

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA**  
**ESCUELA DE POSGRADO**  
**UNIDAD DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**  
**MENCIÓN EN SALUD Y PRODUCCIÓN ANIMAL**



**“DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ANTIBIÓTICOS EN CARNE DE  
BOVINOS EXPENDIDA EN EL MERCADO MUNICIPAL DE HUANTA-  
AYACUCHO 2018”**

**TESIS PARA OBTAR EL GRADO ACADÉMICO DE MAGISTER**

**Maestrando : M.V. Yuvan Arsenio Venegas Moreyra**

**Asesora : Mg. Vidalina Andía Ayme**

**Ayacucho - Perú**

**2019**

## **DEDICATORIA**

- A mi madre Profesora Yolanda Socorro Moreira Soto quién desde muy joven tuvo que luchar sola para lograr sacarme profesional y hoy siempre me inculca a superar las dificultades en la vida.
- A mi amada esposa Yessica por ser el pilar de mi vida, ya que siempre estas apoyándome para superarme en la vida y en la mejora de mi formación profesional.
- A mis hijos Juan, Celeste, Cielo, Yael y Esperanza, ya que ustedes son el motor que da impulso a mi vida todos los días.

## **AGRADECIMIENTOS**

- Al Programa Nacional de Innovación Agraria (PNIA) y en especial a Guiulliano Rojas por financiar la presente investigación.
- A mi asesora Mg. Vidalina Andía Ayme por apoyarme en el desarrollo del trabajo de tesis.
- Al Doctor Gilmar Peña Rojas por su valioso apoyo durante la ejecución del trabajo de investigación.
- Al Mg. Fidel Mujica por colaborar incondicionalmente durante mi formación académica y apoyarme durante el desarrollo la tesis.
- A la Doctora Mirtha Roque Alcarraz por apoyarme en el procesamiento de los resultados.
- A los alumnos del IV semestre del programa de estudios de Producción Agropecuaria del Instituto Superior Tecnológico Público “Huanta”, por colaborar en el desarrollo de la presente investigación.
- A los miembros del jurado por sus aportes y sugerencias para mejorar el trabajo.

<b>ÍNDICE GENERAL</b>	<b>Página</b>
DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
ÍNDICE GENERAL.....	iii
ÍNDICE DE TABLAS.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
ÍNDICE DE ANEXOS.....	viii
RESUMEN .....	01
ABSTRACT .....	02
I INTRODUCCIÓN .....	03
1.1 Justificación de la Investigación .....	04
1.2 Importancia .....	05
1.3 Planteamiento del problema .....	05
1.4 Objetivos .....	07
1.5 Hipótesis .....	08
II CUERPO DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN .....	10
2.1 Marco teórico .....	10
2.1.1 Definición de términos .....	10
2.1.2 Antecedentes de la investigación .....	13
2.1.3 Bases Teóricas .....	17
2.1.3.1 Los antibióticos .....	17

2.1.3.2	Uso de antibióticos en la producción animal .....	24
2.1.3.3	Riesgo de utilizar antibióticos .....	26
2.1.3.4	Intoxicaciones por antibióticos .....	28
2.1.3.5	Reacciones alérgicas .....	30
2.1.3.6	Resistencia Bacteriana .....	31
2.1.3.7	Las superbacterias .....	39
2.1.3.8	Problemas productivos .....	41
2.1.3.9	Pruebas diagnósticas para detectar antibióticos.....	42
2.2	MATERIALES Y MÉTODOS .....	48
2.2.1	MATERIALES, INSUMOS, REACTIVOS Y EQUIPOS.....	48
2.2.2	METODOLOGÍA .....	52
	- Método microbiológico de difusión en placa .....	52
	- Cromatografía Líquida de Alta Performance .....	55
2.3	RESULTADOS Y DISCUSION.....	58
2.3.1	DETECCIÓN DE ANTIBIÓTICOS .....	58
2.3.2	CUANTIFICACIÓN DE RESULTADOS .....	65
III	CONCLUSIONES .....	73
IV	RECOMENDACIONES .....	74
V	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	75
VI	ANEXOS .....	81

<b>INDICE DE TABLAS</b>	<b>Página</b>
Tabla 1 Medicamentos de uso veterinario.....	26
Tabla 2 Principales reacciones de hipersensibilidad a antibióticos .....	29
Tabla 3 Muestras procesadas del 01 – 15.....	58
Tabla 4 Muestras procesadas del 16 – 50 .....	59
Tabla 5 Muestras procesadas del 51 – 85 .....	60
Tabla 6 Resumen de muestras procesadas positivas a la detección de antibióticos.....	61
Tabla 7 Presencia de antibióticos de carnes de bovino comercializados en el mercado de Huanta. Ayacucho 2018 .....	62
Tabla 8 Resultados de cuantificación de muestras positivas a la prueba de difusión en placa .....	65
Tabla 9 Concentración de antibióticos en carnes de bovinos comercializados en el mercado de Huanta. Ayacucho 2018 .....	70
Tabla 10 Certificación de carnes de bovinos comercializados en el mercado de Huanta. Ayacucho 2018 .....	71

<b>INDICE DE FIGURAS</b>	<b>Página</b>
Figura 01 Estructura química general de los antibióticos .....	18
Figura 02 Estructura química de las penicilinas y cefalosporinas .....	18
Figura 03 Estructura química de los macrólidos .....	19
Figura 04 Estructura química de las tetraciclinas .....	20
Figura 05 Estructura química de los Aminoglucósidos .....	21
Figura 06 Estructura química de las sulfonamidas .....	22
Figura 07 Mecanismos de acción de los antibióticos .....	24
Figura 08 Mecanismos intrinsicos de resistencia a los antibióticos .....	35
Figura 09 Vías que regulan el eflujo de multiple fármacos .....	36
Figura 10 Vías que regulan el eflujo de multiple fármacos .....	37
Figura 11 Mecanismo de cambio de sitio de destino .....	38
Figura 12 Diferentes interacciones con antibióticos .....	39
Figura 13 Resistencia a los antibióticos por consumo de carne contaminada .....	41
Figura 14 Proporción de carnes positivas a la presencia de antibióticos .....	62
Figura 15 Muestras positivas a grupo de antibióticos aminoglucósidos .....	63
Figura 16 Muestras positivas a grupo de antibióticos tetraciclinas .....	64
Figura 17 Muestras positivas a grupo de antibióticos macrólidos .....	64
Figura 18 Cromatograma de estándar de Oxitetracilina .....	66
Figura 19 Cromatograma de estándar de Clortetraciclina .....	67
Figura 20 Cromatograma de estándar de Penicilina .....	68

Figura 21 Cromatograma de estándar de Tilosina .....	68
Figura 22 Concentración de antibióticos específicos presentes en carnes de bovino expendidas en el mercado de Hunta. Ayacucho 2018.....	72



<b>INDICE DE ANEXOS</b>	<b>Página</b>
Anexo 01 Materiales de laboratorio.....	82
Anexo 02 Preparación de medios de cultivo .....	84
Anexo 03 Lectura de muestras negativas.....	85
Anexo 04 Lectura de muestras positivas.....	86
Anexo 05 Resultados ensayos de cuantificación de antibióticos.....	87
Anexo 06 Resultados ensayos específicos.....	88
Anexo 07 Cromatogramas de muestras remitidas.....	90
Anexo 08 Certificado de pureza de Agar Antibiótico N° 11.....	105
Anexo 09 Certificado de pureza de Agar TSA.....	106
Anexo 10 Certificado de pureza de <i>Bacillus subtilis</i> .....	107
Anexo 11 Certificado de pureza de <i>Kocuria rhizophila</i> .....	108
Anexo 12 Medios de cultivos recomendados para activación de cepas.....	109
Anexo 13 Método de activación de cepas ATCC.....	110
Anexo 14 Certificado de pureza de agua desionizada .....	112

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó con la finalidad de detectar y cuantificar residuos de antibióticos en carne de bovino que se comercializa en el mercado municipal de la ciudad de Huanta, departamento de Ayacucho. Se muestrearon un total de 85 muestras de carne de vacuno al azar durante los meses de Mayo, Junio y Julio del 2018, las muestras fueron procesadas para su detección de antibióticos mediante la prueba de difusión en placa Nouws, (1981) en el laboratorio de Microbiología Industrial y de Alimentos de la Facultad de Ciencias Biológicas-UNSCH y se utilizó Cromatografía en capa fina para Aminoglucósidos y Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC) (British Pharmacopoenia) para el grupo de las Tetraciclinas, Betalactámicos y Macrólidos. Se observó que el 16.5 % de las carnes de bovino, fueron positivas a la presencia de residuos de antibióticos con un intervalo de confianza de 8.6 y 24.4. Asimismo, se pudo evidenciar que el 3.5% de las carnes resultaron positivas a la presencia de Tetraciclinas, Betalactámicos y Macrólidos con un intervalo de confianza de 0.4 y 7.5, mientras que el 5.9% del total de carnes evaluadas resultó ser positiva a la presencia de Aminoglucósidos con un intervalo de confianza de 0.9 y 10.9 lo que constituye un grave riesgo de contaminación en los consumidores que puede desencadenar en reacciones alérgicas y posibles cuadros de resistencia bacteriana a los antibióticos evaluados.

## PALABRAS CLAVE

Carne de bovino, Antibióticos, Prueba de Difusión en Placa, Cromatografía en capa fina, HPLC.

## **ABSTRACT**

The present investigation work was carried out with the purpose of to detect and to quantify residuals of antibiotics in meat of bovine that is marketed in the municipal market of the city of Huanta department of Ayacucho. Sampled a total of 85 samples of meat of bovine at random during the months of May, June and Julio the 2018, the samples were processed for their detection of antibiotics by means of the diffusion test in badge. Nouws, (1981) in the laboratory of Industrial Microbiology and of Foods of the Ability of Sciences Biological-UNSCH and Chromatography was used in fine layer for Aminoglycosides and Liquid Chromatography of High Performance (HPLC) (British Pharmacopoenia) for the group of the Tetracyclines, Betalactam and Macrolides. It was observed that 16.5% of the meats of bovine, they went positive to the presence of residuals of antibiotics with an interval of trust of 8.6 and 24.4. Also, you could evidence that 3.5% of the meats was positive to the presence of Tetracyclines, Betalactam and Macrolides with an interval of trust of 0.4 and 7.5, while 5.9% of the total of evaluated meats turns out to be positive to the presence of Aminoglycosides with an interval of trust of 0.9 and 10.9 what constitutes a serious risk of contamination in the consumers that it can unchain in reactions allergic and possible squares of bacterial resistance to the evaluated antibiotics.

## **WORDS KEY**

Meat of bovine, Antibiotics, Test of Diffusion in Badge, Chromatography in fine layer, HPLC.

## **I. INTRODUCCIÓN**

La producción de proteína de origen animal como la carne, en el Perú es liderada por las aves, seguido por los bovinos y en tercer lugar por los porcinos. CENAGRO, (2012); esta labor se viene incrementado en los últimos años, favorecido por actividades de mejora agropecuaria como la profilaxis de enfermedades utilizando antibióticos como promotores de crecimiento y también la terapia de enfermedades. Estas actividades han llevado a exponer a los consumidores de carne a un riesgo de salud ya que en la mayoría de los casos no se respeta el tiempo de retiro de estos fármacos, lo que expone a sufrir consecuencias como reacciones alérgicas o a la aparición de una generación de bacterias resistentes a los antibióticos conocidas como superbacterias.

Este trabajo demuestra que el riesgo a la ingesta de carne con residuos de antibióticos es real, sobre todo porque no se tiene un buen control de los fármacos en la producción animal, al uso incorrecto de antibióticos y es lamentable decir también, a la mala praxis de los comercializadores de carne de la provincia de Huanta.

La presencia de residuos de antibióticos está presente en aves. Azañero & Chiroque, (2012) y cerdos. Butrón, (2015), mientras que en bovinos se evidencia la presencia de estos fármacos en varios países tales como Chile. Emilfork, (1998); Colombia. Acosta, (2015) o incluso Egipto. Abdelmoaty, (2015) que muestran que existe residuos en la carcasa de bovino. Azañero & Chiroque, (1988); Acosta, (2015) o en carne cruda y carne procesada lista para consumir. Abdelmoaty, (2015).

Las técnicas microbiológicas para detectar residuos de antibióticos son muy eficientes como se aprecian en los resultados, siendo la especificidad una limitante, ya que detecta el grupo de antibióticos más no así, la especie de antibiótico dentro del grupo, por ello es importante

corroborar la especificidad con pruebas cromatográficas tales como la Cromatografía en Capa Fina para identificar y cuantificar Gentamicina (Antibiótico del grupo de los Aminoglucósidos) y Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC) para identificar y cuantificar Oxitetraciclinas, Clortetraciclinas (Antibióticos del grupo de las Tetraciclinas), Penicilina G Procaínica (Antibiótico del grupo de los Betalactámicos) y Tilosina (Antibiótico del Grupo de los Macrólidos).

Las carnes que resultaron positivas a la detección de antibióticos no deben ser destinadas al consumo o la industria (Embutidos, enlatados, otros), ya que el procesamiento no elimina residuos de antibióticos, sino que seguirá presente en estos alimentos y no serán aptos para el consumo humano. Abdelmoaty, (2015).

### **1.1. Justificación de la investigación**

Esta investigación se realizó porque las pruebas diagnósticas que detectan y cuantifican la presencia de antibióticos en carnes de bovinos que se expenden a la población de Huanta no se ejecutan, ya sea por su alto costo (S/. 656.70 soles por cada muestra para la cuantificación de agentes contaminantes entre ellos antibióticos por HPLC en el SENASA) o por no contar con infraestructura adecuada y equipos y materiales para su detección, ya que existe indicios de un uso indiscriminado de estos biológicos.

Asimismo, existe la posibilidad de que residuos de dichos compuestos (o sus metabolitos) persistan en el animal y, por tanto, pasen a la cadena de alimentación humana. Benito, (2006).

Existe también la posibilidad que estos antimicrobianos pueden ser utilizados incontroladamente como sustancias de desecho de las granjas agrícolas y ganaderas

pudiendo ocasionar problemas de contaminación, resultando éstas extremadamente peligrosas por varias razones. Benito, (2006).

Los residuos por encima de los límites permisibles, suelen ser ilegales y por lo tanto penalizables, ya que estos evitan el crecimiento de cultivos bacterianos necesarios para la elaboración de derivados lácteos como queso o yogurt, ya que inhiben el desarrollo de la microbiota. La preocupación social exige garantías de salubridad en los productos destinados al consumo humano para evitar el desarrollo de resistencias bacterianas y posible contaminación ambiental por parte de estas sustancias. Benito, (2006).

Es por ello que se propone una técnica diagnóstica de difusión en placa para la detección y Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC) para su cuantificación

## **1.2. Importancia**

La importancia de realizar este trabajo de investigación es garantizar alimentos de calidad ofertados a las personas y preservar la salud de los consumidores de ganado bovino de Huanta, evitando reacciones alérgicas, resistencia bacteriana y contaminación del ambiente.

## **1.3. Planteamiento del problema**

El uso y abuso de fármacos para la terapia de enfermedades infecciosas es de manera muy común en nuestro territorio nacional, y en nuestra región (Ayacucho) tenemos 64 418 Unidades agropecuarias que realiza alguna actividad de manejo agropecuario como el suministro de medicinas a sus animales. CENAGRO, (2012), lo que indica que el uso de fármacos es una práctica muy usual entre los productores, además de ello los productores realizan un manejo preventivo de enfermedades por viaje o traslado con antibióticos no prescritos para mitigar los efectos de patógenos como la *Pasteurella multocida* que produce la enfermedad conocida como la Fiebre de transporte.

En la ciudad de Huanta la comercialización del ganado bovino generalmente se realiza los días domingo en la feria de ganados del barrio de San Miguel, y el faenado de estos animales se realizan como máximo a los 6 días posteriores a la compra, o sea entre los días lunes y sábado posteriores a la adquisición de los animales, poniendo en riesgo a los consumidores, ya que la vías de aplicación de estos fármacos son generalmente por vía intramuscular profunda, lesionando los músculos del cuello que podría ser perceptible a la inspección “Post Mortem” realizada por el veterinario municipal (D.S. N° 015 - 2012 ). Si la aplicación es por vía endovenosa, lo más probable es que el veterinario municipal no podrá determinar lesiones Macroscópicas, Microscópicas o de Contaminación Química (Pesticidas, fármacos, otros), calificando muchas veces como apta una carne con residuos de metabolitos de antibiótico por encima de los Límites de Márgenes Permisibles (LMR), esto lleva a que la carne certificada como apta para el consumo humano según el Reglamento de Faenado del SENASA (D.S. N° 015 - 2012), no sería apta para el consumo humano, ya que no cumpliría con los Límites de Márgenes Permisibles (LMR) de medicamentos de uso veterinario en alimentos de consumo humano (R.M. 739-2012), estos ponen en riesgo a la población y al ambiente, ya que los fluidos como la sangre y contenido de cavidad abdominal y torácica son vertidos a los sistemas de drenaje que pueden ser destinados a regar zonas de cultivo o ser trasladados los botaderos municipales, donde habitan animales vagos como los canes y los porcinos, los que se exponen a los residuos de antibióticos, que pudiera originar una posible resistencia bacteriana a estos antibióticos, contribuyendo en la formación de superbacterias.

#### **Enfrentamiento a una situación problemática:**

El uso indiscriminado de antibióticos en ganado bovino.

## **Delimitación del problema:**

Temática:

- Inocuidad Alimentaria
- Uso indiscriminado de antibióticos
- Justicia Ambiental

Geográfica:

Ciudad de Huanta, Provincia de Huanta, Región Ayacucho, País Perú

Temporal:

Año 2018

## **Formulación del problema**

¿Existirá presencia de antibióticos en carnes de bovinos que se expenden en el mercado municipal de Huanta - 2018?

## **1.4.OBJETIVOS**

### **Objetivo principal**

- Detectar y cuantificar antibióticos en carnes de bovinos expendidas en el mercado municipal de Huanta-Ayacucho 2018

### **Objetivos Específicos**

- Determinar el porcentaje de casos positivos a la presencia de antibióticos (Betalactámicos, Sulfonamidas, Tetraciclinas, Aminoglucósidos y Macrólidos) en



carnes de bovinos que se expende en el mercado municipal de Huanta en los meses de mayo a julio del año 2018.

- Evaluar la presencia de antibióticos en carnes de bovinos mediante el método microbiológico de difusión en placa.
- Cuantificar la concentración de antibióticos (Betalactámicos, Sulfonamidas, Tetraciclinas, Aminoglucósidos y Macrólidos) en las muestras de carnes positivas mediante HPLC.

### **1.5.HIPOTESIS**

Los bovinos que son sometidos al uso indiscriminado de antibióticos y que no cumplan con los periodos de retiro establecidos, conllevará a tener carcasa positivas a la presencia de antibióticos no aptas para el consumo humano.

#### **Hipótesis principal**

- Existe la presencia de antibióticos por encima de los Límites Máximos Permisible (LMRs) en la carne de bovino que se expende en el mercado Municipal de Huanta.

#### **Hipótesis específicas**

- Existe un 20% de casos positivos a la presencia de antibióticos en carnes de bovinos que se expende en el mercado municipal de Huanta en los meses de mayo a julio del año 2018.
- El método microbiológico de difusión en placa es eficaz para detectar la presencia de antibióticos en carnes de bovinos.

- Se encontraran concentraciones de antibióticos en carne de bovino por encima de los Límites Máximos Permisibles (LMRs), mediante la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC).

## **II. CUERPO DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN**

### **2.1. MARCO TEÓRICO**

#### **2.1.1. Definición de términos**

##### **Antibióticos**

Los antibióticos son sustancias producidas por diversas especies de microorganismos (Bacterias, Hongos, Actinomicetos) que suprimen la proliferación de otros gérmenes y al final pueden destruirlos. Sin embargo, el uso común a menudo ha ampliado el término de antibióticos de modo que incluya antibacterianos sintéticos como las sulfonamidas y las quinolonas que no son sintetizados por microbios. Se han identificado cientos de antibióticos y muchos han sido llevados a la etapa en que tiene utilidad en la terapéutica de enfermedades infecciosas. Los antibióticos muestran diferencias notables en sus propiedades físicas, químicas y farmacológicas, así como en sus espectros antibacterianos y en sus mecanismos de acción. Los conocimientos de los mecanismos moleculares de la réplica bacteriana han sido posible elaborar de manera racional compuestos que interfieren con esta función. Goodman & Gilman, (2006, p 1095).

##### **Bovino**

Perteneciente o relativo al toro o a la vaca. Se dice de todo mamífero rumiante, con el estuche de los cuernos liso, el hocico ancho y desnudo y la cola larga con un mechón en el extremo. Son animales de gran talla y muchos de ellos están reducidos a domesticidad. RAE, (2017).

##### **Clasificación taxonómica. RAE, (2017).**

- Clase: Mamíferos (Mammalia)
- Orden: Artiodáctilos (Artiodactyla)
- Suborden: Rumiantes (Ruminantia)
- Familia: Bóvidos (Bovidae)

- Subfamilia: Bovinos (Bovinae)
- Tribu: Bovini
- Géneros: Bos
- Especies:
- Bos taurus (bovinos domésticos)
- Bos taurus taurus (bovinos “europeos”)
- Bos taurus indicus (cebúes)

**Características:** Posee un cariotipo de 60 pares de cromosomas, poligástricos con 4 compartimentos (rumen, retículo, omaso y abomaso), su dieta es de naturaleza herbívora. Posee 32 piezas dentales (Incisivos 0/4, Premolares 3/3, Molares 3/3); su piel es dura con pelo corto y cabeza grande y maciza, se encuentra armado con dos cuernos vacíos además de tener pezuña hendida con dos pares de dedos. La ubre de las vacas consta de cuatro glándulas independientes, cada una de ellas tiene un pezón y una sola salida. Su gestación es de 9 meses y está destinada a la producción de carne, leche y piel. RAE, (2017).

### **Carne**

Parte muscular comestible constituido por todos los tejidos blandos que rodean el esqueleto, incluyendo su cobertura, grasas, tendones, vasos, nervios, aponeurosis y todos aquellos tejidos no separados durante la operación de faena. Además se considera carne al diafragma. Se considera carne fresca a aquella que aparte de la refrigeración no ha sido tratada para propósitos de conservación además de ser empacada que tiene sus características naturales. (Decreto Supremo N° 015-2012).

### **Prueba de difusión en Placa**

En las pruebas de difusión en agar, se inoculan en forma normalizada, aplicándose la muestra sobre la superficie del agar. Durante las primeras horas de difusión, la concentración del

antimicrobiano en un medio de agar en el borde de la muestra es relativamente alta y disminuye bruscamente a distancias crecientes desde la muestra. Como la difusión progresa, la pendiente del gradiente de concentración va disminuyendo. En la primera difusión procede radialmente de la fuente. Cuando la parte inferior de la capa de agar es alcanzada, la dirección es lateral. El espesor del agar está inversamente relacionado con el tamaño de la zona. A cierta distancia, en particular de la muestra, el antimicrobiano se diluye hasta un punto que ya no inhibe crecimiento microbiano, formándose una zona de inhibición. La velocidad de difusión a través de un gel de agar por ejemplo, depende de la concentración de fármaco en la muestra, el tamaño y la forma de la molécula antimicrobiana, la viscosidad del gel de agar y la temperatura. Myllyniemi, (2004).

### **Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC)**

La cromatografía se define según la International Unión of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) como un método, usado primariamente para la separación de los componentes de una muestra, en la cual los componentes se distribuyen en dos fases, una de las cuales es estacionaria, mientras la otra se mueve. La fase estacionaria puede ser un sólido, un líquido retenido sobre un sólido o un gel. La fase estacionaria puede estar extendida como una capa o distribuida como una película, etc. La fase móvil puede ser líquida o gaseosa. Azañero & Chiroque, (2010).

### **Inocuidad**

La inocuidad alimentaria se refiere a las condiciones y prácticas que preservan la calidad de los alimentos para prevenir la contaminación y las enfermedades transmitidas por el consumo de alimentos. RAE, (2017).

### **Cuantificación**

Expresión de la cantidad, el número o el grado de lo designado por un elemento. Expresar numéricamente una magnitud de algo, explicitar la cantidad en los

enunciados o juicios. Expresar la cantidad, el número o el grado de lo designado mediante un elemento gramatical. RAE, (2017).

### **Detección:**

Descubrir la existencia de algo que no era patente. RAE, (2017).

#### **2.1.2. Antecedentes de la investigación**

En la ciudad de Ayacucho, no se ha realizado hasta la fecha trabajos de investigación de pre grado o posgrado sobre detección de antibióticos en carne de bovino u otra especie, pero en el país y en el extranjero se cuenta con mucha información, que compartimos algunas de ellas.

En México en 1993 Vázquez-Moreno, et al., (2000) analizaron 50 muestras de carne bovina para la detección de residuos de antibióticos, el 50% de las muestras fueron positivas a residuos de antibióticos, obteniéndose un 86% de muestras positivas con estreptomicina; 68% con gentamicina; 40% con tetraciclina; 12% contenían cloranfenicol y ninguna muestra positiva a penicilina. La concentración residual varió según la familia de la cual proviene el antibiótico. Otro estudio realizado en Estados Unidos por la Food Safety and Inspection Service (FSIS) entre los años 1987 a 1988, basado en la detección de residuos de antibióticos y sulfonamidas en tejidos de bovinos que son beneficiados después de las tres semanas de vida y/o hasta los 150 Kg de peso, se encontraron los siguientes resultados (n= 967): Neomicina fue el antibiótico más frecuente, encontrándose un 44%; inhibidores microbianos no identificados un 30%; estreptomicina 8,9%; penicilina 8,4% y sulfametazina 7,0%; clortetraciclina 6,1% y gentamicina 5,5%. Cloranfenicol no fue detectado. El antibiótico dominante en este estudio fue la Neomicina sola o bien en conjunto con oxitetraciclina, debido a su uso en los sustitutos lácteos como un producto antidiarreico. Vázquez-Moreno, et al., (2000).

En Chile, Emilfork, (1998) determinó la presencia de antibióticos en una Planta Faenadora de Carnes en la X Región de Chile, de una muestra de 300 vacas, 13 vacas resultaron positivas a la prueba microbiológica de detección de residuos de antibióticos y sulfonamidas, lo que corresponde a un 4,3%.

Asimismo, determinó que 6 vacas sanas resultaron positivas a la prueba, lo que correspondería a un 2,3% dentro de un total de 259 individuos sanos y a 7 vacas de faenamiento de urgencia se detectaron residuos lo que correspondió a un 17.1% consideradas dentro del total de 41 que llegaron en la condición de urgencia.

También en Chile Aguilar, (2006) validó el “FAST” como método de “SCREENING” microbiológico para la pesquisa de residuos de antimicrobianos en productos de origen animal, determinando que las variables de temperatura y pH son sensibles a esta prueba.

En España Benito, (2006) desarrolló y validó métodos analíticos basados en nuevos elementos de reconocimiento molecular para la determinación de antibióticos Betalactámicos en muestras de interés agroalimentario y medioambiental.

En Nicaragua Dávila, (2007) determinó la presencia de residuos de antibióticos en carnes bovinas para exportación en el Matadero industrial Nuevo CARNIC, Managua. Los resultados se apreciaron que mediante la inspección sanitaria de la carne se conoce la sistematicidad del muestreo para determinación de residuos de antibióticos en la canal así como la cantidad de animales muestreados para los años 2004 – 2005 y primer semestre del 2006. Se observó que para el año 2004 de un total de 3 680 animales, se tomó una muestra del 0.54% para determinación de antibióticos. Para el año 2005 de un total de 3912 bovinos, una muestra de 0.51% y para el año 2006 un total de 1 486 animales se tomó una muestra de un 0.60% para la determinación de antibióticos.

En España Bailón, (2009) utilizó técnicas separativas miniaturizadas como alternativa a la determinación de antibióticos Betalactámicos en fármacos, aguas y alimentos, para

demostrar la potencialidad de las técnicas miniaturizadas de Electroforesis Capilar y Cromatografía Líquida Capilar en la determinación de una importante familia de compuestos. Este trabajo fue altamente sensible para los siguientes antibióticos: Ampicilina, Amoxicilina, Penicilina G, Penicilina V, Piperacilina, Nafcilina, Oxacilina, Cloxacilina, Dicloxacilina y Clavulamato.

En España Hernández, (2010) realizó el control de calidad y seguridad de la carne y productos cárnicos curados mediante el uso de sensores enzimáticos tipo amperométrico como técnicas rápidas de control de calidad y seguridad de la carne y productos cárnicos curados, concluyendo que los sensores enzimáticos mediante la prueba de Cromatografía líquida de Interacción Hidrofílica (HILIC), es un método fiable y alternativo a la HPLC para evaluar la carne.

En Perú Azañero & Chiroque, (2010) detectaron y cuantificaron residuos antimicrobianos en tejido muscular de pollo en cuatro mercados de Lima Cercado, determinaron la presencia de antibióticos en carne, superiores a los Límites Máximos de Residuos permisibles (LMRs), las técnicas de diagnóstico utilizados fueron método de difusión en Agar (método microbiológico) y la Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC). Los resultados mostraron un 100 % de las muestras positivas para antibióticos Macrólidos y Sulfonamidas y 100 % positivas para los antibióticos Quinolonas y Sulfametoxazol con la prueba de HPLC.

En República Dominicana Acosta, (2011) determinó los niveles residuales de antibióticos en la carne bovina que supera los Límites Máximos de Residuos permisibles (LMRs) según las normativas dominicanas, donde los resultados del Departamento de Control de Riesgos en Alimentos y Bebidas del MSP, informa que existe una deficiencia en el monitoreo de salud pública ya que de los 148 mataderos que cuenta el país el laboratorio solo recibe 4 y 5 muestras mensuales.



En Colombia Vélez, (2013) determinó la presencia de antibióticos en carne fresca vacuna y porcina, proveniente del Norte Antioqueño en la planta FRIGOCOLANTA ubicada en el Municipio de Santa Rosa de Osos destinada al consumo humano mediante una prueba microbiana de amplio espectro PREMI TEST donde los resultados obtenidos del muestreo de carcasa en el frigorífico, resultaron negativos.

En Colombia Acosta, et al., (2014) determinaron la presencia de antibióticos en músculo diafragmático utilizando la cromatografía líquida de alta performance (HPLC), siendo positivos 73 de 149 muestras procesadas.

En Perú Gómez, (2014) realizó una tesina sobre la situación actual de residuos de los fármacos veterinarios en alimentos de origen animal, se muestran los riesgos de los antibióticos, las actuales pruebas diagnósticas en nuestro país y la legislación vigente por el ente rector de seguridad alimentaria de origen animal, el Servicio Nacional de Sanidad Agropecuaria (SENASA).

En Egipto Abdelmoaty, (2015) realizó un trabajo de investigación sobre la comparación entre pollo crudo y carne de res lista para comer, reveló mayor residuos totales de antibióticos en la carne cruda (50%, 47%) que la carne procesada (36%, 29%) respectivamente. También la tetraciclina (28%) fue el antibiótico más predominante en las muestras, seguido por sulfonamida (23%) y penicilina 20%). En otro estudio en comparación con los residuos de antibióticos en muestras de filete de pollo fresco y congelado, los resultados mostraron que 34% de las muestras frescas fueron positivas para residuos de antibióticos, mientras que sólo el 8% de las muestras congeladas fueron positivas. También la oxitetraciclina fue más prevalente que la enrofloxacin en muestras positivas. Esto fue explicado ya que la oxitetraciclina es abundante en Egipto por su bajo precio.

### **2.1.3. Bases teóricas**

#### **2.1.3.1. Los antibióticos**

El término antibiótico fue acuñado de la palabra "antibiosis" que significa literalmente "aplicado contra". En el pasado, los antibióticos eran considerados compuestos orgánicos producidos por un microorganismo que eran tóxicos para otros microorganismos. Mientras que algunos antibióticos pueden matar completamente a otras bacterias, algunos sólo son capaces de inhibir su crecimiento. Aquellos que matan a las bacterias se denominan bactericidas mientras que aquellos que inhiben el crecimiento bacteriano se denominan bacteriostáticos. Etebu & Arikepkar, (2016).

#### **Clasificación de los antibióticos:**

Hay varias maneras de clasificar los antibióticos, pero los esquemas de clasificación más comunes se basan en sus estructuras moleculares, modo de acción y espectro de actividad. Otros incluyen la vía de administración (inyectable, oral y tópica). Antibióticos dentro de la misma clase estructural generalmente muestran un patrón similar de eficacia, toxicidad y efectos secundarios de potencial alérgico. Algunas clases comunes de los antibióticos basados en estructuras químicas o moleculares incluyen Betalactámicos, macrólidos, tetraciclinas, quinolonas, aminoglucósidos, sulfamidas, glicopéptidos y oxazolidinonas. Etebu & Arikepkar, (2016).

El presente trabajo está propuesto para detectar y cuantificar 05 grupos de antibióticos los cuales detallamos

**Betalactámicos:** Los miembros de esta clase de antibióticos contienen un anillo 3 carbono y nitrógeno de 1 que es altamente reactivo (Figuras 1 y 2). Interfieren con las proteínas esenciales para la síntesis de pared celular bacteriana, y en el proceso mata o inhibe su crecimiento. Más sucintamente, ciertas enzimas bacterianas como la proteína de unión a penicilina (PBP) son responsables de unir unidades del péptido durante la síntesis del

peptidoglicano. Miembros de antibióticos Betalactámicos son capaces de unirse a estas enzimas PBP, y en el proceso, interfieren con la síntesis del peptidoglicano originando la lisis y muerte celular. Dentro de ellos encontramos los siguientes: Penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos. Etebu & Arikepkar, (2016).

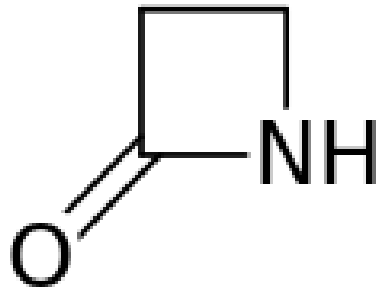


Figura 01. Estructura química general de los Betalactámicos.

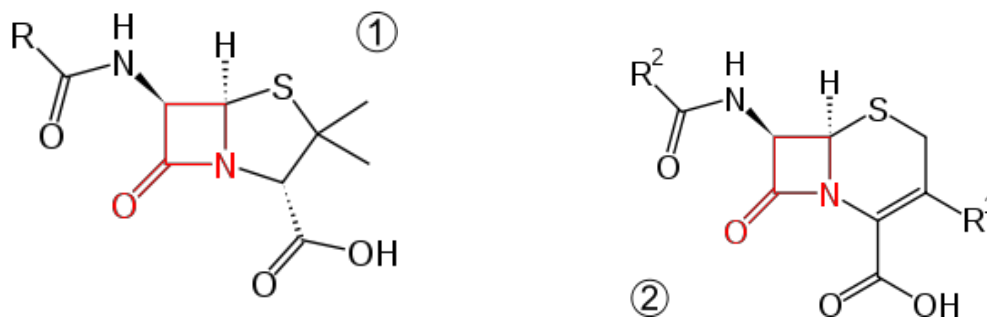


Figura 02. Estructura química de las penicilinas (1) y cefalosporinas (2).

Fuente: Etebu & Arikepkar, (2016)

**Macrólidos:** El primer antibiótico que pertenece a esta clase fue descubierto y aislado en 1952 por J. M. McGuire como un producto metabólico de un suelo que habita el hongo *Saccharopolyspora erythraea*. Este hongo fue conocido anteriormente como *Streptomyces erythraeus* pertenecientes al género *Saccharopolyspora* de bacterias *Actinomycetos*. Los macrólidos se caracterizan por anillos de lactosa macrocíclicos miembros 14, 15 o 16 con inusual desoxiazúcares cladinosa L y D-desosamine adjuntadas (Figura 3). Tienen un espectro más amplio de la actividad antibiótica de las penicilinas y a menudo se administran a pacientes alérgicos a la penicilina. Etebu & Arikepkar, (2016).

Los macrólidos matan microorganismos inhibiendo eficazmente la síntesis de proteína bacteriana. Así que al unirse al ribosoma bacteriano 50s y en el proceso, previenen la adición de aminoácidos a cadenas polipeptídicas durante la síntesis de proteínas. Los macrólidos tienden a acumularse en el cuerpo porque el hígado es capaz de reciclar en la bilis. También tienen la capacidad de causar inflamación., Entre los macrólidos tenemos a los siguientes: Eritromicina, Azitromicina, Tilosina y Claritromicina. Etebu & Arikekar, (2016).

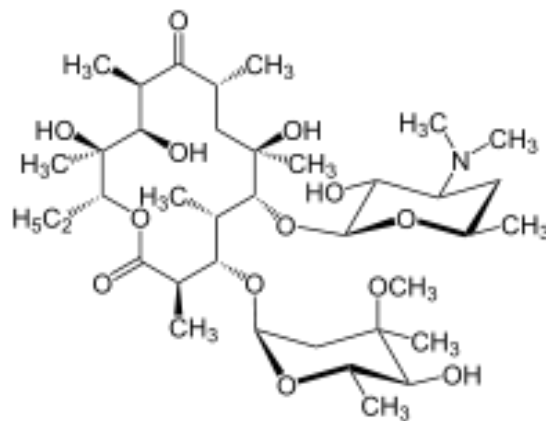


Figura 03. Estructura química de los macrólidos.

Fuente: Etebu & Arikekar, (2016)

**Tetraciclinas:** La Tetraciclina fue descubierta en 1945 de una bacteria del suelo del género *Streptomyces spp.* por Benjamin Duggar. El primer miembro de esta clase fue la clortetraciclina (aureomicina). Los miembros de esta clase tienen cuatro 4 anillos de hidrocarburos y se les conoce con el nombre con el sufijo "ciclina". Históricamente, los miembros de esta clase de antibióticos se agrupan en diferentes generaciones basadas en el método de síntesis. Los obtenidos por la biosíntesis se dice que son primera generación. Los miembros incluyen tetraciclina, Clortetraciclina, oxitetraciclina y democlociclina. Miembros, tales como Doxiciclina, Lymeciclina, están relacionados, Metaciclina, Minociclina y Rolitetraciclina se consideran de segunda generación porque son derivados de la síntesis. Los obtenidos de síntesis total como la tigeciclina se consideran tercera generación. Etebu & Arikekar, (2016).

Su actividad antimicrobiana de las bacterias es el ribosoma 30s, en donde interrumpen la adición de aminoácidos a cadenas polipeptídicas durante la síntesis de proteínas en este organelo bacteriano. Todas las tetraciclinas se recomiendan para pacientes mayores de ocho 8 años porque se demostró que causa decoloración entre los pacientes por debajo de esta edad, solo es recomendada en pacientes menores de 8 años en el tratamiento del paludismo, elefantiasis, parásitos amebianos y rickettsia. Etebu & Arikepkar, (2016).

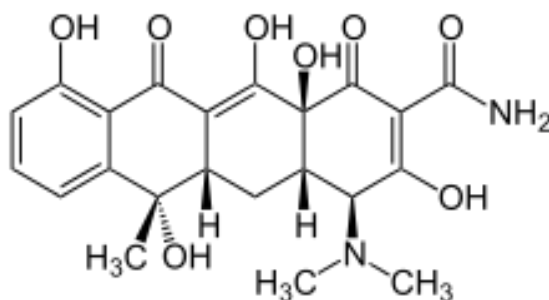


Figura 04. Estructura química de las tetraciclinas.

Fuente: Etebu & Arikepkar, (2016).

**Aminoglucósidos:** El primer fármaco en ser descubierto entre los miembros de esta clase de antibióticos fue la estreptomicina aislada en 1943. La Estreptomicina se ha usado grandemente contra el *Mycobacterium tuberculosis*., el agente causal de la tuberculosis entre los seres humanos. Los aminoglucósidos son compuestos generalmente de 3 amino azúcares conectados por enlaces glucosídicos. Se obtienen del suelo donde existen Actimomicetos. Etebu & Arikepkar, (2016).

Los Aminoglucósidos tienen un amplio espectro de actividad antibacteriana. Son capaces de inhibir la síntesis de proteínas en bacterias al unirse a una de las subunidades ribosomales 30s y son eficaces contra aerobios gramnegativos y algunas bacterias Gram positivas. El aminoglucósido conocido más antiguo es la estreptomicina que solidariamente se ha utilizado en el tratamiento de peste bubónica, tularemia y tuberculosis. A pesar de su eficacia contra una amplia gama de infecciones, la estreptomicina fue catalogada como altamente

tóxica. Esta característica desafortunada de la droga hizo necesario la necesidad de buscar nuevos miembros de los aminoglucósidos que seguiría siendo eficaz contra las bacterias pero menos tóxica para los seres humanos. La búsqueda fue fructífera con los descubrimientos de antibióticos como gentamicina, neomicina, tobramicina y amikacina. La gentamicina es menos tóxica y es ampliamente utilizada para las infecciones causadas por bacterias Gram-negativas (*Escherichia*, *Pseudomonas*, *Shigella* y *Salmonella*). Tobramicina, en particular, se utiliza en el tratamiento de las infecciones por *Pseudomonas* en pacientes con fibrosis quística. Etebu & Arikepkar, (2016).

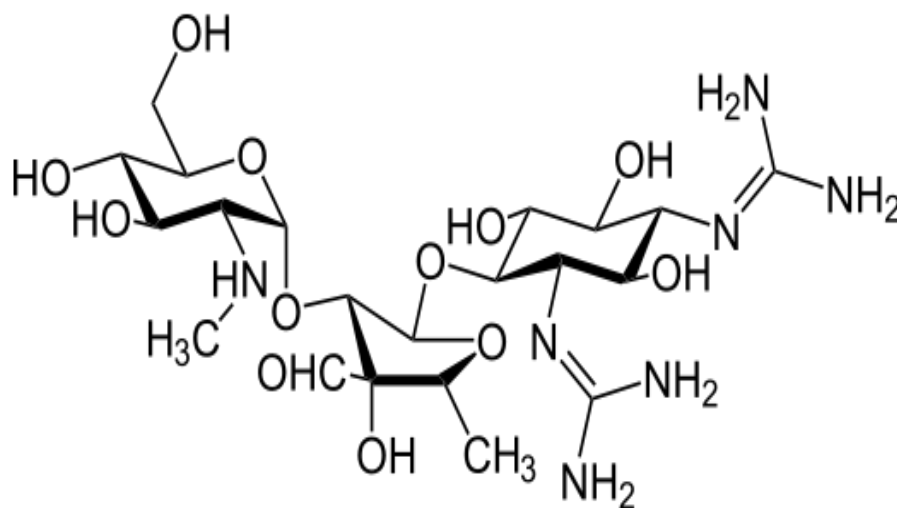
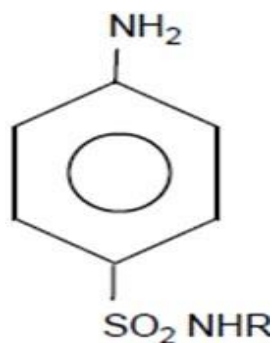


Figura 05. Estructura química de los aminoglucósidos.

Fuente: Etebu & Arikepkar, (2016).

**Sulfonamidas:** Las Sulfamidas son el primer grupo de los antibióticos utilizados en medicina terapéutica, y todavía juegan un papel muy importante en la medicina y práctica veterinaria. Sulfamidas inhiben las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas como *Nocardia*, *E. coli*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella* y *Enterobacter*, *Trachomatis* de *Chlamydia* y algunos protozoos y son ampliamente utilizados en el tratamiento de varias infecciones incluyendo amigdalitis, septicemia, meningitis meningocócica, la disentería bacilar y algunas infecciones del tracto urinario. Estudios han demostrado que las sulfamidas también son capaces de impedir la formación de agentes que promueven el desarrollo de

células cancerosas. Las sulfamidas son agentes antimicrobianos sintéticos que contienen el grupo sulfonamida. Etebu & Arikepkar, (2016).



*Figura 06.* Estructura química general de las sulfonamidas.

Fuente: Etebu & Arikepkar, (2016).

Se piensa que las Sulfamidas son generalmente bacteriostáticos más que bactericidas. Sin embargo, las sulfamidas pueden convertirse en bactericidas si su concentración es suficientemente alta o si la presencia de una concentración de la sulfonamida se acompaña de otras condiciones ambientales desfavorables para bacterias. Tales condiciones desfavorables incluirían malas condiciones culturales, temperaturas adversas, anticuerpos, producto tóxico proteolítico, etc. Etebu & Arikepkar, (2016).

Aunque a las sulfamidas se le adjudicó ser buenas y eficaces en el tratamiento de diversas enfermedades e infecciones, son recomendadas y administradas con precaución por su toxicidad y efectos secundarios, algunos de los cuales incluyen trastornos del tracto urinario, anemia hemolítica, porfiria y reacciones de hipersensibilidad. Entre las más usadas tenemos al Sulfametoxazol. Sulfaquinoxalina y Sulfadoxina. Etebu & Arikepkar, (2016).

### **Mecanismos de acción de los antibióticos**

El mecanismo de acción de los antibióticos es de la manera siguiente:

- Sustancias que inhiben la síntesis de las paredes celulares bacterianas, como Betalactámicos (p. ej., penicilinas, cefalosporinas y carbapenem) y otros medicamentos como cicloserina, vancomicina y bacitracina.
- Sustancias que actúan directamente en la membrana celular del microorganismo, aumentando la permeabilidad y provocando la salida de compuestos intracelulares, como detergentes del tipo de la polimixina; antimicóticos de tipo polieno (p. ej., nistatina y anfotericina B) que se adhieren a los esteroides de la pared celular y el lipopéptido daptomicina.
- Sustancias que alteran la función de las subunidades ribosómicas 30S o 50S para inhibir en forma reversible la síntesis de proteínas, que suelen ser bacteriostáticos (p. ej., cloranfenicol, tetraciclinas, eritromicina, clindamicina, estreptograminas y linezólido).
- Sustancias que se adhieren a la subunidad ribosómica 30S y alteran la síntesis de proteínas, que suelen ser bactericidas (p. ej., aminoglucósidos).
- Sustancias que modifican el metabolismo del ácido nucleico bacteriano, como rifamicinas (p. ej., rifampicina y rifabutina), que inhiben a la polimerasa de RNA y las quinolonas, que inhiben las topoisomerasas.
- Los antimetabolitos, como trimetoprim y las sulfonamidas, que bloquean a ciertas enzimas esenciales del metabolismo.

Goodman & Gilman, (2006 pp 1095, 1096).



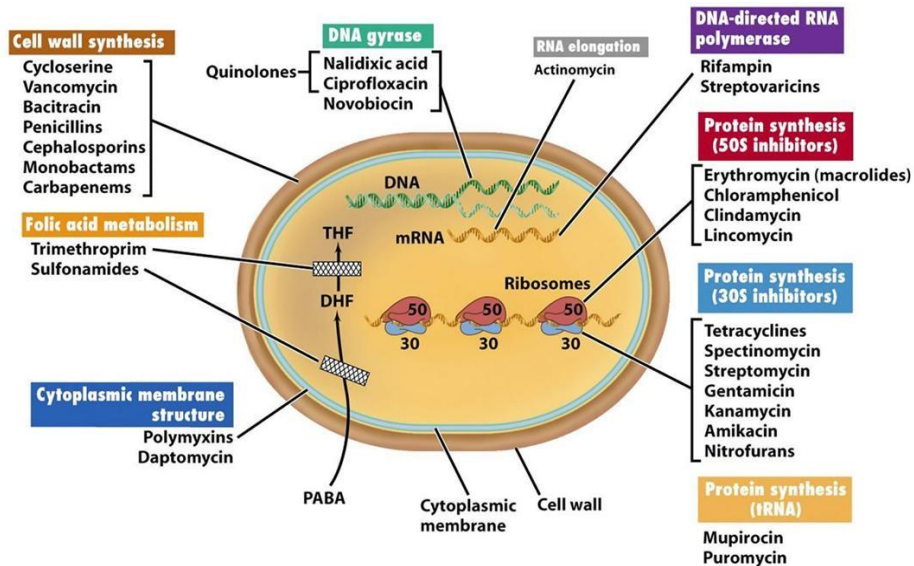


Figura 07. Mecanismos de acción de los distintos grupos de antibióticos.

Fuente: Etebu & Ariekpar, (2016).

### 2.1.3.2. Uso de antibióticos en la producción animal

Con el aumento de la población mundial y la demanda cada vez mayor de alimentos, especialmente los de origen proteico, el hombre se ha visto en la necesidad de intensificar la producción de carne y obtener, no sólo en cantidad, sino también en calidad de proteína animal. Para esto, el mercado ofrece una amplia gama de drogas disponibles como por ejemplo: antibióticos, sulfonamidas, compuestos hormonales, antihelmínticos, etc. Los hallazgos, síntesis y descubrimientos de nuevos fármacos antivirales, antimicóticos y antimicrobianos han sido tan vertiginosos, que en la clínica médica se ha creado un verdadero caos en su sistematización, usos, contraindicaciones y otros problemas inherentes a su empleo adecuado y científico.

En Medicina Veterinaria los antibióticos y las sulfas han constituido una eficaz herramienta para la producción animal. Su uso, no sólo se limita a la prevención y terapia de una serie de enfermedades, sino que también se emplean como "probiótico" o promotor del crecimiento en la dieta de animales jóvenes incrementando la eficiencia en la utilización y conversión del alimento. Cacabelos, (2017).

Los antibióticos que se utilizan en producción animal son administrados por diferentes vías: Oral, para el tratamiento de enfermedades o para ser incorporados como probióticos, parenteral para el tratamiento de numerosas enfermedades, local en infecciones del tracto reproductivo e infusión mamaria para el tratamiento de mastitis. Todas estas vías llevan en menor o mayor grado a la contaminación de los alimentos con residuos antimicrobianos. Cacabelos, (2017).

Todos los residuos, incluidos los productos madre, sus metabolitos y sus productos de descomposición (o cualquier combinación de los mismos) son potencialmente importantes desde el punto de vista toxicológico. Cacabelos, (2017).

En la práctica, la eliminación medicamentosa de los tejidos animales nunca alcanza una concentración cero o nivel de tolerancia cero. Conseguir niveles de residuos cero, luego de administrado un medicamento como aditivo en la ración o como terapia, se considera imposible. La eliminación de un medicamento a partir de la grasa y del músculo esquelético es una función lineal, mientras que no lo es para el caso del hígado y del riñón, ya que su unión a las proteínas y a otros componentes biológicos explica una desaparición más lenta de sólo estos órganos. La concentración de residuos varía mucho de tejido a tejido, habiéndose observado por lo anteriormente citado, que es mayor en los tejidos de reserva, como son la grasa corporal, o en los órganos que lo metabolizan y excretan activamente.

Si bien se han estipulado los períodos de resguardo para cada tipo de quimioterapéutico, en base a los cuales se han fijado los lapsos mínimos que deben transcurrir entre la aplicación del antibacteriano y el faenamiento del animal, es posible que por ignorancia del riesgo o bien por obviar las pérdidas causadas por la muerte natural de un bovino enfermo, éste se faena antes de lograr la eliminación del fármaco del organismo. Sin embargo, aun respetando los periodos de resguardo, puede ocurrir que se presenten concentraciones residuales de antibióticos en leche o carne, ya que existen otros factores que influyen en su presencia. Es

por esto que la suspensión medicamentosa se impone si se pretende evitar residuos de antibióticos en la carne destinados a consumo humano.

En el entorno la adquisición de antibióticos para uso animal no está sujeta a ninguna restricción, pudiendo adquirirse y usarse sin prescripción ni control profesional. Además, muchas veces en la forma farmacéutica no se señalan las precauciones a tomar en cuanto al tiempo de eliminación en carne y leche.

**Tabla 1**

**Medicamentos de uso veterinario y sus metabolitos.**

---

GRUPO DE ANTIBIÓTICOS

---

BETALACTAMICOS: Amoxicilina, Ampicilina, Bencilpenicilina

TETRACICLINAS: Tetraciclina, Oxitretetraciclina HCL, Clortetraciclina HCL, Doxiciclina Hyclato.

MACRÓLIDOS: Eritromicina, AMOZ - Furaltadona, Cloranfenicol, AOZ Furazolidona.

SULFONAMIDAS: Sulfamerazina, Sulfametazina, Sulfatiazol, Sulfametizol, Sulfametoxazol, Sulfapiridina, Sulfaquinoxalina, Sulfaclorpiridazina, Sulfadiazina, Sulfadimetoxina, Sulfadoxina.

QUINOLONAS: Enrofloxacina, Norfloxacina, Ofloxacina , Ciprofloxacina.

OTROS: Trimetoprim, Tilosina Tartrato.

---

Fuente: R.J. N°0207-2012

**2.1.3.3. Riesgo de usar antibióticos en animales**

Se calcula que el 70% de los medicamentos antibióticos que se suministran en Estados Unidos son para los animales destinados al consumo humano y muchas veces el uso de estos fármacos no está dirigido al tratamiento de infecciones, sino para promover el crecimiento de los animales o mejorar su resistencia a enfermedades. Según la FDA este "uso excesivo" está contribuyendo significativamente a la resistencia que las bacterias han desarrollado a estos medicamentos. Recientemente la Organización Mundial de la Salud declaró que la resistencia humana a los antibióticos está provocando que los medicamentos disponibles actualmente en el mundo sean inútiles. Velez, (2013).

Según la organización, se está enfrentando "el fin de la era de la medicina segura". Ahora la FDA está pidiendo a veterinarios, ganaderos y productores de animales "que usen juiciosamente los antibióticos médicamente importantes" en los animales productores de alimentos, limitando su uso al combate de enfermedades o problemas de salud. Velez, (2013).

Tal como explicó el 12 de abril del 2012 a la BBC Mundo la doctora Nora Mestorino, profesora de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional de La Plata, en Argentina "un uso irracional de los antibióticos es cuando se usan en dosis muy bajas o en tiempos muy cortos y por ende no eliminan las bacterias que causan la infección". "Entonces cuando un grupo de bacterias quedan vivas comienzan a implementar diferentes mecanismos para defenderse de ese compuesto químico. Es un proceso lógico de supervivencia que provoca la multiplicación de esas bacterias". Estas bacterias posteriormente transfieren sus mecanismos de defensa y resistencia e incluso pueden transferirlos a otros microorganismos y a otras especies de bacterias y al medio ambiente. "Es decir, se produce una transferencia de la resistencia del animal, al medio ambiente y al hombre" agrega la investigadora. "Esto ha provocado que los microorganismos desarrollen multiresistencias, es decir mecanismos de resistencia a diferentes grupos antibacterianos haciendo muy difícil poder contar con un antimicrobiano eficaz". Navas, (2012).

El uso y abuso de antibióticos en la industria pecuaria (producción de carne) ha originado la aparición de resistencia a los antibióticos por algunas bacterias.

Sobre este tema Robert Tauxe, director adjunto de la División de Enfermedades transmitidas por los alimentos, el agua y el medio ambiente del Centers for Disease Control and Prevention (CDC), "En años recientes hemos visto cómo algunas de las bacterias que más comúnmente se encuentran en los alimentos (gérmenes como la *Salmonella* y el *Campylobacter*) se vuelven cada vez más resistentes a algunos antibióticos". Estas cepas

resistentes pueden causar infecciones que son “más severas, de mayor duración y más difíciles de tratar”, enumera Tauxe. Navas, (2012).

De hecho, los cálculos que hicieron a partir de datos del CDC (Centers for Disease Control and Prevention) muestran que alrededor del 20% de las personas que se enfermaron a causa de un microorganismo resistente a los antibióticos no se contagiaron en el hospital ni de otra persona: les llegó a través de su comida. Consume Reports, (2015).

Ruby Lee, de Sandy, en el Estado de Oregon, estuvo luchando por su vida contra una superbacteria. Los médicos finalmente diagnosticaron que la enfermedad que padecía Ruby formaba parte de un brote de *Salmonella heidelberg* causado por carne molida de pavo y que enfermó además a otras 135 personas en varios estados. Aquella bacteria se había vuelto resistente a varios antibióticos. Ken Koehler, de 55 años, se enfermó durante un brote que hubo en el año 2011 de *Salmonella typhimurium* vinculado a la carne de res molida. Los funcionarios de salud pública le dijeron que la bacteria resistente podía haber llegado a sus manos mientras amasaba la carne cruda para formar los medallones de carne que luego cocinaría. Consume Reports, (2015)

#### **2.1.3.4.Intoxicaciones por antibióticos**

Uno de los problemas más comunes del uso de los antibióticos, ya sea por vía parenteral o por la ingesta a través de alimentos (carne) puede producir en personas muy sensibles reacciones alérgicas, alteraciones en diversos órganos y sistemas del cuerpo en estos individuos expuestos.

**Tabla 2****Principales reacciones de hipersensibilidad a los antibióticos.**

REACCIÓN	SIGNO – SÍNTOMA - ENFERMEDAD	MEDICAMENTOS
Multisistémica	Anafilaxia	Penicilinas
	Enfermedad del suero	Cefalosporinas
	Fiebre medicamentosa	Vancomicina
	Vasculitis Reacciones similares a lupus (lupus-like)	Tetraciclinas
	Linfadenopatías generalizadas	
Cutánea	Urticaria / angioedema	Penicilinas
	Síndrome de Stevens-Johnson	Cefalosporinas
	Necrolisis epidérmica tóxica	Sulfas
	Eritema pigmentado fijo	Macrólidos
	Eritema máculo papular morbiliforme	Fluoroquinolonas
	Dermatitis por contacto	Tetraciclinas
	Fotosensibilidad	Vancomicina
	Eritema nodoso	
Medular	Anemia hemolítica	Cefalosporinas
	Trombocitopenia	Penicilina
	Neutropenia	
	Anemia aplásica	
	Eosinofilia	
Pulmonar	Broncoespasmo	Tetraciclinas
	Neumonitis	Sulfas
	Edema pulmonar	
	Infiltrados intersticiales con eosinofilia	
Renal	Nefritis intersticial	Penicilinas
	Síndrome nefrótico	Cefalosporinas
Cardiaca	Miocarditis	Sulfas
Hepática	Disfunción hepática	Cefalosporinas

Fuente: Asociación Nacional de Medicina -ANMM, (2010)

### 2.1.3.5.Reacciones alérgicas

Los antibióticos producen reacciones inmunológicas que se presentan como cualquier evento nocivo, no intencional e indeseado, desencadenado por un mecanismo inmunológico secundario al empleo de un antibiótico (Asociación Nacional de Medicina - ANMM, 2010).

Estas reacciones se dividen principalmente en 2 tipos:

**Predecibles:** Estas son dependientes del medicamento. Es importante la dosis, ya que es más factible desencadenar una reacción cuando se administra el antibiótico a dosis altas por periodos prolongados o de manera recurrente. Hay que valorar la interacción medicamentosa, pues algunos modifican la farmacocinética de otros y se debe considerar en algunas ocasiones la vía de administración (Asociación Nacional de Medicina - ANMM, 2010).

**Impredecibles:** Estas no depende covalentemente a moléculas portadoras del medicamento, ya que no influyen la dosis o los efectos farmacológicos; ocurren únicamente en individuos susceptibles, y se producen por sensibilización. La capacidad de sensibilización del fármaco ocasiona que el individuo genere una respuesta en contra de sus proteínas, metabolitos o por medio de una reacción cruzada entre aquellos de estructura química semejante. Todas las vías de administración son sensibilizantes, la oral es la más segura y la cutánea la más riesgosa. (Asociación Nacional de Medicina - ANMM, 2010).

**Antibióticos Betalactámicos:** En este grupo tenemos a la penicilina, ampicilina, amoxicilina y cefalexina. Sintomatología Clínica: Náuseas, vómitos, diarrea, dolor abdominal, hepatitis colestásica (en formacrónica), aumento de enzimas hepáticas, fallo renal agudo, hematuria, nefritis intersticial, anafilaxia, convulsiones, arritmias cardíacas (Asociación Nacional de Medicina - ANMM, 2010); Guzmán et al., (2004).

**Antibióticos Macrólidos:** Tenemos a la eritromicina, claritromicina, azitromicina. Sintomatología Clínica: Náuseas, vómitos, diarrea, hepatitis colestásica, aumento de transaminasas, nefritis intersticial, anemia hemolítica (Asociación Nacional de Medicina - ANMM, 2010).

#### **2.1.3.6 Resistencia bacteriana:**

El 2014, la OMS publicó su primer informe Global sobre vigilancia titulado "Resistencia antimicrobiana". En este informe, centrado en la resistencia a los antibióticos, que es cuando las bacterias cambian y los antibióticos, alerta el mundo que este fenómeno ya no es una predicción para el futuro, sino que está pasando ahora mismo en todo el mundo. Posteriormente publicó dos hojas tituladas "Resistencia a los antibióticos" y la "Resistencia antimicrobiana". Fymat, (2017).

En poblaciones de regiones alejadas del mundo, que nunca habían conocido o habían sido tratados con antibióticos, o habían estado en contacto con personas tratadas con antibióticos, fueron encontradas que tenían resistencia a antibióticos. Esto demuestra que la resistencia es una parte natural de la composición genética de las comunidades microbianas. La información sobre la resistencia puede ser llevado en el cromosoma de la bacteria, o cuando el cromosoma se rompe, estos satélites (conocidos como plásmidos) lleva a dos tipos de resistencia a los antibióticos: (a) cromosómico y (b) factor R mediado. Estos dos mecanismos pueden ser aumentados cuando se saltan las secuencias de ADN de una molécula de DNA a otra (llamados transposones). Fymat, (2017).

Las bacterias resistentes a los antibióticos que son difíciles o imposibles de tratar se están volviendo cada vez más comunes y están causando una crisis de salud mundial. La resistencia a los antibióticos está codificada por varios genes, muchos de ellos se pueden transferir entre las bacterias. Constantemente se describen nuevos mecanismos de



resistencia, y los nuevos genes y vectores de transmisión son identificados en una base regular. Este artículo examina los avances recientes en nuestra comprensión de los mecanismos por los cuales las bacterias o bien son intrínsecamente resistentes o adquieren resistencia a los antibióticos. Blair et al., (2014).

La resistencia microbiana a los antibióticos está en subida, en parte por el uso inadecuado de estos en medicina humana sino también por las prácticas de la industria de la agricultura. La producción animal intensiva implica dar a los animales grandes cantidades de antibióticos para promover el crecimiento y prevenir la infección. Estos promotores utilizados promueven la selección de resistencia a antibióticos en poblaciones bacterianas. Las bacterias resistentes a los ambientes agrícolas pueden transmitirse a los seres humanos, en los cuales causan enfermedades que no pueden ser tratados con antibióticos convencionales. Khachatourians, (1998).

La resistencia bacteriana a los antibióticos y sulfas puede ocurrir de tres formas siendo la más importante la conjugación y mutación. El mecanismo de la conjugación es uno de los más importantes, especialmente en las bacterias Gram negativas, pues, los plásmidos pueden transferir resistencia a múltiples drogas antimicrobianas. Esto constituye la resistencia bacteriana transferible. Este mecanismo es el más frecuente y representa un 90 a 95% de los casos de resistencia de los microorganismos a los agentes antimicrobianos. Martinez, (1992). El problema de la resistencia bacteriana transferible se presenta, generalmente cuando se usan antibióticos para tratar cualquier infección y en concentraciones sub terapéuticas. Un animal portador de cepas resistentes a uno o más antibióticos, puede eliminar vía fecal estas bacterias resistentes y transmitir las a otro animal o también al ser humano. Esto se ha podido comprobar con cepas de *E. coli*, *Salmonella* y *Shigella*. Es importante señalar también que existe otra forma importante de resistencia, denominada resistencia cruzada, y consiste en que las bacterias resistentes a ciertos antibióticos pueden serlo también a otros agentes

antimicrobianos por el hecho de compartir algún mecanismo de acción o de resistencia común. Así, las bacterias que han desarrollado resistencia a sulfonamidas, mostrarán un incremento de la resistencia a todas las sulfas. Igual comportamiento puede presentarse entre los antibióticos de tipo lincosamida, los beta - lactámicos y quinolonas. Martinez, (1992).

Un estudio realizado por Holmberg et al en 1986 identificó a 18 personas con una extraña cepa de *Salmonella* que presentaba resistencia a la tetraciclina, ampicilina y carbamicilina. De estas 18 personas, 13 habían consumido hamburguesas provenientes de carne de un rebaño particular, que estaba recibiendo dosis sub terapéuticas de clortetraciclina en la dieta. Concentraciones sub terapéuticas en diferentes tejidos de origen animal, al ser consumidos, pueden originar reacciones de hipersensibilización y se producen generalmente con mucho más gravedad con la penicilina que con otros antibióticos. Estas reacciones pueden ir desde un vulgar prurito, reacciones urticariales, edema, fiebre medicamentosa y otros. Martinez, (1992).

Sobre el tema de residuos de antibióticos y sulfonamidas en carne, el año 1998 Walton opinó que no existe evidencia que la limitada presencia de estas drogas influya sobre la resistencia bacteriana en el hombre o que desarrolle reacciones de hipersensibilidad, ya que en Europa y Estados Unidos 10 millones de bacterias aisladas no revelaron, ni evidenciaron ningún cambio en cuanto a la resistencia bacteriana. Martinez, (1992).

Esta generalización de señalar que la resistencia bacteriana y las reacciones de hipersensibilidad en la población humana se deben a la existencia de residuos medicamentosos en los alimentos, corresponde a una minoría de instancias que pretenden con ello incrementar la producción y ventas de antibióticos en la medicina humana y medicina veterinaria, por lo tanto, el empleo de este antimicrobiano debe ser en aquellos animales que no van destinados a consumo humano. Martinez, (1992).

El Consejo Nacional de investigación, que es parte de la Academia Nacional de Ciencias concluyó que un enlace puede ser demostrado entre el uso de antibióticos en animales incluidos en el alimento, el desarrollo de microorganismos resistentes en estos animales y las zoonosis y propagación de patógenos para los seres humanos. Fowler, (2016).

El 2003, un taller de expertos copatrocinada por la Organización Mundial de la salud, alimento y organización agrícola (FDA) y Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) llegó a la conclusión de "que hay clara evidencia de consecuencias perjudiciales para la salud humana debido a la resistencia de organismos por el uso de antimicrobianos. En consecuencia estas incluyen infecciones que no hubieran ocurrido, hubo fracasos frecuentes en los tratamientos (en algunos casos la muerte) y aumento en la severidad de las infecciones. Fowler, (2016).

El 2010, el departamento de Agricultura para la administración de medicamentos, de Estados Unidos y el CDC testificaron delante del Congreso que existe una conexión entre el uso rutinario de antibióticos para la producción de carne y la baja efectividad de los antibióticos para la gente. El Dr. Thomas R. Frieden, Director del CDC, señaló que "hay fuerte evidencia científica de un vínculo entre el uso de antibióticos en animales de alimentos y resistencia a los antibióticos en los seres humanos, ya que en la industria el 40 % de todos los antibióticos utilizados en la granja son medicamentos llamados ionóforos, estos no se utilizan en medicina humana, por lo que no importa si las bacterias se vuelven resistentes a ellos. Sin embargo, un estudio realizado por científicos de los Estados Unidos del Departamento de Agricultura (USDA) y la Universidad de Cornell con monensina (ionóforos más utilizados en la producción de ganado en los Estados Unidos), demostró que el uso de monensina en la alimentación de ganado y la selección de bacterias ruminales monensina resistente, mostraron resistencia a la bacitracina, antibiótico que se utiliza en medicina humana, este

estudio demuestra que uno no puede alegar que el uso de los ionóforos evita una reacción cruzada de resistencia a cualquier antibiótico de uso en medicina humana. Fowler, (2016).

### Mecanismos moleculares de resistencia bacteriana:

#### Mecanismos intrínsecos de resistencia

La figura 8 muestra una visión general de los mecanismos de resistencia intrínsecas. El ejemplo mostrado es de antibióticos Betalactámicos dirigidas a una proteína de unión a penicilina (PBP). El antibiótico A puede entrar en la célula a través de una proteína porina que abarca la membrana, alcanzar su objetivo e inhibir la síntesis del peptidoglicano. Antibiótico B también puede entrar en la célula a través de una porina, pero a diferencia del antibiótico A, se retira de manera eficiente por eflujo. Antibiótico C no pueden cruzar la membrana externa y así es incapaz de acceder a la PBP objetivo. Blair et al., (2014).

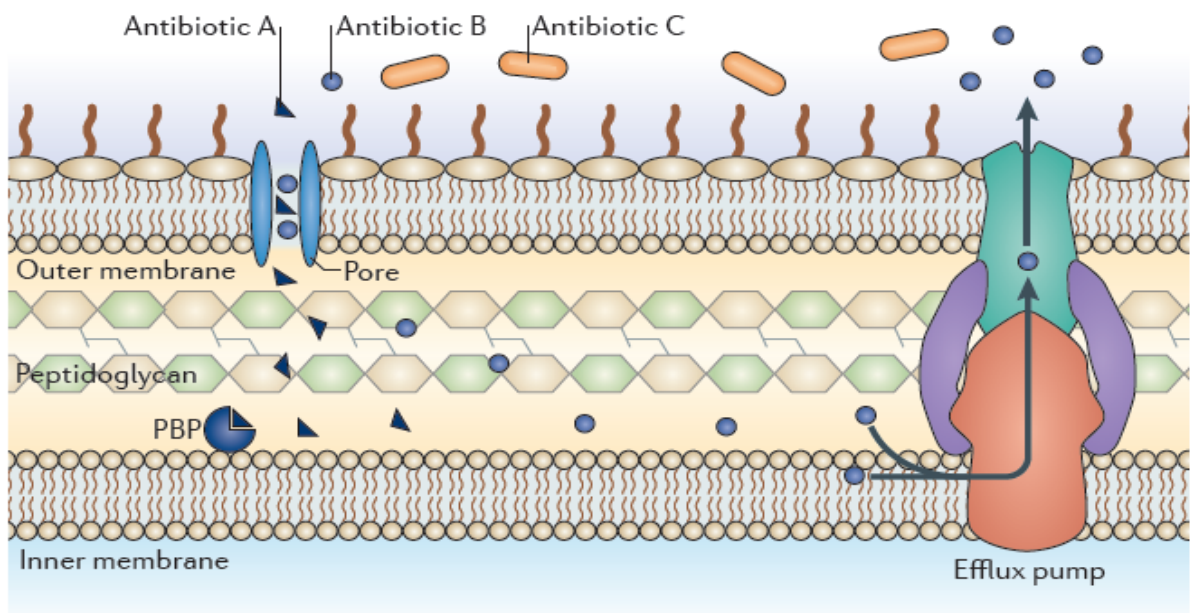


Figura 08. Mecanismos intrínsecos de resistencia a los antibióticos.

Fuente: Blair et al., (2014).

## Vías que regulan el flujo de múltiples fármacos.

La expresión de línea de base de la división de resistencia nodular (RND) bombas de eflujo es controlado por un represor de la familia TetR codificada localmente, y los niveles del factor de transcripción de la familia AraC, que puede aliviar la represión mediada por TetR se mantiene baja por la represión de la proteína de resistencia a múltiples antibióticos (MarR) represor de la familia Blair et al., (2014).

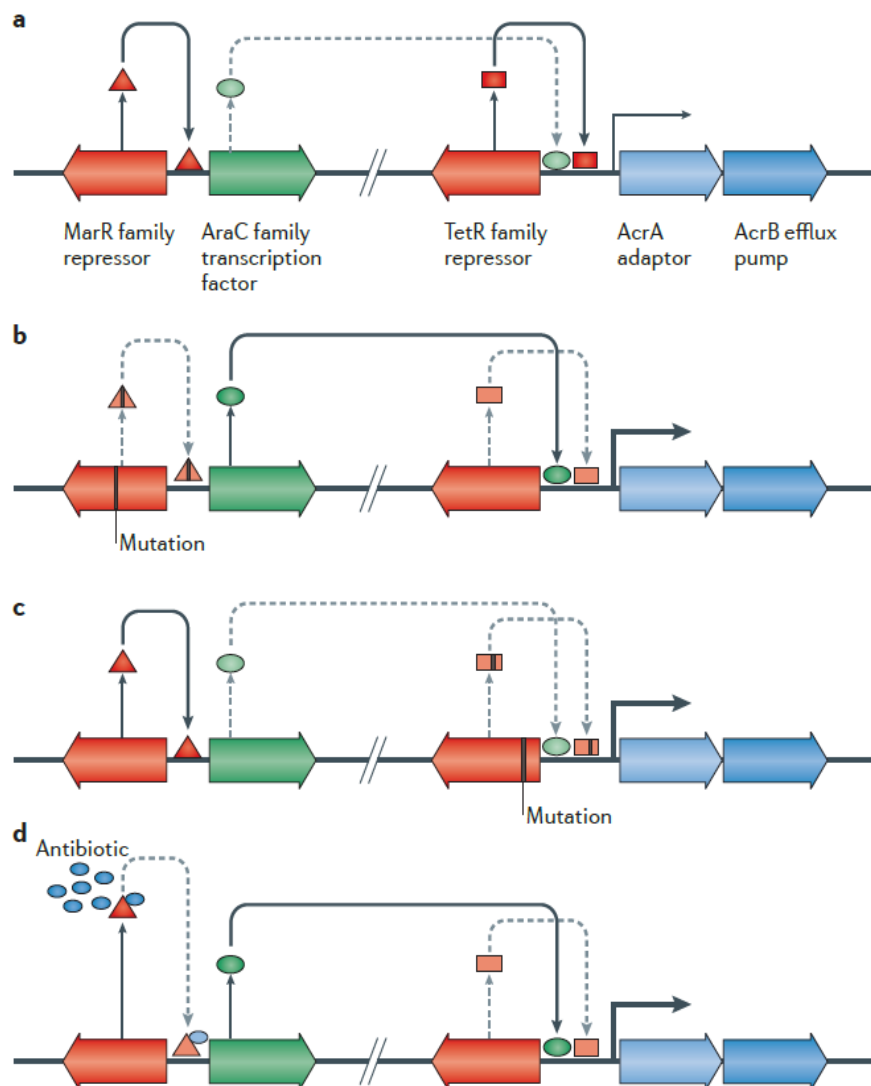


Figura 09. Vías que regulan el eflujo de múltiples fármacos.

Fuente: Blair et al., (2014).

## Vías que regulan el flujo de múltiples fármacos.

Las mutaciones en el gen represor de la familia MarR causan que el represor pierda la capacidad de inhibir los activadores de la familia AraC. El aumento de la expresión del activador AraC confiere una mayor expresión de la AcrB en la bomba de eflujo RND y el adaptador periplásmico AcrA. En cambio la mutación en el gen represor de la familia TetR reduce la unión del represor del agua sobre el AcrA y AcrB, dando lugar al aumento de la transcripción del AcrA y AcrB. Los antibióticos se unen a MarR y causan cambios conformacionales que impiden la represión del activador AraC. El aumento de la expresión del activador AraC conduce al aumento de la transcripción de AcrA y AcrB. Las vías activadas se indican mediante flechas continuas y las vías inhibidas se indican mediante flechas discontinuas Blair et al., (2014).

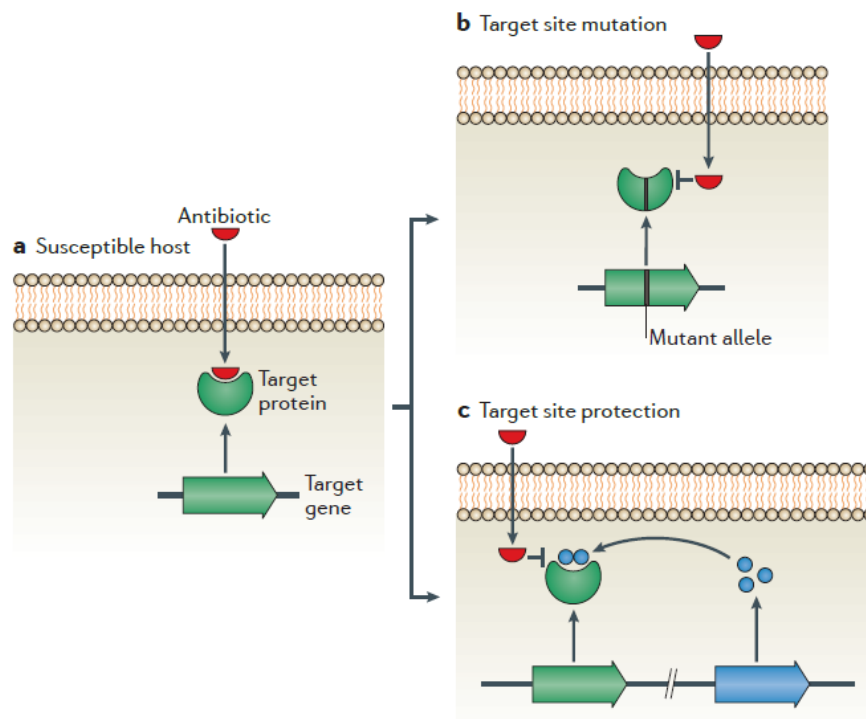


Figura 10. Vías que regulan el eflujo de múltiples fármacos.

Fuente: Blair et al., (2014).

### Cambio del sitio de destino.

Un huésped susceptible en el que un antibiótico es capaz de unirse fuertemente a su objetivo específico y ejercer un efecto inhibitorio como la mutación del sitio diana (por ejemplo, como se encuentra en las mutaciones en los genes de la topoisomerasa en muchas especies que confieren resistencia a fluoroquinolonas) o recombinación para proporcionar un alelo mosaico (como se encuentra en las proteínas de unión a penicilina de mosaico en neumococos y gonococos que confieren Betalactamasa de resistencia) resulta en un objetivo funcional con afinidad reducida para el antibiótico, que no se une de manera eficiente y por lo tanto tiene un efecto reducido o insignificante. La modificación de la diana mediante la adición de un grupo químico también puede evitar la unión antibiótico sin alterar la secuencia de la proteína primaria de la diana, que conserva su actividad. Blair et al., (2014).

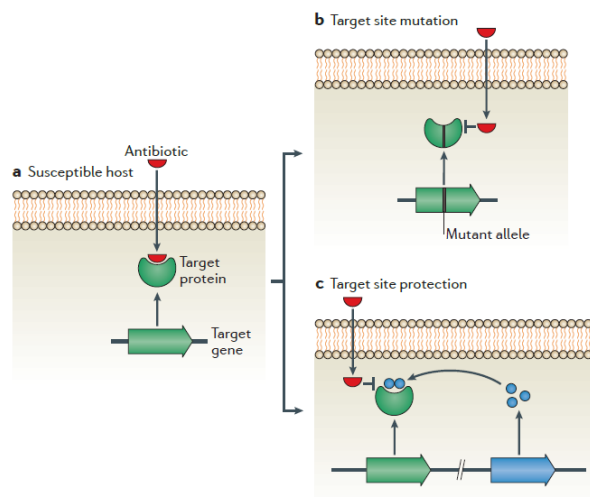


Figura 11. Las bacterias utilizan el mecanismo de cambio del sitio de destino.

Fuente: Blair et al., (2014).

## Interacciones directas con antibióticos.

Un huésped susceptible con un objetivo que se inhibe de manera eficiente por un antibiótico. La adquisición y la producción de una enzima que destruye el antibiótico (Betalactamasas) impide la unión a la diana y confiere resistencia y la adquisición y la producción de una enzima que modifica la estructura del antibiótico (Aminoglucósidos capaces de modificar enzimas) también puede prevenir la unión a la diana y conferir resistencia. Blair et al., (2014).

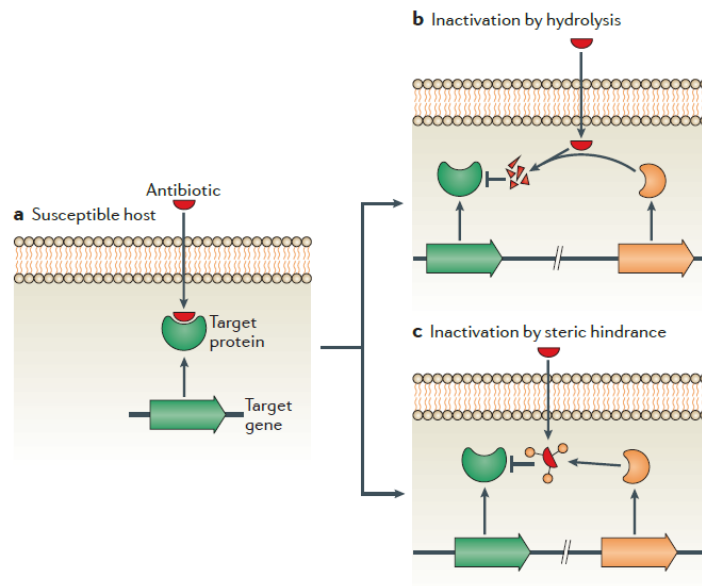


Figura 12. Interacciones directas con antibióticos.

Fuente: Blair et al., (2014).

### 2.1.3.7 Las Superbacterias

Las superbacterias son bacterias resistentes a uno o más antibióticos, y hacen difícil tratar o curar infecciones que una vez fueron tratadas fácilmente. El antibiótico ha perdido su capacidad de controlar o matar el crecimiento bacteriano. Las bacterias pueden crecer incluso en un mar de antibióticos porque los antibióticos no inhiben su desarrollo. Las



bacterias han adquirido la capacidad para destruir el antibiótico con el fin de protegerse a sí mismos. Fymat, (2017).

El mal uso de antibióticos para tratar el virus en lugar de las bacterias a los que están destinados sólo contribuye a la resistencia a los antibióticos. Lo mismo ocurre para otros usos ya que cerca del 80% de los antibióticos producidos son ingeridos por los animales: ganado de carne, pollos, cerdos, como promotores de crecimiento. Los animales excretan antibióticos en forma intacta en gran medida, que entran en el entorno (tierra, agua) y conservan su capacidad de afectar a las bacterias y promover la resistencia a los antibióticos. Ahora hay escasez de nuevos antibióticos para cuidar de estas superbacterias. ¡Así que quedamos a merced de las bacterias! Fymat, (2017).

Una pregunta clave es, ¿puede el uso de antibióticos en animales como promotores de crecimiento favorecer el desarrollo de superbacterias resistentes a los antibióticos y que sea difícil de tratar cuando se enferman las personas? Y si se puede, son las ocurrencias de enfermedades raras y los riesgos teóricos o podría su uso actual de animales plantear una grave amenaza para la salud humana. Fowler, (2016).

Pero la Unión de consumidores ha concluido que la amenaza a la salud pública por el uso excesivo de antibióticos en animales como alimento es real y creciente. Los seres humanos están en riesgo tanto debido a la presencia potencial de superbacterias en carne y aves de corral y a la migración general de superbacterias en el ambiente, donde pueden transmitir su inmunidad genética a los antibióticos a otras bacterias, incluyendo las bacterias que hacen que la gente enferme. Fowler, (2016).

Numerosas organizaciones de salud, incluyendo la Asociación Médica Americana, Asociación Americana de Salud Pública, Sociedad de Enfermedades Infecciosas de América

y la Organización Mundial de la Salud, acordaron y han pedido reducciones significativas en el uso de antibióticos para la producción de alimentos para animales. Fowler, (2016).



Figura 13. Resistencia a los antibióticos por consumo de carnes contaminadas

Fuente: CDC, (2013)

### 2.1.3.8 Problemas productivos

Desde el punto de vista de la producción de alimentos, la presencia de residuos de antibióticos tiene importantes consecuencias para la industria alimentaria, ya que puede interferir en la producción de alimentos. Vélez, (2013).

### **2.1.3.9 Pruebas diagnósticas para detectar antibióticos**

Con el propósito de encontrar solución a los problemas anteriormente citados, se han desarrollado varios métodos de diagnóstico, para detectar residuos de antibióticos, buscando en ellos características como alta sensibilidad, fácil ejecución, amplio espectro antibiótico, breve tiempo en la obtención de resultados y mínimo costo por análisis. Dentro de los métodos de diagnóstico se pueden encontrar: métodos fisicoquímicos, métodos inmunológicos o métodos microbiológicos. Gómez, (2014).

Los métodos fisicoquímicos son necesarios para identificar y cuantificar residuos de antibióticos en la leche y en los tejidos animales. Existen diferentes técnicas como son la electroforesis de alto voltaje con procedimientos por bioautografía y la cromatografía. Gómez, (2014).

En cambio los sistemas inmunológicos se basan en la medición activa del antibiótico o formas presentes del antibiótico que pueden inhibir los microorganismos. La especificidad de los anticuerpos hace de este método muy similar a los métodos enzimáticos. Dentro de las técnicas inmunológicas para el análisis de residuos de antibióticos se puede encontrar: Aglutinación, Radioinmunoensayo, Inmunoensayos no isotópicos, Fluorinmunoensayos, EMIT (Enzyme Multiplied Immunoassay Technique), ELISA. Gómez, (2014).

Finalmente dentro de los métodos microbiológicos se considera una amplia gama de posibilidades de análisis, las que comprenden: Pruebas de desarrollo simple: que consisten en test de bajo costo, rápidos (durante la noche) y fáciles de realizar y son fácilmente utilizables en el campo, en los mataderos o en el laboratorio. Gómez, (2014).

Para detectar la presencia de residuos de antimicrobianos en el animal, las muestras pueden ser tomadas de cualquier tejido del mismo, incluyendo leche, orina, sangre, suero, plasma, lágrimas y bilis. De los microorganismos empleados como cepas sensibles, *Bacillus subtilis* presenta ventajas frente a otras bacterias indicadoras y entre ellas la cepa de *Bundes gesun*

*dheitsamt*. Generalmente son utilizados como forma de Screening, para la detección de residuos en los diferentes tejidos. Estos métodos consisten en saturar un trozo de algodón con fluido (suero, orina), tejido o extracto de alimento y se deposita en un medio de crecimiento con una cepa sensible. Se incuba durante toda la noche y se observa halos de inhibición si es que el antibiótico se encontrara presente. Se conocen los siguientes métodos: Sistemas de difusión: Test de las cuatro placas, método que utiliza *Bacillus subtilis B.G.A*, *Barcina lutea* y *Escherichia coli*. Nouws, (1979); Test del riñón con *Barcina lútea*. Nouws, (1981); Test del *Bacillus subtilis B.G.A*, método oficial de la República Federal de Alemania. Nouws, (1981), Test de la tórula en animal vivo (LAST), Test de la tórula en predio (STOP), Test de antibiótico / sulfonamidas en terneros (CAST), Test de la tórula en predio II: CAST II, Test de Disponibilidad de antibiótico en el alimento concentrado (RAFT). Gómez, (2014). Una diferencia importante de las anteriores técnicas microbiológicas, con respecto a las inmunológicas, la constituye el tiempo de determinación de los residuos, puesto que estas últimas sólo requieren de minutos para obtener resultados. Aunque sin embargo se señala, que los métodos microbiológicos presentan ventajas frente a otros métodos como son los métodos inmunológicos y fisicoquímicos, ya que resultan ser más económicos y sencillos. Además de que requieren sólo material de uso frecuente en un laboratorio de microbiología, prescindiendo de equipos especializados. Gómez, (2014).

#### **Método microbiológico de detección de difusión en placa, 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 antimicrobianos pero no permite determinar la identidad del residuo inhibidor. La técnica se basa en la difusión de los residuos antimicrobianos presentes en una muestra de tejido animal que se pone en contacto con un medio de cultivo inoculado con un microorganismo inhibiendo su crecimiento y dando lugar a la formación de zonas de inhibición. Azañero & Chiroque, (2010).

## **Cromatografía en capa fina**

La cromatografía en capa fina se basa en la preparación de una capa uniforme de un adsorbente mantenido sobre una placa de vidrio u otro soporte. Los requisitos esenciales son, pues, un adsorbente, placas de vidrio, un dispositivo que mantenga las placas durante la extensión, otro para aplicar la capa de adsorbente, y una cámara en la que se desarrollen las placas cubiertas. Es preciso también poder guardar con facilidad las placas preparadas y una estufa para activarlas. La fase móvil es líquida y la fase estacionaria consiste en un sólido. La fase estacionaria será un componente polar y el eluyente será por lo general menos polar que la fase estacionaria, de forma que los componentes se desplacen con mayor velocidad serán los menos polares. (UNAM, 2007).

Polaridad de los compuestos orgánicos en orden creciente: hidrocarburos < olefinas < flúor < cloro < nitro < aldehído aldehído < ester < alcohol < cetonas < aminas < ácidos < amidas. La cromatografía en capa fina presenta una serie de ventajas frente a otros métodos cromatográficos (en columna, en papel, en fase gaseosa) ya que el utillaje (Conjunto de útiles e instrumentos que se usan) precisa que es más simple. El tiempo que se necesita para conseguir las separaciones es mucho menor y la separación es generalmente mejor. Pueden usarse reveladores corrosivos, que sobre papel destruirían el cromatograma. El método es simple y los resultados son fácilmente reproducibles, lo que hace que sea un método adecuado para fines analíticos. Al realizar la elección del adsorbente se debe tener en cuenta el tamaño de las partículas del adsorbente, cuanto más finamente dividido esté mayor será su adhesión al soporte, aunque también se le puede añadir un adherente. (UNAM, 2007).

En la elección del eluyente influyen varios factores:

- Precio

- Pureza
- No utilizar mezclas de eluyentes (Reproductibilidad)
- No utilizar Compuestos muy volátiles
- Evitar que contengan trazas de metales (catalizadores)

La elección del eluyente se realiza de forma empírica. Hay que estudiar la polaridad del componente y probar con eluyentes cada vez menos polares. (UNAM, 2007).

Generalmente se utiliza como reactivo revelador el yodo, el cual forma complejos coloreados con los componentes orgánicos (con tono amarillo-marrón), pero las manchas desaparecen con el tiempo con lo que es conveniente señalar las manchas aparecidas.

Otro reactivo revelador bastante utilizado es el ácido sulfúrico, que reacciona con los componentes orgánicos produciendo manchas negras. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que el tamaño de las manchas no está relacionado con la cantidad de componente separado. (UNAM, 2007).

### **Método cuantitativo de Cromatografía Líquida de Alta Resolución /Performance (HPLC)**

La cromatografía líquida de alta resolución ha tenido una creciente difusión desde comienzos de la década del 70, y hoy representa una de las herramientas más empleadas en el laboratorio analítico moderno.

La cromatografía se define según la International Unión of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) como “un método, usado primariamente para la separación de los componentes de una muestra, en la cual los componentes se distribuyen en dos fases, una de las cuales es estacionaria, mientras la otra se mueve. La fase estacionaria puede ser un sólido, un líquido retenido sobre un sólido o un gel. La fase estacionaria puede estar extendida

como una capa o distribuida como una película, etc. La fase móvil puede ser líquida o gaseosa” El resultado obtenido de la cromatografía es un cromatograma el cual según IUPAC es “un gráfico u otra representación de la respuesta del detector, concentración del efluente u otra cantidad usada como una medida de la concentración del efluente, versus el volumen de efluente o tiempo”. Tapia, (2013).

Esta técnica se considera muy importante a nivel de análisis químico ya que no solo permite la separación de los componentes de la mezcla sino también la identificación y la cuantificación de éstos. Además es elegida entre otras técnicas de separación por su sensibilidad, fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles y su aplicación a sustancias de primordial interés en la industria. Tapia, (2013).

El uso de ésta técnica permite la identificación y valoración de residuos, procesados de una sola muestra de tejido, de una manera rápida y eficaz de las siguientes sustancias antimicrobianas:

- Sulfametoxazol
- Sulfatiazol
- Sulfopiridina
- Sulfameracina
- Sulfadiazina
- Sulfametizol
- Tetraciclinas
- Oxitetraciclina
- Clortetraciclina
- Doxiciclina
- Ofloxacina

- Norfloxacino
- Ciprofloxacino
- Enrofloxacino
- Trimetoprim
- Tilosina
- Eritromicina
- Penicilina G sódica
- Ampicilina
- Amoxicilina



## **2.2 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.2.1. MATERIALES, INSUMOS, REACTIVOS Y EQUIPOS**

#### **Materiales de Vidrio**

- 48 placas Petri de 10 cm
- 12 tubos de Ensayo de 15 ml
- 05 matraces de 250 ml
- 04 matraces de 500 ml
- 02 balones de 500 ml
- 05 pipetas de vidrio de 5 ml
- 01 Anza Drigalski
- 01 beacker de 30 ml
- 01 beacker de 500 ml
- 01 probeta de 100 ml
- 04 frascos ámbar de 120 ml

#### **Materiales de Plástico**

- 20 placas Petri de 10 cm
- 100 tips para Micropipeta de 100 ul
- 50 tips para Micropipeta de 1 ml
- 01 rollo de bolsas de plástico 15 x 25
- 28 frascos colectores de orina estériles
- 04 lentes
- 02 picetas de 250 ml
- 01 balde de 15 L
- 01 galonera de 4 L

## **Equipos**

- 01 balanza digital marca OHAUS MODELO EP-413
- 01 balanza comercial marca Exacto CB-2
- 01 autoclave marca He & A CORPORATION de 30 litros
- 01 incubador marca NEMMERT
- 01 refrigerador marca SINDELEN MODELO RD-2000SI
- 01 refrigerador marca MABE 19FT CLEAN STEEL
- 01 congeladora marca FAEDA
- 01 pH metro marca ADWA MODELO AD-11
- 01 termómetro digital marca SKU MODELO WT-1
- 01 cocina eléctrica marca ARISANJAYA
- 01 cámara fotográfica marca SAMSUNG
- 01 laptop marca HP Corel I-5
- 01 impresora marca Epson L - 380

## **Reactivos**

- Calibradores de pH 4 y 7
- Agua desionizada 20 L
- Agua destilada 35 L
- HCL 1 N 100 ml
- HCL 0.1 N 100 ml
- NaOH 1 N 100 ml
- NaOH 0.1 N 100 ml
- NaCl 0.09 % 1 Litro
- Alcohol de 70 grados 1 Litro

- Alcohol de 96 grados 1 Litro

### **Medios de Cultivo y Cepas Bacterianas**

- Agar TSA 500 gr.
- Agar Antibiótico 500 gr.
- *Bacillus subtilis* ATCC 6633
- *Kocuria rhizophila* ATCC 9341

### **Muestras**

- 85 muestras de carne de ganado bovino de 500 g. cada uno

### **Vestimenta de Bioseguridad**

- 04 mandiles de tela
- 50 pares de unidades de guantes descartables estériles
- 50 pares de guantes descartables
- 50 mascarillas descartables
- 20 mandiles descartables
- 50 pares de cubrecalzados
- 50 unidades de cubrecabezas

### **Útiles de Escritorio**

- 01 cuaderno
- 04 marcadores
- 02 lapiceros
- 500 hojas de papel Bond A4 de 75 gr.
- 01 regla milimétrica
- 30 unidades de papel Kraft

## Otros

- 01 cuchillo Tramontina N° 07
- 01 bandeja de aluminio
- 02 rollos de papel aluminio
- 01 mango de bisturí N° 04
- 100 unidades de hoja de bisturí N° 22
- 04 pinzas de disección
- 03 sacabocados marca Truper
- 50 unidades de jeringa descartable de 20 ml
- 50 unidades de jeringa descartable de 10 ml
- 50 unidades de jeringa descartable de 03 ml
- 01 Anza de Kolle
- 01 mechero
- 01 balón de gas
- 01 detergente de 100 gr
- 01 Ayudin líquido de 500 ml
- 01 algodón 500 gr.
- 02 cepillos de diente
- 01 pincel grueso
- 01 espátula
- 01 atomizador descartable para botella
- 02 paños absorbentes
- 02 rollos de papel toalla
- 04 rollos de papel higiénico suave
- 01 trapeador

## 2.2.2. METODOLOGÍA

- **Método microbiológico de difusión en placa. Método oficial de la República Federal de Alemania. Nouws, (1981).**

**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 antimicrobianos pero no permite determinar la identidad del residuo inhibidor. La técnica se basa en la difusión de los residuos antimicrobianos presentes en una muestra de tejido animal que se pone en contacto con un medio de cultivo inoculado con un microorganismo inhibiendo su crecimiento y dando lugar a la formación de zonas de inhibición.

### **Descripción del ensayo**

**Preparación del inóculo:** Se adquirió cultivo de reserva comercial (*Bacillus subtilis* ATCC 6633 y *Kocuria rhizophila* ATCC 9341) los cuales fueron activados según el protocolo recomendado por el fabricante. Fue sembrado en Agar TSA a un pH de 7.31 en 03 placas Petri con 11 ml de Agar diluido y luego solidificado; se incubó a 37 °C por un lapso de 48 Horas, observándose un crecimiento denso y uniforme, Posteriormente fue repicado en 06 tubos de ensayo de 10 ml y luego incubado a 37 °C por un lapso de 48 horas hasta ver colonias en la superficie, se conservó en refrigeración a 5 °C hasta su uso. Para preparar el inóculo para plaquear, se diluyó las cepas bacterianas en la dilución ( $10^{-2}$ ) utilizada para realizar la siembra de las colonias bacterianas que fueron enfrentadas a las muestras de carne.

### **Preparación de los medios de cultivo**

**TSA (Tryptic Soy Agar):** Para poder activar las cepas ATCC, se preparó agar TSA, para lo cual primero se pesó 8 g de Agar al cual se le añadió 200 ml de agua destilada y se mezcló en un matraz de 500 ml, se calentó el agar y cuando llegó a temperatura de

ebullición se dejó enfriar a temperatura de 45°C, luego utilizando una Micropipeta de 100 ul se ajustó el pH a 7.31 con 600 ul de HCl al 0.1 Normal, ideal para el crecimiento de cepas bacterianas de *Bacillus subtilis* y *Kocuria rhizophila*, luego se autoclavó a 121°C a 15 Lb de presión durante 15 minutos, se esperó que se enfriará y se mantuvo en refrigeración hasta ser utilizada.

**Agar Antibiótico N° 11, DIFCO BD:** Para preparar el medio de cultivo para detectar los residuos de antibióticos, se utilizó Agar Antibiótico N° 11, DIFCO BD, se pesó 7.1 gr y luego se vertió en un matraz de 500 ml agregando agua destilada en una cantidad de 200 ml, se calentó a temperatura de ebullición y luego se dejó enfriar hasta 45 °C y con la ayuda del peachimetro se ajustó el pH. Utilizando una Micropipeta de 100 ul se agregó HCl al 1 Normal o NaOH al 1 Normal según el pH requerido, así tenemos que para cada 200 ml de Agar antibiótico se usó:

Antibióticos a detectar	pH	Solución para Ajustar
➤ Beta Lactamicos	6.0	760 ul de HCl 1 Normal
➤ Tetraciclinas	6.0	760 ul de HCl 1 Normal
➤ Sulfonamidas	7.2	300 ul de HCl 1 Normal
➤ Macrólidos y Aminoglucósidos	8.0	450 ul de NaOH 1 Normal

Una vez ajustado el pH, se autoclavó a 121 °C a 15 Lb de presión por 15 minutos, luego se dejó enfriar y se conservó en refrigeración a 5 °C hasta ser utilizado.

**Preparación de Placas:** Se lavaron las placas Petri con agua y detergente, se secaron, posteriormente se envolvieron con papel, luego se autoclavaron a 121°C a 15 Lb de presión durante 15 minutos, se sacaron del autoclave y luego se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su uso.

**Preparación de la muestra:** Para preparar las muestras de carne, primero ésta se identificó y se congeló hasta ser enfrentado a las placas Petri conteniendo las cepas bacterianas según el pH (6, 7.2 y 8) y la especie (*Bacillus subtilis* o *Kocuria rhizophila*), para obtener los discos, se cortó la carne en láminas de 2 mm de grosor y luego con la ayuda de sacabocados se obtuvieron 05 discos de carne (01 para cada placa según el pH y cepa bacteriana) para evitar la contaminación se colocó las muestras en placas Petri previamente identificadas.

**Inoculación de las placas:** En una placa Petri se vertió 2 ml de suspensión de la cepa bacteriana (*Bacillus subtilis* o *Kocuria rhizophila*) en una dilución de  $10^{-2}$  con la ayuda de una Micropipeta de 1 ml, luego se le añadió 11 ml de Agar Antibiótico N° 11, DIFCO BD calentado y diluido previamente con la ayuda de una cocina, se dejó enfriar en una superficie horizontal hasta que el agar se solidificó. Luego se pasó a identificar las muestras del número 01 al 85 con un código para no tener problemas ni errores en la lectura de resultados, luego se enfrentó con un disco control según el grupo de antibióticos y 03 discos de muestras de carne por placa. Una vez concluido se envolvió con papel identificando las muestras procesadas y se incubó a 37 °C por un lapso de 48 horas y luego se procedió a dar lectura a los resultados.

Para las muestras positivas a la primera lectura, se vertió 11 ml de Agar Antibiótico N° 11, DIFCO BD, se esperó a que se solidifique y posteriormente se inoculó 2 ml de las cepas bacterianas con una Micropipeta de 1 ml y con ayuda del asa drigalsky se diseminó por todo el medio de cultivo, posteriormente se colocaron los discos y las muestras de carne (01 disco control y 03 muestras por placa)

Para detectar los residuos de antibióticos se procedió de manera específica para cada grupo de la siguiente manera:

- **Antibióticos del grupo de los Betalactámicos:** Se utilizó Agar Antibiótico N° 11, DIFCO BD a un pH de 6.0 con el inóculo de *Bacillus subtilis* BGA ATCC 6633

- **Antibióticos del grupo de las Tetraciclinas:** Se utilizó Agar Antibiótico N° 11, DIFCO BD a un pH de 6.0 con el inóculo de *Bacillus subtilis* BGA ATCC 6633.
- **Antibióticos del grupo de las Sulfonamidas:** Se utilizó Agar Antibiótico N° 11, DIFCO BD a un pH de 7.2 con el inóculo de *Bacillus subtilis* BGA ATCC 6633.
- **Antibióticos del grupo de los Aminoglucósidos:** Se utilizó Agar Antibiótico N° 11, DIFCO BD a un pH de 8.0 con el inóculo de *Bacillus subtilis* BGA ATCC 6633.
- **Antibióticos del grupo de los Macrólidos:** Se utilizó Agar Antibiótico N° 11, DIFCO BD a un pH de 6.0 con el inóculo de *Kocuria rhizophila* ATCC 9341.

### **Lectura de resultados**

Las muestras incubadas después de 48 horas se procedió a la lectura de las muestras, considerando positivas todas aquellas que formaron un halo inhibitorio de colonias mayor a 2 mm se consideró muestra positiva.

### **- Cromatografía líquida de Alta Performance (HPLC) Validado por la British Pharmacopoenia**

**Principio del ensayo:** La muestra que contiene el analito de interés a ser cuantificado es tratada previamente con el fin de extraer dicho analito para luego cuantificarlo a través de la cromatografía líquida. La muestra tratada pasa a través de una columna específica, la cual previamente ha sido sometida a saturación con fase móvil, aquí tiene lugar la separación de los componentes presentes en la muestra, el analito de interés se detecta de acuerdo a la mayor absorbancia la cual es representada gráficamente mediante un pico con características aceptables de acuerdo a parámetros analíticos como asimetría, platos teóricos, tiempo de retención, factor de capacidad, resolución, entre los más importantes.

### **Descripción del ensayo**

**Preparación de la Fase Móvil:** Medir 780 ml de agua en una probeta y verter a un Beaker de un litro, en otra probeta medir 220mL de Metanol HPLC mezclar con el agua agregar



1 ml de TEA (trietilamina) mezclar y llevar a pH 5.5 con la ayuda de un potenciómetro y ácido fosfórico p.a. Luego filtrar la mezcla por poro 0.45um.

**Preparación del Estándar:** Pesar 20 mg de estándar de antibiótico en una fiola de 100 ml agregar 20 ml de metanol HPLC, disolver y enrasar con metanol. Tomar 1 ml de la dilución anterior en una fiola de 100 ml y enrasar con fase móvil.

**Preparación de muestra:** Triturar la muestra con un bisturí luego en un mortero con pilón hasta que se vuelva una masa pastosa homogénea, pesar exactamente 500 mg en un balanza y llevarlo a un tubo de ensayo agregar 5 ml de metanol agitar con el vortex por 5 minutos aproximadamente luego centrifugar la muestra por 15 min a 6000 rpm y verter el sobrenadante en un Beaker de 50 ml en un baño maría, llevar a sequedad y luego agregar 1ml de fase móvil y filtrar por 0.45 um a viales para inyección en el HPLC.

## **Procedimiento**

**Preparación de la muestra:** Las Muestras Positivas a la técnica de difusión en Placa (14 muestras) fueron cortadas en 3 cm cúbicos, dando un peso promedio de 50 g, fueron envueltas en papel aluminio y se colocadas dentro de frascos estériles para muestras de orina. Luego se conservaron en congeladora a -8°C hasta que fueron remitidas al laboratorio para su posterior cuantificación. Cada muestra se preparó por duplicado.

**Transporte de muestras:** En primer lugar se adquirió 20 geles refrigerantes y 02 cajas de tecnopor grandes. Cada gel refrigerante fue congelado por un lapso de 05 días a -8°C. 02 horas antes de viajar se envolvió cada gel refrigerante congelado en papel y se puso en la base de las cajas de tecnopor, sobre ellas las muestras preparadas y encima el gel refrigerante congelado, se cerró las cajas de tecnopor y se envolvió con FILM. Las muestras fueron enviadas a la ciudad de Lima por vía aérea y trasladadas inmediatamente al laboratorio donde se realizó la cuantificación de los antibióticos.

## **Procesamiento de cuantificación de antibióticos.**

Para detectar la cantidad de antibióticos presentes en las muestras de carne se realizaron 02 pruebas diagnósticas:

**01 Cromatografía Líquida de Alta Performance:** Para detectar y cuantificar antibióticos del grupo de los Betalactámicos, Tetraciclinas y Macrólidos.

**02 Cromatografía en capa fina:** Para detectar y cuantificar antibióticos del grupo de los Aminoglucósidos.

Para la realización de las pruebas el Centro de Control Analítico de la Facultad de Farmacia de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos no contaba con las columnas de los antibióticos detectados y para la realización se recurrió al laboratorio ASDELAB que procesó las muestras en un tiempo de 45 días calendarios.

## 2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 2.3.1. DETECCIÓN DE ANTIBIÓTICOS

Se procesaron 85 muestras de carne entre los meses de Mayo y Julio de 2018, de los cuales 14 muestras fueron positivas a la detección de antibióticos para 04 grupos de antibióticos (Betalactámicos, Tetraciclinas, Aminoglucósidos y Macrólidos)

**Tabla 3**  
**Muestras procesadas del 01 – 15.**

PUESTO	MUESTRA		TE	SENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS					TOTAL
	FECHA	Nº		BL	SLF	MCR	AMG		
599	26-jun	1	0	0	0	0	0	0	
155	22-may	2	0	0	0	0	0	0	
171	22-may	3	0	0	0	0	0	0	
180	19-jun	4	0	0	0	0	0	0	
181	22-may	5	0	0	0	0	0	0	
168	19-jun	6	0	0	0	0	0	0	
170	19-jul	7	0	0	0	0	0	0	
187	19-jun	8	0	0	0	0	0	0	
182	19-jun	9	0	0	0	0	0	0	
174	03-jul	10	0	0	0	0	0	0	
180	03-jul	11	0	0	0	0	0	0	
172	22-may	12	0	0	0	0	0	0	
166	22-may	13	0	0	0	0	0	0	
162	26-jun	14	0	0	0	0	0	0	
176	03-jul	15	0	1	0	0	0	1	

Fuente Elaboración Propia

**Tabla 4****Muestras procesadas del 16 – 50.**

MUESTRA				SENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS				
PUESTO	FECHA	Nº	TE	BL	SLF	MCR	AMG	TOTAL
186	03-jul	16	0	0	0	0	0	0
156	19-jun	17	0	1	0	0	0	1
179	03-jul	18	0	0	0	0	0	0
174	24-jul	19	0	1	0	0	0	1
168	24-jul	20	1	0	0	0	0	1
166	24-jul	21	1	0	0	0	0	1
171	24-jul	22	0	0	0	0	0	0
159	24-jul	23	0	0	0	0	0	0
181	24-jul	24	0	0	0	0	0	0
157	24-jul	25	1	0	0	0	0	1
161	24-jul	26	0	0	0	0	0	0
175	24-jul	27	0	0	0	0	0	0
155	24-jul	28	0	0	0	0	0	0
172	24-jul	29	0	0	0	0	0	0
187	24-jul	30	0	0	0	0	0	0
184	12-jun	31	0	0	0	0	0	0
181	03-jul	32	0	0	0	0	0	0
159	03-jul	33	0	0	0	0	0	0
185	12-jun	34	0	0	0	0	0	0
161	12-jun	35	0	0	0	0	0	0
173	19-jun	36	0	0	0	0	0	0
187	03-jul	37	0	0	0	0	0	0
165	19-jun	38	0	0	0	0	0	0
164	19-jun	39	0	0	0	0	0	0
173	12-jun	40	0	0	0	0	0	0
157	22-may	41	0	0	0	0	0	0
157	03-jul	42	0	0	0	0	0	0
179	19-jul	43	0	0	0	0	0	0
175	26-jun	44	0	0	0	0	0	0
182	26-jun	45	0	0	0	0	0	0
173	19-jul	46	0	0	0	0	0	0
586	12-jun	47	0	0	0	0	1	1
153	19-jul	48	0	0	0	0	0	0
171	19-jul	49	0	0	0	1	1	2
182	19-jul	50	0	0	0	1	0	1

Fuente Elaboración propia

**Tabla 5****Muestras procesadas del 51 – 85.**

MUESTRA				SENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS				
PUESTO	FECHA	Nº	TE	BL	SLF	MCR	AMG	TOTAL
156	19-jul	51	0	0	0	0	0	0
159	19-jul	52	0	0	0	0	0	0
183	19-jul	53	0	0	0	0	0	0
157	19-jul	54	0	0	0	0	0	0
163	19-jul	55	0	0	0	0	0	0
185	26-jun	56	0	0	0	1	0	1
164	19-jun	57	0	0	0	0	0	0
187	22-may	58	0	0	0	0	0	0
187	12-jun	59	0	0	0	0	0	0
169	19-jun	60	0	0	0	0	0	0
179	22-may	61	0	0	0	0	0	0
610	12-jun	62	0	0	0	0	0	0
181	19-jul	63	0	0	0	0	1	1
155	19-jul	64	0	0	0	0	0	0
162	19-jun	65	0	0	0	0	0	0
166	26-jun	66	0	0	0	0	0	0
157	16-jun	67	0	0	0	0	0	0
171	26-jun	68	0	0	0	0	0	0
165	22-may	69	0	0	0	0	0	0
163	26-jun	70	0	0	0	0	0	0
162	12-jun	71	0	0	0	0	0	0
181	12-jun	72	0	0	0	0	0	0
174	12-jun	73	0	0	0	0	1	1
169	26-jun	74	0	0	0	0	0	0
162	22-may	75	0	0	0	0	0	0
159	22-may	76	0	0	0	0	0	0
185	03-jul	77	0	0	0	0	0	0
159	12-jun	78	0	0	0	0	0	0
164	26-jun	79	0	0	0	0	0	0
186	03-jul	80	0	0	0	0	0	0
167	26-jun	81	0	0	0	0	0	0
173	26-jun	82	0	0	0	0	0	0
163	03-jul	83	0	0	0	0	0	0
178	22-may	84	0	0	0	0	0	0
171	12-jun	85	0	0	0	0	1	1

Fuente Elaboración propia

**Tabla 6****Resumen de muestras procesadas positivas a la detección de antibióticos en carne.**

PUESTO	MUESTRA		SENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS					TOTAL
	FECHA	Nº	TE	BL	SLF	MCR	AMG	
176	03-jul	15	0	1	0	0	0	1
156	19-jun	17	0	1	0	0	0	1
174	24-jul	19	0	1	0	0	0	1
168	24-jul	20	1	0	0	0	0	1
166	24-jul	21	1	0	0	0	0	1
157	24-jul	25	1	0	0	0	0	1
586	12-jun	47	0	0	0	0	1	1
171	19-jul	49	0	0	0	1	1	2
182	19-jul	50	0	0	0	1	0	1
185	26-jun	56	0	0	0	1	0	1
181	19-jul	63	0	0	0	0	1	1
174	12-jun	73	0	0	0	0	1	1
171	12-jun	85	0	0	0	0	1	1
TOTAL			3	3	0	3	5	14

Leyenda:

TE Tetraciclinas  
 BL Betalactámicos  
 SLF Sulfonamidas  
 MCR Macrólidos  
 AMG Aminoglucósidos

Leyenda:

1 Positivo  
 0 Negativo

Fuente Elaboración propia

En las tablas 3, 4 y 5, se observa que de 85 muestras procesadas, 13 muestras fueron positivas a la detección de antibióticos, siendo la muestra 49 positiva a la presencia de 02 grupos de antibióticos en el mismo momento.

### **Presencia de antibióticos en carnes de Bovinos comercializados en el mercado municipal de Huanta**

En la figura 14 y en la tabla 7 se presenta el porcentaje de carnes de bovinos que resultaron ser positivas y negativas a la presencia de grupos de antibióticos según clasificación, las

mismas que suelen ser vendidas en los puestos de expendio de carnes del mercado municipal de Huanta.

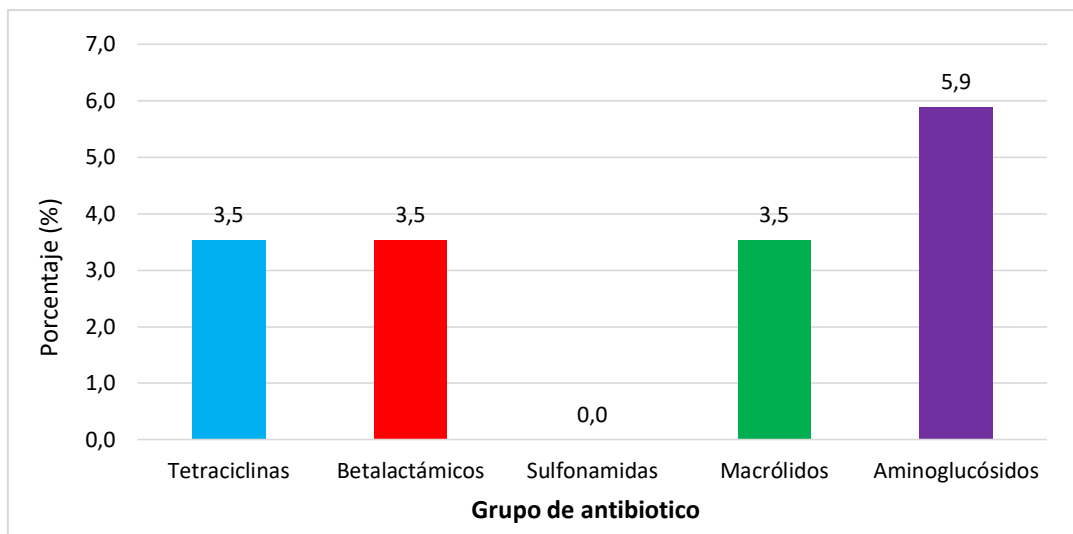


Figura 14. Porcentaje de carnes positivas a la presencia de antibióticos.

Se observa que el 16.5 % de las carnes de bovino que se comercializan en el mercado municipal de Huanta, fueron positivas a la presencia de antibióticos con un intervalo de confianza de 8.6 y 24.4. Asimismo, se pudo evidenciar que el 3.5% de las carnes resultaron positivas a la presencia de Tetraciclinas, Betalactámicos y Macrólidos con un intervalo de confianza de 0.4 y 7.5; mientras que el 5.9% del total de carnes evaluadas resultó ser positiva a la presencia de Aminoglucósidos con un intervalo de confianza de 0.9 y 10.9 a un nivel de significancia del 95%.

**Tabla 7**

**Presencia de antibióticos en carnes de bovinos comercializados en el mercado de Huanta. Ayacucho 2018.**

Grupo de Antibiótico	n	Negativos		Positivos		
		n	%	n	%	I.C.
Tetraciclinas	85	82	96.5	3	3.5	0.4 ; 7.5
Betalactámicos	85	82	96.5	3	3.5	0.4 ; 7.5
Sulfonamidas	85	85	100.0	0	0.0	0.0 ; 00
Macrólidos	85	82	96.5	3	3.5	0.4 ; 7.5
Aminoglucósidos	85	80	94.1	5	5.9	0.9 ; 10.9
<b>Total</b>	<b>85</b>	<b>71</b>	<b>83.5</b>	<b>14</b>	<b>16.5</b>	<b>8.6 ; 24.4</b>

Las muestras positivas presentaron un halo de inhibición de crecimiento de colonias bacterianas como se muestra en la figura 15, muestras positivas a la detección de antibióticos en carne – grupo Aminoglucósidos; en la figura 16, muestras positivas a la detección de antibióticos en carne – grupo Tetraciclinas y en la figura 17, muestras positivas a la detección de antibióticos en carne – grupo Macrólidos.

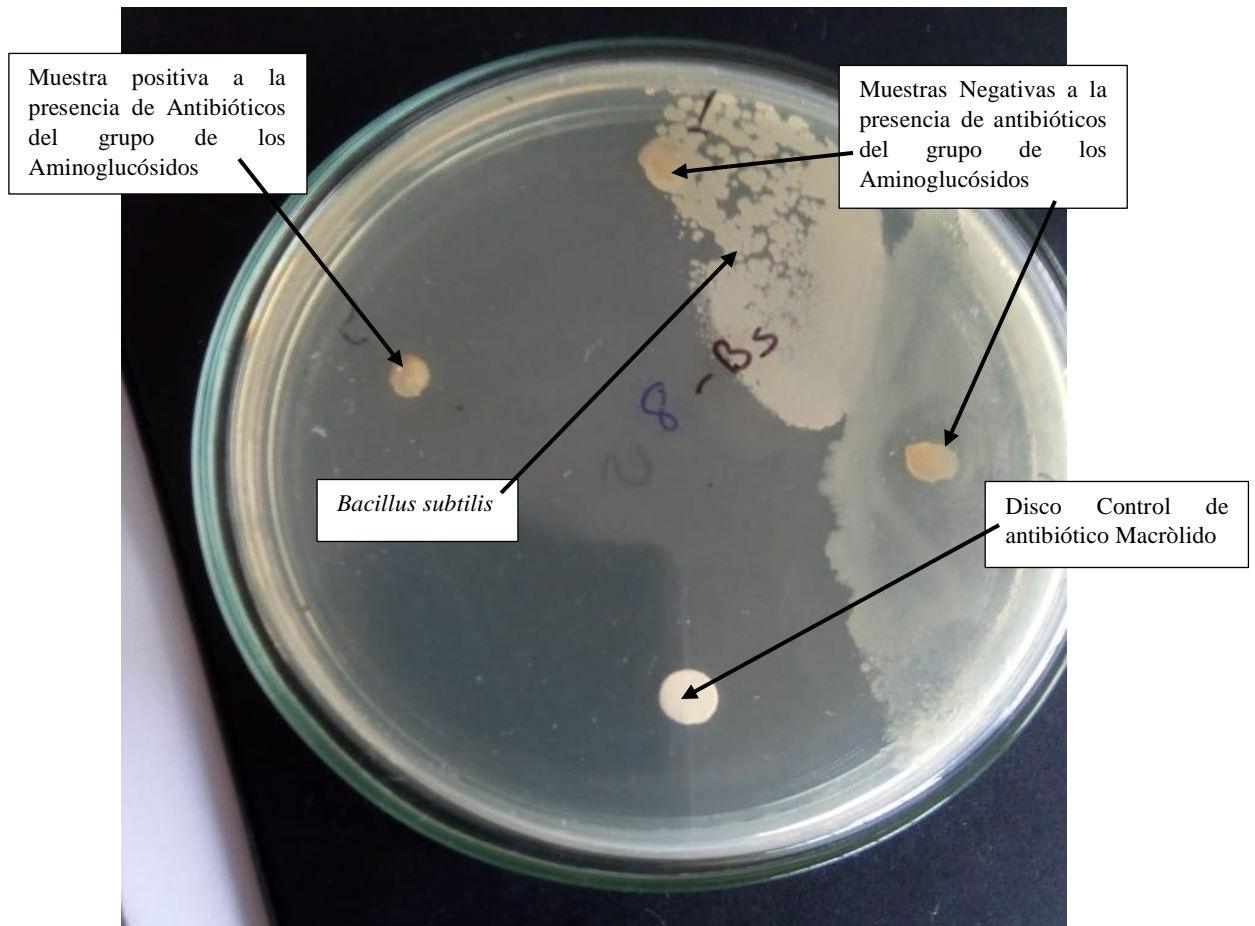


Figura 15. Muestras positivas a la detección de antibióticos en carne – grupo aminoglucósidos.



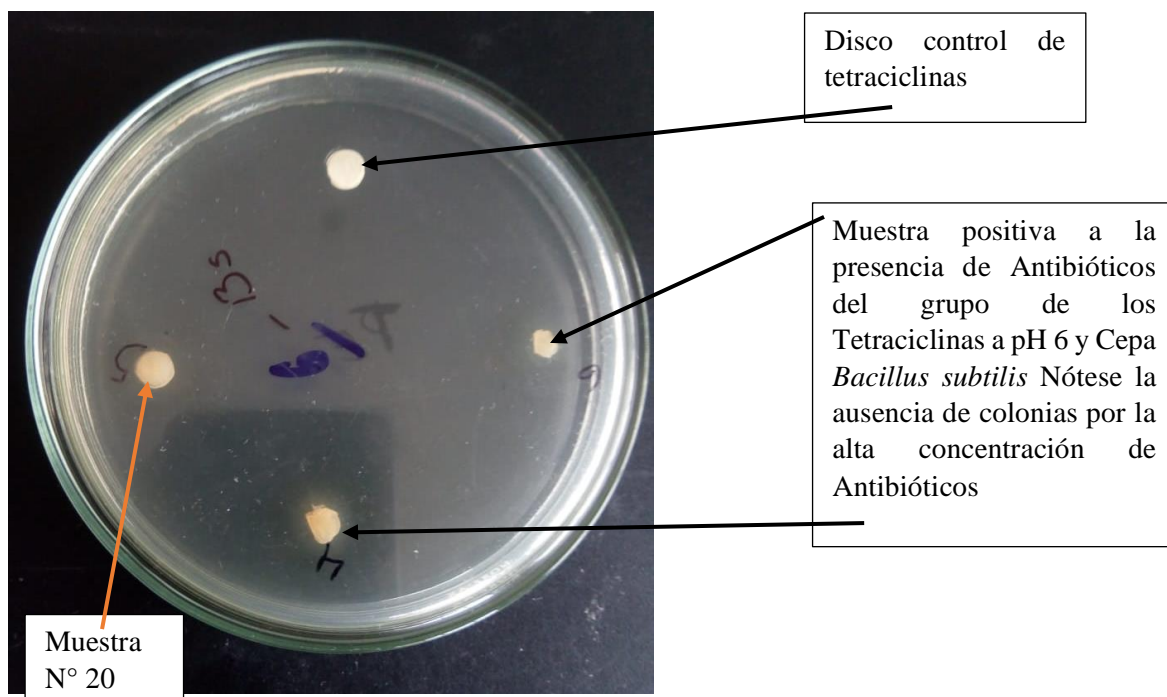


Figura 16. Muestras positivas a la detección de antibióticos en carne – grupo tetraciclinas.

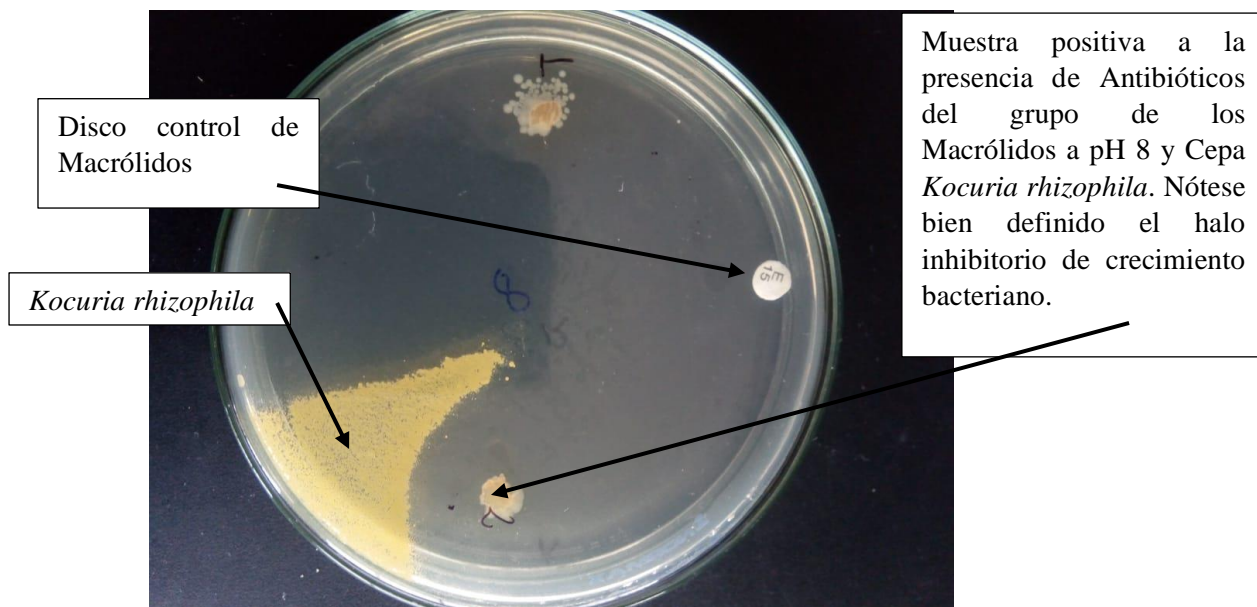


Figura 17. Muestras positivas a la detección de antibióticos en carne – grupo macrólidos.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran un 16.5 % de muestras positivas a la presencia de antibióticos, superando el 4.3 % presentado por Emilfork, (1998) en Chile, pero muy por debajo de los residuos que muestra Abdelmoaty, (2015) en Egipto muestra la presencia de antibióticos en un 29%.

El uso indiscriminado de antibióticos en especial los del grupo de las Tetraciclinas se utiliza a mayor escala como muestra en el presente trabajo en donde la muestra 20 fue positiva a la identificación y cuantificación de Clortetraciclina que era de 66.57 veces más el LMRs, también Acosta, (2014) obtuvo 8 % de muestras superiores a los LMRs en un estudio realizado en Antioquia, Colombia de musculo diafragmático de Bovino positivo a Oxitetraciclina, también Abdelmoaty, (2015) en Egipto demostró que las tetraciclinas predominaban en un 28 % y las penicilinas en un 20 % de las muestras positivas que llegaron al 29%.

### 2.3.2. CUANTIFICACIÓN DE ANTIBIÓTICOS

Para cuantificar los antibióticos de las muestras positivas a la detección de antibióticos fueron sometidas a la prueba de Cromatografía en Capa Fina para el grupo de antibióticos Aminoglucósidos y Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC) para el grupo de antibióticos Tetraciclinas, Betalactámicos y Macrólidos, cuyos resultados se presentan en la tabla 08

**Tabla 8**

**Resultados de cuantificación de muestras positivas a la prueba de difusión en placa**

ENSAYOS	MUESTRA	LÍMITE MÁXIMO	RESULTADOS (ug/Kg)
	20		0,00
<i>OXITETRACICLINA</i>	21	100 ug/Kg	270,47
	25		0,00
	20		6656,64
CLORTETRACICLINA	21	100 ug/Kg	1044,88
	25		2091,47
	15		0,00
<i>PENICILINA</i>	17	50 ug/Kg	139,26
	19		71,22
	49		0,00
TILOSINA	50	100 ug/Kg	241,01

	56		0,00
	47		0,00
	49		0,00
<b>GENTAMICINA</b>	63	<b>50 ug/Kg</b>	0,00
	73		0,00
	85		0,00

Fuente: Elaboración Propia

### Resultados del ensayo de Cromatografía Líquida de Alta Performance

En las figuras 18, 19, 20 y 21 se presentan los cromatogramas (figuras de HPLC) para cada ensayo de los diferentes antibióticos presentes en las muestras de carne.

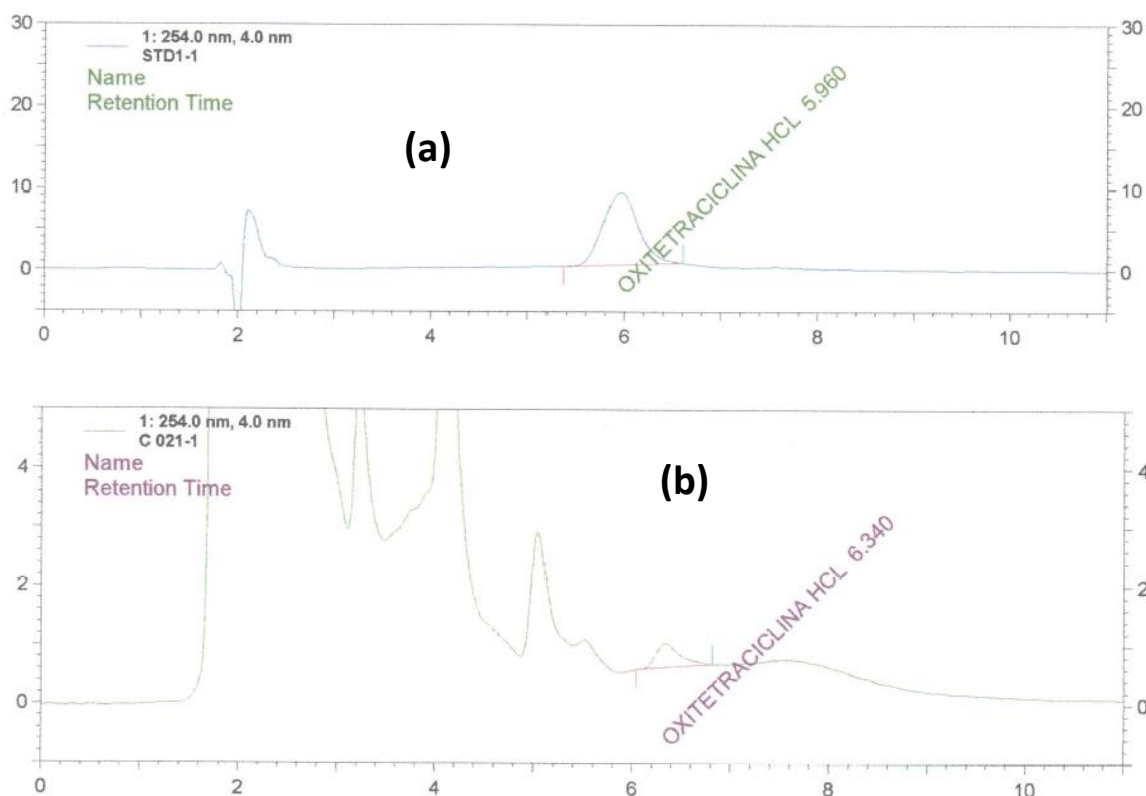


Figura 18. Cromatogramas de (a) un estándar de oxitetraciclina y de (b) una muestra de tejido muscular de bovino. Se puede apreciar el tiempo de retención corto en (a) y mucho más pronunciado en (b), esto indica concentración de antibióticos presente en la muestra.

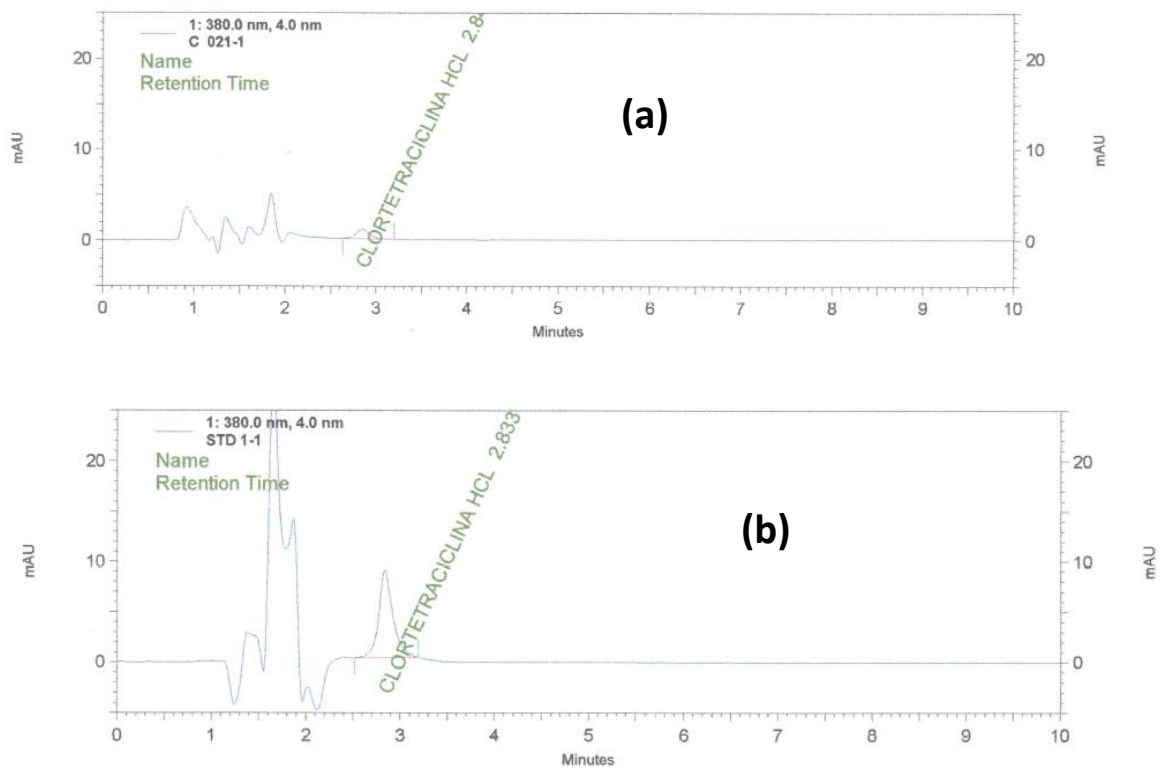
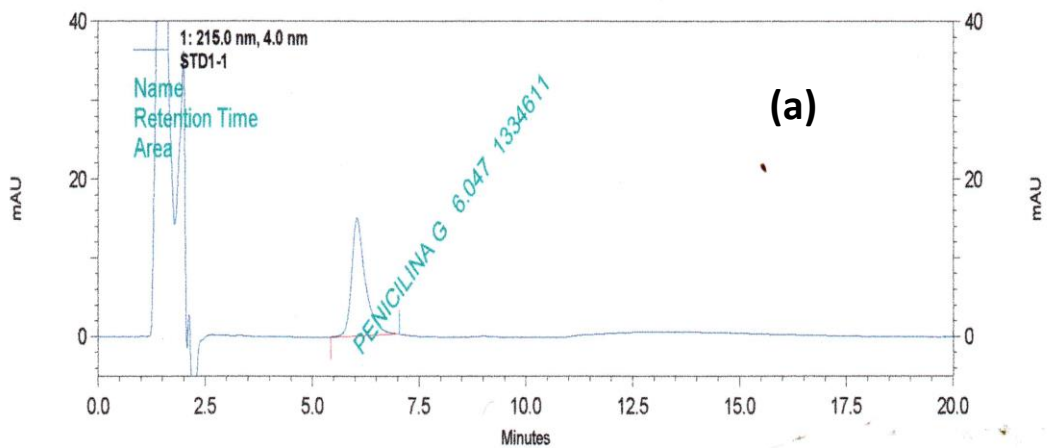
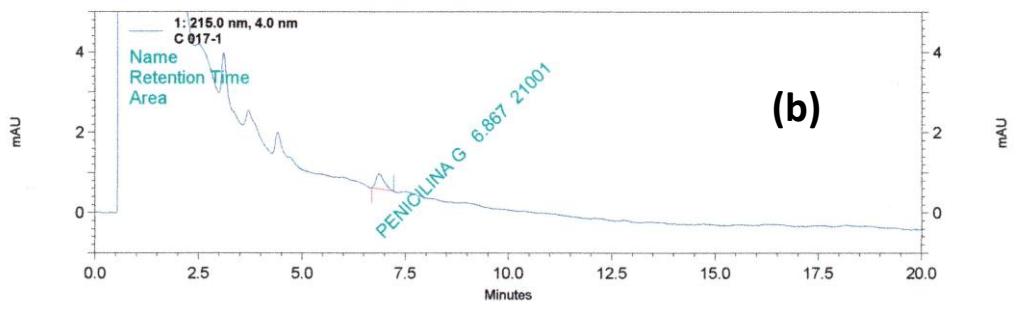


Figura 19. Cromatogramas de (a) un estándar de clortetraciclina y de (b) una muestra de tejido muscular de bovino. Se puede apreciar el tiempo de retención corto en (a) y mucho más pronunciado en (b), esto indica concentración de antibióticos presente en la muestra.





Name	Retention Time	Area
PENICILINA G	6.867	21001

Figura 20. Cromatogramas de (a) un estándar de penicilina G Benzatínica y de (b) una muestra de tejido muscular de bovino. Se puede apreciar el tiempo de retención corto en (a) y mucho más pronunciado en (b), esto indica concentración de antibióticos presente en la muestra.

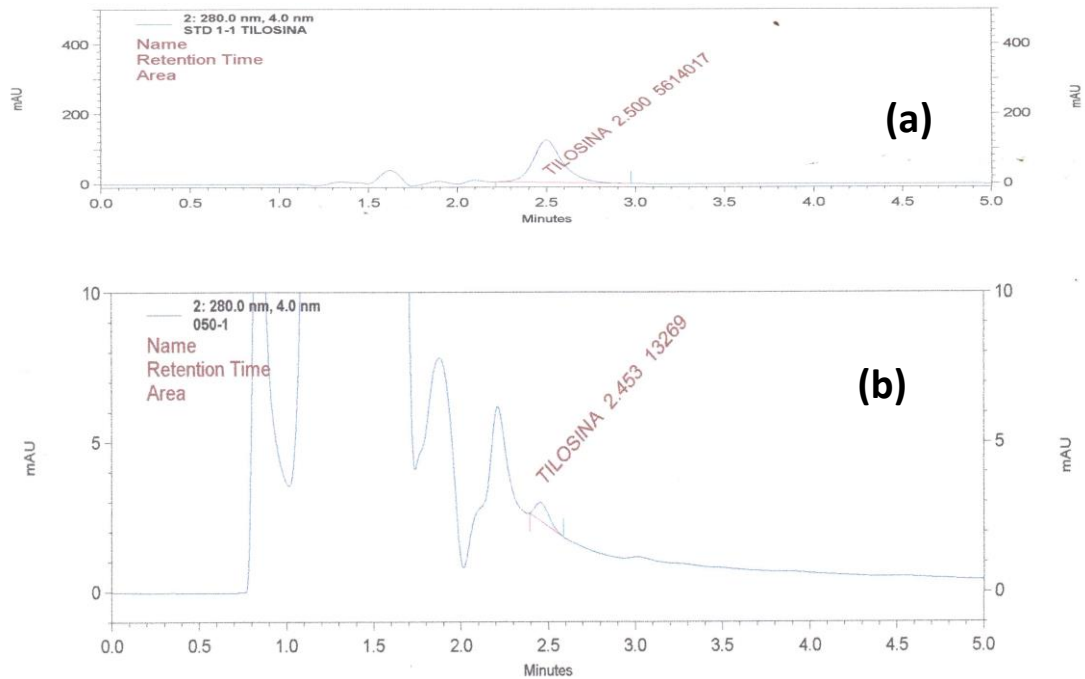


Figura 21. Cromatogramas de (a) un estándar de Tilosina y de (b) una muestra de tejido muscular de bovino. Se puede apreciar el tiempo de retención corto en (a) y mucho más pronunciado en (b), esto indica concentración de antibióticos presente en la muestra.

### **Concentración de antibióticos en muestra de carnes positivas**

En la tabla 9, se presenta la concentración de los antibióticos específicos presentes en las carnes de bovinos que resultaron ser positivas a la prueba de difusión en placa y que normalmente suelen ser expandidas y comercializadas en los puestos de expendio de carnes del mercado municipal de Huanta. Se observa que del grupo de carnes que resultaron positivas a la presencia de Tetraciclinas, 03 muestras resultaron ser positivas a la presencia de Clortetraciclina con una concentración media de  $3,264.33 \text{ ug/kg} \pm 2,984.07$ , mientras que 01 de ellas resultó ser positiva a la presencia de Oxitetraciclina con una concentración de  $270.47 \text{ ug/kg}$ . Cabe mencionar que de las 03 muestras de carnes, 01 resultó ser positiva a la presencia de Clortetraciclina y Oxitetraciclina a la vez. Respecto al grupo de los Betalactámicos, se observa que de las 03 muestras de carnes remitidas al laboratorio, 02 resultaron positivas a la presencia de la penicilina G con una concentración media de  $105.24 \text{ ug/kg} \pm 48.11$ , mientras que 01 muestra resultó negativa a la prueba de especificidad para dicho antibiótico, no pudiéndose determinar su especificidad y concentración para determinado tipo de antibiótico perteneciente al grupo, a razón de que no se pudo disponer del marcador respectivo.

En relación al grupo de los Macrólidos, sólo 01 muestra de las 03 remitidas al laboratorio, resultó ser positiva a la presencia de la Tilosina con una concentración de  $241.01 \text{ ug/kg}$ , no habiéndose determinado la prueba de especificidad para otros tipos de antibióticos que perteneciera al grupo a nivel de las otras 02 muestras restantes, a razón de la no disponibilidad de marcadores específicos.

A nivel del grupo de los Aminoglucósidos, las 05 muestras de carnes positivas a dicho grupo de antibiótico y que fueron remitidas al laboratorio, resultaron negativas a la prueba de especificidad con Gentamicina, no habiéndose determinado la prueba de especificidad para

los otros tipos de antibióticos pertenecientes al grupo de los Aminoglucósidos dado que no fue posible disponer de marcados específicos.

**Tabla 9**

**Concentración de antibióticos en carnes de vacunos comercializados en el mercado de Huanta. Ayacucho 2018.**

Grupo de Antibiótico (*)	Antibiótico específico	N	Concentración (ug/kg)	
			Media	D.S
Tetraciclinas	Oxitetraciclina	1	270.47	0
	Clortetraciclina	3	3,264.33	2,984.07
	Otros	2	+ (n.d)	-
Betalactámicos	Penicilinas G	2	105.24	48.11
	Otros	1	+	
Macrólidos	Tilosina	1	241.01	0
	Otros	2	+ (n.d)	-
Aminoglucósidos	Gentamicina	0	0	
	Otros	5	+ (n.d)	-

Nota: (\*) Muestras que resultaron ser positivas a la prueba difusión de placa

+(n.d.) = Muestras positivas a las que no se realizaron la prueba de especificad

En el Perú (Tacna) se ha demostrado que otras especies como el pollo tienen presencia de residuos de antibióticos inferiores a los LMRs. Barrios, (2012). Asimismo Butron, (2015) en Tacna determinó que el 40% de muestras procesadas de cerdo tenían residuos de metabolitos de antibióticos entre 500 y 2059 ug/Kg utilizando la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Performance. Azañero & Chiroque (2010) mostraron resultados de detección y cuantificación de metabolitos de antibióticos en un 100 % de carne de pollo muestreados de 04 mercados de Lima.

## Comparación de la calidad de carne

En la tabla 10 y figura 22 se compara la calidad de las carnes de bovinos que resultaron positivas a la presencia de antibióticos, y que a su vez se determinaron sus respectivas concentraciones según su especificidad. Se observa que el 100% de todas las muestras de carnes que resultaron ser positivas a la presencia de antibióticos por el método de placa y que posteriormente fueron remitidas al laboratorio para la determinación de su concentración según especificidad del antibiótico, fueron catalogadas como no aptos para el consumo humano según el nivel máximo permisible referido el MINSA el 2018. (R.M. 739-2012) En ese sentido, se menciona que para el caso de la Clortetraciclina, que la concentración media de este antibiótico supera en más de 32 veces el nivel mínimo permisible referido por dicha organización (100 ug/kg), siendo menos alarmante para el caso de la oxitetraciclina, Tilosina y penicilina dado que sus concentraciones superan un poco más que el doble.

**Tabla 10**

**Comparación de la calidad de carnes de bovinos comercializados en el mercado de Huanta. Ayacucho 2018.**

<b>Grupo de Antibiótico</b>	<b>Antibiótico específico</b>	<b>Nivel Máximo permitido (ug/kg)</b>	<b>Valor medio (ug/kg)</b>	<b>Calificación</b>
Tetraciclinas	Oxitetraciclina	100	270.5	No apto
	Clortetraciclina	100	3264.3	No apto
Betalactámicos	Penicilinas	50	105.2	No apto
Macrólidos	Tilosina	100	241.0	No apto



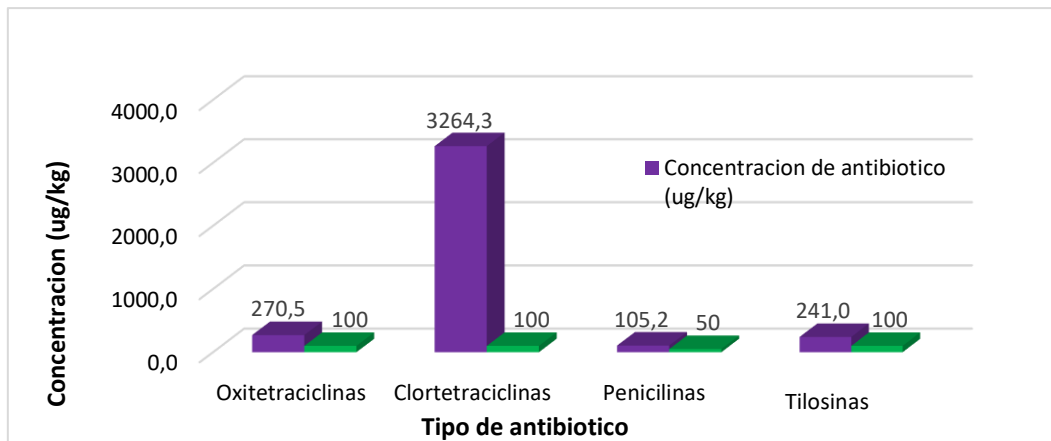


Figura 22. Concentración de antibióticos específicos presentes en carnes de bovino comercializados en el mercado de Huanta. Ayacucho 2018.

### III. CONCLUSIONES

1. Se detectó y cuantificó la presencia de antibióticos en carnes de bovinos expandidas en el mercado de Huanta en los meses de mayo a Julio de 2018, mediante las técnicas de difusión en placa y Cromatografía Líquida de Alta Performance.
2. Catorce muestras que representan el 16.5 % fueron positivas a residuos de antibióticos mediante la prueba de difusión en placa, hallándose 04 grupos de antibióticos como Tetraciclinas en un 3.5%, Betalactámicos en 3.5 %, Macrólidos en 3.5% y Aminoglucósidos en 5.9%.
3. La cuantificación de metabolitos de antibióticos fueron procesados mediante Cromatografía Líquida de Alta Performance, superando los LMRs para Penicilina G. (50 ug/Kg), para Clortetraciclina, Oxitetraciclina y para Tilosina (100 ug/Kg) mientras que las muestras presentaron entre 72.21 a 139.26 ug/Kg, entre 104.88 a 6654.64 ug/Kg, 270.47 ug/Kg y 241.01 ug/Kg respectivamente.
4. El 16.5 % de la carne de bovino que se expende en el mercado municipal de Huanta, no es apta para el consumo, ya que los residuos de antibióticos podrían causar daños en la salud de los consumidores como reacciones alérgicas y problemas de resistencia bacteriana al grupo de antibióticos detectados.
5. El uso de técnicas microbiológicas (Prueba de difusión en placa) permite detectar residuos de antibióticos en 48 horas, siendo efectiva para identificar y cuantificar su concentración mediante pruebas cromatográficas (Difusión en capa fina y HPLC), pero estos resultados demoraron más de 30 días.

#### **IV. RECOMENDACIONES**

- Implementar laboratorios para realizar trabajos similares en los mataderos autorizados por el SENASA, ya que solo la inspección visual (Post Mortem) no garantiza inocuidad del producto que se expende en los mercados.
- El muestreo de carnes de bovino y de otras especies animales deben ser en mayor significancia en todo el territorio nacional.
- La venta de productos veterinarios y en especial de antibióticos debe ser bajo prescripción Médico Veterinario Autorizada.
- Promover una cultura de profilaxis de enfermedades de las diferentes especies animales que no sea a base de antibióticos, ya que estos son considerados productos no renovables.
- Implementar un sistema de trazabilidad de los productos expendidos de origen animal como la carne y otros.
- Sensibilizar de los riesgos a la salud por el consumo de carnes con residuos de antibióticos a los comerciantes de carne de ganado bovino.
- Establecer sanciones penales para aquellas personas que exponen a los consumidores a productos contaminados.

## V. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Academia Nacional de Medicina - ANMM (2010). Reacciones inmunológicas a los antibióticos más frecuentemente utilizados. *Boletín de Información Clínica Terapéutica*, 55(5), 55-58. Recuperado de: <http://www.scielo.org.mx/pdf/facmed/v55n5/v55n5a10.pdf>
- Abdelmoaty, D. (2015) Antibiotic residues in beef and poultry meat. Researchgate. 280528974(01) 1-11. DOI. 10. 13140/RG. 2.1.5018.8645.
- Acosta M. (2011). *Determinación de niveles residuales de antibióticos en la carne bovina en República Dominicana*. Tesis para optar el título de Master en Administración de programas sanitarios, con énfasis en inocuidad de los alimentos. Universidad para la Cooperación Internacional (UCI). San José, Costa Rica.
- Acosta, S., Romero, M. & Taborda, G. (2014). Determinación de residuos de oxitetraciclina en muestras de carne bovina. *Luna Azul ISSN 1909-2474*.(39). 143-152.
- Aguilar, D. (2006). *Validación del "FAST" como método de "SCREENING" microbiológico para la pesquisa de residuos de antimicrobianos en productos de origen animal*. Tesis para optar al Título Profesional de Médico Veterinario. Universidad de Chile. Santiago, Chile.
- Azañero, G y Chiroque, M. (2010). *Detección y cuantificación de residuos antimicrobianos en tejido muscular de pollo en cuatro mercados de Lima Cercado*. TESIS para optar al título profesional de Químico Farmacéutica. Universidad Nacional Mayor de San marcos. Lima, Perú.

- Bailón, M. (2009). *Uso de técnicas separativas miniaturizadas .como alternativa a la determinación de antibióticos beta - lactámicos en fármacos, agua y alimentos*. Tesis para obtener el grado de Doctor. Universidad de Granada. Granada, España.
- Barrios, L. (2012). *Estudio de los niveles de residuos de antibióticos en músculo e hígado de pollos beneficiados en la ciudad de Tacna, 2011*. Tesis para optar el grado de Magíster. Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Tacna, Perú.
- Benito, M. (2006). *Desarrollo y validación de métodos analíticos basados en nuevos elementos de reconocimiento molecular para la determinación de antibióticos  $\beta$ -lactámicos en muestras de interés agroalimentario y medioambiental*. Tesis para obtener el Doctorado. Universidad Complutense. Madrid, España.
- Blair, J., Webber, M., Baylay, A., Ogbolu, D. and Piddock, L. (2014). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*. AOP Published On Line (01), 1-10.DOI. 10.1038/nrmicro 3380.
- Butron, Y. (2015). *Cromatografía líquida y Espectometría de masa en Tandem, para la detección de residuos de Nitrofranos en carne de cerdo en Tacna*. Tesis para obtener el título de profesional de Médico Veterinario Zootecnista. Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Tacna, Perú.
- Cacabelos, R (06 de agosto de 2017). Uso y abuso de los antibióticos. *El Correo Gallego 2017*. Recuperado de <http://www.elcorreogallego.es/tendencias /el-correo2/ecg/antibioticos-uso-abuso/idEdicion-2017-08-06/idNoticia-1067860/>
- Censo Nacional Agrario – CENAGO (2012). *Resultados finales del Censo Agrario*

2012 recuperado de [http://www.fao.org/fileadmin/templates/ess/ess\\_test\\_folder/World\\_Census\\_Agriculture/Country\\_info\\_2010/Reports/Reports\\_4/PER\\_SPA\\_PRE\\_REP\\_2012.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/ess/ess_test_folder/World_Census_Agriculture/Country_info_2010/Reports/Reports_4/PER_SPA_PRE_REP_2012.pdf)

Centro de Escritura Javierano (2016). Normas APA sexta edición. Recuperado de <https://www.um.es/documents/378246/2964900/Normas+APA+Sexta+Edici%C3%B3n.pdf/27f8511d-95b6-4096-8d3e-f8492f61c6dc>

Centro para el control y la prevención de enfermedades – CDC (2013) *Resistencia a los antibióticos de la granja a la mesa*. Recuperado de <https://www.cdc.gov/foodsafety/es/ar-farm-to-table.html>.

Consume Reports (18 de noviembre de 2015). La verdad de los antibióticos de carne. *El Diario*. Recuperado de: <https://eldiariony.com/2015/11/18/verdad-antibioticos-carne-que-comes/>

Dávila, R. (2007). *Determinación de presencia de residuos de antibióticos en Carnes bovinas en el matadero industrial Nuevo CARNIC*. Tesis para obtener el título de Médico Veterinario. Universidad Nacional Agraria. Managua, Nicaragua 91p.

Decreto Supremo N° 015-2012-AG.- SENASA: Reglamento sanitario del faenado de animales de abasto. 2012.

Emilfork, C. (1998). *Detección de residuos de antibióticos y sulfonamidas en canales de vacas de lechería*. Tesis para obtener el título de Médico Veterinario. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile.

Etebu & Arikepkar. (2016). Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. *IJAMBR 4* (2016) 90-101. Recuperado de: <https://www.researchgate.net/publication/319881509>

Fymat, A. (2017) Antibiotics and Antibiotic Resistance. *Biomed J Sci & Tech Res*.

1(1), 65-80 DOI: 10.26717/BJSTR. 2017. 01.000117

- Fowler, R. (2016). The Overuse of Antibiotics in Food Animals Threatens Public Health. *Consumer Union*. Recuperado de <https://www.pinterest.com/pin/443041682081888831/?lp=true>
- Gómez, P. (2014). *Situación actual de residuos de fármacos veterinarios en alimentos de origen animal en el Perú*. Tesina para optar el título de Médico Veterinario. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.
- Goodman & Gilman. (2006). *Las bases farmacológicas de la terapéutica*, Ciudad de México, México. Mc Graw-Hill Interamericana Editores.
- Guzmán, M., Salinas, J., Toche, P. y Afani, A. (2004). Alergia a B-Lactámicos. *Revista Chilena de Infectología*. 21. (4), 285-14.
- Hernández, A. (2010). *Control de calidad y seguridad de la carne y productos cárnicos curados mediante el uso de sensores enzimáticos*. Tesis para obtener el Doctorado. Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España.
- Instituto Nacional de Salud (2002). Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión. Recuperado de: <http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/manual%20sensibilidad%202.pdf>
- Khachatourians, G. (1998). Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic-resistant bacteria. *Canadian Medical Association*. 158 (9), 1129 – 1137.
- Martinez, J (1992). *Resistencia a antibióticos betalactámicos en Enterobacteriaceae y Pseudomonas aeruginosa*. Tesis para obtener el Doctorado. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España.
- Myllyniemi, A. (2004). Development of microbiological methods for the detection

- and identification of antimicrobial residues in meat. *National Veterinary and Food Research Institute* 13 (34), 1-87.
- Navas, M. (13 de abril 2012) El riesgo de usar antibióticos en animales, BBC Mundo recuperado de [http://www.bbc.com/mundo/movil/noticias/2012/04/120412\\_antibioticos\\_animales\\_resistencia\\_men.shtml](http://www.bbc.com/mundo/movil/noticias/2012/04/120412_antibioticos_animales_resistencia_men.shtml)
- Nouws, J. (1979). A critical evaluation of several microbiological test for residues of antimicrobial drugs in ruminants. *Lebensmittelhygiene* 1 (30), 4-8.
- Nouws, J. (1981). Tolerance and detection of Antimicrobial Residues in Slaughtered Animals. *Lebensmittelhygiene* 1 (32), 103-110.
- Núñez, M. (2008). *Evaluación de las técnicas diagnósticas: Análisis estadístico*. Montevideo. Uruguay. Escuela Universitaria de Tecnología Médica.
- Real Academia de la Lengua Española – RAE (2017) Recuperado de <http://www.rae.es/>
- Resolución Jefatural N° 0207-2012-AG.-SENASA-MINAGRI: Programa Nacional de Monitoreo de Contaminantes en alimentos agropecuarios primarios y piensos. 2012.
- Resolución Ministerial 739 – 2012 MINSA (2012). *Norma Sanitaria que establece los Límites Máximos de Residuos (LMR) de medicamentos veterinarios en alimentos de consumo humano*. Recuperado de: [ftp://ftp2.minsa.gob.pe/normaslegales/2012/RM739\\_2012\\_MINSA.pdf](ftp://ftp2.minsa.gob.pe/normaslegales/2012/RM739_2012_MINSA.pdf)
- Tapia, P. (2013). Residuos de antibacterianos en carne bovina. *SIRIVIS UNMSM* Recuperado de: <http://docplayer.es/8658016-Residuos-de-antibacterianos-en-carne-bovina.html>
- UNAM (2007). *Manual de Técnicas Cromatográficas*. Facultad de Química –



Química Analítica Instrumental. Recuperado de: [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/M.Cromatograficos\\_6700.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/M.Cromatograficos_6700.pdf)

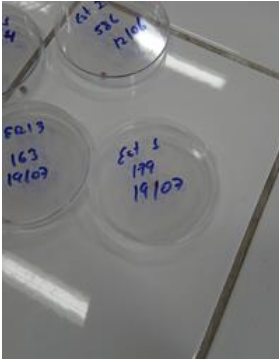
Vásquez - Moreno, L., Bermúdez, M., García, L., Laguré, A., Flores, M. y Orantes, C. (2000). Estudio de residuos tóxicos en tejidos animales destinados al consumo. *Revista Científica, FCV-LUZ / 7, (3)*, 186-193.

Vélez, C. (2013). *Determinación de antibióticos en carne vacuna y porcina, proveniente del Norte Antioqueño en la planta Frigocolanta ubicada en el Municipio de Santa Rosa de Osos*. Tesis para optar el título de Ingeniero de Alimentos. Corporación Universitaria Lasallista. Antioquia, Colombia.

# **ANEXOS**

## Anexo 01 Materiales de laboratorio

### Placas Petri, Matraz de 250 ml y Probeta de 100 ml



### Beaker de 50 ml, Micropipeta para 100 ul y Tips para Micropipeta de 100 ul



### Peachimetro, Termómetro y NaCl al 0.9%



Solución buffer pH 7.01 y 4.01



Cepas ATCC 6633 (*Bacillus subtilis*) y ATCC 9341 (*Kokuria rhizophila*)



## Anexo 02 Preparación de Medios de Cultivo

### Agar Antibiótico calentándose y Solido

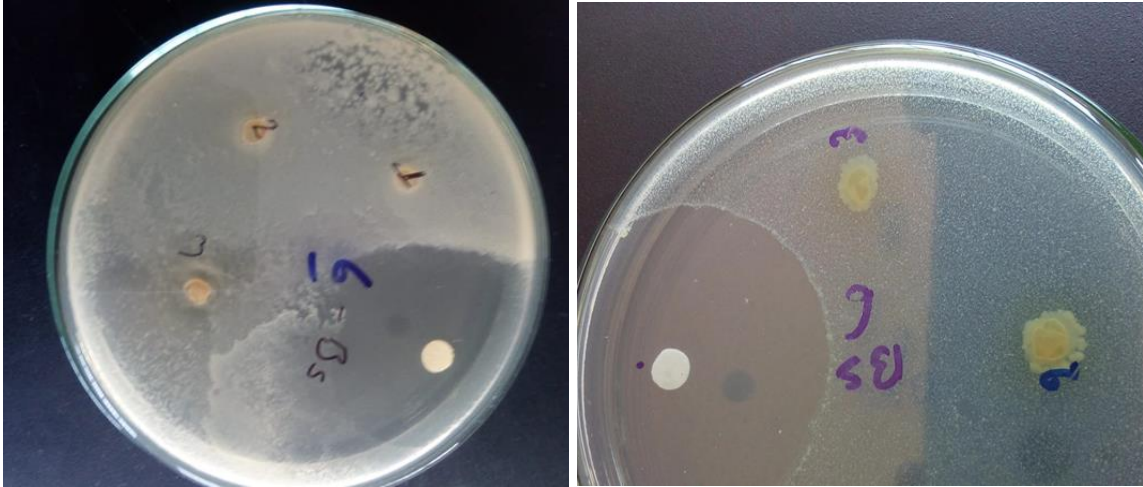


### Preparación del Inóculo y lectura de Resultados



### Anexo 03 lecturas de muestras

#### Detección de Antibióticos: Muestras Negativas

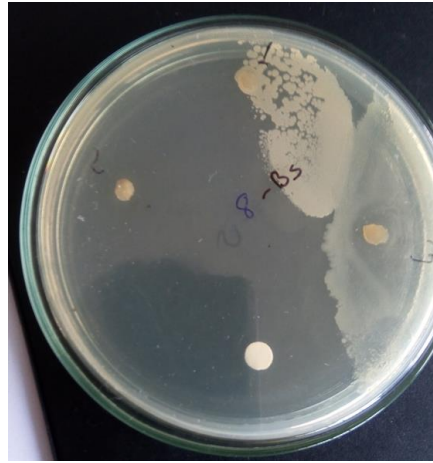
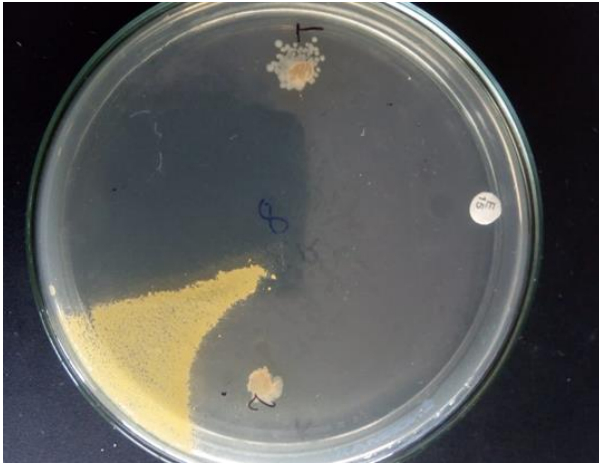


TE 2	←	162 / 26-06
TE 3	←	176 / 03-07
TE 4	+	168 / 24-07
TE 5	+	166 / 24-07
TE 6	+	157 / 24-07
TE 7	←	175 / 24-07
TE 8	←	173 / 19-06

Muestras Negativas

## Anexo 04 lecturas de muestras

### Detección de Antibióticos: Muestras Positivas



TE 2	162 / 26-06
TE 3	176 / 03-07
TE 4 +	168 / 24-07
TE 5 +	166 / 24-07
TE 6 +	157 / 24-07
TE 7	175 / 24-07
TE 8	173 / 19-06

Muestras Positivas

## Anexo 05 Resultados ensayos de cuantificación de antibióticos



### INFORME DE ENSAYO N° 0293 - 2018

Pág. 1 de 1

CLIENTE : Yuvan Venegas  
 DIRECCIÓN : Ayacucho  
 MUESTRA : CARNE DE GANADO VACUNO  
 SOLICITUD DE ANALISIS : Cotización N° 0144-2018  
 ORDEN DE ANALISIS : N° 0293-2018  
 CANTIDAD : 14 frascos x 100 g  
 CONDICIÓN DE LA MUESTRA RECIBIDA : carne congelada  
 TIPO DE ANALISIS SOLICITADO : residuos de antibióticos  
 FECHA DE RECEPCIÓN : 7 de setiembre de 2018  
 FECHA DE INICIO DE ANALISIS : 14 de setiembre de 2018

ENSAYOS	LIMITE MAXIMO RESIDUOS *	RESULTADOS
<b>OXITETRACICLINA</b>		
20		0 µg/Kg
21	100 µg/Kg	270.47 µg/Kg
25		0 µg/Kg
<b>CLORTETRACICLINA</b>		
20	100 µg/Kg	6656.64 µg/Kg
21		1044.88 µg/Kg
25		2091.47 µg/Kg
<b>PENICILINA</b>		
15	50 µg/Kg	0 µg/Kg
17		139.26 µg/Kg
19		71.22 µg/Kg
<b>TILOSINA</b>		
49		0 µg/Kg
50	100 µg/Kg	241.01 µg/Kg
56		0 µg/Kg
<b>GENTAMICINA</b>		
47	50 µg/Kg	0 µg/Kg
49		0 µg/Kg
63		0 µg/Kg
73		0 µg/Kg
85		0 µg/Kg

\* REGLAMENTO (UE) N° 37 /2010

Lima, 05 de octubre de 2018


**ASDELAB** | Asesoría, Capacitación y Laboratorio de Control de Calidad  
  
 Mirtha Roque Alcaraz  
 DOCTORA EN FARMACIA  
 QUÍMICO FARMACÉUTICA  
 C O I P 04113

TOR-CC-013  
 V.02  
 VIGENCIA: 2017.05.08

"CAMINO A LA CALIDAD TOTAL"

381-3856

asdelabsac@hotmail.com

www.asdelabsac.com

Psje. Carlos Velarde N° 118 Urb. Ingeniería - S.M.P.



## Anexo 06 Resultados ensayos específicos

### Ensayo de Oxitetraciclina

**Laboratorio Asdelab SAC**  
Área de Instrumentación HPLC  
Reporte de Contenido de Oxitetraciclina (Anexo FOR-CC-001)

**Método:**

C:\OL-Data\OXITETRACICLINA\Method

**Secuencia:**

C:\OL-Data\OXITETRACICLINA\Result\2018\120918\IDAD (Offline).39 2018-09-14 16-0...

**Analista:**

System (Eva Limaymanta)

**Muestra:**

CARNE

**Determinación de :**

Oxitetraciclina HCl

Código Muestra	Peso Mu... (g)	Factor	Area	Oxitetraciclina HCl ( ug/ Kg)
C 020-1	5.6312	5000	0	0.00
C 020-2	5.6312	5000	0	0.00
C 021-1	5.9201	5000	28295	292.26
C 021-2	5.9201	5000	24075	248.67
C 025-1	5.6310	5000	0	0.00
C 025-2	5.6310	5000	0	0.00

### Ensayo de Clortetraciclina

**Laboratorio Asdelab SAC**  
Área de Instrumentación HPLC  
Reporte de Contenido de Clortetraciclina HCl  
(ANEXO FOR-CC-001)

**Método:**

C:\OL-Data\CLORTETRACICLINA CLORHIDRATO\Method

**Secuencia:**

C:\OL-Data\CLORTETRACICLINA CLORHIDRATO\Result\2018\130818\IDAD (Offline)...

**Analista**

System (Eva Limaymanta)

**Código de muestra:** CARNE

**Determinación de:** Clortetraciclina HCl

**Forma farmacéutica:** Sólido

Código muestra	Peso Muestra (g)	Factor	Area	Clortetraciclina HCl (ug/kg)
C 020-1	5.6312	5000	270988	6622.03
C 020-2	5.6312	5000	273820	6691.24
C 021-1	5.9201	5000	44527	1034.99
C 021-2	5.9201	5000	45378	1054.77
C 025-1	5.6310	5000	85583	2091.43
C 025-2	5.6310	5000	85586	2091.51

## Ensayo de Penicilina G Benzatínica

**Laboratorio Asdelab SAC**  
Área de Instrumentación HPLC  
Reporte de Contenido de Penicilina G  
(ANEXO FOR-CC-001)

**Método:**

C:\OL-Data\PENICILINA G\Method

**Secuencia:**

C:\OL-Data\PENICILINA G\Result\2018\170918\IDAD (Offline).39 2018-09-27 16-54-14 (...)

**Analista:** System (Eva Limaymanta)

**Código de muestra:** CARNE

**Determinación de :** Penicilina Benzatínica

**Forma farmacéutica:** SÓLIDO

Muestra	Peso Muestra (g)	Factor	Área	Penicilina Ben... (ug/Kg)
C 015-1	5.9208	5000	0	0.00
C 015-2	5.9208	5000	0	0.00
C 017-1	5.5041	5000	21001	138.61
C 017-2	5.5041	5000	21197	139.90
C 019-1	5.2687	5000	10262	70.76
C 019-2	5.2687	5000	10394	71.67

## Ensayo de Tilosina

**Laboratorio Asdelab SAC**  
Área de Instrumentación HPLC  
Reporte de Contenido de Tilosina  
(Anexo FOR-CC-001)

**Método:**

C:\OL-Data\TILOSINA\Method

**Secuencia:**

C:\OL-Data\TILOSINA\Result\2018\110918\IDAD (Offline).39 2018-09-14 17-40-22 (GMT -05...

**Analista:** System (Eva Limaymanta)

**Código Muestra:** CARNE

**Determinación de :** Tilosina

**Forma farmacéutica:** SOLIDO

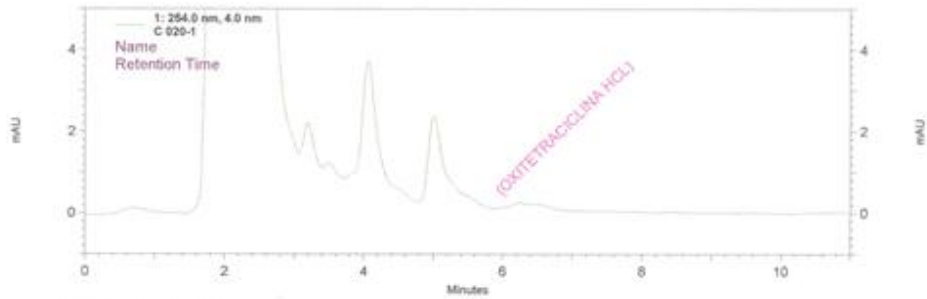
Código Muestra	Peso Mue... (g)	Factor	Area	Tilosina (ug/kg)
049-1	5.3246	5000	0	0.0000
049-2	5.3246	5000	0	0.0000
050-1	5.9201	5000	13269	242.8692
050-2	5.9201	5000	13066	239.1536
056-1	5.3838	5000	0	0.0000
056-2	5.3838	5000	0	0.0000

## Anexo 07 Cromatogramas de muestras remitidas

### Cromatograma Oxitetraciclina muestra 20

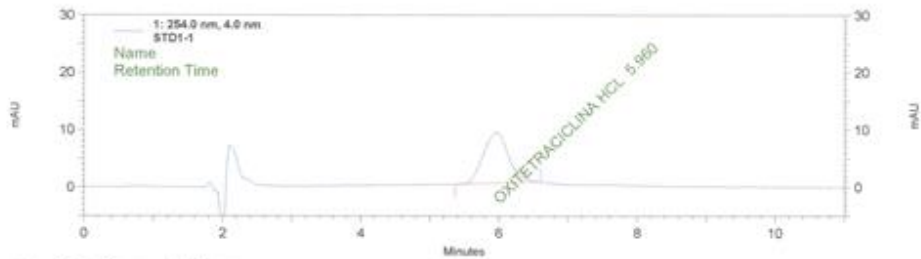
*Laboratorio Asdelab SAC  
Área de Instrumentación HPLC  
Reporte de Identificación y Contenido de Oxitetraciclina HCl*

Método: C:\OL-Data\OXITETRACICLINA\Method\OXITETRACICLINA-P.met  
 Secuencia: C:\OL-Data\OXITETRACICLINA\Result\2018\120918\DAD (Offline).39 2018-09-14  
 16-06-31 (GMT -05-00).rst  
 Analista: System (Eva Limaymanta)  
 Fecha de corrida: 2018/09/12 17:52:45 (GMT -05:00)  
 Fecha de impresión: 2018/09/14 17:06:24 (GMT -05:00)  
 Vol. inyección: 10 uL  
 Vial: 2



1: 254.0 nm, 4.0 nm  
 Results

Name	Area	Retention Time
OXITETRACICLINA HCL		
<b>Totals</b>		



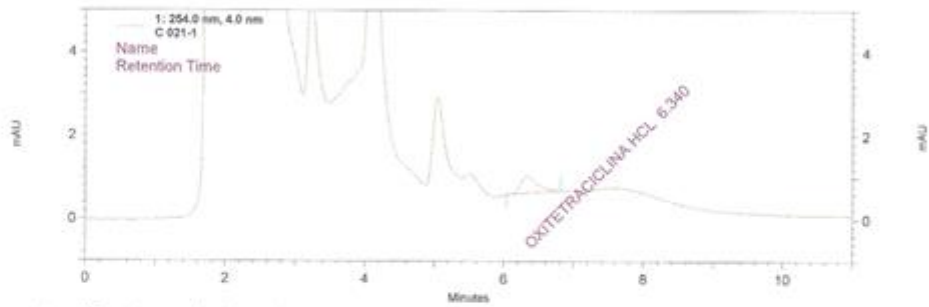
1: 254.0 nm, 4.0 nm  
 Results

Name	Area	Retention Time
OXITETRACICLINA HCL	49794613	6.627
<b>Totals</b>		
	49794613	

# Cromatograma Oxitetraciclina muestra 21

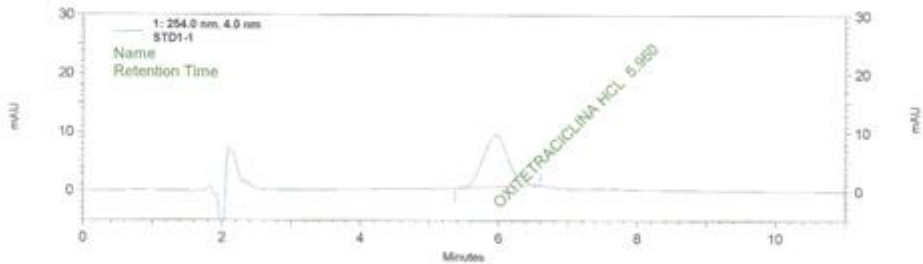
**Laboratorio Asdelab SAC**  
**Área de Instrumentación HPLC**  
**Reporte de Identificación y Contenido de Oxitetraciclina HCl**

Método: C:\OL-Data\OXITETRACICLINA\Method\OXITETRACICLINA-P.met  
 Secuencia: C:\OL-Data\OXITETRACICLINA\Result\2018\120918\DAD (Offline).39 2018-09-14  
 16-06-31 (GMT -05-00).rst  
 Analista: System (Eva Limaymanta)  
 Fecha de corrida: 2018/09/12 18:46:13 (GMT -05:00)  
 Fecha de impresión: 2018/09/14 17:07:42 (GMT -05:00)  
 Vol. inyección: 10 uL  
 Vial: 3



1: 254.0 nm, 4.0 nm  
 Results

Name	Area	Retention Time
OXITETRACICLINA HCL	28295	6.340
<b>Totals</b>	<b>28295</b>	



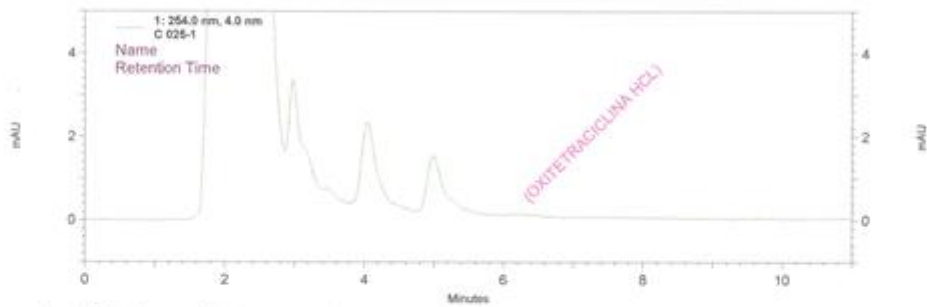
1: 254.0 nm, 4.0 nm  
 Results

Name	Area	Retention Time
OXITETRACICLINA HCL	49794613	6.627
<b>Totals</b>	<b>49794613</b>	

# Cromatograma Oxitetraciclina muestra 25

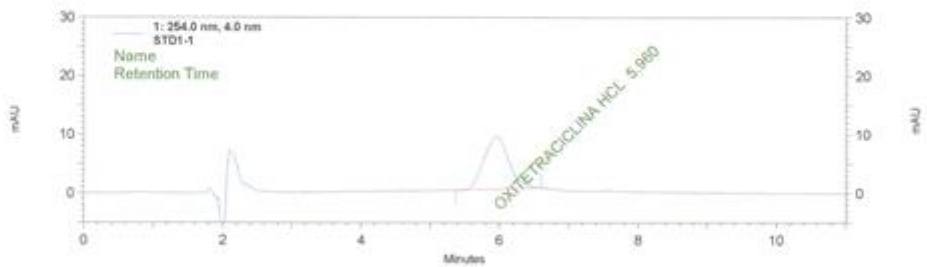
**Laboratorio Asdelab SAC**  
**Área de Instrumentación HPLC**  
**Reporte de Identificación y Contenido de Oxitetraciclina HCl**

Método: C:\OL-Data\OXITETRACICLINA\Method\OXITETRACICLINA-P.met  
 Secuencia: C:\OL-Data\OXITETRACICLINA\Result\2018\120918\DAD (Offline).39 2018-09-14  
 16-06-31 (GMT -05-00).rst  
 Analista: System (Eva Limaymanta)  
 Fecha de corrida: 2018/09/12 19:39:41 (GMT -05:00)  
 Fecha de impresión: 2018/09/14 17:08:15 (GMT -05:00)  
 Vol. inyección: 10 uL  
 Vial: 4



1: 254.0 nm, 4.0 nm  
 Results

Name	Area	Retention Time
OXITETRACICLINA HCL		
Totals		



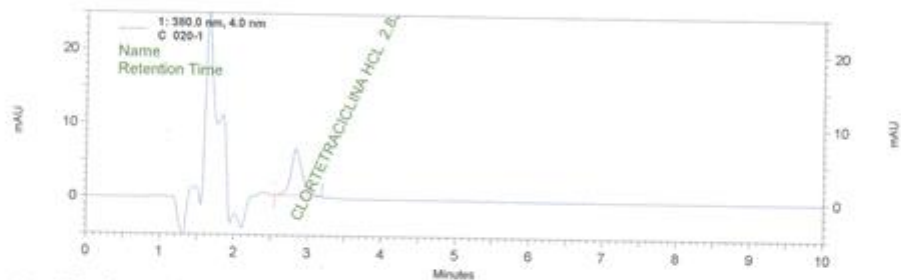
1: 254.0 nm, 4.0 nm  
 Results

Name	Area	Retention Time
OXITETRACICLINA HCL	49794613	6.627
Totals		
	49794613	

## Cromatograma Clortetraciclina muestra 20

**Laboratorio Asdelab SAC**  
**Área de Instrumentación HPLC**  
**Reporte de identificación y contenido de Clortetraciclina HCl**

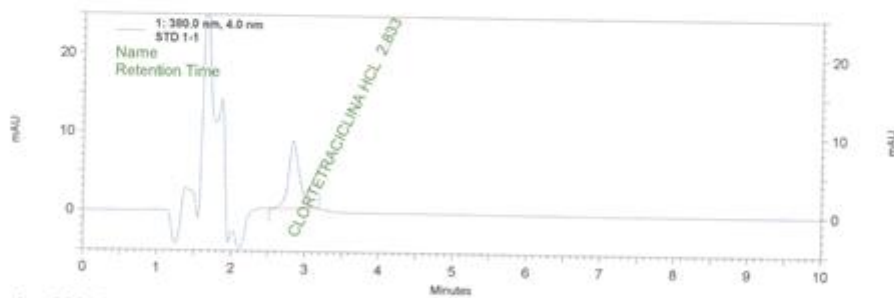
Método: C:\OL-Data\CLORTETRACICLINA  
 CLORHIDRATO\Method\CLORTETRACICLINA.met  
 Secuencia: C:\OL-Data\CLORTETRACICLINA CLORHIDRATO\Result(2018\130818\DAD  
 (Offline).39 2018-09-14 10-49-41 (GMT -05:00).rst  
 Fecha de análisis: 2018/09/13 13:08:04 (GMT -05:00)  
 Fecha de impresión: 2018/09/14 11:01:05 (GMT -05:00)  
 Analista: System (Eva Limaymanta)  
 Vol. inyección: 10 µL



1: 380.0 nm, 4.0 nm

Results

Name	Retention Time	Area
CLORTETRACICLINA HCL	2.833	270988
Totals		270988



1: 380.0 nm, 4.0 nm

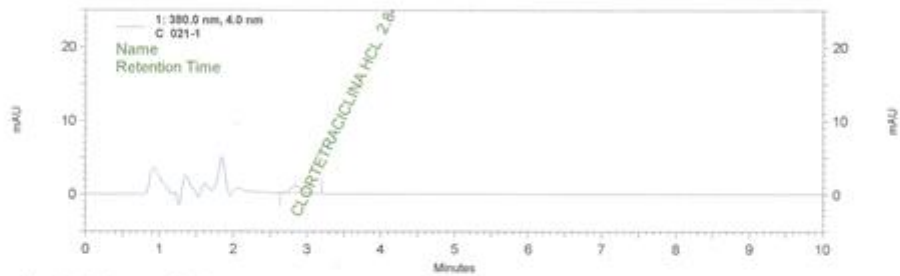
Results

Name	Retention Time	Area
CLORTETRACICLINA HCL	2.833	366316
Totals		366316

# Cromatograma Clortetraciclina muestra 21

*Laboratorio Asdelab SAC  
Área de Instrumentación HPLC  
Reporte de identificación y contenido de Clortetraciclina HCl*

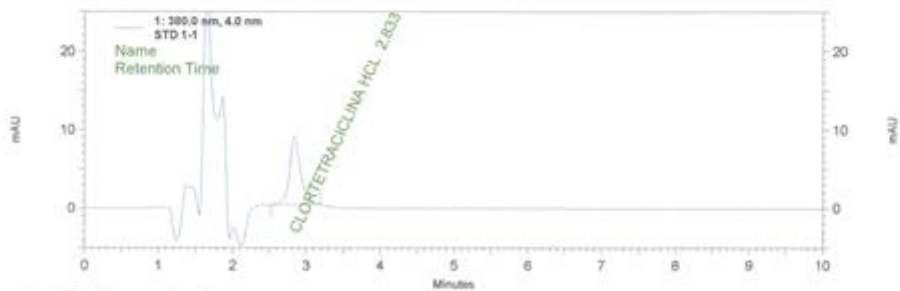
Método: C:\OL-Data\CLORTETRACICLINA CLORHIDRATO\Method\CLORTETRACICLINA.met  
 Secuencia: C:\OL-Data\CLORTETRACICLINA CLORHIDRATO\Result\2018\130818\DAD (Offline).39 2018-09-14 10-49-41 (GMT -05-00).rst  
 Fecha de análisis: 2018/09/13 14:01:31 (GMT -05:00)  
 Fecha de impresión: 2018/09/14 11:02:35 (GMT -05:00)  
 Analista: System (Eva Limaymanta)  
 Vol. inyección: 10 uL



1: 380.0 nm, 4.0 nm

Results

Name	Retention Time	Area
CLORTETRACICLINA HCL	2.840	44527
Totals		44527



1: 380.0 nm, 4.0 nm

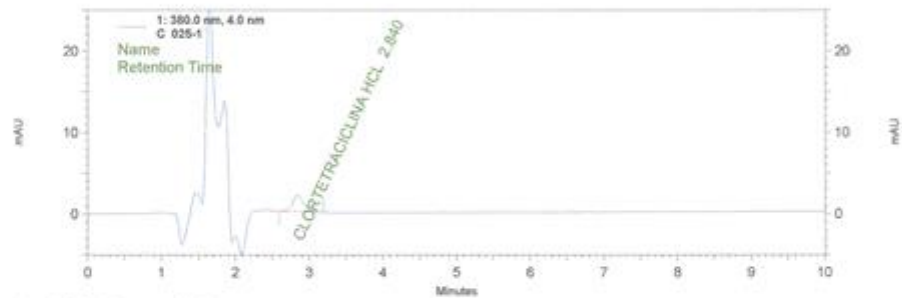
Results

Name	Retention Time	Area
CLORTETRACICLINA HCL	2.833	366316
Totals		366316

## Cromatograma Clortetraciclina muestra 25

**Laboratorio Asdelab SAC**  
**Área de Instrumentación HPLC**  
**Reporte de identificación y contenido de Clortetraciclina HCl**

Método: C:\OL-Data\CLORTETRACICLINA  
 CLORHIDRATO\Method\CLORTETRACICLINA.met  
 Secuencia: C:\OL-Data\CLORTETRACICLINA CLORHIDRATO\Result\2018\130818\DAD  
 (Offline).39 2018-09-14 10-49-41 (GMT -05-00).rst  
 Fecha de análisis: 2018/09/13 14:54:59 (GMT -05:00)  
 Fecha de impresión: 2018/09/14 11:03:46 (GMT -05:00)  
 Analista: System (Eva Limaymanta)  
 Vol. inyección: 10 uL

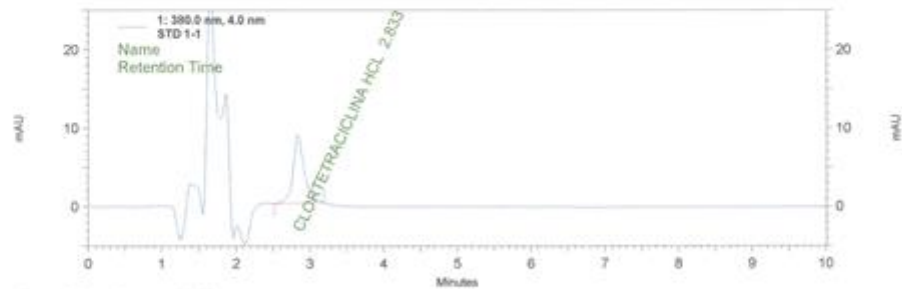


1: 380.0 nm, 4.0 nm

Results

Name	Retention Time	Area
CLORTETRACICLINA HCL	2.840	85583

Totals		Area
		85583



1: 380.0 nm, 4.0 nm

Results

Name	Retention Time	Area
CLORTETRACICLINA HCL	2.833	366316

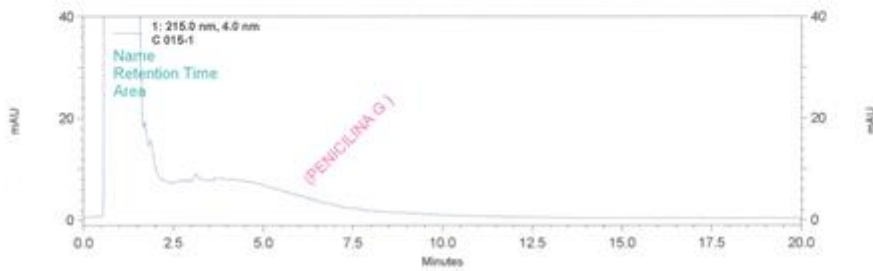
Totals		Area
		366316



# Cromatograma Penicilina G Benzatínica muestra 15

*Laboratorio Asdelab SAC*  
*Área de Instrumentación HPLC*  
**Reporte de Contenido de Penicilina G Benzatínica**

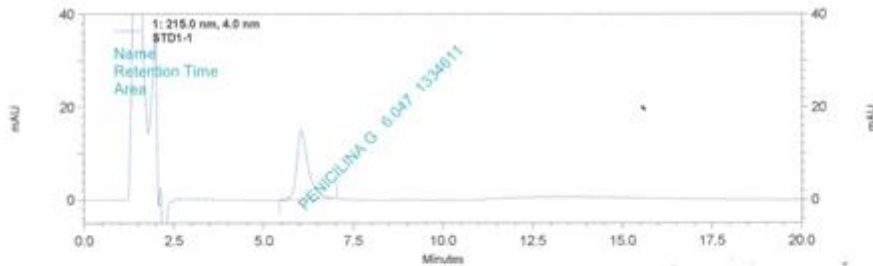
Method Name: C:\OL-Data\PENICILINA G\Method\PENICILINA G.met  
 Sequence: C:\OL-Data\PENICILINA G\Result\2018\170918\IDAD (Offline),39 2018-09-27  
 16-54-14 (GMT -05-00).rst  
 Acquired: 2018/09/18 14:30:59 (GMT -05:00)  
 Printed: 2018/09/27 18:10:25 (GMT -05:00)  
 Vial: 5  
 Vol. inyeccion: 20  
 Muestra: C 015-1



1: 215.0 nm, 4.0 nm

Results

Name	Retention Time	Area
PENICILINA G		



1: 215.0 nm, 4.0 nm

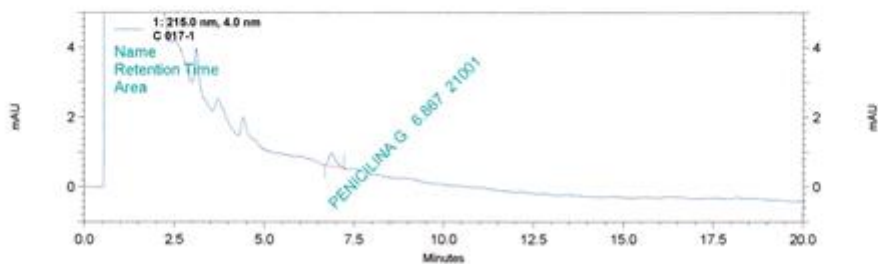
Results

Name	Retention Time	Area
PENICILINA G	6.047	1334611

Cromatograma Penicilina G Benzatínica muestra 17

**Laboratorio Asdelab SAC**  
**Área de Instrumentación HPLC**  
**Reporte de Contenido de Penicilina G Benzatínica**

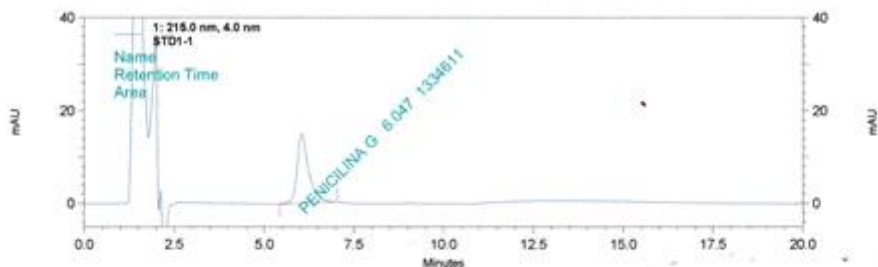
Method Name: C:\OL-Data\PENICILINA G\Method\PENICILINA G.met  
 Sequence: C:\OL-Data\PENICILINA G\Result\2018\170918\DAD (Offline).39 2018-09-27  
 16-54-14 (GMT -05-00).rst  
 Acquired: 2018/09/18 15:24:43 (GMT -05:00)  
 Printed: 2018/09/27 18:11:09 (GMT -05:00)  
 Vial: 6  
 Vol. inyeccion: 20  
 Muestra: C 017-1



1: 215.0 nm, 4.0 nm

Results

Name	Retention Time	Area
PENICILINA G	6.867	21001



1: 215.0 nm, 4.0 nm

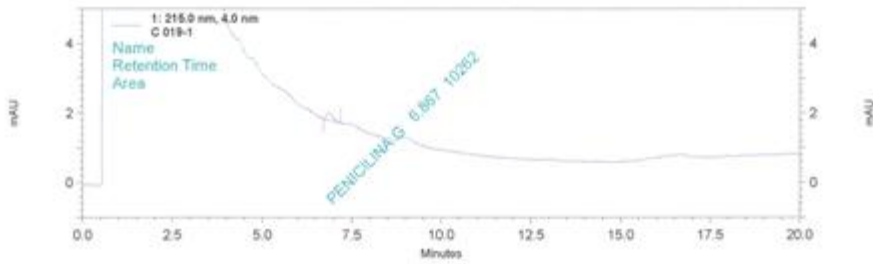
Results

Name	Retention Time	Area
PENICILINA G	6.047	1334611

# Cromatograma Penicilina G Benzatínica muestra 19

*Laboratorio Asdelab SAC*  
*Área de Instrumentación HPLC*  
**Reporte de Contenido de Penicilina G Benzatínica**

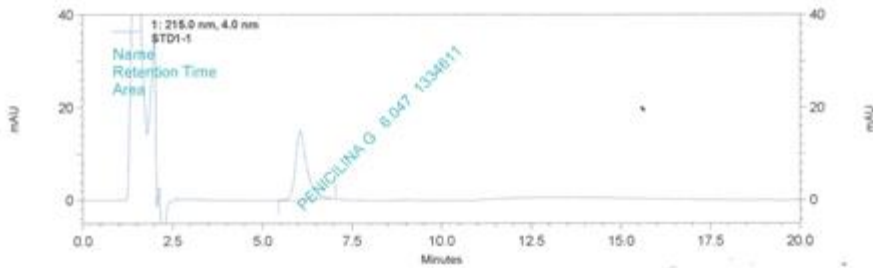
Method Name: C:\OL-Data\PENICILINA G\Method\PENICILINA G.met  
 Sequence: C:\OL-Data\PENICILINA G\Result\2018\170918\IDAD (Offline).39 2018-09-27  
 16-54-14 (GMT -05-00).rst  
 Acquired: 2018/09/18 16:18:26 (GMT -05:00)  
 Printed: 2018/09/27 18:11:32 (GMT -05:00)  
 Vial: 7  
 Vol. inyección: 20  
 Muestra: C 019-1



1: 215.0 nm, 4.0 nm

Results

Name	Retention Time	Area
PENICILINA G	6.867	10262



1: 215.0 nm, 4.0 nm

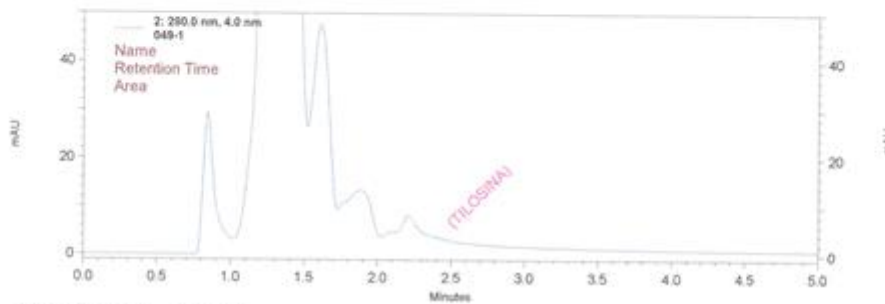
Results

Name	Retention Time	Area
PENICILINA G	6.047	1334611

**Cromatograma Tilosina muestra 49**

*Laboratorio Asdelab SAC  
Área de Instrumentación HPLC  
Reporte de Identificación y Contenido de Tilosina*

Metodo: C:\OL-Data\TILOSINA\Method\TILOSINA.met  
 Secuencia: C:\OL-Data\TILOSINA\Result\2018\110918\DAD (Offline).39 2018-09-14 17-40-22 (GMT -05-00).rst  
 Analista: System (Eva Limaymanta)  
 Fecha de inyección: 2018/09/11 13:17:32 (GMT -05:00)  
 Fecha de impresión: 2018/09/14 18:00:57 (GMT -05:00)  
 Vol. inyección: 10 uL

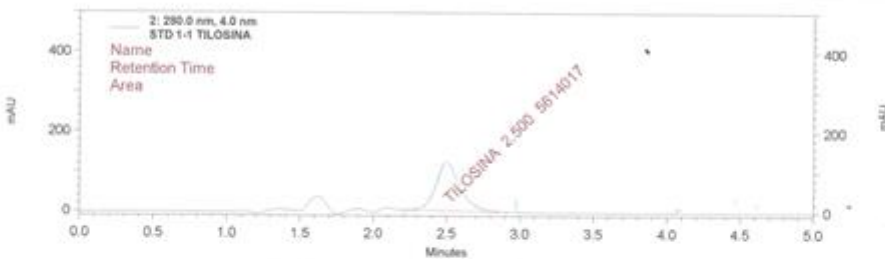


2: 290.0 nm, 4.0 nm

Results

Name	Retention Time	Area
TILOSINA		

Totals		



2: 280.0 nm, 4.0 nm

Results

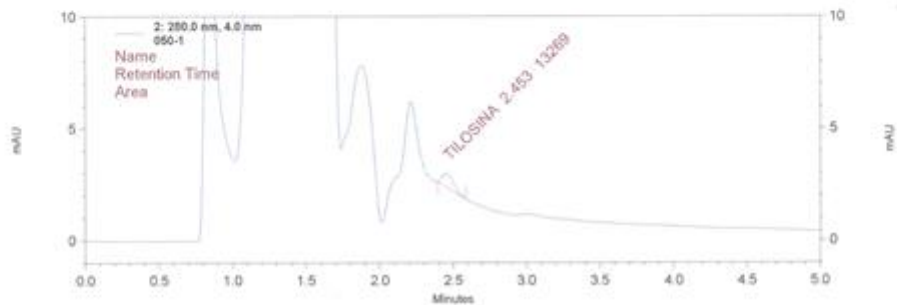
Name	Retention Time	Area
TILOSINA	2.500	5614017

Totals		
		5614017

# Cromatograma Tilosina muestra 50

**Laboratorio Asdelab SAC**  
**Área de Instrumentación HPLC**  
**Reporte de Identificación y Contenido de Tilosina**

Metodo: C:\OL-Data\TILOSINA\Method\TILOSINA.met  
 Secuencia: C:\OL-Data\TILOSINA\Result\2018\110918\DAD (Offline).39 2018-09-14 17-40-22  
 (GMT -05-00).rst  
 Analista: System (Eva Limaymanta)  
 Fecha de inyección: 2018/09/11 14:01:04 (GMT -05:00)  
 Fecha de impresión: 2018/09/14 18:02:44 (GMT -05:00)  
 Vol. inyección: 10 uL

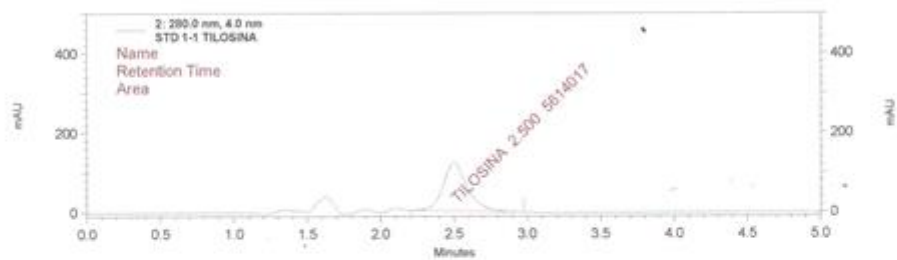


2: 280.0 nm, 4.0 nm

Results

Name	Retention Time	Area
TILOSINA	2.453	13269

Totals		13269
--------	--	-------



2: 280.0 nm, 4.0 nm

Results

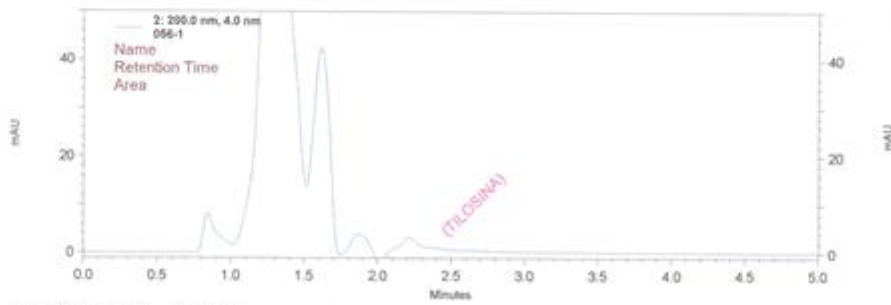
Name	Retention Time	Area
TILOSINA	2.500	5614017

Totals		5614017
--------	--	---------

**Cromatograma Tilosina muestra 56**

*Laboratorio Asdelab SAC  
Área de Instrumentación HPLC  
Reporte de Identificación y Contenido de Tilosina*

Metodo: C:\OL-Data\TILOSINA\Method\TILOSINA.met  
 Secuencia: C:\OL-Data\TILOSINA\Result\2018\110918\DAD (Offline).39 2018-09-14 17-40-22 (GMT -05-00).rst  
 Analista: System (Eva Limaymanta)  
 Fecha de inyección: 2018/09/11 14:44:30 (GMT -05:00)  
 Fecha de impresión: 2018/09/14 18:02:04 (GMT -05:00)  
 Vol. inyección: 10 uL

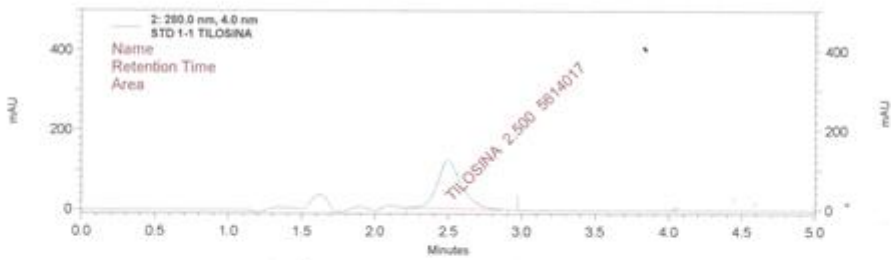


2: 280.0 nm, 4.0 nm

Results

Name	Retention Time	Area
TILOSINA		

Totals		



2: 280.0 nm, 4.0 nm

Results

Name	Retention Time	Area
TILOSINA	2.500	5614017

Totals		
		5614017

# Cromatografía Gentamicina muestra 47

ANEXO AL FORMATO: FOR-CC-004

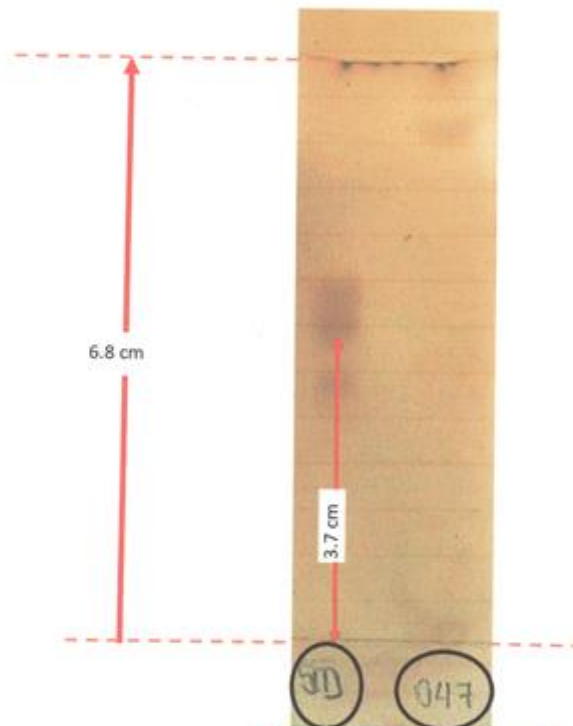
## CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

STD: Gentamicina sulfato

Lote: 160820991

Fecha de Expira: 07/2020

CÓDIGO MUESTRAS: CARNE



Rf STD= 0.54

Rf MP<sub>047</sub>= 0.0

### Conclusión:

- No se ha identificado Gentamicina sulfato en la muestras.

## Cromatografía Gentamicinas muestras 49 y 85

ANEXO AL FORMATO: FORM-CC-004

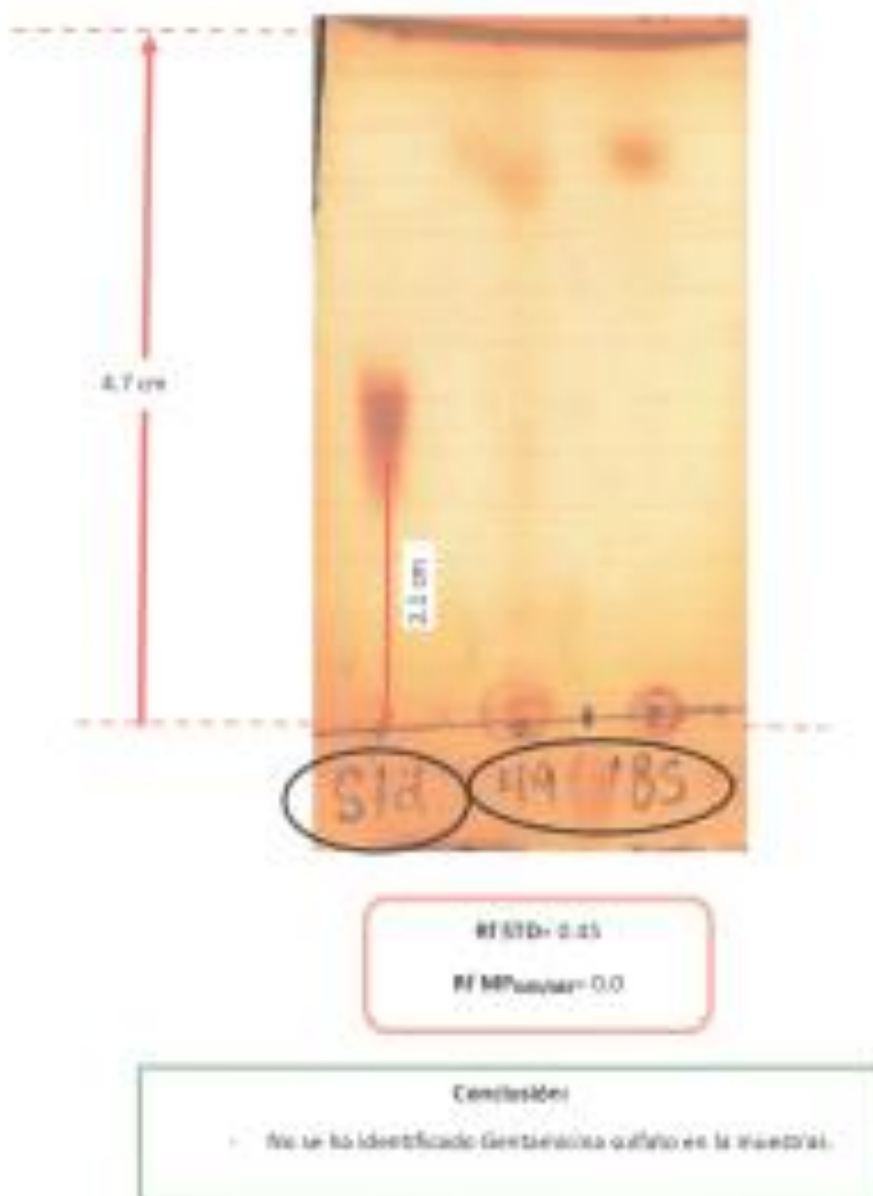
### CRUMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

STD: Gentamicina sulfato

Lote: 310820921

Fecha de Expir: 07/2020

CÓDIGO MUESTRA: 49/85





## Cromatografía Gentamicinas muestras 63 y 73

ANEXO AL FORMATO: FOR-CC-004

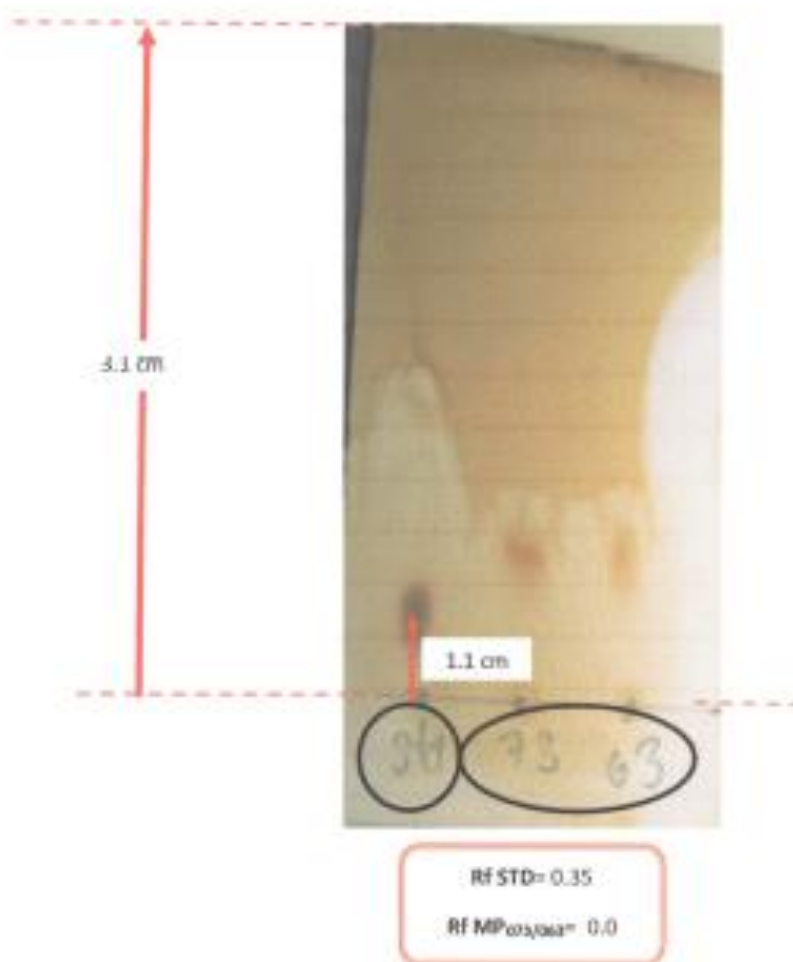
### CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

STD: Gentamicina sulfato

Lote: 160820991

Fecha de Expira: 07/2020

CÓDIGO MUESTRAS: CARNE



#### Conclusión:

- No se ha identificado gentamicina sulfato en la muestras.

## Anexo 08 Certificado de pureza Agar Antibiótico N° 11

<b>Liofilchem S.r.l.</b>	<b>CERTIFICATO CONTROLLO QUALITÀ</b> <b>QUALITY CONTROL CERTIFICATE</b>	<b>N° 610315</b> Revisione 2 del 09.10.2013 Pag. 1 di 1
--------------------------	--	---

PRODOTTO / PRODUCT : **ANTIBIOTIC AGAR No.11**

LOTTO / BATCH : **082817504**

DATA PRODUZIONE / PRODUCTION DATE : **28.08.2017**

DATA SCADENZA / EXP. DATE : **2021.08.27**

### CARATTERISTICHE FISICHE / PHYSICAL CHARACTERISTICS

Terreno / Medium	Aspetto/ Appearance	Colore/ Colour
Disidratato/Dehydrated	Omoogeneo/ Homogeneous	Beige
Pronto / Ready	Leggermente opalescente/ Slightly opalescent	Ambra chiaro/ Light amber

### CARATTERISTICHE BIOLOGICHE / BIOLOGICAL CHARACTERISTICS

Tempo di incubazione / Incubation time	18 h - 24 h
Temperatura / Temperature	36 °C ± 1 °C
Modalità di incubazione / Procedure of incubation	√ O <sub>2</sub> CO <sub>2</sub>

Medium	ANTIBIOTIC AGAR No.11			
Microorganism	Theoretical results		Result of conformity	
	Growth	Colour	Growth	Colour
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	+	Colorless	☒	☒
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	+	Colorless	☒	☒
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	+	Colorless	☒	☒
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	+	White	☒	☒
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	+	White	☒	☒
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933	+	Colorless	☒	☒
pH at 25 °C	7.9 ± 0.2		7.9	

(+) = Crescita / Growth    (-) = Inibizione / Inhibition    (±) = Inibizione parziale / Partial inhibition

Quality Control of inhibition diameter (mm)			
Microorganism	Theoretical results		Result of conformity
	antibiotic	Inhibition zones	Inhibition zones
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	Ampicillin	> 30 mm	☒
	Erythromycin	> 30 mm	☒
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P	Kanamycin	> 30 mm	☒
	Neomycin	> 20 mm	☒

LOTTO / BATCH :  Idoneo / Approved

Non Idoneo / Not approved

DATA / DATE : 13.09.2017

Responsabile Controllo Qualità  
 Quality Control Manager  
 (D. Vitagliano)

*Dario Vitagliano*

Questo documento è di proprietà della Liofilchem S.r.l. che se ne riserva tutti i diritti

## Anexo 09 Certificado de pureza Agar Tripticasa Soya

### Liofilchem® Certificate of Analysis

Page 1 of 1

Product	Batch	Expiration date
<b>Tryptic Soy Agar</b> Ref. 610052 – 620052 – 6100525	082117503	2021.07.09

Physical quality control	Specification	Results
Expected pH-value (25°C)	7.3 ± 0.2	7.4
Appearance of powder	Free-flowing, homogeneous	Conforms
Colour of powder	Light beige	Conforms
Appearance of prepared medium	Slightly opalescent	Conforms
Colour of prepared medium	Light amber	Conforms

#### Microbiological Performance

Tested according to CLSI M22-A3, EN ISO 11133  
Reference media: Tryptic Soy Agar – batch already validated

#### Productivity, Method of control: Quantitative

Inoculum: 50-100 CFU

Control strains	Incubation	Expected Results	Specification	Results
<i>Bacillus cereus</i> WDCM 00001	Aerobic, 24-48 h 30 ± 1°C	P <sub>R</sub> ≥ 0.7	Good growth	Conforms
<i>Bacillus subtilis</i> WDCM 00003	Aerobic, 72 ± 3 h 30 ± 1°C	P <sub>R</sub> ≥ 0.7	Good growth	Conforms
<i>Escherichia coli</i> WDCM 00012	Aerobic, 24 ± 2 h 30 ± 1°C	P <sub>R</sub> ≥ 0.7	Good growth	Conforms
<i>Listeria monocytogenes</i> 4b WDCM 00021	Aerobic, 40-48 h 37 ± 1°C	P <sub>R</sub> ≥ 0.7	Good growth	Conforms
<i>Staphylococcus aureus</i> WDCM 00034	Aerobic, 24-48 h 37 ± 1°C	P <sub>R</sub> ≥ 0.7	Good growth	Conforms
<i>Clostridium perfringens</i> WDCM 00007	Anaerobic, 24-48 h 37 ± 1°C	P <sub>R</sub> ≥ 0.7	Good growth	Conforms
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> WDCM 00024	Aerobic, 40-48 h 36 ± 2°C	P <sub>R</sub> ≥ 0.7	Good growth	Conforms
<i>Enterococcus faecalis</i> WDCM 00087	Aerobic, 40-48 h 36 ± 2°C	P <sub>R</sub> ≥ 0.7	Good growth	Conforms

#### Batch Release

Approved

Date 24.08.2017

Signature

Quality Control  
(D. Vitagliano)

*Dario Vitagliano*

The results reported were obtained at the time of release.

## Anexo 10 Certificado de pureza *Bacillus subtilis* ATCC 6633



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

<b>Specifications</b> <b>Microorganism Name:</b> Bacillus subtilis subsp. spizizenii <b>Catalog Number:</b> 0486 <b>Lot Number:</b> 486-557** <b>Reference Number:</b> ATCC® 6633™* <b>Purity:</b> Pure <b>Passage from Reference:</b> 2	<b>Expiration Date:</b> 2019/3/31 <b>Release Information:</b> <b>Quality Control Technologist:</b> Kieshia L. Negen <b>Release Date:</b> 2017/5/5
--	--

Performance	
<b>Macroscopic Features:</b> Large, irregular, flat, undulate edge, gray and wrinkled with ground glass appearance; beta hemolysis and slight yellow coloring may appear in wrinkles by 48 hours.	<b>Medium:</b> SBAP
<b>Microscopic Features:</b> Straight, gram positive rod, with an ellipsoidal, central or terminal endospore.	<b>Method:</b> Gram Stain (1)
<b>ID System:</b> MALDI-TOF (1) See attached ID System results document.	<b>Other Features/ Challenges: Results</b> (1) Purple Broth w/Rhamnose: negative (1) Purple broth w/Lactose: negative MYP Agar: Growth of yellow, dry colonies without precipitate  <div style="text-align: right; margin-top: 20px;"> <p>Amanda Kuperus Quality Control Manager AUTHORIZED SIGNATURE</p> </div>

**\*\*Disclaimer:** The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.

**Note for Vitek®:** Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.

Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.

Individual products are traceable to a recognized culture collection.



(\*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.

(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.




Anexo 11 Certificado de pureza *Kocuria rhizophila* ATCC 9341



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

<b>Specifications</b> <b>Microorganism Name:</b> Kocuria rhizophila <b>Catalog Number:</b> 0688 <b>Lot Number:</b> 688-152** <b>Reference Number:</b> ATCC® 9341™** <b>Purity:</b> Pure <b>Passage from Reference:</b> 3	<b>Expiration Date:</b> 2019/4/30 <b>Release Information:</b> <b>Quality Control Technologist:</b> Mary L Bowman <b>Release Date:</b> 2017/6/9
--	---

Performance	
<b>Macroscopic Features:</b> Small to medium, yellow, convex colonies with regular edge. Two colony types may be observed; rough and smooth variants.	<b>Medium:</b> SBAP
<b>Microscopic Features:</b> Gram positive cocci occurring in tetrads and irregular clusters of tetrads.	<b>Method:</b> Gram Stain (1)
<b>ID System:</b> MALDI-TOF See attached ID System results document.	<b>Other Features/ Challenges: Results</b> (1) Catalase(3% Hydrogen Peroxide): positive (1) Coagulase(rabbit plasma-tube): negative Lysostaphin: negative (1) Nitrate(Broth): negative
	 Amanda Kuperus Quality Control Manager AUTHORIZED SIGNATURE

\*\*Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.

Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.

⚠ Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.

Individual products are traceable to a recognized culture collection.



(\*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.

(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.



TESTING CERT #2655.01

## Anexo 12 Medios de cultivo recomendados para microorganismos (*Bacillus subtilis* y

### *Kocuria rhizophila*)



www.microbiologics.com

## Recommended Culture Methods for Microorganisms

### Selection of Growth Requirements

1. Primary growth on a nonselective agar medium is preferred. Primary growth in a fluid medium should only occur in special instances or when recommended. Because of the manipulations required during hydration, it is difficult to obtain purity of a lyophilized strain in a fluid medium. A contaminant may completely overgrow and obscure the presence of the lyophilized strain.
2. The following information lists which method should be used to grow the various microorganism species. Descriptions of methods follow the microorganism list.

<i>Aureobasidium</i> species	Method 5	
<i>Bacillus</i> species	Method 49	
<i>Bacteroides</i> species	Method 4	An exception is <i>Bacteroides ureolyticus</i> .
<i>Bacteroides ureolyticus</i>	Method 38	
<i>Bifidobacterium</i> species	Method 4	An exception is <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>animalis</i> .
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>animalis</i> .	Method 39	
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	Method 15	

<i>Klebsiella</i> species	Method 1	
<i>Kloekera</i> species	Method 5	
<i>Kocuria</i> species	Method 1	An exception is <i>Kocuria rosea</i> .
<i>Kocuria rosea</i>	Method 21	
<i>Lactobacillus</i> species	Method 65	Exceptions are <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus gasserii</i> , and <i>Lactobacillus leichmanni</i> .
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Method 11	

## Anexo 13 Método de activación de cepas ATCC

### Maintenance of Quality Control Strains

Proper maintenance of quality control strains is essential for ensuring acceptable performance.<sup>1</sup> This technical bulletin provides a maintenance plan for preserving the viability, purity, and genotypic and phenotypic characteristics of a microorganism strain. Most strains produced by Microbiologics can be maintained for up to a month after reconstitution.

#### Getting Started \_\_\_\_\_

- Microbiologics microorganism strains should be started on a non-selective agar such as Tryptic Soy Agar or Sheep Blood Agar. The Growth Requirements Technical Information Bulletin lists individual species media requirements.<sup>2</sup> Broth is not recommended because contaminants can be easily introduced.
- To maintain the microorganism strain, follow the plan on the next page.

#### Storage of Reconstituted Microorganisms \_\_\_\_\_

- Most quality control microorganisms can be maintained on nonselective agar plates or slants for up to four weeks at room temperature or in the refrigerator.<sup>1,4</sup>
- Fastidious microorganisms have shorter survival periods than aerobic bacteria. They will need to be subcultured every few days. For example, *Streptococcus pneumoniae* and *Neisseria gonorrhoeae* need to be subcultured every third day.
- Microbiologics has found the following storage conditions to be favorable for maintenance:

Category of Microorganism	Storage Conditions
Aerobic Bacteria	Store at 2-8°C. A few species of <i>Bacillus</i> remain viable for a longer period when stored at room temperature.
CO <sub>2</sub> Dependent Species	Store at room temperature in a candle jar or in a container with a CO <sub>2</sub> packet.
Yeast and Fungi	Store at room temperature.
Anaerobes	Store in anaerobic conditions at room temperature.
Campylobacter	Store on chocolate agar at 35°C in microaerophilic conditions.

- Microorganisms stored at 4°C should not be used for certain tests. Consult manufacturer's instructions.
- If the resuscitated culture is frozen, Microbiologics cannot guarantee the stated characteristics of the product.

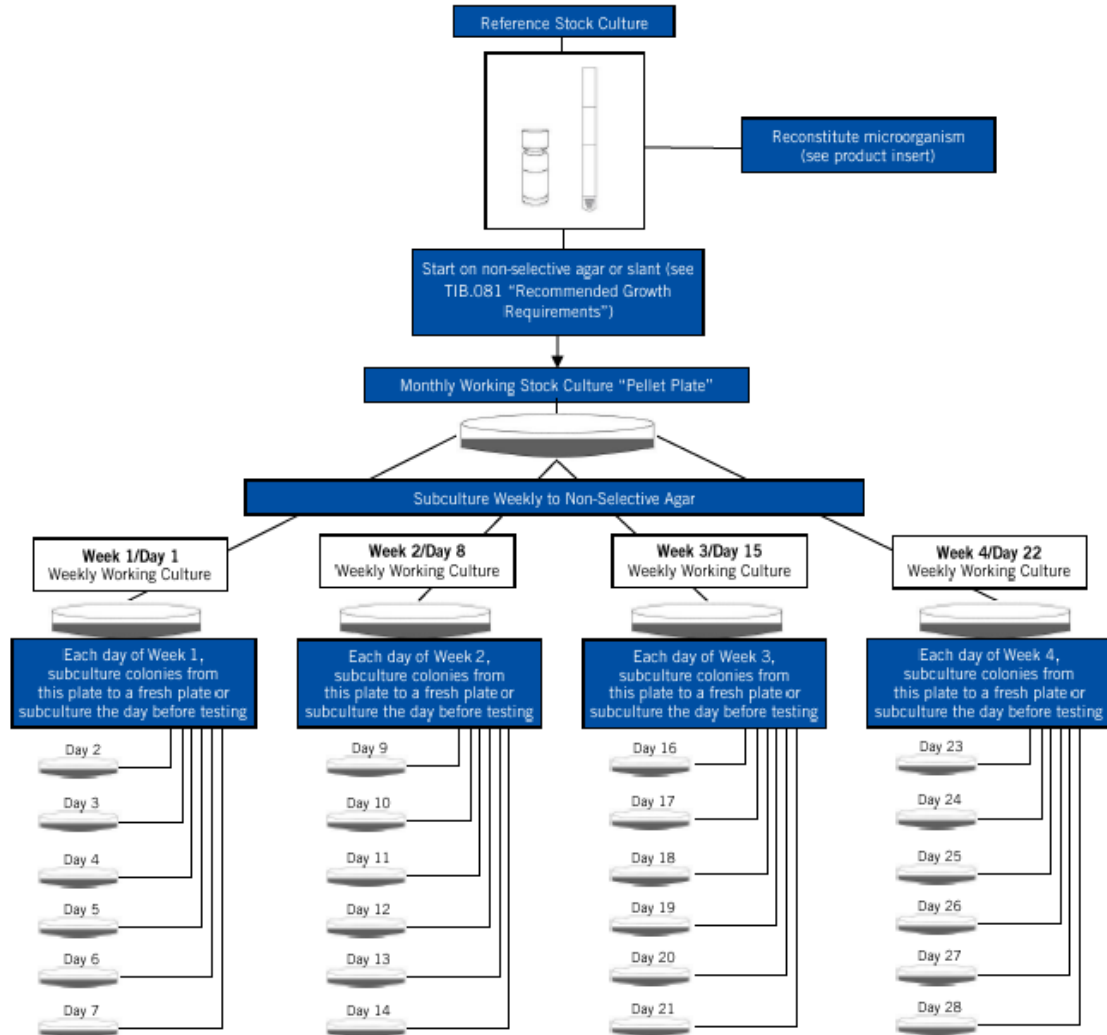
#### Tips for Best Performance \_\_\_\_\_

- Do not test the original pellet plate for phenotypic characteristics. This is the plate on which the lyophilized pellet was started. The organisms growing on this plate are not fully resuscitated.
- Select isolated colonies for a test. Do not test colonies from a contaminated plate.
- When possible, use microorganisms that are not more than 24 hours old for biochemical tests.
- It may be necessary to start microorganisms used for quality control of antibiotic susceptibility tests every two weeks because some microorganisms lose resistance over time.<sup>1</sup>
- Some pharmacopeia tests, such as the growth promotion test, require that strains be 5 passages or less from the original reference culture.<sup>3</sup> In this case, Microbiologics recommends customers use KWIK-STIK™ Plus strains (two passages from reference culture) or quantitative products such as EZ-Accu Shot™.

#### Wrapping Up \_\_\_\_\_

- After the fourth week, dispose of plates and start the process over with a new lyophilized pellet.
- A microorganism may be used beyond expiry date if (1) the lyophilized pellet is grown before expiry date and (2) the microorganism is not used beyond week four of the maintenance program.

## Microorganism Maintenance Plan



### REFERENCES

1. CLSI M07-A10, Vol. 35 No.2, *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically: Approved Standard – Tenth Edition*, Clinical Standards Laboratory Institute, April 2015.
2. Growth Requirements Technical Information Bulletin: [www.microbiologics.com](http://www.microbiologics.com), Support Center/Document Library/Technical Information Bulletins
3. United States Pharmacopeia 38 NF 33, <61> *Microbiological Examination of Nonsterile Products: Microbial Enumeration Tests*, 2015
4. ISO 11133, *Microbiology of food, animal feed and water – Preparation, production, storage and performance testing of culture media*. First edition 2014-05-15



## Anexo 14 Certificado de pureza agua desionizada



Agua Desionizada, Desmineralizada, Blanda,  
Osmosis Inversa, Destilada no esteril

### FICHA TECNICA DEL AGUA DESTILADA Y/O DESIONIZADA

Nro. Lote: 070718	Fecha de Producción: 07-JUL-18	Fecha de Vencimiento: JUL-2019
-------------------	--------------------------------	--------------------------------

PRODUCTO: AGUA TRATADA MICROFILTRADO POR OSMOSIS INVERSA Y DESIONIZADORES

#### RESULTADOS ANÁLISIS QUÍMICOS MEDIDOS EN PLANTA

ANALISIS	RESULTADO
conductividad	< 1 $\mu$ S/cm
PH	5.5 – 7.5
Solidos Totales	< 0.5 mg/L


#### RESULTADOS ANÁLISIS QUÍMICOS MEDIDOS POR UN LABORATORIO EXTERNO

ANALISIS		RESULTADO	
Aluminio	< 0.01 mg/L	Magnesio	< 0.01 mg/L
Cloruros	< 0.15 mg/L	Manganeso	< 0.01 mg/L
Arsenico	< 0.01 mg/L	Molibdeno	< 0.01 mg/L
Bario	< 0.01 mg/L	Sodio	< 0.01 mg/L
Sílice(SiO <sub>2</sub> )	< 0.10 mg/L	Níquel	< 0.01 mg/L
Berilio	< 0.01 mg/L	Estaño	< 0.01 mg/L
Antimonio	< 0.01 mg/L	Vanadio	< 0.01 mg/L
Arsénico	< 0.01 mg/L	Calcio	< 1.00 mg/L
Boro	< 0.01 mg/L	Cadmio	< 0.01 mg/L
Bario	< 0.01 mg/L	Cromo	< 0.01 mg/L
Níquel	< 0.01 mg/L	Molibdeno	< 0.01 mg/L
Densidad	0.9979 g/cm <sup>3</sup>	Temperatura	22°C

#### METODOLOGÍA DE ANALISIS

- Dureza Total : Standard Methods 2340C, titulation EDTA
- Conductividad: Equipo medidor de Conductividad,
- pH: Método Potenciométrico, medidor de pH con electrodo combinado.

ANALIZADO POR:

  
Damaris Villanueva Morillo  
Ingeniera Química  
Reg. CIP N° 194563

ventas@adescoperu.comteléfonos: Nro. Cel. 998452174 RPC.981011591  
Urb. Taurija Mz.G Lt.5 Los Olivos (cdra.7 angelica gamarra)