterias gram-positivas en general y especialmente frente aquellas sustancias susceptibles a miembros del grupo de los macrólidos.

tip punta descartable de la pipeta automática.

trimetoprima antibacteriano que se administra junto con sulfonamida porque los dos fármacos presentan potenciación mutua.

violeta de genciana tinte orgánico brillante de color púrpura intenso. También denominado cristal violeta.

virulencia grado de patogenicidad de un microorganismo según la tasa de casos mortales o su capacidad para invadir tejidos del huésped o ambas. adj. virulento.

zona de inhibición área donde el desarrollo de las bacterias disminuyó o no ocurrió.

zootecnia control de los animales, que comprende las siguientes ciencias: la economía y la biometría (aplicación de métodos estadísticos a los datos biológicos) del cuidado de los animales de granja.

Anexo III: Material complementario

Lista de sustancias farmacológicamente activas cuyos LMR se han establecido. Reglamento del Consejo Europeo 2758/99 (modificación del 23.12.99 del R2377/90)

Sustancia farmacológicamente activa	Especie animal	Límite máximo residual ($\mu\text{g}/\text{Kg}$) / Tejidos diana
QUIMIOTERAPÉUTICOS		
Sulfonamidas		
Todas las sustancias de este grupo	Todas las especies productoras de alimentos Bovinos, ovinos, caprinos	100 /músculo, grasa, hígado, riñón 100 /leche
Derivados de la diaminopirimidina		
Baquiloprim	Bovinos	10 /grasa; 30 /leche; 150 /riñón; 300 /hígado
	Porcinos	40 /piel más grasa; 50 /hígado, riñón
Trimetoprim	Bovinos	50 /músculo, grasa, hígado, riñón, leche
	Porcinos	50 /músculo, piel más grasa, hígado, riñón
	Équidos	100 /músculo, grasa, hígado, riñón
	Aves (no productoras de huevos para el consumo humano)	50 /músculo, piel más grasa, hígado, riñón
	Pescado	50 /músculo y piel en proporciones normales
ANTIBIÓTICOS		
Penicilinas		
Amoxicilina, ampicilina, bencilpenicilina	Todas las especies productoras de alimentos	4 /leche; 50 /músculo, grasa, hígado, riñón
Cloxacilina, docloxacilina, oxacilina	Todas las especies productoras de alimentos	30 /leche; 300 /músculo, grasa, hígado, riñón
Penetamato	Bovinos	4 /leche; 50 /músculo, grasa, hígado, riñón
	Porcinos	50 /músculo, grasa, hígado, riñón
Cefalosporinas		
Cefalexina	Bovinos	100/leche; 200/músculo, grasa, hígado; 1000/riñón
Cefazolina	Bovinos, ovinos, caprinos	50 /leche
Cefquinoma	Bovinos	20 /leche; 50 /músculo, grasa; 100 /hígado; 200 /riñón
	Porcinos	50 /músculo, piel y grasa; 100 hígado; 200/ riñón
Ceftiofur	Bovinos	100 leche; 1000 /músculo; 2000 grasa, hígado; 6000 riñón
	Porcinos	1000 /músculo; 2000 /grasa, hígado; 6000 /riñón
Quinolonas		
Danofloxacina	Bovinos (no productores de leche para el consumo humano)	30/leche; 100 grasa; 200 /músculo; 400 /hígado, riñón
	Porcinos	50 /piel y grasa; 100 /músculo; 200/hígado y riñón
	Pollo	100 /piel más grasa; 400 /hígado, riñón
Difloxacina	Pollo, pavo	300 /músculo; 400 /piel más grasa; 600/ riñón; 1900 /hígado
Enrofloxacina	Bovinos	100 /músculo, grasa, leche; 200 /riñón; 300 /hígado;
	Conejos	100 /músculo, grasa; 200 /hígado; 300 /riñón
	Porcinos	100 /músculo, piel más grasa; 200 /hígado; 300 /riñón
	Aves (no productoras de huevos para consumo humano)	100 /músculo, piel más grasa; 200 /hígado; 300 riñón
	Ovinos	100 /músculo, grasa; 200 /riñón; 300 /hígado;
Flumequina	Bovinos, ovinos (no productores de leche de consumo)	200/músculo; 300/grasa; 500/hígado; 1500/riñón
	Porcinos	200/músculo; 300/piel y grasa; 500/hígado; 1500/riñón
	Pollo	250/piel y grasa; 400/músculo; 800/hígado; 1000/riñón
	Salmónidos	600/músculo y piel en proporciones normales
Sarafloxacina	Pollo	10 /piel más grasa, hígado
	Salmónidos	30 /músculo y piel en proporciones normales
Tiamulima	Porcinos	100/músculo; 500/hígado

Sustancia farmacológicamente activa	Especie animal	Límite máximo residual ($\mu\text{g/Kg}$) / Tejidos diana
Macrólidos		
Espiramicina	Bovinos	200 músculo, leche; 300 /grasa, hígado, riñón
	Porcinos	250 /músculo; 1000 /riñón; 2000 /hígado
	Pollo	200 /músculo; 300 /piel más grasa; 400 /hígado
Tilmicosina	Bovinos, ovinos, porcinos	50 /músculo, grasa; 1000 /hígado, riñón
	Ovinos	50 /leche
	Pollo	75 /músculo, piel más grasa; 250 /riñón; 1000 /hígado
Tilosina	Bovinos	100 /músculo, grasa, hígado, riñón; 50 /leche
	Porcinos	100 /músculo, piel más grasa, hígado, riñón
	Aves (no productoras de huevos para consumo humano)	100 /piel más grasa, hígado, riñón
Fluorfenicol y compuestos asociados		
Florfenicol	Bovinos	200 /músculo; 300 /riñón; 3000 /hígado;
	Porcinos	300 /músculo; 500 /piel y grasa, riñón; 2000 /hígado
	Pollo	100 /músculo; 200 /piel y grasa; 750 /riñón; 2500 /hígado
Tianfenicol	Bovinos	50 /músculo, grasa, hígado, riñón, leche
	Pollo	50 /piel más grasa, hígado, riñón
Tetraciclina		
Clortetraciclina	Todas las especies productoras de alimentos	100 /músculo y leche; 200/huevos; 300 /hígado; 600 /riñón
Doxiclina	Bovinos	100 /músculo; 300 hígado; 600 /riñón
	Porcinos	100 /músculo; 300 /piel más grasa, hígado; 600 /riñón
	Aves (no productoras de huevos para consumo humano)	100 /músculo; 300 /piel más grasa, hígado; 600 /riñón
Oxitetraciclina	Todas las especies productoras de alimentos	100 /músculo, leche; 300 /hígado; 600 /riñón; 200 huevos
Tetraciclina	Todas las especies productoras de alimentos	100 músculo, leche; 300 /hígado; 600 /riñón; 200 /huevos
Ansamicina con anillo de naftaleno		
Rifaximina	Bovinos	60 /leche
Pleuromutilinas		
Valnemulina	Porcinos	50 /músculo; 100 /riñón; 500 /hígado
Lincosamidas		
Lincomicina	Bovinos	50/grasa; 100 /músculo; 150/leche; 500 /hígado; 1500 /riñón
Aminoglucósidos		
Apramicina	Bovinos	1000 /músculo, grasa; 10000 /hígado; 20000 /riñón
Otros antibióticos		
Novobiocina	Bovinos	50 /leche

II

(Actos cuya publicación no es una condición para su aplicabilidad)

COMISIÓN

DECISIÓN DE LA COMISIÓN

de 27 de junio de 2003

mediante la que se modifica la Decisión 2000/159/CE de la Comisión, por la que se aprueban provisionalmente los planes de investigación de residuos de terceros países, de conformidad con la Directiva 96/23/CE del Consejo

[notificada con el número C(2003) 1973]

(Texto pertinente a efectos del EEE)

(2003/485/CE)

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Europea,

Vista la Directiva 96/23/CE del Consejo, de 29 de abril de 1996, relativa a las medidas de control aplicables respecto de determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos y por la que se derogan las Directivas 85/358/CEE y 86/469/CEE y las Decisiones 89/187/CEE y 91/664/CEE (¹), y, en particular, su artículo 29,

Vista la Directiva 72/462/CEE del Consejo, de 12 de diciembre de 1972, relativa a problemas sanitarios y de policía sanitaria en las importaciones de animales de las especies bovina, ovina, caprina y porcina y de carnes frescas procedentes de terceros países (²), cuya última modificación la constituye el Reglamento (CE) n° 1452/2001 (³) y, en particular, su artículo 3,

Considerando lo siguiente:

- (1) La Decisión 2000/159/CE de la Comisión, de 8 de febrero de 2000, por la que se aprueban provisionalmente los planes de investigación de residuos de terceros países de conformidad con la Directiva 96/23/CE del Consejo (⁴), cuya última modificación la constituye la Decisión 2003/16/CE (⁵), enumera los terceros países que han presentado un plan relativo a las garantías que ofrecen respecto al control de los grupos de residuos y sustancias contemplados en el anexo I de dicha Directiva.

(¹) DO L 125 de 23.5.1996, p. 10.
 (²) DO L 302 de 31.12.1972, p. 28.
 (³) DO L 198 de 21.7.2001, p. 11.
 (⁴) DO L 51 de 24.2.2000, p. 30.
 (⁵) DO L 7 de 11.1.2003, p. 91.

- (2) Algunos terceros países han presentado a la Comisión planes de vigilancia para la detección de residuos referidos a productos y especies que no figuraban originalmente en el anexo de la Decisión 2000/159/CE. Conforme a la evaluación de dichos planes y de la información adicional solicitada por la Comisión, estos países ofrecen suficientes garantías con relación a los productos o especies indicados. Convendría añadir dichos productos y especies procedentes de estos países al anexo de la Decisión 2000/159/CE.
- (3) Determinados terceros países no han presentado a la Comisión planes de vigilancia para la detección de residuos o bien no le han ofrecido garantías suficientes en el ámbito de la detección de residuos referidos a productos y especies indicados originalmente en el anexo de la Decisión 2000/159/CE. Convendría eliminar dichos productos y especies procedentes de estos países del anexo de la Decisión 2000/159/CE.
- (4) La Decisión 2000/159/CE debe modificarse en consecuencia.
- (5) Las medidas previstas en la presente Decisión se ajustan al dictamen del Comité permanente de la cadena alimentaria y de sanidad animal.

HA ADOPTADO LA PRESENTE DECISIÓN:

Artículo 1

El anexo de la Decisión 2000/159/CE se modifica conforme a lo dispuesto en el anexo de la presente Decisión.

ANEXO

El anexo de la Decisión 2000/159/CE se modifica en los siguientes términos:
 Se sustituyen las líneas relativas a Antillas Neerlandesas, Argentina, Bulgaria, Belice, Chile, Honduras, Kenia, Letonia, Filipinas, Estados Unidos, Uruguay, Serbia y Montenegro y Sudáfrica por las siguientes líneas:

Código ISO2	País	Bovinos	Ovinos y caprinos	Porcinos	Équidos	Aves de corral	Acuicultura	Lecite	Huevos	Conejos	Caza silvestre	Caza de cría	Miel
AN	Antillas Neerlandesas (*)												
AR	Argentina	X	X	X (*)	X	X	X	X	X	X	X	X	X
BG	Bulgaria	X	X	X	X (*)	X	X	X			X	X	X
BZ	Belice						X						X
CL	Chile	X	X	X	X (*)	X	X				X	X	X
HN	Honduras		X (*)										
KN	Kenia												X
LV	Letonia	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X
PH	Filipinas												
US	Estados Unidos	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
UY	Uruguay	X	X		X		X	X		X	X	X	X
YU	Serbia y Montenegro	X	X	X	X (*)								X
ZA	Sudáfrica	X	X	X		X	X	X		X	X	X	X

(*) El tercer país utiliza para la producción de alimentos únicamente productos básicos procedentes de otros terceros países aprobados.

(†) Únicamente tripas de animales.

(‡) Exportaciones de équidos vivos para el matadero (sólo animales destinados a la producción de alimentos).

Comparación entre los métodos de cuatro y cinco placas.

Si bien hasta el momento se utiliza el método de 4 placas la UE está recomendando la utilización del método de 5 placas para la detección de residuos antibacterianos. Este método fue desarrollado con la cooperación de los Estados miembros de la UE con el fin de aumentar la sensibilidad del ensayo y reducir el número de resultados falsos negativos

El método de las 5 placas permite detectar la presencia de inhibidores del crecimiento bacteriano en músculo, hígado y riñón de los animales. Se trata de una técnica de difusión en agar en la que las muestras se sitúan sobre la superficie de varias placas que contienen *Bacillus subtilis* BGA, *Micrococcus luteus* ATCC 9341 y *E. coli* ATCC 11303 inoculados en medios de cultivo con diferentes pH. Se utiliza una placa de pH 6, una de pH 7,2 y una de pH 8 inoculadas con *B. subtilis*, una de pH 8 con *M. luteus* y una de pH 7,2 inoculada con *E. coli*. Se utilizan también discos de control situados en posiciones opuestas. Si la muestra contiene inhibidores, éstos difunden alrededor de aquellas provocando la aparición de zonas de inhibición del crecimiento del microorganismo sembrado. Se establece un mínimo de, al menos, 2 mm de ancho de la zona de inhibición, para considerar que existe alguna sustancia inhibidora en la muestra (Pérez de Ciriza).

A continuación se ven dos cuadros que permiten la comparación de ambos métodos.

Método de 4 placas:

Antibióticos de referencia	Microorganismo	pH del medio (a 30°C)	Temperatura-tiempo de incubación
Bencilpenicilina sódica	<i>Bacillus subtilis</i>	6	30°C-18 h
Sulfametazina	<i>Bacillus subtilis</i>	7,2	30°C-18 h
Estreptomina	<i>Bacillus subtilis</i>	8	30°C-18 h
Eritromicina	<i>Micrococcus luteus</i>	8	37°C-24 h

Método de 5 placas:

Antibióticos de referencia	Microorganismo	pH del medio (a 30°C)	Temperatura-tiempo de incubación
Estreptomina	<i>Bacillus subtilis</i>	7,2	30°C-18 h
Tilosina	<i>Kocuria varians</i>	8	37°C-24 h
Clortetraciclina	<i>Bacillus cereus</i>	6	30°C-18 h
Ciprofloxacina	<i>Escherichia coli</i>	8	37°C-16-18 h
Sulfadimidina	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	7,4	55°C-12-15 h

Anexo IV: Regulaciones Nacionales e Internacionales Vigentes

	Reglamentos del Consejo Europeo	Directivas Europeas	Resoluciones SENASA
Medicamentos veterinarios		93/40/CEE	
Piensos con medicamentos: preparación, puesta en el mercado y utilización		90/167/CEE	
Límites máximos residuales: establecimiento comunitario para la fijación de LMR de medicamentos en alimentos de origen animal	2758/99		
Procedimientos para la inclusión de establecimientos de faena y/o procesos habilitados para exportar "Carnes frescas, menudencias y productos a base de carne".			1/03
Medidas de control aplicables respecto de determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos		23/96/CE	
Aprobación provisional de los planes de investigación de residuos de terceros países.		03/485/CE	
Registro de Establecimientos proveedores de animales para predios inscriptos como proveedores de ganado para faena exportación. Su inscripción garantiza a los países europeos, que desde el origen esos animales nunca han sido tratados con sustancias hormonales tirostáticas, o cualquier otra con principios activos que tengan efecto anabolizante. Los animales deben haber nacido y permanecido en los establecimientos que se inscriban, hasta el momento de su envío a predios habilitados para proveer ganado para faena exportación.			391/03