

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA**

**EAP. DE MEDICINA VETERINARIA**

**Presencia de residuos de sustancias inhibidoras del  
crecimiento microbiano en huevos de gallinas  
destinados al consumo humano en Lima Metropolitana**

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

**AUTOR**

Karen Susana ÁLVAREZ MURGUEYTIO

**ASESOR**

Sonia Yenny CALLE ESPINOZA

Lima - Perú

2009

## **Dedicatoria**

*Va dedicada especialmente para mi hijo Tharick, que me acompañó durante todo el proceso; y a su papá Sabdiel, por el apoyo para poder finalizar este proyecto.*

## **Agradecimientos**

*A mis padres  
Sergio y Lidia por su  
apoyo constante y  
sobretudo su paciencia, a  
mis hermanos Francis,  
Nadia, Claudia, a mi  
abuelita "Mamina", a mi  
tía Juanita, y a toda mi  
familia en general.*

*A mi directora de  
tesis Dra. Sonia Calle y a  
mis asesores por  
brindarme éste proyecto y  
ayudarme a realizarlo.*

*A mis amigas y  
amigos en general.*

*A mis mascotas  
Shane, Gandalf, Erika,  
Saori, Leia.*

## **TABLA DE CONTENIDO**

Abreviaturas

Resumen

Summary

Lista de Cuadros

Lista de Figuras

### **I. INTRODUCCION**

### **II. REVISION BIBLIOGRAFICA**

#### **2.1. SUSTANCIAS INHIBIDORAS**

##### **2.1.2. Los Antibióticos**

###### **2.1.2.1. Definición**

###### **2.1.1.2. Clasificación**

###### **2.1.1.2.1 Según su efecto**

###### **2.1.1.2.1.1. Bacteriostáticos**

###### **2.1.1.2.1.2. Bactericidas**

###### **2.1.1.2.2. Según su mecanismo de acción**

###### **2.1.1.2.3. Según su espectro antimicrobiano**

###### **2.1.1.3. Uso de los antibióticos en Medicina Veterinaria**

###### **2.1.1.3.1. En Avicultura**

###### **2.1.1.4. Vías de Administración de los Antibióticos en Avicultura**

###### **2.1.1.4.1. Medicamentos en el agua de bebida:**

###### **2.1.1.4.2. Aditivos para piensos:**

###### **2.1.1.4.3. Inyección**

###### **2.1.1.5. Principales Tipos de Antibióticos Usados en Avicultura**

###### **2.1.1.5.1. Quinolonas**

- 2.1.1.5.2. Sulfonamidas
- 2.1.1.5.3. Penicilinas y antibióticos b-lactámicos relacionados
- 2.1.1.5.4. Tetraciclinas
- 2.1.1.5.5. Macrólidos, lincosamidas
- 2.1.1.5.6. Aminoglucósidos
- 2.1.1.5.7. Nitrofuranos, bacitracinas, polimixinas
- 2.1.1.5.8. Cloranfenicol, florfenicol, fosfomicinas

## **2.2. EL HUEVO DE GALLINA**

### **2.2.1. Estructura**

- 2.2.1.1. Cutícula
- 2.2.1.2. Cáscara
- 2.2.1.3. Membranas Testáceas
- 2.2.1.4. Clara (Albumen o Albúmina)
- 2.2.1.5. Yema

### **2.2.2. Formación**

### **2.2.3. Composición**

### **2.2.4. Consumo Nacional y Mundial**

## **2.3. LOS RESIDUOS DE ANTIBIOTICOS**

### **2.3.1. Residuos de Medicamentos Veterinarios**

### **2.3.2. Factores que determinan el nivel del residuo de antibiótico en los productos de origen animal en general y en el huevo de gallina**

### **2.3.3. Límite máximo para residuos de medicamentos veterinarios (LMR O LMRMV)**

#### **2.3.3.1. LMRs de antibióticos en huevos de gallina**

### **2.3.4. Nivel sin efecto adverso observado (NOEL)**

**2.3.5.** Ingesta Diaria Admisible (IDA)

**2.3.6.** Período de Retiro o Resguardo

**2.3.7.** Residuos en el Huevo

## **2.4. METODOS ANALITICOS UTILIZADOS EN LA DETECCION DE RESIDUOS DE ANTIBIOTICOS**

**2.4.1.** Validación de las metodologías analíticas

**2.4.1.1.** Especificidad

**2.4.1.2.** Exactitud

**2.4.1.3.** Precisión

**2.4.1.4.** Sensibilidad

**2.4.2.** Métodos Screening o de Cribado

**2.4.2.1.** Métodos Microbiológicos

**2.4.2.1.1.** Bacterias usadas en métodos microbiológicos

**2.4.2.1.2.** Pruebas de difusión agar

**2.4.2.1.2.1.** Formación de una zona de inhibición

**2.4.2.1.2.2.** Composición del medio de cultivo

**2.4.2.1.2.3.** Zonas de inhibición no específica

**2.4.2.1.2.4.** *Bacillus subtilis* como cepa sensible

**2.4.2.1.2.4.1.** Prueba usada en el estudio en el presente estudio

**2.4.2.1.2.5.** Pruebas screening de tipo microbiológico estandarizadas

**2.4.3.** Métodos Inmunoquímicos

**2.4.4.** Métodos Cuantitativos Confirmatorios

## **2.5. RIESGOS EN SALUD PÚBLICA**

**2.5.1.** Reacciones de Hipersensibilidad

**2.5.2.** Problemas Tóxicológicos

**2.5.3.** Cambios Microflora Intestinal

**2.5.4.** Resistencia bacteriana por el uso de antimicrobianos en alimento

**2.5.4.1.** Resistencia en *Salmonella*, *Campylobacter* y otros

## **2.6. CONTROL INTERNACIONAL Y NACIONAL**

**2.6.1.** Comisión del Codex Alimentarius y el Codex Alimentarius  
(FAO/OMS)

**2.6.2.** JEFCA

**2.6.3.** Unión Europea (EU) y Área Europea Económica (EEA)

**2.6.4.** FDA y FSIS

**2.6.5.** Control Nacional: Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA)

## **III. MATERIALES Y METODOS**

**3.1.** Área de estudios e instalaciones:

**3.2.** Materiales y Equipos:

**3.2.1.** Materiales

**3.2.2.** Medios de cultivos, reactivos, cepas bacterianas

**3.2.3.** Equipos

**3.3.** Diseño experimental

**3.4.** Método

**3.5.** Procedimiento

**3.5.1.** Preparación del buffer fosfato pH 4.5 + Tween 20 al 0.75%

**3.5.2.** Procesamiento de muestras (huevos)

**3.5.3.** Preparación de las placas de agar Muller Hilton (MH) sembradas con *Bacillus subtilis* (ATCC 6633)

**3.5.3.1.** Preparación de agar MH

**3.5.3.2.** Preparación del inóculo *Bacillus subtilis* (ATCC 6633)

**3.5.3.3.** Sembrado de placas

**3.5.3.4.** Inoculación de la muestra (hisopos)

**3.5.4.** Lectura de resultados

**3.5.5.** Análisis de datos:

#### **IV. RESULTADOS**

#### **V. DISCUSION**

#### **VI. CONCLUSIONES**

#### **VII. LITERATURA CITADA**

#### **VIII. APENDICE**

## RESUMEN

El presente estudio busca evidenciar la presencia de residuos de sustancias inhibidoras del crecimiento microbiano en huevos de gallinas destinados al consumo humano a nivel de Lima Metropolitana. La hipótesis consiste en encontrar al menos que el 1% de huevos de gallinas que se expenden en diferentes mercados y supermercados de Lima presentan residuos de sustancias inhibidoras detectables a la prueba de diagnóstico microbiológico. Se tomaron un total de 315 muestras, 15 por cada punto de comercialización, en 2 supermercados y 5 mercados minoristas, localizados en las zonas norte, sur, este, oeste y centro de Lima Metropolitana, con un intervalo de 2 semanas a más en promedio en tres ocasiones diferentes. Para determinar el número muestral se utilizó el diseño de Fórmula de Prevalencia Límite al  $P=0.01$ . La presencia de residuos de sustancias inhibidoras se demostró como zonas claras de inhibición de crecimiento de la bacteria alrededor del hisopo con la muestra. Muestras con halos de inhibición igual o mayor a 2 mm son considerados positivos. Se encontraron 148 muestras positivas (46.98%) a la presencia de residuos de sustancias inhibidoras del crecimiento microbiano en huevos de gallina destinados al consumo humano y 167 muestras negativas (53.02%). Todas las áreas muestreadas mostraron presencia de residuos de sustancias inhibidoras del crecimiento microbiano en mayor o menor grado.

**Palabras Clave:** residuos, sustancias inhibidoras, huevos, microbiológico.

## **ABSTRACT**

This study aimed to reveal the presence of residues of inhibitory substances of microbial growth in chicken eggs for human consumption at the level of metropolitan Lima. The hypothesis consists in find at least 1% of eggs from hens that are sold in different markets and supermarkets in Lima have detectable residues of inhibitory substances for microbiological diagnostic test. It took a total of 315 samples, 15 for each point of commercialization, 2 supermarkets and 5 retail markets, located in the north, south, east, west and center of metropolitan Lima, with an interval of 2 weeks or more on average on three different occasions. To determine the sample number was used the limit prevalence formula at  $P = 0.01$  as design. The presence of residues of inhibitory substances was demonstrated as clear zones of inhibition of bacterial growth around the swab sample. Samples with inhibition zones equal or greater than 2 mm are considered positive. 148 samples were found positive (46.98%) to the presence of residues of inhibitory substances of microbial growth in chicken eggs for human consumption and 167 samples were found negative (53.02%). All sampled areas showed presence of residues of inhibitory substances of microbial growth in greater or lesser degree.

**Keywords:** residues, inhibitory substances, eggs, microbiological

## **LISTA DE CUADROS:**

**Cuadro 1.** Resultados positivos a residuos de sustancias inhibidoras del crecimiento microbiano en huevos de gallinas destinados a consumo humano en Lima Metropolitana.

## **LISTA DE FIGURAS:**

**Figura 1.** Mecanismos de acción de los antibióticos.

**Figura 2.** Partes y estructura del huevo de gallina.

**Figura 3.** Formación del huevo de gallina.

**Figura 4.** Materiales y reactivos para la elaboración del buffer fosfato a pH 4,5 más Tween 20 (Monolaurato de Sorbitan Polioxetilénico).

**Figura 5.** Cepa de *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

**Figura 6.** Crecimiento de colonias de *Bacillus subtilis* ATCC 6633, en medio agar sangre (izquierda) y vista al microscopio de la colonia con tinción gran (derecha).

**Figura 7.** Uno de los mercados que se muestreo en el estudio.

**Figura 8.** Hisopos en los tubos con caldo con la cepa de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 al 0.5 en la escala de Mc Farland.

**Figura 9.** Medición del halo de inhibición del disco de neomicina 30 ug con la regla medidora de antibiograma.

**Figura 10.** Medición con la regla medidora de antibiograma de una muestra positiva con un promedio igual o mayor a 2mm.

**Figura 11.** Medición de una muestra positiva con un halo de inhibición de 10 mm en promedio.

**Figura 12.** Medición de una muestra positiva con halo de inhibición de 3 mm en promedio.

**Figura 13.** Medición de muestra con 4 mm de halo de inhibición en promedio.

**Figura 14.** Muestra control negativo con suero fisiológico

**Figura 15.** Muestra control negativo con Solución Buffer Fosfato Tween 20.

**Figura 16.** Medición de una muestra negativa que no supera los 2mm de halo de inhibición.

**Figura 17.** Muestra negativa sin presencia de halo de inhibición

**Figura 18.** Muestras negativas cuyo halo de inhibición es menor a 2 mm en promedio.

#### **LISTA DE APENDICES ó ANEXOS:**

**Apéndice 1.** Clasificación química de los antimicrobianos, algunos ejemplos, modo de acción y espectro simplificados.

**Apéndice 2.** Periodo de retiro para fármacos antimicrobianos de uso avícola.

**Apéndice 3.** Composición nutricional del huevo de gallina.

**Apéndice 4.** Producción y consumo de huevos años 1990-2006. Perú

**Apéndice 5.** Screening test estándar de tipo microbiológico para la detección de residuos de antimicrobianos en carne, leche y huevos.

## I. INTRODUCCIÓN

La aparición de los antibióticos a inicios del siglo XX, su uso, desarrollo e investigación han constituido uno de los principales sucesos no sólo para el campo de la medicina humana, sino también para la medicina veterinaria, tanto para su aplicación a nivel individual como productivo. En las diversas producciones de alimentos de origen animal destinados al consumo humano (carne, leche, huevos, mieles, etc.), se les usa como terapéuticos, profilácticos y también como promotores del crecimiento.

En avicultura en general, tanto en la producción de carne ó huevo, la impresionante magnitud que actualmente alcanza la población avícola mundial, ha creado complejas situaciones de carácter sanitario al tener que afrontar el desafío de multiplicidad de enfermedades tipo bacteriosis, virosis, micosis y micoplasmosis, entre otras, que hace algunas décadas no tuvieron la significación que hay que advertir en nuestros días. Este panorama ha dado lugar a la búsqueda de soluciones para prevenir las enfermedades, con apoyo de productos biológicos y, otras veces, a tratarlas mediante el camino de la quimioterapia o terapia antibiótica (Ilender, 1999), por lo que éstos vienen a constituir una herramienta muy útil en el área de sanidad animal. Como contraparte, un uso inadecuado e indiscriminado de los antibióticos puede conllevar a la presencia de residuos, en este caso en el huevo de gallina destinado al consumo humano, así como a la presencia de resistencias

bacterianas en las propias aves, y su transferencia en algunos casos hacia el hombre.

En la sociedad actual se está incrementando la tendencia hacia la búsqueda de alimentos que sean “naturales u orgánicos”, evitándose productos que puedan contener residuos o sustancias nocivas en general, tendencia que probablemente irá aumentando a medida que pase el tiempo. A su vez hay constantes avances y mejoras en cuanto a metodologías y tecnologías de detección de residuos de medicamentos veterinarios (entre ellos los residuos de antibióticos), en los diferentes productos de origen animal destinados al consumo humano, así como en trabajos de investigación, permitiendo que los residuos sean evaluados con mayor exactitud y precisión.

Dentro de la metodología analítica para la detección de residuos de antibióticos de los diversos productos de origen animal, se encuentran los “screening tests” o métodos de cribado, la mayoría trata de pruebas de tipo microbiológico de difusión en agar, de tipo cualitativo, que son considerados de “primera mano” es decir determinan o no la presencia de residuos de algún inhibidor bacteriano (Nouws, 1981; Aerts *et al.*, 1995), y son elegidos por ser de bajo costo, de alto rendimiento, rápidos, accesibles y de resultados fiables.

El huevo de gallina al ser un alimento que posee una gran demanda tanto a nivel mundial como nacional, ya que tiene un excelente contenido nutricional aparte de un precio accesible para la mayoría de los consumidores, ha sido nombrado por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), como “uno de los alimentos más completos y nutritivos de la naturaleza” (D’Marino, 2005).

Por ello el presente estudio busca evaluar la presencia de residuos de sustancias inhibidoras del crecimiento microbiano en huevos de gallina destinados al consumo humano en el distrito de Lima Metropolitana con un método de detección microbiológica de difusión en agar.

## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. SUSTANCIAS INHIBIDORAS

El término “sustancias inhibidoras” reúne a todas las sustancias capaces de inhibir el crecimiento microbiano en los animales de abasto (Residuos de Medicamentos Veterinarios). Según Pascual (2000), el grupo de residuos de antibióticos determinados mediante pruebas microbiológicas se suelen denominar como “inhibidores del crecimiento bacteriano”.

#### 2.1.1. Los Antibióticos

##### 2.1.1.1. Definición:

Los antibióticos son sustancias antimicrobianas producidas por diversas especies de microorganismos (bacterias, hongos, y actinomicetos) que suprimen el crecimiento de otros microorganismos. Sin embargo, por costumbre este término abarca también a los antibióticos sintéticos como las sulfonamidas y quinolonas (Goodman, 2007).

##### 2.1.1.2. Clasificación:

###### 2.1.1.2.1 Según su efecto:

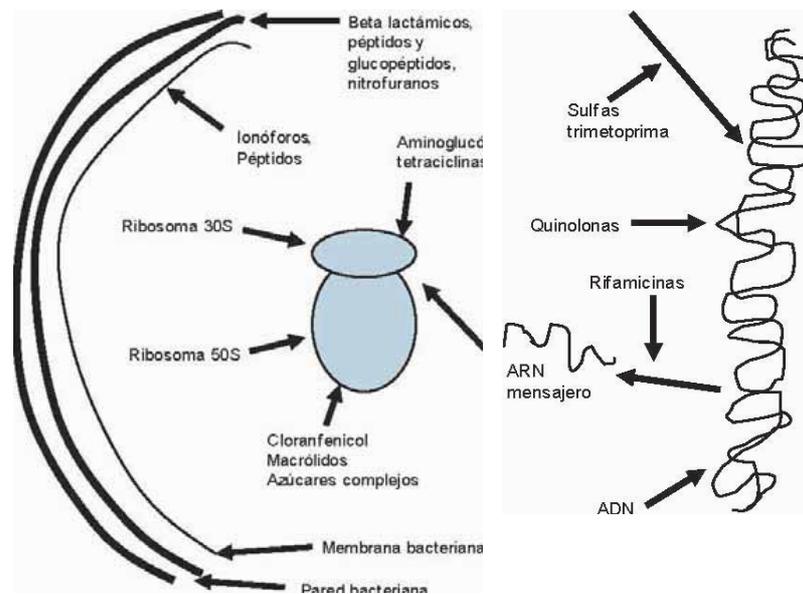
**2.1.1.2.1.1 Bacteriostáticos:** Son aquellos antibióticos que, a las concentraciones que se alcanzan en el suero o los tejidos, inhiben el crecimiento y la multiplicación bacteriana, favoreciendo su ulterior destrucción por el sistema inmunológico del paciente, pero que por sí mismos, no destruyen

a las bacterias, Ejemplos: cloranfenicol, clindamicina, eritromicina, lincomicina, nitrofurantoina, sulfonamidas, tetraciclinas y trimetropin (Alvarado, 1997).

**2.1.1.2.1.2. Bactericidas:** Son aquellos antibióticos que ocasionan la lisis de las bacterias, con efectos irreversibles. Ejemplos: aminoglucósidos, bacitracina, carbapenemas, cefalosporinas, fosfomicina, monobactámicos, penicilinas y demás betalactámicos, polimixina B y demás antibióticos polipeptídicos, quinolonas, rifampicina, y vancomicina (Alvarado, 1997).

#### 2.1.1.2.2. Según su mecanismo de acción

- **Antibióticos que inhiben la síntesis de la pared celular:** Ejemplos: betalactámicos (penicilinas, cefalosporinas, ipenemem, aztreonam), bacitracina, vancomicina, cicloserina y fosfomicina (Alvarado, 1997).



**Figura 1.** Mecanismos de acción de los antibióticos (Tomado de Errecalde, 2004)

- **Antibióticos que alteran la función de la membrana celular:** Se incluyen: polimixina B, anfotericina B, colistina y nistatina (Alvarado, 2007).

- **Antibióticos que inhiben la síntesis proteica:** Se incluyen:

- Antibacterianos que actúen sobre la subunidad 30-S: aminoglucósidos, tetraciclinas.

- Antibacterianos que actúan sobre la subunidad 50-S: macrólidos (eritromicinas), cloranfenicol, lincosamidas (Alvarado, 1997).

- **Antibióticos que inhiben la síntesis o función de los ácidos nucleicos:** Inhibiendo la replicación del ADN (quinolonas), impidiendo la transcripción (rifampicina, actinomicina), inhibiendo la síntesis de metabolitos esenciales (bloqueo de la formación de bases purinas y pirimidinas (sulfonamidas, diaminopirimidinas (trimetropin, pirimetamina, metotrexate)) (Alvarado, 1997).

### 2.1.1.2.3. Según su espectro antimicrobiano:

De acuerdo a la variedad de especies sobre las cuales ejercen su acción, los antibacterianos pueden dividirse en tres grupos:

- **De espectro reducido:** Agentes que sólo actúan sobre un escaso grupo de bacterias: Ejemplo: penicilina G, que es activa básicamente contra cocos grampositivos.

- **De espectro ampliado:** Término usado para designar aquellos agentes que son eficaces contra bacterias grampositivas y, además contra un grupo significativo de gramnegativas. Ejemplo: ampicilina, que es activa contra los mismas bacterias que la penicilina G y que, además, es activa contra algunos gramnegativos.

- **De amplio espectro:** Son activas contra múltiples grupos de bacterias (grampositivas y gramnegativas, rickettsias, espiroquetas), abarcando un gran número de especies de los mismos. Ejem: tetraciclinas, cloranfenicol, macrólidos, etc (Alvarado, 1997).

### 2.1.1.3. Uso de los Antibióticos en Medicina Veterinaria

Se usa principalmente en forma terapéutica para el tratamiento de determinadas enfermedades infecciosas; luego viene la profiláctica, que implica su uso para la prevención de la enfermedad en animales individuales o en un

grupo de ellos. Además está su uso como promotores del crecimiento a concentraciones subterapéuticas (Errecalde, 2004).

Cuando son utilizados como agentes terapéuticos en el tratamiento de enfermedades infecciosas agudas, los agentes antimicrobianos se administran durante un corto periodo de tiempo (1-7 días) y en dosis altas. Sin embargo, cuando se busca su efecto promotor de crecimiento o cuando se usan en el marco de una profilaxis colectiva, las dosis de administración son bajas y se mantienen durante periodos muy prolongados de vida de los animales (Residuos de Medicamentos de Uso Veterinario).

#### **2.1.1.3.1. En Avicultura:**

Se utilizan igualmente de forma: Terapéutica, profiláctica, y como promotor de crecimiento (Mack, 1998).

Los antibióticos se suelen usar en la industria de ponedoras comerciales mayormente prevenir o tratar las infecciones bacterianas secundarias durante una enfermedad viral y con menos frecuencia para tratar una enfermedad producida por un agente bacteriano primario (Kreager, 1995).

Entre las enfermedades bacterianas primarias se puede mencionar al *Mycoplasma gallisepticum* (MG) causante de la Enfermedad Respiratoria Crónica (ERC) y a la Coriza infecciosa (*Haemophilus paragallinarum*), que por lo general se pueden controlar en mejor forma mediante la vacunación. Los agentes secundarios son mucho más comunes, generalmente están asociados con un agente viral primario, infecciones por Mycoplasmas: MG, *Mycoplasma sinoviae* (MS) y factores medio ambientales estresantes como el polvo y el amoníaco. La infección secundaria más frecuente es ocasionada por la *Escherichia coli* y otras bacterias coliformes que producen aerosaculitis y peritonitis. También los problemas de enteritis son bastante frecuentes en las granjas. El uso menos justificado de los antibióticos es el reportado para tratar el estrés (Kreager, 1995).

Entre las enfermedades causadas por virus en ponedoras podemos citar: Enfermedad de Marek, Leucosis Linfoide, Encefalomiелitis aviar, Enfermedad

de New Castle, Bronquitis Infecciosa, Viruela Aviar, Laringotraqueitis infecciosa, Enfermedad de Gumboro, Síndrome de la caída de puesta 76 (EDS 76), Influenza Aviar, Artritis vírica (Buxade, 1987).

Entre las principales enfermedades de tipo bacteriano en las cuales es necesario el uso de antibióticos se pueden mencionar: Micoplasmosis (MG, MS), Coriza Infecciosa (*Haemophilus paragallinarum*), Cólera Aviar (*Pasteurella* spp), infecciones por *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Salmonella* spp. (tifosis, paratifosis, pullorosis), infecciones por *E. coli* (colibacilosis, aerosaculitis, salpingitis, onfalitis) enteritis necrótica (*Clostridium perfringens*) (Buxade, 1987; Dhillon *et al*, 2004).

Entre los antibióticos más utilizados como promotores del crecimiento en ponedoras tenemos: bacitracina de zinc, clortetraciclina, eritromicina, neomicina (con oxitetraciclina), novobiocina, oxitetraciclina, penicilina y tilosina (Kreager, 1995). En el ámbito nacional los antibióticos más usados como promotores del crecimiento en la avicultura son: lincomicina, zinc bacitracina, tilosina (tartrato, fosfato), clortetraciclina y oxitetraciclina (CMVP, 2006).

La Comisión de la Unión Europea (UE), ha prohibido como aditivos para piensos en alimentos para animales cuyos productos son destinados al consumo humano la avoparcina, zinc bacitracina, espiramicina, virginiamicina, fosfato de tilosina, monensina sódica, salinomicina sódica, avilamicina y flavofosfolipol (Memo 02-66, 2002).

#### **2.1.1.4. Vías de Administración de los Antibióticos en Avicultura**

La vía oral (VO) es la preferida y la más recomendable dentro de la práctica sanitaria avícola, para administrar medicamentos en general y antibióticos en particular (Ilender, 1999).

##### **2.1.1.4.1. Medicamentos en el agua de bebida:**

Se administran mayormente antibióticos, coccidiostáticos, agentes antiprotozoarios y antihelmínticos. Esta es preferible a menudo, ya que el ave de corral usualmente bebe cuando deja de comer, sin embargo este consumo puede variar debido a las condiciones climáticas, a la facilidad de acceso, a la

higiene de los bebederos, o a la palatabilidad del medicamento en el agua. La cantidad de agua medicada consumida por las aves durante los ensayos de residuos debe ser comunicada, para permitir la determinación de la dosis recibida (mg/kg) (Residue Guideline N°31, 2004).

También se debe tener en cuenta la composición de los sistemas de riego o contenedores, y la calidad del agua real (Residue Guideline N°31, 2004).

La administración en el agua de bebida, debe hacerse en forma intensiva por un corto periodo de tiempo, obligando a las aves a consumirla, previo bloqueo al consumo de agua, de modo que se genere sed. Este tipo de medicación es denominada "pulsátil" y busca obtener altas concentraciones sanguíneas y/o tisulares, que superen ampliamente el CIM en corto tiempo (Serrano, 2002b).

La medicación pulsátil es muy útil en infecciones agudas, que necesitan de una terapia rápida y con altos niveles tisulares del antibiótico; aquí juega un papel importante el gradiente de concentración que favorece una mayor difusión tisular. Esta medicación ha sido evaluada farmacocinéticamente en aves por Ziv G. *et al* (1997) con amoxicilina y cefalexina y por Dijkstra J (1997) con difloxina.

#### **2.1.1.4.2. Aditivos para piensos:**

Se administran antibióticos, promotores del crecimiento, endoparaticidas, aditivos alimenticios, electrolitos y suplementos dietéticos. Los aditivos para alimentos, incorporados en forma de "pellets", desmenuzados o en masa, se utilizan en la medicación masiva de las aves de corral, en particular cuando las propiedades fisicoquímicas de la droga hacen que sea insoluble en agua. Las variaciones en el consumo de alimento están asociadas con el clima, los cambios en la vivienda, raza, tipo, y edad de las aves, el peso corporal, rango de postura, el contenido de energía y fibra de los piensos, y el tamaño de las partículas de los ingredientes de piensos (Residue Guideline N° 31, 2004).

La absorción de la droga de las aves tratadas puede ser imprevisible a causa de los ingredientes vinculados a los piensos y su biodisponibilidad oral

puede verse alterada por ciertas interacciones que se puedan presentar a lo largo del intestino con otros compuestos presentes en el alimento o en la misma agua de bebida; la práctica de añadir otros medicamentos aparte de los antibióticos es muy conocida (Serrano, 2002b). Proceso como la molienda y temperaturas de 75-95°C pueden afectar la estabilidad de la droga (Residue Guideline N°31, 2004).

La medicación en el alimento como una premezcla, no es la más aconsejada para el tratamiento de enfermedades agudas de tipo sistémico, ya que pueden dar origen a resistencias, como lo menciona Sumano y Gutiérrez (2000). Estas premezclas pueden ser útiles en el tratamiento de enfermedades entéricas, con antibióticos no absorbibles por el tracto gastrointestinal, o como medicación de control por largos periodos en enfermedades de tipo crónico, y también en tratamientos profilácticos ó preventivos y como promotores del crecimiento (Serrano, 2002b)

#### **2.1.1.4.3. Inyección:**

La inyección intramuscular (IM) se suele dar en el músculo del muslo o en el cuello de pollitos de un día. La inyección en el muslo o el músculo del pecho en aves adultas es una vía potencial de administración (Residue Guideline N° 31, 2004). Su uso sólo se ve justificado si se trata de animales valiosos como aquellos de exposición o de competición (gallos de pelea por ejemplo) en donde si se hace viable la utilización de un tratamiento individual (Gómez *et al*, 1991). También en algunos casos se usa en la vacunación de huevos, pollos de días y adultos (Residue Guideline N°31, 2004).

Otros métodos: de administración son: gotas oculares, inhalantes, polvos, aerosoles, etc. (Residue Guideline N°31, 2004).

#### **2.1.1.5. Principales Tipos de Antibióticos Usados en Avicultura**

##### **2.1.1.5.1. Quinolonas**

Su principal mecanismo de acción parece estar medido por su capacidad de interacción con la enzima bacteriana girasa del ácido dexosirribonucleico (ADN-

girasa) que es responsable de permitir el enlace circular de las cadenas del ADN enrollado, para que el cromosoma sea organizado dentro de la célula bacteriana (Glisson, 1995). Son bactericidas y poseen una buena actividad frente a la mayoría de bacterias gramnegativas, especialmente de la familia Enterobacteriaceae, y sensibilidad variable frente a grampositivas (Adams, 2004). Las principales quinolonas usadas en avicultura incluyen: enrofloxacin, danofloxacin, norfloxacin, ciprofloxacina, sarafloxacin, difloxacin, flumequina y ácido oxolínico (Serrano, 2000).

Entre las quinolonas disponibles y más usadas a nivel nacional en avicultura se encuentran: enrofloxacin, ciprofloxacina, norfloxacin, norfloxacin más amoxicilina, y otros de manera escasa como: gatifloxacin, levofloxacin, pefloxacin, difloxacin. Casi todas las presentaciones se administran vía agua de bebida, por un corto período de tiempo (3-5 días en promedio), algunas que otras presentaciones se aplican por vía IM (CMVP, 2006).

En avicultura, generalmente la mayoría de las fluoroquinolonas son muy potentes contra infecciones por *E. coli*, *Salmonella* spp., *Pasteurella multocida*, *Haemophilus* sp. Adicionalmente poseen una potente actividad contra *Mycoplasma* sp., etc. (Glisson, 1995).

#### **2.1.1.5.2. Sulfonamidas**

Son análogos estructurales y antagonistas competitivos del ácido paraaminobenzoico, (PABA), los microorganismos sensibles que sintetizan su propio ácido fólico, no son afectados (Goodman, 2007). Afectan a bacterias grampositivas y gramnegativas, y también a muchos protozoos, siendo su acción más bacteriostática que bactericida. La combinación de las sulfamidas con las diaminopirimidinas mejora en gran medida su espectro de actividad (Sumano, 2006) y se produce un efecto bactericida (Myllyniemi, 2004).

Entre las sulfonamidas que se encuentran disponibles en avicultura a nivel nacional tenemos: Sulfamonometoxina – Trimetropim, Sulfadimidina - Trimetropim, Sulfacloropiridazina sódica - Trimetropim, Sulfametoxasol - Trimetropim, Sulfadiazina - Trimetropim, Sulfamerazina - Trimetropim,

Sulfadimetoxina - Trimetropim, Sulfatiazol - Trimetropim, etc., así como sulfas sin combinar como: sulfadiazina, sulfaclozina, sulfamonoquinoxalina, sulfamonometoxina, sulfaquinoxalina, etc., además de algunas que se asocian con otro tipo de antibióticos por ejemplo: norfloxacin (CMVP, 2006).

La gran mayoría de las presentaciones se administra en el agua de bebida por un corto periodo de tiempo (3-5 días en promedio), muy pocas se pueden administrar en el alimento, así como por vía IM. Se usan en avicultura principalmente para el tratamiento y prevención de: infecciones por *E. coli*, *Salmonella sp.*, *Haemophilus paragallinarum*, *Pasteurella spp.*, infecciones por *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, coccidias, etc. (CMVP, 2006; Calnek 2000).

#### **2.1.1.5.3. Penicilinas y antibióticos b-lactámicos relacionados**

Los antibióticos b-lactámicos ejercen su efecto bactericida inhibiendo la síntesis de la pared bacteriana y destruyendo la integridad de la misma (Adams, 2004). Las penicilinas son uno de los grupos de antibióticos más generosos desde el punto de vista de su eficacia y casi nula toxicidad (Sumano, 2006).

Se pueden distinguir cuatro familias de penicilinas: las penicilinas naturales, las aminopenicilinas, las penicilinas resistentes a penicilinasas y las penicilinas de amplio espectro (Adams, 2004). Las cefalosporinas y cefamicinas inhiben la síntesis de la pared bacteriana de manera semejante a como lo hace la penicilina (Goodman, 2007).

Entre los antibióticos b-lactámicos disponibles y más utilizados en la industria avícola a nivel nacional tenemos: amoxicilina, amoxicilina - ciprofloxacina, amoxicilina - norfloxacina, ceftriazona y ceftiofur; la amoxicilina se administra generalmente vía agua de bebida por un corto período de tiempo, aunque algunas presentaciones pueden darse a través del alimento, las cefalosporinas son de uso IM, SC, frecuentemente asociados con la puesta de vacuna de Marek en pollos BB. Se usan mayormente para el tratamiento y prevención de infecciones por *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *E. coli*; y bacterias sensibles anteriormente mencionadas (Calnek, 2000), en

enfermedades como la salmonelosis, coriza infecciosa (CMVP, 2006), cólera aviar y enteritis necrótica (clostridiosis) (CMVP, 2006; Calnek, 2000).

#### **2.1.1.5.4. Tetraciclinas**

Poseen actividad antimicrobiana por su unión a la subunidad 30s de los ribosomas de microorganismos sensibles. A concentraciones terapéuticas son antibióticos bacteriostáticos de amplio espectro (grampositivos y gramnegativos), inhiben el crecimiento de una extensa variedad de bacterias, protozoos y muchos organismos intracelulares tales como *Mycoplasma* spp., *Chlamydia* spp., *Rickettsia* spp. (Prescott y Baggot, 1993).

Entre las tetraciclinas disponibles y más usadas en avicultura a nivel nacional tenemos: oxitetraciclinas, clortetraciclina, tetraciclinas, doxiciclinas. Algunas presentaciones las asocian con cloranfenicol, florfenicol, tilosina, sulfas, neomicina, etc. La clortetraciclina puede ser usada también como promotor del crecimiento y se administra por medio del alimento; la mayoría de las doxiciclinas se administran por medio del agua de bebida, y algunas por vía IM, SC. Las tetraciclinas se administran mayormente por vía agua de bebida, y la mayoría de las presentaciones de oxitetraciclina se administran por vía IM, SC, aunque también por VO (alimento, agua de bebida) (CMVP, 2006).

Se indican más para el tratamiento y prevención en casos de micoplasmosis, Coriza Infecciosa, Cólera Aviar, en infecciones por *E. coli*, *Salmonella* spp., *Clostridium perfringens* (CMVP, 2006; Calnek, 2000), e infecciones por *Staphylococcus aureus* (Calnek, 2000).

#### **2.1.1.5.5. Macrólidos, Lincosamidas**

Su acción antibacteriana se basa en la inhibición de la síntesis proteica al unirse a la subunidad ribosómica 50s de las bacterias. Se acepta en general que son bacteriostáticos (Adams, 2004).

Son eficaces contra bacterias grampositivas (estreptococos, estafilococos), también *Mycoplasma* spp., *Corynebacterium*, *Erysipelothrix*, *Bordetella*,

*Bartonella*, también son sensibles unas cuantas bacterias gramnegativas especialmente *Pasteurella* spp., la actividad frente a bacterias anaerobias es solamente moderada. En el caso de la tilmicosina, su mayor interés reside en la buena actividad que tiene frente a *Pasteurella* spp., y *Haemophilus somnus* (Adams, 2004).

Los macrólidos se absorben muy bien por VO, aunque se suelen aplicar por otras vías como son IM, IV, nasal, intraocular. Una vez que se absorben se distribuyen muy bien por los tejidos y líquidos corporales, con excepción del líquido cefalorraquídeo (LCR) y cerebro (Sumano, 2006).

Los macrólidos más usados en medicina aviar son la tilosina, espiramicina, eritromicina, y la tilmicosina. La tilosina es quizás el compuesto más conocido en avicultura, tiene 2 sales: tartrato y fosfato. En términos de biodisponibilidad se considera que el fosfato tiene una bajísima absorción (Huber W.G. 1988), y esa es la razón por la cual se ha utilizado siempre como promotor de crecimiento, se administra a través del alimento. El tartrato es la sal utilizada principalmente como antimicoplasmático en el agua de bebida; su absorción se considera adecuada por este medio (Serrano, 2002a).

Entre los macrólidos disponibles y más usados a nivel nacional tenemos: tilosina – tartrato, tilosina – fosfato (también se asocia tilosina - tartrato con otros antibióticos como: doxiciclina, amoxicilina, lincomicina, gentamicina, etc.), hay tilosinas que se pueden administrar vía IM o SC, en especial las asociadas con gentamicina; la tilmicosina, (se administra en agua de bebida y también se puede usar en pollos BB, administrada al día siguiente de una vacuna viva); leucomicina (a través del alimento); espiramicina (IM) y el aivlosin (nuevo macrólido) por VO a través del agua de bebida (CMVP, 2006).

Se usan principalmente para el tratamiento y prevención de infecciones por *Mycoplasma* spp, estafilococos, estreptococos, y en enfermedades como cólera aviar, enteritis necrótica, etc. (CMVP, 2006; Calnek, 2000), coriza infecciosa (Calnek, 2000) y cólera aviar (CMVP, 2006).

Las lincosamidas tienen similar mecanismo de acción a los macrólidos y se comportan como bacteriostáticos (Adams, 2004), y similar espectro de

actividad sólo que en comparación con los macrólidos son menos eficaces contra gramnegativos (Sumano, 2006).

La lincomicina es la más utilizada en avicultura (Serrano, 2002a). Al administrarse por VO (sea en agua de bebida o en el alimento) la absorción a nivel intestinal es apreciable para conseguir alrededor de las dos horas adecuadas concentraciones sanguíneas. No atraviesa la barrera hematoencefálica (BHE) (Ilender Corp, 2005).

Disponible a nivel nacional tenemos la lincomicina, que se usa mucho como promotor del crecimiento, a través del alimento y agua de bebida. Se indica para la prevención y tratamiento de micoplasmosis, en casos de enteritis necrótica, en infecciones por estreptococos, estafilococos (CMVP, 2006; Calnek, 2000), y coriza infecciosa. Se le encuentra algunas veces asociado con espectinomicina (aminociclitol) (CMVP, 2006).

#### **2.1.1.5.6. Aminoglucósidos**

Entre los aminoglucósidos disponibles y usados en avicultura a nivel nacional se encuentran: gentamicina, estreptomina, neomicina, y la mayoría se administran por vía IM o SC. La presentación de neomicina también se da por VO. Se usan principalmente para el tratamiento y prevención contra infecciones por *E. coli*, *Salmonella* spp., en enfermedades como la coriza infecciosa, cólera aviar (CMVP, 2006; Calnek, 2000); algunas presentaciones se aplican junto con la vacuna de la enfermedad de Marek en pollos bebé (CMVP, 2006).

#### **2.1.1.5.7. Nitrofuranos, bacitracinas, polimixinas**

Los nitrofuranos son antibacterianos sintéticos y hasta ahora se han sintetizado más de 3500 de ellos. En Estados Unidos se ha limitado el uso de nitrofuranos por VO para animales destinados al consumo, debido a que en algunos estudios se ha demostrado que son cancerígenos, aunque éstas evidencias son claras sólo en animales de laboratorio y usando dosis elevadas (Sumano, 2006), también han demostrado tener potencial mutagénico (la

nitrofurazona como ungüento tópico está permitido) (Board and Agriculture, 1999).

Tiene acción contra bacterias grampositivas y gramnegativas, además de algunos protozoos, pero son más efectivas contra bacterias gram negativas. Se pueden administrar por VO y tópica, la absorción oral se incrementa cuando se da junto con el alimento (Adams, 2004).

Entre los nitrofuranos disponibles a nivel nacional tenemos: furazolidona, furaltadona, que se administran por medio del alimento por un corto periodo de tiempo, y se utilizan principalmente para tratamiento y prevención de infecciones por *E. coli*, *Salmonella* spp. (CMVP, 2006; Calnek, 2000).

La bacitracina actúa principalmente contra bacterias grampositivas, su espectro es similar al de la penicilina G y actúa contra microorganismos resistentes a ésta (Sumano, 2006). Se encuentran disponibles a nivel nacional: zinc bacitracina, y bacitracina metileno disalicilato, se administran en el alimento como promotores del crecimiento y para control y prevención de la enteritis necrótica (CMVP, 2006, Calnek, 2000).

Las polimixinas muestran actividad antibacteriana sobre microorganismos gramnegativos y ninguna sobre grampositivos (Adams, 2004). Disponibles para avicultura a nivel nacional tenemos la colistina sulfato (polimixina E1), que se encuentra muy escasamente, se administra por medio del alimento, donde puede ser usado también como promotor, y también por medio del agua de bebida. Se usa para el tratamiento y prevención de infecciones por *E. coli* (CMVP, 2006; Calnek, 2000) y en casos de salmonelosis (CMVP, 2006).

#### **2.1.1.5.8. Cloranfenicol, florfenicol, fosfomicinas**

El cloranfenicol inhibe la síntesis proteica, interfiriendo con la actividad peptidiltransferasa de la subunidad 50S del ribosoma bacteriano, es un antibiótico de amplio espectro que actúa sobre bacterias grampositivas y gramnegativas, bacterias aerobias y anaerobias, y sobre muchos gérmenes intracelulares (Adams, 2004).

Es bacteriostático y a la fecha su uso en animales de abasto se encuentra prohibido (desde 1990), en muchos países, debido a la toxicidad de sus residuos, ya que un ppm (parte por millón) es suficiente para inducir anemia aplásica en individuos susceptibles. Se habla de problemas de resistencia sobre todo en bacterias gramnegativas (Sumano, 2006), especialmente en la familia Enterobacteriaceae (Adams, 2004).

Para muchos de los fármacos se tiene valores máximos permitidos, para el cloranfenicol existe la normal internacional de cero residuos admitidos (Sumano, 2006).

El florfenicol es un derivado del cloranfenicol (al igual que el tianfenicol), carece del grupo *para*-nitro que podría contribuir a la inducción de anemia aplásica en el hombre, por lo tanto sus residuos en animales tratados no conlleva riesgo alguno para la salud humana. Es tan potente o más que el cloranfenicol o tianfenicol contra muchas bacterias (Adams, 2004).

Se encuentran disponibles a nivel nacional: cloranfenicol (aunque en muy pocas presentaciones), tanto para administración por agua de bebida o alimento, e IM (principalmente en asociaciones con oxitetraciclina), algunas presentaciones limitan su uso en ponedoras; el florfenicol se administra tanto en alimento como en agua de bebida, algunos se utilizan también como promotores, y algunas presentaciones también limitan su uso en ponedoras. Se utilizan principalmente para el tratamiento y prevención de casos de salmonelosis, cólera aviar, infecciones por *E. coli* (CMVP, 2006; Calnek, 2000) y también coriza infecciosa (CMVP, 2006).

La fosfomicina es altamente eficaz contra los gérmenes gramnegativos y en menor proporción frente a los grampositivos. Tiene efecto bactericida (Zaldívar, 2006).

Se encuentran disponibles a nivel nacional: fosfomicina, tanto para su administración por agua de bebida y alimento, y algunos para su aplicación junto con la vacuna de Marek como diluyente. Se utilizan principalmente en casos de infecciones por *E. coli*, estreptococos, estafilococos; en enfermedades como cólera aviar, coriza infecciosa, salmonelosis, etc. (CMVP, 2006).

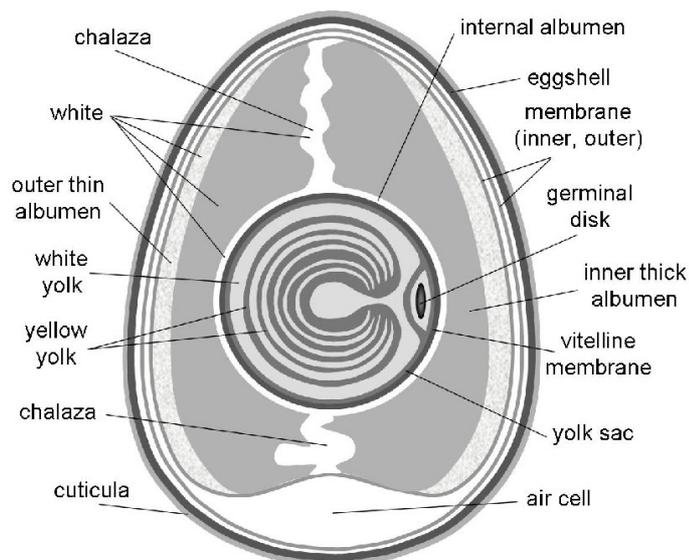
## 2.2. EL HUEVO DE GALLINA

Según el Consejo Americano de Ciencia y Salud (2002) el huevo de gallina es un excelente alimento que tiene un rol invaluable en la dieta, ya que ayuda a mantener una alimentación balanceada, variada y nutritiva (Balmonde, 2006). Ha sido considerado por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (Food and Agriculture Organization - FAO) como el recurso más nutritivo que existe en la naturaleza, además de representar una gran alternativa para los sectores más deprimidos por su costo más bajo que otros alimentos con similar aporte nutricional (D´Marino, 2005a).

Es un alimento de alto valor nutritivo, aporta cantidades elevadas de proteínas, vitaminas (especialmente vitamina B12, ácido pantoténico, biotina, vitamina D, A, B2 y niacina) y minerales (fósforo, selenio), en una cantidad relativamente baja de calorías (Ortega, 2003). Su tamaño varía entre 4.5 - 6 cm y su peso entre 50 y 70 gr en promedio (Opielinski, 2007).

### 2.2.1. Estructura

En el huevo de gallina, la clara representa el 57,3% del peso total, la yema el 30,9% y la cáscara el 11,5% (Instituto de Estudios del Huevo, 2009).



**Figura 2.** Partes y estructura del Huevo de Gallina:  
Fuente: <http://ogpta.polsl.pl/mqa/files/28/pdf/203-216.pdf>

#### **2.2.1.1. Cutícula**

Es la capa compuesta de mucina y algunas glucoproteínas inespecíficas (Opielinski, 2007) que recubre la cáscara y actúa a modo de tapón sellante de sus poros. Se comienza a perder a los 4 días desde la puesta. Cuando está seca es una excelente barrera frente a la pérdida de humedad del huevo y a la entrada de microorganismos (Vilca, 2006).

#### **2.2.1.2. Cáscara**

Es la primera barrera de defensa que posee el huevo y se compone de carbonato cálcico (94%) (Di Marino, 2005b) y fibras proteicas (complejo-mucopolisacárido) en la proporción de 50:1. Además existen pequeñas cantidades de carbonato magnésico y de fosfatos. Emite hacia el interior prolongaciones verrugosas. Posee alrededor de 7000-17000 poros por huevo que discurren desde la membrana a la superficie (Dieter & Grosch, 1985).

#### **2.2.1.3. Membranas Testáceas**

La cáscara está revestida interiormente por dos finas membranas que constituyen una envoltura, ambas telillas se separan entre sí parcialmente en el polo obtuso del huevo para constituir la cámara de aire, que mide un promedio de 5 mm, aumentando a medida que envejece el huevo (Dieter & Grosch, 1985).

#### **2.2.1.4 Clara ó Albumen**

Está formada principalmente por agua y proteínas (Di Marino, 2005b). La clara rodea a la yema y al embrión protegiéndolos, absorbiendo o atenuando los golpes del manipuleo y sirve de alimento al embrión (Bustamante, 1997).

La clara consiste de 3 partes: albúmina fluida externa, albúmina densa interna, albúmina fluida interna (Opielinski, 2007). La porción espesa de la clara se diferencia de la más fluida en que contiene unas cuatro veces más cantidad de ovomucina (Dieter & Grosch, 1985). Las chalazas están formadas

fundamentalmente por albúmina densa, y su misión es brindar sostén a la yema manteniéndola en el centro del huevo (Buxade, 1987; Opielinski, 2007). Su pH es de 7.6 a 8.5 (huevos frescos) con el paso del tiempo, el huevo envejece y se va alcalinizando pudiendo llegar a un pH de 9,7 (Di Marino, 2005b).

Entre sus principales componentes tenemos: Proteínas (Ovoalbúmina, Conalbúmina (Ovotransferrina), Ovomucoide, Lizosima (Globulina g1), Globulina g2, Globulina g3, Ovomucina, Flavoproteína, Ovoglicoproteína, Ocomacroglobulina, Ovoinhibidor, Avidina); lípidos (0.03%.); carbohidratos (1%); minerales (S, P, Na, Mg, K, Ca, Fe); vitaminas: Tiamina, Rivoflavina, Niacina, Piridoxina, Ácido Pantoténico, Biotina, Ácido Fólico (Dieter & Grosch, 1985).

#### **2.2.1.5. Yema:**

Es la porción amarilla del huevo, está formada por lípidos y proteínas y es la mayor fuente de vitaminas y minerales del huevo (Di Marino, 2005b). Sus partes son:

- Blastodisco o Disco Germinativo: es la estructura celular germinal femenina en forma de disco situado en la parte superior de la yema, se encuentra presente en todos los huevos y que va a originar el embrión si es que ha sido fecundado por el espermatozoide del gallo, transformándose en blastodermo (Bustamante, 1997).
- Latebra: es un cordón de vitelo que se inicia en el disco germinativo y se prolonga hasta el centro de la yema, su color es blancuzco (Buxadé, 1987).
- Vitelos blanco y amarillo: dispuestos en capas concéntricas de un color y otro alternativamente, en torno a la latebra, el conjunto de éstas capas supone la práctica totalidad de la yema.
- Membrana Vitelina: Es una fina membrana, que rodea a todos los componentes de la yema (Buxadé, 1987).

Entre sus principales componentes tenemos: Proteínas (32.4 %) (Lipovitelinas, Fosfovítina, Lipovitelinas, Livetina); lípidos (63.5%) (Triglicéridos 66%, Fosfolípidos 28%, Colesterol y ésteres 6%); carbohidratos (1%); minerales (S, P, Na, K, Mg, Ca, Fe); vitaminas: Vit A, Tiamina, Rivoflavina, Niacina, B6, Acido Pantoténico, Acido Fólico, Tocoferoles (Dieter & Grosch, 1985).

### 2.2.2. Formación:

Día a día, la gallina va formando y moldeando estructuras variadas cuyo producto final es el huevo, su proceso de formación, aún dentro de su complejidad, sigue los pasos de modo que en un período de 24 horas, el óvulo, que es la yema, va a prepararse y protegerse en su salida al exterior (Instituto de Estudios del Huevo, 2009).

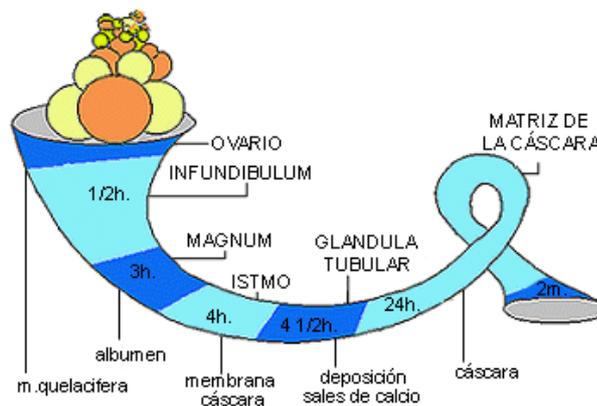


Figura 3. Formación del Huevo de Gallina

Fuente: <http://www.institutohuevo.com/scripts/formacion.asp>

Los componentes de la yema (principalmente lipoproteínas) se forman en el hígado y se transportan a través de la sangre al ovario. El ovario de las gallinas en producción activa contiene tres tipos de folículos que se podrán depositar como yemas: Folículos muy pequeños en fase de desarrollo lento; folículos que pueden estar en la fase intermedia de crecimiento (unos 60 días); folículos en fase de crecimiento rápido, (10 días aproximadamente). Como un folículo ovula aproximadamente cada 24 horas, aproximadamente 10 folículos están presentes en diferentes etapas de crecimiento rápido (Kan & Petz, 2000).

Las proteínas de la clara del huevo solubles en agua son formadas y secretadas por una parte del oviducto llamada magnum. La formación de las proteínas toma 1-2 días y la deposición de la clara alrededor de la yema toma unas 2 o 3 horas (Kan & Petz, 2000). La formación de las membranas se realiza en la próxima hora, y por último, el depósito de la cáscara (carbonato de calcio) se lleva a cabo en 18-20 horas (Bell & Freeman, 1971).

### **2.2.3. Composición:**

El huevo es rico en proteínas de alto valor biológico y de fácil digestión. La proteína del huevo es tan buena que los científicos la usan como patrón con la que pueden comparar la calidad proteica de otros alimentos (Instituto de Estudios del Huevo, 2009) además de tener un valor biológico muy alto (94 en escala de 100), ya que es rica en aminoácidos esenciales (Ortega, 2003), conteniendo los 9 aminoácidos esenciales e (imprescindibles para el organismo humano (Di Marino, 2005a).

Un huevo aporta cantidades significativas de una amplia gama de vitaminas (A, B<sub>2</sub>, B<sub>12</sub>, D, E, etc.) y minerales (Fósforo, Selenio, Hierro, Yodo y Zinc) (Instituto de Estudios del Huevo, 2009).

El contenido energético por huevo se acerca a las 75 kilocalorías (Balmonde, 2006) es decir, el aporte calórico de un huevo es relativamente bajo. El huevo tiene 7,5 g de lípidos totales, de los cuales 2 g corresponden a ácidos grasos saturados (AGS), 1,1 g son ácidos grasos poliinsaturados (AGP) y 3 g de ácidos grasos monoinsaturados. La relación AGP/AGS es 0,55, considerada más que aceptable y por tanto recomendable en términos de nutrición (Instituto de Estudios del Huevo, 2009).

El huevo es la principal fuente de fosfolípidos de la dieta y contribuye a satisfacer de forma significativa las necesidades de ácido linoleico, ácido esencial que el organismo no puede sintetizar. Posee colina, una sustancia naturalmente contenida en la yema (la clara presenta sólo trazas) (Di Marino, 2005b).

Aporta gran parte de la colina recomendada por los organismos responsables de la educación nutricional, unos 500 mg/día (Instituto de Estudios del Huevo, 2009) y que es considerado como esencial (Balmonde, 2006). También es la mejor fuente dietética de lecitina (fosfatidilcolina), compuesto de gran interés nutricional (Ortega, 2003).

Es una fuente importante de minerales, siendo destacable el elevado aporte de Yodo, Selenio y Zinc, asimismo de importantes cantidades de Potasio y Fósforo, así como de las vitaminas A, D, E, Vit B12, Complejo B, etc. (Ortega, 2003).

Recientes investigaciones ponen de relieve que los huevos son fuente de carotenoides (luteína, zeaxantina) fácilmente disponibles, y que estos componentes antioxidantes pueden ayudar al mantenimiento de una visión saludable (Balmonde 2006; Instituto de Estudios del Huevo, 2009). Apéndice N°3.

#### **2.2.4. Consumo Nacional y Mundial**

En el Perú, el consumo per cápita de huevos a aumentado de 5 kg por habitante a 6.5 kg por habitante desde el año 1990 al 2005 (Asociación Peruana de Avicultores - APA, 2008). Apéndice N°4.

La producción mundial de huevos de consumo alcanzó los 63 millones de toneladas en el 2004 (según FAO). El gran crecimiento se debe a la producción tradicional del continente asiático que representa más del 60% de la producción mundial (Curso de Actualización Producción y Tecnología Avícola, 2007).

China representa el 45% del mercado mundial, USA un 8%, Japón un 4%, y Rusia, México, India, Brasil un 3% del mercado cada uno. La UE representa el 12% del mercado mundial, siendo Francia el 8avo productor mundial con un gran desarrollo de ovoproductos (Curso de Actualización Producción y Tecnología Avícola, 2007).

## **2.3. LOS RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS**

### **2.3.1. Residuos de Productos Veterinarios**

El uso de antibióticos en los animales productores de alimentos genera residuos en productos como carne, leche y huevos (Anadon, 2007).

Se define como residuos de medicamentos veterinarios a los productos originales o sus metabolitos en cualquier porción comestible del producto animal, así como los residuos de impurezas relacionadas con el medicamento veterinario correspondiente (XOT10; Lucas, 2000). Son las sustancias farmacológicamente activas y sus metabolitos que permanecen en los productos alimenticios obtenidos de animales a los que se ha administrado el medicamento veterinario en cuestión (Residue Guideline N°31, 2004).

### **2.3.2. Factores que determinan el nivel del residuo de antibiótico en los productos de origen animal en general y en el huevo de gallina**

La presencia de estos residuos, en mayor o menor proporción, está relacionada con: la naturaleza del producto, la dosis utilizada, la forma de aplicación y el tiempo transcurrido desde su aplicación hasta la faena (en el caso de la carne y las vísceras) o hasta la recolección del producto (cuando se trata de leche y huevos) (Fernández, 2003).

Estos residuos pueden abarcar el fármaco inalterado y/o el compuesto(s) resultante del metabolismo del fármaco. Según Anadon (2007) la formación del residuo del fármaco está en función de la especie animal y su metabolismo, el fármaco, la formulación, la dosis, el modo de administración y el tiempo tras la administración del fármaco.

Demicoli (2007) menciona, que entre los factores que contribuyen a la presencia de residuos de antibióticos en los productos de origen animal, aparte del incumplimiento del período de retiro, estarían los factores relacionados a una incorrecta dosificación de las aves, ya sea dosificando más elevado de lo usual, por más tiempo del requerido, utilizando una vía de administración que no es la indicada, ó que se esté usando un antibiótico que no esté indicado para la especie requerida.

### **2.3.3. Límite máximo para residuos de medicamentos veterinarios (LMR ó LMRMV)**

El límite máximo para residuos de medicamentos veterinarios (LMRMV), es la concentración máxima de residuos resultante del uso de un medicamento veterinario (expresada en mg/kg o ug/kg del peso del producto fresco) que la Comisión del Codex Alimentarius recomienda como legalmente permisible o reconoce como aceptable dentro de un alimento o en la superficie del mismo (Lucas, 2000). Se basa en el tipo y la cantidad de residuos que se consideran sin ningún riesgo toxicológico para la salud humana (XOT 10).

Se calcula tomando la Ingesta Diaria Alimenticia (IDA), multiplicándola por un peso promedio por persona de 60 kg y dividiendo esa cifra por la ingesta media diaria del alimento considerado (Fernández, 2003).

#### **2.3.3.1. LMRs de antibióticos en huevos de gallina**

La Comisión del Codex Alimentarius, con última modificación en Julio del 2009, establece los LMRs en huevos de gallinas sólo para los siguientes antibióticos:

- Clortetraclina/Oxitetraciclina/Tetraciclina: LMR 400 ug/kg.
- Colistin: LMR 300 ug/kg.
- Eritromicina: LMR 50 ug/kg.
- Espectinomicina: LMR 2000 ug/kg.
- Neomicina: LMR 500 ug/kg.
- Tilosina: LMR 300 ug/kg (Codex, 2009).

#### **2.3.4. Nivel sin efecto adverso observado (NOEL)**

Es la dosis de un principio activo que no produce ningún efecto negativo cuando es suministrada por vía oral a la especie más sensible, es decir que no se producen cambios en la actividad fisiológica, en el peso de los órganos del cuerpo, en la velocidad de crecimiento, la estructura celular o la actividad enzimática. Para su determinación es necesario desarrollar estudios de toxicidad crónica en ratas y otros mamíferos no roedores y se expresa en mg/kg, se utiliza un factor de seguridad (FS), valor que reduce

significativamente a la NOEL. En base a esto, se define la ingesta diaria admisible (Minasen, 2009).

### **2.3.5. Ingesta Diaria Admisible (IDA)**

Es una estimación formada por el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) de la cantidad de un medicamento veterinario, expresada en función del peso corporal, que puede ingerirse diariamente a lo largo de toda la vida sin riesgo apreciable para la salud (estándar hombre = 60 kg). Se expresa en términos de mg/ kg de peso corporal por día (XOT 10).

### **2.3.6. Período de Retiro o Resguardo**

Es el período de tiempo entre la última administración de un fármaco y la recolección de tejidos comestibles o productos de un animal tratado. Asegura que el contenido de residuos en los alimentos cumpla con el límite máximo de residuos de este medicamento veterinario (XOT 10).

Sin lugar a dudas respetar este período, que es recomendado por las industrias farmacéuticas para sus productos, es una de las medidas más adecuadas, para evitar la presencia de estas drogas en productos de origen animal destinados al consumo humano; sin embargo esto no siempre se lleva a cabo (San Martín, 1996). Apéndice N°2.

### **2.3.7. Residuos en el Huevo**

Las propiedades fisicoquímicas de la droga, la fisiología del ave y el proceso de formación del huevo determinaran que tanta droga podrá ser depositada en el huevo (Residue Guideline N°31, 2004; Kan y Petz, 2000).

Martínez (1998) en un reciente estudio presta atención a los siguientes factores: (i) la unión a proteínas plasmáticas, ya que determina la disponibilidad a otros compartimentos; (ii) peso molecular; las moléculas que son demasiado voluminosas no son capaces de cruzar las membranas, (iii) la solubilidad lipídica, medida por el coeficiente de partición octanol / agua, y (iv) el valor de pKa, que determina si una molécula es ionizada a un determinado pH, ya que,

según algunas teorías sólo los compuestos no ionizados penetran las membranas biológicas.

Las drogas que tienden a ser solubles en lípidos se encuentran en concentraciones mucho más altas en yema. Las que tienden a ser solubles en agua se encuentran en mayores concentraciones en clara. Se espera que en la mayor parte de pruebas estándar para su detección, la mayoría de resultados demuestren niveles más altos de residuos en clara poco después del tratamiento (Residue Guideline N°31, 2004).

Los residuos de las drogas aparecen primero en la clara del huevo y son un reflejo de los niveles en plasma, por lo tanto, mostrarán un nivel constante en el tiempo cuando así lo hagan los niveles plasmáticos. El tiempo necesario para lograr un nivel constante en clara es una exposición de generalmente 2 a 3 días (Kan y Petz, 2000). En cambio, la yema se produce y excreta en 6-8 días. Hay pruebas que demuestran la transferencia de residuos de drogas antes de la ovulación en las yemas, y su secuestro hasta que las yemas en desarrollo ovulan (Donoghue, 2001; Donoghue *et al.*, 1996).

Los residuos en yema reflejan los niveles plasmáticos que hubo durante el período de crecimiento rápido (10 días), por lo tanto, dependiendo del calendario de exposición y duración de las drogas veterinarias usadas en relación con la yema en crecimiento, los niveles puede aumentar, ser constantes, o disminuir. Los residuos de las drogas en general, requieren de una exposición de 8-10 días para que los niveles en yema sean constantes (Kan y Petz, 2000)

Una sola exposición a un medicamento podría ser suficiente para detectar la droga, ya sea en clara o yema, dependiendo de las características de la droga y la sensibilidad del método analítico utilizado. La desaparición de las drogas en clara y yema depende en gran medida de los niveles plasmáticos del fármaco probado. Las que desaparecen rápidamente del cuerpo también desaparecen de la clara 2-3 días después del

cese de administración. En yema desaparecen después de 10 días desde el cese de la administración (Kan y Petz, 2000).

Anhalt (1977) y Hafez (1991) consideran a la yema como el principal compartimiento del huevo a ser tomado en cuenta a la hora de evaluar residuos de drogas. Esto en contraste a las observaciones de Blom (1975) citado por ambos autores quienes reportan residuos muchos más altos de algunas sulfonamidas en clara que en yema.

Las sulfonamidas muestran apreciables niveles tanto en clara como en yema. Los niveles en clara son al menos igual a los de la yema, aunque muchas veces son más elevadas. En un estudio sistemático en gallinas ponedoras con 11 diferentes sulfonamidas con diferentes valores de pKa y lipofilia, se midió la distribución de los residuos entre yema y clara y la distribución entre una fase de agua (buffer) y una fase orgánica. No se pudo encontrar una correlación evidente (Kan y Jacobs, 1998). Las tetraciclinas como grupo, muestran una imagen más divergente. La doxiciclina y minociclina a pesar de ser las más lipofílicas, muestran niveles más altos en la clara que en yema (Kan y Petz, 2000).

La flumequina, ácido oxolínico, y enrofloxacin también tuvieron muchos mayores residuos en clara de huevo que en yema. Muchas otras sustancias, como los macrólidos y nitrofuranos muestran patrones divergentes de distribución, pero en todos los casos los niveles en clara son sustanciales. Algunos compuestos, como el trimetoprim, pirimetamina, amprolio, decoquinato, dinitolmida, y la ivermectina muestran niveles muy bajos en la clara de huevo (Kan y Petz, 2000).

#### **2.4. MÉTODOS ANALÍTICOS UTILIZADOS EN LA DETECCIÓN DE RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS**

La Comisión del Codex Alimentarius clasifica los métodos analíticos en tres tipos: Tipo I; Tipo II; Tipo III:

### - **Métodos Analíticos Tipo I**

Ofrecen el mayor grado de fiabilidad en lo que respecta a la cuantificación e identificación de la estructura del analito. Estos se denominan a veces métodos confirmatorios o de referencia (San Martín y Cañón, 2000). También se denominan métodos instrumentales (Residue Guideline N 26). Ejem: Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (High Performance Liquid Chromatography - HPLC), Cromatografía Líquida ligada a Espectrometría de Masas (Liquid Chromatography and Mass Spectrometry - LC- MS), etc.

### - **Métodos Analíticos Tipo II**

Suelen determinar la concentración del analito, pero no permiten una identificación inequívoca de su estructura (San Martín y Cañón, 2000), ejem: Cromatografía Líquida ligada a Ultravioleta (Liquid Chromatography and Ultraviolet -LC-UV), Cromatografía en Capa Fina (Thin Liquid Chromatography -TLC).

### - **Métodos Analíticos Tipo III**

Son los que proporcionan una información menos definitiva pero útil. Estos procedimientos de ensayo determinan por lo general la presencia o ausencia de un compuesto o clase de compuestos. Con frecuencia se basan en técnicas no instrumentales. Por estos motivos se les denominan también métodos de selección, semicuantitativos o de "screening". En esta categoría se incluyen muchos de los métodos microbiológicos de ensayo con placas y ensayos de inhibición de enzimas (San Martín y Cañón, 2000).

Otra clasificación de los métodos de detección de residuos de antibióticos puede ser en tres fases: cribado, post-cribado y confirmación. En las dos primeras se pueden utilizar pruebas microbiológicas, mientras que la confirmación se realiza mediante técnicas de cromatografía líquida de alta resolución (Pascual, 1999; Fernández, 2007).

Entre las técnicas post cribado se pueden citar:

- Inhibición microbiana post-cribado, HPTLC (Cromatografía de capa fina), Métodos inmuno-enzimáticos: inmunológicos (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas - ELISA, Radio Inmuno Ensayo - RIA, etc.), enzimáticos (Pezym), Métodos de unión a receptores: receptores microbiológicos (Charm), receptores proteicos (Beta-star, Snap) (Fernández, 2007).

Entre las técnicas de confirmación tenemos:

- HPLC/UV (HPLC ligado a ultravioleta), HPLC/DAD (HPLC ligado a una matriz de diodos), HPLC/FLUO (HPLC ligado a fluorescencia), HPLC/MS-MS, GS (Espectrometría de Gases) GS/MS, etc. (Fernández, 2007).

#### **2.4.1. Validación de las metodologías analíticas**

La validación de los métodos analíticos se convierte en una actividad fundamental en los sistemas de calidad de los laboratorios. Este proceso de validación guarda una estrecha relación con la representatividad de los resultados, dependiendo del objetivo de los análisis y del tipo de muestra (San Martín y Cañón, 2000).

Los principales parámetros a determinar para validar un método son:

**2.4.1.1. Especificidad:** Es la capacidad de un método para distinguir entre el analito de interés y otras sustancias que pueden estar presentes en la muestra objeto de ensayo. En lo posible debe identificarse inequívocamente la estructura química (San Martín y Cañón, 2000; Residue Guideline N°26).

**2.4.1.2. Exactitud:** Se refiere al grado de coincidencia entre el valor verdadero de la concentración del analito y el resultado medio que se obtiene, aplicando un gran número de veces el procedimiento experimental a un conjunto de muestras homogéneas. Está estrechamente relacionada con el error sistemático y con la recuperación del analito expresada en porcentaje. (San Martín y Cañón, 2000).

**2.4.1.3. Precisión:** Es el grado de coincidencia entre los resultados obtenidos en ensayos independientes, a partir de un material de ensayo homogéneo. La variabilidad analítica entre los diferentes laboratorios se denomina reproductividad. La variabilidad analítica dentro de un mismo laboratorio se denomina repetitividad. Tanto la reproductividad como la repetitividad, se expresan habitualmente como desviación típica relativa o coeficiente de variación (San Martín y Cañón, 2000; Residue Guideline N°26).

**2.4.1.4. Sensibilidad:** Es la capacidad para detectar la presencia de un analito y discernir pequeñas diferencias en la concentración de éste (San Martín y Cañón, 2000).

Para determinar estas características se necesitan estudios bien diseñados y que se realicen por diferentes analistas del laboratorio (San Martín y Cañón, 2000).

#### **2.4.2. Métodos Screening o de Cribado:**

Un método screening o de cribado es el análisis de primera mano de la muestra para establecer la presencia o ausencia de residuos (Aerts *et al.*, 1995). Tiene entre sus principales ventajas el ser de bajo costo y de alto rendimiento (Heitzman, 1994; Korsrud *et al.*, 1995 y 1998; Booth y Harding, 1986; Cullors *et al.*, 1992) además de ser sencillas, rápidas, inespecíficas o multiresiduo, es decir capaces de detectar un gran número de compuestos, dado que lo que se busca al principio es un grupo de inhibidores, no un antibiótico concreto (Pascual, 1999), y otorgan una adecuada confiabilidad (Booth y Harding, 1986; Cullors *et al.*, 1992)

Está optimizado para evitar resultados falsos negativos y tener un aceptable número de resultados falsos positivos (Heitzman, 1994; Korsrud *et al.*, 1995 y 1998). Pascual (1999) menciona que deben contar con un Límite de Detección (LOD) ajustado al Límite Máximo de Residuos (LMRs) para evitar falsos resultados negativos, además conviene que ambos límites estén cercanos para evitar falsos resultados positivos que llevan a confirmar muestras que en realidad no deberían pasar la fase de cribado.

Otros antibióticos se identifican y analizan de forma individual ya que no son detectados adecuadamente por éstas técnicas (sulfamidas) o requieren unos límites de detección muy bajos por tratarse de compuestos prohibidos (cloranfenicol, nitrofuranos) (Pascual, 1999)

Si bien existen diversas metodologías de análisis cuantitativo para la detección de inhibidores bacterianos en alimentos, como método de control de rutina se prefiere la aplicación de técnicas microbiológicas de tipo cualitativo que no pretenden más que indicar la presencia o ausencia de algún inhibidor bacteriano (Nouws, 1981). Pero cabe mencionar que, es necesario realizar pruebas posteriores para la caracterización preliminar del residuo (Lott *et al.*, 1985; Aureli *et al.*, 1996; Ferrini *et al.*, 1997). El analista siempre debe recurrir posteriormente a técnicas más específicas de confirmación (Gratacos, 2007).

#### **2.4.2.1 Métodos Microbiológicos:**

La mayoría de métodos screening se basan en el cultivo de un microorganismo en agar que tiene resistencia o sensibilidad frente a un antibiótico o grupos de antibióticos determinados que se encuentran como residuos en los tejidos de origen animal o en sus productos.

Para conseguir un amplio espectro de identificación, se juega con la siembra en agares de distinta composición y pH (Fernández, 2007), hay algunos métodos basados en la inhibición del crecimiento en medios líquidos, pero sólo se han descrito unas pocas pruebas sobre la base de éstos métodos microbiológicos alternativos (Myllyniemi, 2004). Estas técnicas se han perfeccionado constantemente con el fin de asegurar una sensibilidad tal que la ausencia de inhibidores detectables asegure la inocuidad del alimento (Nouws, 1981).

Estos métodos permiten detectar la presencia de numerosos compuestos antimicrobianos pero carecen de especificidad, al no discriminar entre sustancias de una misma familia terapéutica y no son válidos para la detección de compuestos sin actividad antimicrobiana (Aerts, *et al.*, 1995).

El grupo de residuos de antibióticos determinados mediante pruebas microbiológicas se suelen denominar como inhibidores del crecimiento bacteriano (Pascual, 2000). Los métodos microbiológicos son adecuados para su uso a gran escala debido a su conveniencia y características de amplio espectro (Aerts *et al.*, 1995; Haasnoot *et al.*, 1999).

Entre los factores que pueden causar alteraciones y variación de los resultados en una prueba microbiológica se encuentran: la concentración del inóculo, el tipo y pH del medio, el nivel de espesor del medio, el tiempo de incubación y la temperatura (Demicoli, 2007; Lorian, 1996).

#### **2.4.2.1.1 Bacterias usadas en métodos microbiológicos:**

El límite de detección de una prueba microbiológica para un determinado antimicrobiano depende principalmente de la sensibilidad innata de la bacteria usada (Cooper, 1972). A través de diferentes estudios se ha llegado a seleccionar cepas de microorganismos con un comportamiento característico frente a determinadas familias de inhibidores en determinadas condiciones de incubación (Bogaerst y Wolf, 1980).

La bacteria *Bacillus subtilis* se ha utilizado ampliamente (Huber *et al.*, 1969; Bartels *et al.*, 1972; Fabiansson y Rutegård, 1979; Bogaerts y Wolf, 1980; Nouws *et al.*, 1988; Koenen-Dierick *et al.*, 1995, etc) debido a su sensibilidad a una amplia gama de antibióticos, y por su disponibilidad comercial. Entre los métodos más usados que usan esta bacteria se encuentran principalmente: STOP (Swab Test on Premises – Prueba in Situ con Torundas) (USDA, 2005), LAST (Live Animal Swab Test – Prueba con Torundas en animals vivos) (Griffin, 2006), FPT (Four Plate Test – Prueba de las Cuatro Placas) (Bogaerts y Wolf, 1980).

*Bacillus megaterium* es la bacteria usada en el método Calf Antibiotics And Sulfa Test (CAST) (USDA, 1984). Cepas de *Bacillus cereus* se han utilizado para la detección de residuos de tetraciclina (McCracken *et al.*, 1976; Bugyei *et al.*, 1994; Okerman *et al.*, 2001 y 2004).

*Bacillus stearothermophilus* también ha sido ampliamente utilizado (Bielecka *et al.*, 1981; Braham *et al.*, 2001). Es usada en los métodos PremiRTest (DSM Food Specialities, Delft, Netherlands), en el Charm Farm Test (CFT) (Charm Sciences Inc., Malden, MA, USA), y en el Brilliant Black Reduction Test Kit (BR Test) (Enterotox Laboratories, Germany; Lloyd and van der Merwe, 1987). Sin embargo su desventaja es su sensibilidad frente a la actividad inhibitoria de la lizosima (van Schothorst and Peelen-Knol, 1970), haciéndola menos conveniente para la detección de residuos en tejido renal. Presenta buena sensibilidad frente a antibióticos b- lactámicos (Pascual, 1999).

Las bacterias no esporuladoras también se utilizaron como organismos de prueba. *Micrococcus luteus* (Huber *et al.*, 1969; van Schothorst y van Leusden, 1972; McCracken *et al.*, 1976; Nouws, 1979; Bogaerts y Wolf, 1980; Okerman *et al.*, 2001) es especialmente sensible a b-lactámicos y macrólidos (Okerman *et al.*, 1998).

Asimismo cepas de *Escherichia coli* (Ellerbroek, 1991; Choi *et al.*, 1999; Okerman *et al.*, 2001) se utilizaron para detectar residuos de fluoroquinolona. Una bacteria bioluminiscente *Photobacterium phosphoreum* se ha utilizado para la detección de cloranfenicol y ácido oxolínico (Tsai y Kondo, 2001).

#### **2.4.2.1.2. Pruebas de difusión agar:**

##### **2.4.2.1.2.1. Formación de una zona de inhibición**

En la pruebas de difusión en agar, el agar se inocula en forma estandarizada, y la muestra se coloca en su superficie. Durante las primeras horas de difusión, la concentración de los antimicrobianos en el borde de la muestra es relativamente alta y disminuye drásticamente conforme se aleja de la muestra (Barry, 1976). El resultado de una prueba de inhibición es el resultado de una carrera entre la propagación de los antimicrobianos por difusión y el crecimiento de los organismos en la prueba (Myllieniemi, 2004).

Al inicio, la difusión se produce en forma radial desde la muestra. Cuando la parte inferior de la capa de agar se alcanza, la dirección se convierte en lateral.

El espesor del agar es inversamente proporcional al tamaño de la zona de inhibición (Currie *et al.*, 1998; Koenen-Dierick y De Beer, 1998).

Bajo condiciones estandarizadas, el tamaño de la zona de inhibición muestra una relación lineal con el registro de la concentración logarítmica de la droga. En alguna distancia en particular de la muestra los antimicrobianos se diluyen hasta el punto de que ya no inhiben el crecimiento microbiano, y ya está formada una zona de inhibición (Schoevers *et al.*, 1994).

La tasa de difusión a través de un gel de agar por ejemplo, depende de la concentración de drogas en la muestra, el tamaño y la forma de la molécula de los antimicrobianos, la viscosidad del gel de agar y la temperatura (Barry, 1976). El tiempo de preincubación, es el tiempo que permite a los antimicrobianos difundirse en el agar antes que la bacteria en prueba comience a crecer, sin embargo el efecto no es igualmente importante para todas las sustancias (Koenen-Dierick y De Beer, 1998).

El ancho de la zona de inhibición puede medirse con reglas o con sistemas de análisis por imagen computarizada (Schoevers *et al.*, 1994). Desde el borde exterior de la droga difundida puede existir una inhibición completa del crecimiento microbiano, rodeado por una zona parcialmente inhibida, encerrada en una zona de crecimiento microbiano estimulado (Barry, 1976).

La zona de inhibición parcial, probablemente represente una breve inhibición y un sobrecrecimiento eventual que a menudo se observan con concentraciones subinhibitorias de los agentes antimicrobianos. Una zona interna con retraso en el crecimiento se puede ver con medicamentos que son principalmente bacteriostáticos (Barry, 1976).

#### **2.4.2.1.2.2. Composición del medio de cultivo y pH**

La capacidad general de los nutrientes del medio tienen influencia sobre la bacteria usada en la prueba (Barry y Effinger, 1974); los medios

nutricionalmente deficientes producen grandes zonas de inhibición a causa de una prolongada fase de retraso en la bacteria (Barry, 1976).

El pH del medio afecta la actividad de ciertos antimicrobianos. La actividad de las tetraciclinas y aminopenicilinas se incrementan en pH ácidos, y la actividad de los macrólidos, las quinolonas y aminoglucósidos en pH alcalino (Yamada *et al.*, 1981; De Zutter *et al.*, 1985). Los mecanismos del efecto de pH sobre la actividad antimicrobiana no se entiende completamente y se presenta de manera inconsistentemente entre droga y droga (Amsterdam, 1996).

Estudios de residuos de antibióticos en leche demuestran que un pH de 8.0 es ideal para la expresión de quinolonas usando cepas de *E. coli* (Fernández, 2007; Fuselier *et al.*; Gatica, 2007). Asimismo los aminoglucósidos, mejoran su expresión a un pH de 8.0 en general usando como microorganismo sensible *Bacillus subtilis* (Bogaerts y Wolf, 1980; Gesche, 1986; San Martín, 1996, Inglis y Katz, 1977; etc), al igual que los macrólidos pero usando *Micrococcus luteus* (Fuselier *et al.*; Bogaerts y Wolf, 1980).

Un pH de 7.0 usando *Bacillus stearothermophilus* demuestra mejoras en la sensibilidad para la detección de betalactámicos (Gatica, 2007). Lohajova, (2006) usó un pH de 7.4 también con resultados fiables. Usando *Bacillus subtilis*, Gesche (1986) usó un pH de 6.0 y San Martín (1996) usó un pH de 6.2, ambos demostraron buenos resultados. Para la expresión adecuada de sulfonamidas es ideal usar la bacteria *Bacillus subtilis* con un pH de 7.2, siempre y cuando se le añada trimetropin al medio (San Martín, 1996; Bogaerts y Wolf, 1980; Gesche, 1986). Un pH de 6.0 usando *Bacillus cereus* es ideal para detectar tetraciclinas y oxitetraciclinas (Fuselier *et al.*); también un pH de 7.2 obtiene valores parejos al pH 6.0 con bacteria *Bacillus subtilis* (Gatica, 2007).

#### **2.4.2.1.2.3. Reacciones falsas positivas - zonas de inhibición no específicas**

Los métodos de inhibición microbiológica son inespecíficos por naturaleza, es decir, cualquier sustancia con actividad antimicrobiana podría inhibir el crecimiento bacteriano. La inhibición no causada por drogas antimicrobianas es inespecífica, el resultado de esta inhibición se llama una reacción falsa positiva, y se ha demostrado que se producen con frecuencia (Myllyniemi, 2004).

Productos naturales de metabolitos fúngicos, como las micotoxinas poseen características antibacterianas - las aflatoxinas, la ocratoxina A, la patulina, citrinin, ácido tenuazonico, rubratoxin, alternariol, y varios tricotenos (Berdy, 1974), y sustancias antibacterianas no identificadas de granos con moho (Williams *et al*, 1992) podrían causar inhibición en las pruebas.

El tejido de cerdo expuesto a daño mecánico por congelamiento ha sido suspendido por ser causante de zonas de inhibición inespecífica. Casi todos los riñones de animales sacrificados contienen una enzima bacteriolítica llamada lizosima (Heinert *et al*, 1976). La lizosima es activa frente a las mayoría de bacterias grampositivas, particularmente formadoras de esporas termofílicas (Beuchat y Golden, 1989).

La contaminación bacteriana puede ser una causa importante de falsos positivos (Okerman *et al.*, 1998) por la presencia de bacteriocinas, sustancias producidas por diversas especies de bacterias que en contraste con todos los demás sustancias antimicrobianas actúan principalmente contra cepas de la misma o de especies estrechamente relacionadas (Reeves, 1965).

Los cambios en el pH pueden provocar falsas reacciones positivas (Tritschler *et al.*, 1987). Un estudio realizado por Bielecka *et al.* (1981) demostró que la orina de ganado con pH 7,5 inhibe el crecimiento de *B. stearothermophilus*. La alta osmolaridad y pH en las muestras de orina muestra correlación con la inhibición del crecimiento de *B. subtilis* (Terhune y Upson, 1989), aunque Erasmuson *et al.* (1998) encontró que, aunque la alcalinidad en

las muestras de orina se asoció con falsas reacciones positivas, la inhibición fue causado por bicarbonato.

La aparición de falsas reacciones positivas también está asociada con el tipo de matriz usada en la prueba, por ejemplo se han detectado en la prueba CFT con músculo (Korsrud *et al.*, 1995), pero no con la que usa plasma como matriz (Boison *et al.*, 1995). La prueba FAST que utiliza orina como matriz parece también dar resultados falsos positivos (Tritschler *et al.*, 1987; Seymour *et al.*, 1988).

Katz y Levine (1978), en un trabajo acerca de la determinación de neomicina en huevos de gallina, menciona que la lisozima del huevo interfiere con los resultados, dando reacciones falsas positivas al inhibir el crecimiento microbiano, pero que esta actividad es destruída al darse a la muestra un tratamiento previo de calor durante el procedimiento.

#### **2.4.2.1.2.4. *Bacillus subtilis* como cepa sensible**

Este microorganismo está caracterizado porque denota gran sensibilidad frente a un amplio número de antibióticos (Levetzow, 1978; Nouws, 1981; Korkeala *et al.* 1982; Lindsay, 1983). *Bacillus subtilis*, es una bacteria inocua, según regulaciones de la Food and Drug Administration (FDA) ésta está clasificada como “Generalmente Aceptada como Segura” (GAAS - Generally Accepted As Safe), ya que este microorganismo no causa enfermedad en humanos ni en animales domésticos (Wasserman, 1984).

Los niveles de tolerancia o LMRs que han sido propuestos o fijados por algunas instancias, quedan cubiertos en su mayoría por la sensibilidad de la técnica microbiológica del *Bacillus subtilis* B.G.A, que por sus bondades se presta para la aplicación rutinaria (Nouws, 1981).

#### **2.4.2.1.2.4.1. Prueba usada en el presente estudio**

Se usó la técnica utilizada previamente por Maekawa (2008) en la tesis “Detección de Residuos de Oxitetraciclina en Huevos de Gallinas Medicadas Bajo Vía Oral y en Diferentes Dosis”. Ésta usó la técnica de difusión en agar modificada de Katz y Fassbender (1972), usada en un trabajo de Dipelou *et al* (2004).

#### **2.4.2.1.2.5. Pruebas screening de tipo microbiológico estandarizadas**

Existen diferentes pruebas screening de tipo microbiológico que se utilizan en forma estándar para la detección de residuos de antibióticos en productos de origen animal, se encuentran disponibles sobretodo para productos como leche y carnes. Apéndice N°5.

#### **2.4.3. Métodos Inmunoquímicos**

En los últimos años su uso se ha incrementado. Estos métodos se basan en reacciones muy específicas entre antígeno - anticuerpo en la fase sólida de una matriz, donde participan la conjugación de una enzima a la droga analito y la unión de anticuerpos específicos contra el analito. Entre las ventajas de los inmunoensayos enzimáticos se incluyen su sensibilidad (por lo general en ng/ml), la sencillez de la prueba, la estabilidad de los reactivos, la falta de uso de radioisótopos y de sus peligros potenciales para su automatización y el equipo relativamente barato (Dulin, 1998).

#### **2.4.4. Métodos Cuantitativos Confirmatorios**

Se incluyen las pruebas de cromatografía HPLC (High Performance Liquid Chromatography), cromatografía de gases (CG), cromatografía en capa fina (TLC) y espectrometría de masas (MS) (Aerts *et al.*, 1995; McCracken *et al.*, 2000). Tienen el inconveniente de que la muestra necesita de un tratamiento

previo lo que encarece los costos analíticos, además el rendimiento por hora de trabajo es muy bajo (San Martín y Cañón, 2000).

En los últimos años los avances técnicos de la cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas (LC/MS) han contribuido a su elección como método oficial de confirmación en el campo del análisis de residuos de algunos compuestos (Kennedy y col., 1998; Niessen, 1998; Stolker y Brinkman, 2005).

Los métodos cuantitativos confirmatorios, ofrecen el mayor grado de fiabilidad en lo que respecta a la cuantificación e identificación de la estructura del analito (San Martín y Cañón, 2000), además de ser los que poseen mayor sensibilidad, sin embargo presenta entre sus principales desventajas sus altos costos (San Martín y Moraga, 1996); y el inconveniente de no poder analizar grandes volúmenes de muestras en tiempo reducido (Pastor-Navarro *et al*, 2007), ya que necesitan un tratamiento previo de la muestra (lo que encarece los costos analíticos), y hace que el rendimiento por hora de trabajo sea muy bajo (San Martín y Cañón, 2000).

## **2.5. RIESGOS EN SALUD PÚBLICA**

El uso masivo e indiscriminado de antibióticos trae consigo algunas consecuencias negativas como es la generación de cepas bacterianas resistentes (Okolo, 1986) y la presencia de residuos en los productos destinados a consumo humano, especialmente huevos, leche y carne (Ortega, 1988).

Los residuos de antibióticos en el alimento constituyen una variedad de riesgos para la salud humana. Estos riesgos dependen de la frecuencia y grado de exposición (Anadon, 2007).

Los dos principales riesgos están relacionados con las reacciones de hipersensibilidad que puedan ser inducidas en personas alérgicas y, la

adquisición de microorganismos patógenos resistentes a ciertos antibióticos (Anadon, 2007).

### **2.5.1. Reacciones de Hipersensibilidad**

Los problemas alérgicos son conocidos y afectan a la población sensibilizada. En general las bajas concentraciones de antibióticos alergénicos (ejem. beta lactámicos) no alcanzan para sensibilizar pacientes (aunque puede haber excepciones), pero sí para desencadenar reacciones que en general no son graves aunque, eventualmente, pueden llegar a serlo (anafilaxia) (Errecalde, 2004).

Es importante mencionar el caso de los  $\beta$  lactámicos (penicilina amoxicilina-cloxacilina y cefalosporinas), estimándose que alrededor de un 10% de la población manifiesta reacciones de hipersensibilidad cuando se exponen a estos medicamentos, aún en concentraciones muy pequeñas (San Martín, 1998).

En un estudio de 15 personas, que se sabe son muy sensibles a la penicilina, se encontró que tres reaccionaron después de beber leche con un total de 2,5 microgramos de penicilina, y dos voluntarios sensibles desarrollaron erupciones después de comer carne de cerdo que contiene 0.02-0.04 ppm de penicilina. Las sulfonamidas pueden causar reacciones alérgicas hasta en un 3% de los usuarios de estas drogas. Otros antibióticos (tetraciclinas, estreptomicina, etc.) son implicados con menos frecuencia (Doyle, 2006). De todas maneras siempre hay un componente fuertemente individual en estas reacciones que está representado por el terreno inmunológico del paciente (Errecalde, 2004).

### **2.5.2. Problemas Tóxicológicos**

Los problemas toxicológicos, por su parte, son bastante difíciles de probar, dadas las bajas concentraciones residuales de estas drogas. El riesgo de toxicidad directa de los antibióticos o de sus metabolitos en los tejidos animales

es extremadamente bajo, según lo indicado por la falta de casos documentados en la literatura (Errecalde, 2004; Corry *et al.* 1983).

Los nitrofuranos de uso interno no se han aprobado o su uso se ha eliminado de la alimentación de los animales, ya que han demostrado tener potencial mutagénico y carcinogénico (la nitrofurazona como ungüento tópico está permitido) (Board and Agriculture, 1999) pero los peligros inherentes a su genotoxicidad podría ser superado por el uso adecuado y la adhesión a los protocolos conservadores de retiro (Somogyi, 1984).

Otro antibiótico que sí es capaz de dar lugar a problemas tóxicos es el cloranfenicol, y en este caso a dosis muy bajas. El cloranfenicol es capaz de producir dos tipos de manifestaciones toxicológicas: una mielo depresión dosis dependiente que se presenta en el curso de un tratamiento con la droga y una anemia aplástica, que es dosis independiente y se desarrolla en individuos susceptibles, siendo irreversible una vez instalada (Errecalde, 2004; San Martín y Moraga, 1996) razón que ha motivado a los Estados Unidos, Canadá y a los países de la UE, a prohibir o restringir su empleo en animales de abasto (Settepani, 1984), existiendo penalidades a nivel de los productores y plantas procesadoras si se encuentran trazas de esta droga en los productos finales (Keukens y col., 1992).

Los derivados fenicoles tianfenicol y florfenicol, pueden generar algún tipo de mielo depresión dosis dependiente, que cede al suprimir el tratamiento o bajar la dosis, no son capaces de producir la anemia aplástica que puede producir el cloranfenicol. Esta es la razón por la que el cloranfenicol haya sido prohibido en algunos países, pero no haya ocurrido lo mismo con los otros fenicoles (Errecalde, 2004).

### **2.5.3. Cambios en la Microflora Intestinal:**

Los datos indican que el riesgo de perturbación de la microflora por presencia de residuos de antimicrobianos en los alimentos es muy bajo (WHO, 2008). Las bacterias que viven normalmente en el intestino actúan como una

barrera para impedir que las bacterias patógenas se establezcan y causen enfermedad. Los antibióticos pueden reducir el número total de estas bacterias o matar selectivamente algunas especies importantes (Doyle, 2006).

Las lincosamidas tales como la clindamicina pueden inducir enterocolitis pseudomembranosa en el hombre originada por *Clostridium difficile* toxigénico; estudios de implantación de flora humana a ratones tratados con clindamicina han demostrado que el fármaco puede romper los efectos barrera y desarrollar esta enfermedad. Sin embargo, las concentraciones usadas fueron relativamente altas (0,3 y 3 mg/ml de agua de bebida) y excedían a las que se encuentran normalmente como residuos en los alimentos de origen animal (Anadon, 2007).

#### **2.5.4. Resistencia bacteriana por el uso de antimicrobianos en alimento**

Unos 30 antibióticos son aprobados por la FDA para la administración oral en los alimentos animales (Board on Agriculture, 1999).

En gran medida, se utilizan las mismas clases de antibióticos en animales y en seres humanos y en algunos casos se añaden a los piensos y al agua para promover el crecimiento. Se considera que esta exposición prolongada a dosis bajas o subterapéuticas de antibióticos tiene más probabilidades de dar origen a la aparición de resistencias que las dosis para tratamiento o prevención de infecciones en animales productores de alimentos. Los datos indican que hay un riesgo importante para la salud humana relacionada con la aparición de resistencias a antibióticos en bacterias (WHO, 2008).

El riesgo más grande para la salud de los consumidores que implica la utilización de antibióticos en animales está dado por el desarrollo de resistencias en bacterias de los mismos animales. Estas resistencias pueden, por supuesto, dar lugar a fallos terapéuticos en tratamientos veterinarios, y al riesgo de transferencia de bacterias resistentes de los animales al hombre, o

de genes portadores de información que codifica resistencia de bacterias de animales a bacterias humanas (Errecalde, 2004).

Como consecuencia tenemos que las infecciones por bacterias patógenas resistentes exigirán un tratamiento más difícil y caro; por consiguiente, la resistencia a los antibióticos es un problema de salud pública y de sanidad animal, así como una carga económica (WHO, 2008).

No cabe duda de que el paso de bacterias resistentes a los antibióticos de los animales a los seres humanos se produce y puede ser el resultado de un contacto directo con animales o sus excrementos, como puede ocurrir con los trabajadores en la granja (Holmberg *et al.*, 1984; Bates *et al.*, 1994; Haapapuro *et al.*, 1997), la exposición indirecta a través de alimentos contaminados con bacterias de origen animal (Witte y Klare, 1995), o de persona a persona después de una exposición primaria de las personas no agrícolas (Lyons *et al.* 1980).

#### **2.5.4.1. Resistencia a *Salmonella*, *Campylobacter* y otros**

De los 10 agentes patógenos más importantes relacionados con resistencias, la Food Safety and Inspection Service (FSIS) ha identificado a *Campylobacter*, *Salmonella* y *Shigella* como los 3 más frecuentes patógenos que causan enfermedades diarreicas notificables en los seres humanos (Board on Agriculture, 1999).

Entre los ejemplos más relacionados con avicultura, *Salmonella* y *Campylobacter* son dos de las bacterias responsables más frecuentes de enfermedades transmitidas por los alimentos, y se ha constatado una creciente resistencia a los antibióticos en ambas bacterias. La mayoría de las salmonelas no tifoideas, en particular en los países desarrollados, se propagan con los alimentos, y la fuente inicial son sus animales productores. Se han registrado brotes por salmonelas no tifoideas multirresistentes tanto en Europa como en los Estados Unidos de América. En algunos casos no se ha dispuesto de un tratamiento antibiótico eficaz (WHO, 2008; WHO, 1997).

También se conoce resistencia transferible de bajo nivel a las fluoroquinolonas en bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*; *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina en animales y apariciones en todo el mundo de aislamientos en humanos y animales de *E. coli* y *Salmonella* spp. con beta-lactamasas de espectro extendido (WHO, 2008).

Cepas de *E. coli* multirresistentes han sido seleccionadas por el uso de un amplio espectro de antibióticos en los animales de producción y seres humanos. El desarrollo de la resistencia antibiótica en *E. coli* crea problemas debido a su propensión para difundir sus genes de resistencia. Han sido localizados genes de resistencia de cepas de *E. coli* en los animales a *E. coli* en los seres humanos (WHO, 1997).

## **2.6. CONTROL INTERNACIONAL Y NACIONAL**

### **2.6.1. Comisión del Codex Alimentarios y el Codex Alimentarius (FAO/OMS)**

La Comisión del Codex Alimentarius fue creada en 1963 por la FAO (Organización de las Naciones Unidas para Agricultura y la Alimentación) y la OMS (Organización Mundial de la Salud). En términos sencillos, el Codex Alimentarius es un conjunto de normas, códigos de prácticas, directrices, y otras recomendaciones. (FAO OMS, 2006). Para el uso de medicamentos se han establecido por recomendaciones del Codex las **buenas prácticas en el uso de medicamentos veterinarios** (BPMV), que corresponden a los modos de empleo oficialmente recomendado o autorizado, incluidos los períodos de suspensión del tratamiento aprobado por autoridades nacionales y de los medicamentos veterinarios administrados en condiciones prácticas (Lucas, 2000).

### **2.6.2. JEFCA**

El Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) es un comité científico de expertos internacionales que administran

conjuntamente la FAO y la OMS. Fue establecido para examinar aspectos químicos, toxicológicos y de otro tipo de los contaminantes y residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos destinados al consumo humano

El JECFA ha evaluado más de 1.500 aditivos alimentarios, alrededor de 40 contaminantes y sustancias tóxicas presentes en la naturaleza y los residuos de unos 90 medicamentos veterinarios (FAO OMS, 2009).

### **2.6.3. Unión Europea (EU) y Área Europea Económica (EEA)**

El proceso de armonización de los controles legales sobre los medicamentos veterinarios y humanos entre los estados miembros de la Unión Europea viene desde hace más de 20 años. La Agencia Europea de Evaluación de Medicinas (EMA) que se creó en 1993 (Reglamento 2309/93) es responsable tanto de los medicamentos para medicina humana y veterinaria, y el Comité de Medicamentos Veterinarios (CMV) previamente establecido, ahora es un comité dentro de su estructura (Subasinghe y Alderman).

### **2.6.4. FDA Y FSIS**

En los EE.UU, todas las aprobaciones de drogas, tanto para humanos como veterinarios es responsabilidad de la USFDA (EE.UU Food And Drug Administration). La USFDA Center for Veterinary Medicine (CVM) es responsable de las autorizaciones de medicamentos veterinarios. Las aprobaciones de productos biológicos (es decir, vacunas) son responsabilidad de la US Department of Agriculture (USDA), así como la mayoría de los programas de control para residuos de medicamentos veterinarios tanto en carnes rojas y de aves, se realiza a través de la Food Safety and Inspection Service (FSIS) (Subasinghe y Alderman).

### **2.6.5. Control Nacional: SENASA (Servicio Nacional de Sanidad Agraria)**

El Servicio Nacional de Sanidad Agraria - SENASA, organismo público descentralizado del Ministerio de Agricultura de Perú, con autonomía técnica,

administrativa, económica y financiera, es la autoridad nacional y el organismo oficial del Perú en materia de sanidad agraria (SENASA, 2009a).

SENASA se encarga de la evaluación de los productos de origen animal de forma primaria, o con procesamiento primario (cortes). El Ministerio de Salud (MINSA) con su área de Dirección General de Salud (DIGESA) se encarga de la evaluación en general de los alimentos de diverso origen dentro de ellos el de origen animal con procesamiento posterior, y el Ministerio de la Producción (ITP) se encarga de todo lo relacionado a productos hidrobiológicos (SENASA, 2009b; M. Flórez, Lima, comunicación personal).

El área encargada del control de residuos de medicamentos en general en los productos de origen animal es la Sub dirección de Inocuidad Agroalimentaria, que se encuentra dentro de la Dirección de Insumos Agropecuarios e Inocuidad Agroalimentaria, perteneciente a la Dirección de Sanidad Animal. Esta área lleva 3 años desde sus inicios, y está en constante proceso de implementación con respecto a todo lo relacionado al tema de la presencia de residuos de medicamentos en los productos destinados a consumo humano (SENASA, 2009b; M. Flórez, Lima, comunicación personal).

Actualmente SENASA menciona que no hay ningún control, monitoreo o seguimiento a nivel nacional con respecto a residuos de antibióticos en productos de origen animal, como carne, leche, huevos, etc. Sin embargo se viene determinando el nivel de residuos de medicamentos veterinarios y otros contaminantes en carne, grasa e hígado de aves (pollos, pavos y avestruces), provenientes de establecimientos autorizados por el SENASA y que deseen exportar a la Unión Europea y Japón. Además menciona que tiene contemplado brindar programas de capacitación y cursos sobre inocuidad de los alimentos para productores y personas interesadas en diversas regiones del país (SENASA, 2009b; M. Flórez, Lima, comunicación personal).

Las granjas que desean exportar a la Unión Europea (UE), deben cumplir los requisitos expuestos por ellos en su Directiva 96/23/CE del Consejo, y para ello deben realizar los análisis en laboratorios del extranjero que cuenten con la certificación ISO 17025, certificación requerida por la UE. Además SENASA se encarga a través de su Manual de Directrices, de asesorar a las granjas que

necesitan analizar sus productos, dándoles las respectivas pautas y procedimientos para poder ser llevadas y examinadas en el extranjero (Sub Dirección de Inocuidad Agroalimentaria-SENASA, 2009; SENASA, 2009b; M. Flórez, Lima, comunicación personal).

Con respecto a las legislaciones a nivel nacional se cuenta con la Ley de Inocuidad de Alimentos, aprobado mediante Decreto Legislativo N° 1062, de fecha 28 de junio del 2008, y con Decreto Supremo N° 034-2008-AG, de fecha 27 de diciembre de 2008. Asimismo con respecto al sector avícola se cuenta con el Reglamento del Sistema Sanitario Avícola, aprobado con Decreto Supremo N° 029-2007-AG (El Peruano, 2007; El Peruano, 2008; SENASA, 2009b).

Asimismo contamos con las Normas Técnicas Peruanas NTP 011.217:1983, NTP 011.218:1983, NTP 011.219:1983, NTP 011.220:1983, NTP 011.221:1983, NTP 011.222:1983, NTP 011.223:1983, NTP 206.019:1984 concernientes al huevo de gallina para consumo humano en temas de definición, clasificación, requisitos, almacenamiento, embalaje, rotulado, conservación, transporte, preparación de la muestra para los análisis microbiológicos, etc. (Indecopi, 2009).

## **II. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.1. Área de Estudios e Instalaciones:**

Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria – Sección de Bacteriología y Micología. Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad Nacional Mayor de San Marcos (FMV- UNMSM).

### **3.2. Materiales y Equipos:**

#### **3.2.1. Materiales**

- Placas petri.
- Tubos de ensayo.
- Tapones de jebe para tubos de ensayo.
- Tubos vacutainers.
- Gradillas.
- Pipetas de 10 ml.
- Probetas.
- Pipeteador.
- Pinzas.
- Anza de siembra.

- Hisopos de madera estériles.
- Frascos de vidrio.
- Envases y botellas de vidrio con tapa de 400 ml estériles.
- Agua desionizada.
- Tiras indicadoras de pH.
- Bolsas Zip Loc.
- Regla medidora de halo de inhibición.
- Lápiz o plumón marcador indeleble.
- Mascarillas.
- Guantes.

### **3.2.2. Medios de Cultivos, Reactivos, Cepas Bacterianas**

- Medio Agar Muller Hilton.
- Medio Agar sangre.
- Caldo Tripticasa de soya.
- Cepa de *Bacillus subtilis* (ATCC 6633).
- Discos control de neomicina (30 ug).
- Solución al 0.75% de Tween 20 (Monolaurato de Sorbitan Polioxetilénico -Polyoxyethene sorbitan monolaurete).
- Fosfato de potasio monobásico.
- Solución estándar Mc Farland 0.5.

### **3.2.3. Equipos**

- Balanza.
- Estufa de incubación  $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ .
- Mechero.

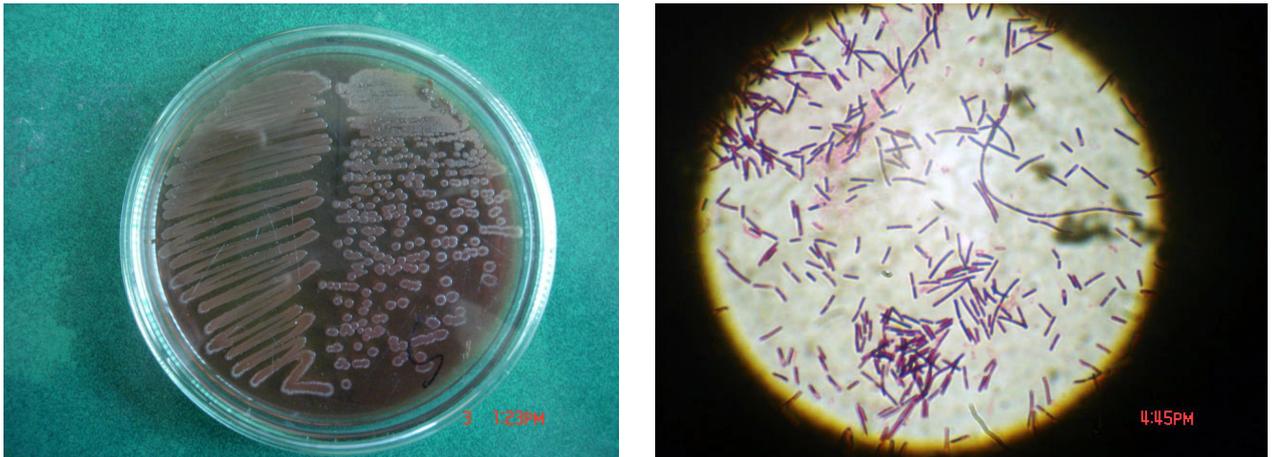
- Equipo de baño maría.
- Centrifuga.
- Autoclave.
- Refrigeradora.
- Congelador a temperatura - 20°C ± 1 °C.
- Potenciómetros – pH metro.
- Agitador Tipo Vortex.



**Figura 4.** Materiales y reactivos para la elaboración del buffer fosfato a pH 4,5 más Tween 20 (Polyoxyethene sorbitan monolaurete)



**Figura 5.** Cepa de *Bacillus subtilis* ATCC 6633



**Figura 6.** Crecimiento de colonias de *Bacillus subtilis* ATCC 6633, en medio agar sangre (izquierda) y vista al microscopio de la colonia con tinción gran (derecha).

### 3.3. Diseño experimental

Para la obtención del tamaño muestral se utilizó la Fórmula de Prevalencia Límite con un intervalo de confianza del 99% ( $P=0.01$ ). Se muestrearon 7 diferentes punto de comercialización en Lima Metropolitana: 2 supermercados, de cualquier zona, y 5 mercados minoristas, localizados en las zonas norte, sur, este, oeste y centro. Se tomaron 15 huevos por punto, cada 2 semanas a más en promedio para verificar que no provengan del mismo lote y se realizaron en tres ocasiones diferentes, dando un total de 315 huevos muestreados.

$$n = \frac{\ln \alpha}{\ln(1-p)} \quad n = \frac{\ln(0.05)}{\ln(1-0.01)} = 298 \text{ unidades (mínimo)}$$

$\alpha$  = nivel de significancia (0.05)

P = Prevalencia limite para el estudio (0.01)



**Figura 7.** Uno de los mercados que se muestreo en el estudio.

### **3.4. Método**

Se usó la técnica microbiológica de difusión en agar modificada previamente por Maekawa (2008), a su vez ésta es una modificación del método descrito por Katz y Fassbender (1972), usado en un trabajo de Dipelou *et al* (2004).

### **3.5. Procedimiento**

#### **3.5.1. Preparación del Buffer Fosfato pH 4.5 + Tween 20 al 0.75%**

- Se disolvió 13.61gr de Fosfato de Potasio Monobásico en 750 ml de agua desionizada.
- Se midió el pH con el Potenciómetro o con tiras medidoras de pH, debía oscilar entre  $4.5 \pm 0.1$ .
- Si era necesario se corregía el pH con hidróxido de potasio o ácido acético.
- La solución buffer fosfato se completaba con 250 ml de agua desionizada.
- De la solución anterior se extraía 7.5 ml y se agregaba 7.5 ml de Tween 20.

- Se mezcló y autoclavó a 121°C por 15 minutos.

### **3.5.2. Procesamiento de muestras (huevos)**

- Se limpió la superficie de cada huevo con alcohol, se rompió y vertió el contenido en un frasco de vidrio estéril, se pesó, homogenizó y añadió la solución buffer pH 4.5 + Tween 20 al 0.75%, correspondiente al doble del peso del huevo.
- Se homogenizó la mezcla en una agitador a alta velocidad por 30 - 60 segundos y se puso en baño maría a 85°C durante 5 minutos, luego se centrifugó la muestra a 4000 rpm por 10 minutos.
- El sobrenadante obtenido se almacenó en tubos de vidrio previamente esterilizados o también vacutainers, se guardaron en la congeladora (-20°C) hasta su posterior procesamiento.

### **3.5.3. Preparación de las placas de agar Muller Hilton (MH) sembradas con *Bacillus subtilis* (ATCC 6633)**

#### **3.5.3.1. Preparación de agar MH:**

- Se preparó a partir de la base deshidratada la cantidad requerida de agar MH (según las especificaciones del fabricante en el frasco).
- Se autoclavó a 121°C por 15 minutos.
- Se dejó enfriar hasta que alcance los 50°C en promedio y se verificó el pH (debía estar entre 7.2 y 7.4), con un potenciómetro a temperatura ambiente.
- En cada placa petri de vidrio se colocó 25 ml, para dar un promedio de 4 mm de espesor (INS, 2002).
- Para realizar las pruebas de esterilidad se colocó las placas en la estufa de incubación ( $\pm 37^\circ$ ) durante 24 horas a más y se descartó aquellas que presentaron contaminación.

### 3.5.3.2. Preparación del inóculo *Bacillus subtilis* (ATCC 6633)

- Se tomó con el asa de siembra colonias aisladas de *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), del mismo tipo morfológico sembradas previamente en agar sangre.
- Se colocaron en tubos con 4 a 5 ml de caldo Tripticasa de Soya (TSA), se incubó a 35°C – 37°C en la estufa hasta alcanzar o exceder una turbidez de 0.5 en la escala de Mc Farland.
- Si era necesario se ajustaba la turbidez del inóculo con solución salina o caldo TSA y siempre se realizaba una comparación visual con el estándar 0.5 de la escala de Mc Farland. Para ello se usó una luz apropiada y se visualizó los tubos contra un fondo blanco con líneas negras como contraste.



**Figura 8.** Hisopos en los tubos con caldo con la cepa de *Bacillus subtilis* ATCC6633 al 0.5 en la escala de Mc Farland.

### 3.5.3.3. Sembrado de placas

- Previamente dentro de los 15 minutos siguientes al ajuste de turbidez se sumergieron hisopos estériles en los tubos con inóculos de *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) durante 30-45 minutos, para una correcta saturación.

- Se realizó la siembra de la cepa en las placas de MH con la cepa, estriando con el hisopo embebido, en 3 direcciones diferentes cubriendo toda la superficie del agar. Se dejó reposar por 3 a 5 minutos para que cualquier exceso de humedad superficial fuera absorbido (INS, 2002).

#### **3.5.3.4. Inoculación de la muestra (hisopos)**

- Se colocó un disco de neomicina (30ug) como disco control en el centro, con una pinza estéril.
- Se colocaron 2 hisopos en cada tubo que contenía el sobrenadante de la muestra, se dejó por 30-45 minutos, para su correcta saturación, dichas muestras fueron previamente sacadas de congelación hasta que alcancen la temperatura ambiente, para poder ser utilizadas.
- Luego se sacó con una pinza estéril los hisopos, se cortó y colocó en las placas sembradas con *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), se presionó levemente para que se adhiriera al agar e incubó a 37°C por 18 - 24 horas.



**Figura 9.** Tubo con el sobrenadante de la muestra y dos hisopos.

#### **3.5.4. Lectura de resultados**

- La lectura de resultados se realizó a las 18 – 24 horas de incubación.

- La presencia de residuos de sustancias inhibidoras del crecimiento microbiano en las muestras de huevo se observaron como zonas claras de inhibición del crecimiento de la bacteria alrededor del hisopo.
- Solo son válidos las lecturas de resultados de las placas cuyo disco control de neomicina presenten un halo de inhibición mayor a 17 mm de diámetro (N.C.C.L.S).
- Se midieron los diámetros de la zona de inhibición con una regla medidora de antibiograma, tomando la medida en cuatro puntos diferentes y obteniendo un promedio, se consideraron como muestras positivas aquellas que presentaron un halo de inhibición promedio igual o mayor a 2 mm.
- Para una correcta visualización y medida se utilizó un fondo negro y una correcta iluminación.



**Figura 9.** Medición del halo de inhibición del disco de neomicina 30 ug con la regla medidora de antibiograma

### 3.5.5. Análisis de datos:

La presencia de al menos un huevo positivo indica que la prevalencia de residuos de sustancias inhibidoras del crecimiento microbiano en huevos de gallina destinados a consumo humano en Lima Metropolitana es de al menos el 1% (prevalencia límite para el estudio). Se procedió a determinar la frecuencia para cada tipo de comercialización de las muestras positivas.

## IV. RESULTADOS

En el presente estudio se encontraron 148 muestras positivas (46.98%) a la presencia de residuos de sustancias inhibidoras del crecimiento microbiano en huevos de gallina destinados al consumo humano a nivel de Lima Metropolitana y 167 muestras negativas (53.02%), de las 315 muestras procesadas.

De acuerdo a los resultados por grupo tenemos:

**Cuadro 1. Resultados positivos a residuos de sustancias inhibidoras del crecimiento microbiano en huevos de gallinas destinados a consumo humano en Lima Metropolitana**

	Tamaño del halo de inhibición (promedio)			Total (+)	%
	>=2 mm	>=3 mm	>=4 mm		
<b>Supermercados</b>					
San Luis	20	2	0	<b>22</b>	<b>6.98</b>
La Molina	13	0	0	<b>13</b>	
<b>4.13</b>					
<b>Mercados</b>					
Ate	29	1	0	<b>30</b>	<b>9.52</b>
Lince	18	3	0	<b>21</b>	<b>6.66</b>
Villa el Salvador	15	2	0	<b>17</b>	<b>5.40</b>
Independencia	19	7	2	<b>28</b>	<b>8.89</b>
San Miguel	14	2	1	<b>17</b>	<b>5.40</b>
<b>Total (+):</b>	<b>148</b>	<b>46.98 %</b>			

No se encontraron resultados opuestos entre los dos hisopos por muestra en las placas, los halos de inhibición del disco control de neomicina estuvieron siempre entre 20 y 24 mm de diámetro con un promedio de  $22 \pm 0.5$  mm,

Los controles negativos, usando sustancias sin presenciade inhibidores como hisopos embebidos con suero fisiológico o con la solución Buffer fosfato pH 4,5 + Tween 20 al 0.75%, no mostraron ningún halo de inhibición.

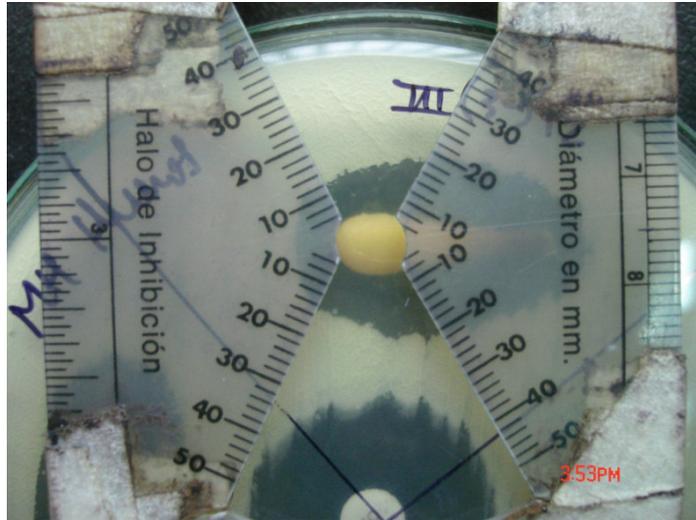
Entre los distritos que presentan mayor frecuencia de residuos de sustancias inhibidoras se encuentran: Ate (30), Independencia (28), San Luis (22) y Lince (21). Los distritos que presentan menor frecuencia son: La Molina (13), Villa el Salvador (17) y San Miguel (17).

Entre los distritos que presentan mayor tamaño de halo de inhibición se encuentran: Independencia (2 halos: de 7 mm y 10 mm respectivamente) y San Miguel (1 halo: 4 mm).

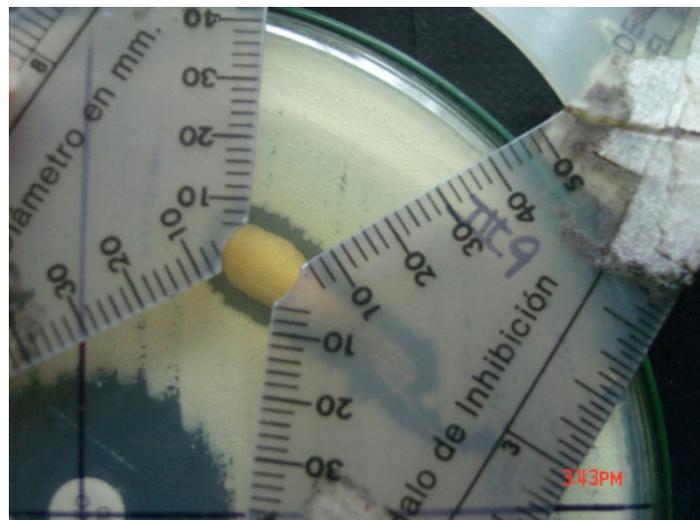
Dentro de los resultados positivos, los que presentan halos de inhibición iguales o mayores a 2 mm ocupan un 86.49%, los iguales o mayores a 3 mm un 11.48%, y los iguales o mayores a 4 mm un 2.03%.



**Figura 10.** Medición con la regla medidora de antibiograma de una muestra positiva igual o mayor a 2mm en promedio.



**Figura 11.** Medición de una muestra positiva con un halo de inhibición de 10 mm en promedio.



**Figura 12.** Medición de una muestra positiva con halo de inhibición de 3 mm en promedio.



**Figura 13.** Medición de muestra con 4 mm de halo de inhibición en promedio.



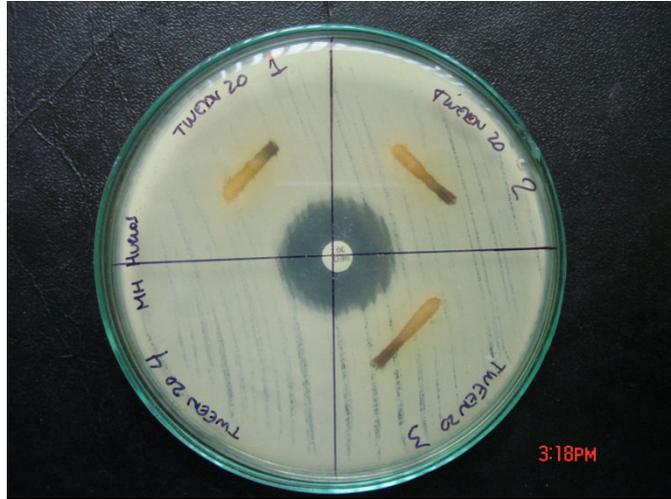
**Figura 14.** Muestra control negativo con suero fisiológico



**Figura 15.** Muestra control negativo con Solución Buffer Fosfato + Tween 20.



**Figura 16.** Medición de una muestra negativa que no supera los 2mm de halo de inhibición.



**Figura 17.** Muestra negativa sin presencia de halo de inhibición



**Figura 18.** Muestras negativas cuyo halo de inhibición es menor a 2 mm en promedio.

## V. DISCUSIÓN

A nivel nacional y en Lima Metropolitana no se encuentran estudios previos acerca de la detección de residuos de sustancias inhibidoras del crecimiento microbiano de ningún tipo, en huevos de gallina destinados al consumo humano a nivel de puestos de venta.

Los resultados encontrados en el presente estudio demuestran que el 46.98% de los huevos muestreados presentan residuos de sustancias inhibidoras del crecimiento microbiano en huevos de gallinas destinados al consumo humano a nivel de Lima Metropolitana.

Pascual (2000), define al grupo de residuos de antibióticos determinados mediante pruebas microbiológicas como “inhibidores del crecimiento bacteriano”, las zonas de inhibición formadas en este tipo de pruebas también pueden ser producidas por otros tipos de sustancias como micotoxinas en los granos con moho, presencia de lisozima en los tejidos animales que sufren daño mecánico, contaminación bacteriana de la muestra con producción de bacteriocinas, orina con mayor alcalinidad, uso de una matriz diferente a la correspondiente para la prueba, matriz, etc. (Berdy, 1974; Williams *et al.*, 1992; Heinert *et al.*, 1976; Okerman *et al.*, 1998; Korsrud *et al.*, 1995; Tritschler *et al.*, 1987; Seymour *et al.*, 1988, etc.) pero la mayoría de estos casos no son aplicables al huevo.

El huevo por sus características de conformación y estructura (al estar protegido por una cáscara) hace posible que sean pocos los factores que contribuyan a formar zonas de inhibición diferentes a los residuos de antibióticos. Entre éstos tenemos la presencia de la lisozima, una de las proteínas de la clara, que es capaz de inhibir el crecimiento microbiano (Katz y Levine, 1978) y la contaminación bacteriana de la muestra (Okerman *et al.*, 1998).

Katz y Levine (1978) mencionan que la actividad de la lisozima es destruída con un tratamiento previo de calor, con el fin de evitar falsos resultados positivos, por ello en el presente estudio uno de los pasos en la preparación de la muestra consiste en calentarla en baño maría a 85°C por 5 minutos. Asimismo la contaminación bacteriana de la muestra se trato de reducir en lo posible al congelar las muestras hasta su procesamiento, y al tratar de siempre mantener condiciones asépticas en todo el procedimiento realizado en el laboratorio.

En los resultados positivos encontrados en el presente estudio se evidencia la presencia del residuo de algún inhibidor, por lo mencionado anteriormente lo más probable es que se trate de residuos de antibióticos. Al ser ésta una prueba de tipo cualitativa, no podemos determinar qué tipo de antibiótico estamos encontrando con exactitud ya que no hay un seguimiento anterior sobre el tipo de antibiótico que se administró a las gallinas ponedoras cuyos huevos se tomaron como muestras, ni tampoco en que concentraciones se encuentran, sólo podemos determinar su presencia o ausencia (Aerts *et al.*, 1995; Nouws, 1981).

Con respecto a los probables grupos de antibióticos, que pueden estar actuando como inhibidores en los resultados positivos, un estudio hecho por Gatica (2007) comprobó que usando cepas de *Bacillus subtilis* a un pH de 7.2 se logra facilitar la difusión de los antibióticos pertenecientes al grupo de las tetraciclinas, antibióticos comúnmente usados en avicultura. De acuerdo a esto podríamos afirmar que la sensibilidad de la prueba en el presente estudio se

orienta a detectar con mayor facilidad residuos de éste grupo en comparación a otros antibióticos y que una gran parte de los resultados positivos, quizás sean debido a la presencia de residuos de tetraciclinas (oxitetraciclina, clortetraciclinas, tetraciclinas, doxiciclinas, etc).

Esto no indica, que los halos de inhibición encontrados, no hayan sido producidos probablemente por otros grupos de antibióticos diferentes a las tetraciclinas, ya que tanto antibióticos pertenecientes al grupo de las quinolonas, penicilinas y b-lactámicos, macrólidos, lincosamidas, que son antibióticos bastante usados en avicultura en ponedoras, así como otros de menor uso como aminoglucósidos, bacitracinas etc. podrían estar dentro de los causantes de los halos de inhibición, debido a que la bacteria *Bacillus subtilis*, es una bacteria sensible a una gran cantidad de antibióticos (Levetzow, 1978; Nouws, 1981; Korkeala *et al.* 1982; Lindsay, 1983), sólo que su difusión se vería un poco disminuída en comparación con las tetraciclinas debido al factor pH del medio.

La probabilidad de detectar sulfonamidas en el presente estudio es limitada, ya que no se adicionó trimetropin al medio, condición que es necesaria para aumentar la sensibilidad de la prueba hacia este tipo de antibiótico (San Martín y Moraga, 1996; Bogaerts y Wolf, 1980; Gesche, 1986). Antibióticos como el cloranfenicol y nitrofuranos, se detectan necesariamente por medio de pruebas de cuantitativas o de confirmación como HPLC, LC-MS, etc., también se usa métodos inmunoquímicos como el ELISA (Pérez de Ciriza *et al.*, 1999), por ser particularmente tóxicas en cantidades muy pequeñas (Errecalde, 2004; Sumano, 2006).

Los controles negativos sin ninguna presencia de sustancias inhibidoras como los hisopos embebidos con suero fisiológico o con la solución buffer fosfato, no produjeron halos de inhibición en la prueba microbiológica. Estudios anteriores a nivel local hechos también con cepas de bacteria *Bacillus subtilis* ATCC 6633, y con un procedimiento muy similar al usado demostraron que en

los grupos control y en las etapas de pre-dosificación, no se produjeron halos de inhibición (Maekawa, 2008; Chávez, 2008).

Entre los principales factores causantes de la presencia de residuos de antibióticos, se encuentra la falta de respeto al período de retiro de los antibióticos usados (San Martín, 1998; Fernández, 2003; Demicoli, 2007). Los resultados positivos podrían indicar que los huevos se estarían recogiendo antes de cumplirse este plazo, e incluso durante la etapa de dosificación de los animales. Un cumplimiento inadecuado del periodo de retiro depende también a su vez de diversos factores, como el manejo, donde adquieren gran responsabilidad tanto productores como personal técnico que labora directamente con las aves y en especial los médicos veterinarios a cargo del galpón o granja.

Entre los otros factores que podrían estar relacionados a la presencia de residuos de antibióticos en el huevo, se encuentran la misma especie animal, su metabolismo (Anadon, 2007), las propiedades fisicoquímicas de la droga, la fisiología del ave y el proceso de formación del huevo (Kan y Petz, 2000; Residue Guideline N°31, 2004), y sobretodo factores relacionados a la dosis, forma de aplicación y naturaleza del producto (Fernández, 2003), es decir una incorrecta dosificación de las aves, ya sea dosificando más elevado de lo usual, por más tiempo del requerido, utilizando una vía de administración que no es la indicada, ó usando un antibiótico que no esté indicado para la especie requerida, etc. van a relacionarse también con la presencia de residuos de antibióticos en el huevo (Demicoli, 2007).

La diferencia entre los resultados positivos encontrados en los distritos obedecería a que los huevos pueden provenir de distintos galpones ó granjas proveedoras, es decir estaría regido más que todo por factores de mercadeo y distribución en la compra y venta de huevos de gallina para consumo humano en Lima Metropolitana.

El impacto en salud pública que tienen los resultados encontrados estarían en discusión, porque no sabemos qué tipo de antibiótico estamos encontrando,

ni en que concentraciones se encuentran, por lo tanto no podemos determinar si exceden o no los LMRs permisibles, y no podemos decir si es inocuo o no, lo único que podemos demostrar es su presencia como residuos de sustancias inhibidoras del crecimiento microbiano. Y a su vez ésta presencia evidencia el uso de antibióticos en la avicultura en ponedoras.

El uso masivo e indiscriminado de antibióticos trae consigo algunas consecuencias negativas como es la generación de cepas bacterianas resistentes transmisibles al hombre (WHO, 2008; Okolo, 1986) y la presencia de residuos en los productos destinados a consumo humano, especialmente huevos, leche y carne (Ortega, 1988).

El principal riesgo en salud pública debido a la presencia de residuos de antibióticos en huevos de gallina destinados al consumo humano, está representado principalmente por las reacciones alérgicas (Errecalde, 2004; Doyle, 2006). La presencia de reacciones de toxicidad son bajas en sí (Corry *et al.* 1983) y se presentan más con antibióticos como el cloranfenicol, que puede causar anemia aplásica con pequeñas dosis (Errecalde, 2004, San Martín y Moraga, 1996) y los nitrofuranos, que tiene potencial mutagénico y carcinogénico (Board and Agriculture, 1999).

La producción de alteraciones a nivel de la microflora intestinal también es baja (WHO, 2008), y se podría producir con determinados antibióticos, como las lincosamidas, y en concentraciones determinadas (Anadon, 2007). De todas maneras todos estos efectos sumados, representan un riesgo en general para la salud del consumidor.

A nivel nacional hay una amplia gama de antibióticos provenientes de diferentes laboratorios, puestas a las manos del productor y del médico veterinario para tratar, prevenir o promover el crecimiento de las aves en la industria avícola, tanto para la producción de carne de ave, como para la producción de huevos. Se pueden encontrar en diferentes tipos de presentación y formulación, asimismo algunas presentaciones presentan diversas restricciones en su uso, por ejemplo, advierten no aplicar en aves de

postura que se encuentren en producción de huevos para consumo humano (CMVP, 2006),

SENASA menciona que hasta el momento no lleva a cabo ni realiza ningún tipo de control ni monitoreo a nivel nacional con respecto a la presencia de residuos de antibióticos en la producción avícola en general, ni en ningún producto de origen animal destinado al consumo humano (leche, carne, mieles, etc.). Esto sólo se produce en el caso de que ciertas granjas o empresas en general deseen exportar sus productos al extranjero, como es el caso de la carne de ave que se exporta a la Unión Europea, pero que para ello tiene que cumplir con los requisitos expuestos por ellos en su Directiva 96/23/CE del Consejo; además de realizar los respectivos análisis de sus muestras en laboratorios del extranjero que cuentan con la certificación ISO 17025, certificación requerida por la UE (Sub Dirección de Inocuidad Agroalimentaria-SENASA, 2009; SENASA, 2009b; M. Florez, Lima, comunicación personal).

Asimismo SENASA menciona que el Laboratorio de Residuos Tóxicos, ya está próximo a recibir esta certificación internacional. Además recalca que tiene contemplado brindar programas de capacitación y cursos sobre inocuidad de los alimentos para productores y personas interesadas en diversas regiones del país (Sub Dirección de Inocuidad Agroalimentaria-SENASA, 2009; SENASA, 2009b).

El tema del correcto uso de los antibióticos, no sólo viene a tomarse en cuenta por la presencia de residuos en los productos dirigidos al consumo humano, sino por la producción de resistencias microbianas transmisibles de los animales al hombre, temas ya mencionados por la FAO y la OMS que tienen un gran peso en la salud pública a nivel mundial. Por ello es necesario una adecuada información y capacitación por parte de los profesionales ligados a la medicina veterinaria en el campo avícola y en general, logrando un correcto uso de los medicamentos en general y de los antibióticos en cualquier tipo de producción que tenga como finalidad un producto de origen animal destinado al consumo humano, como en éste caso el huevo de gallina.

## **VI. CONCLUSIONES**

La mayoría de todas las áreas muestreadas presentan residuos de sustancias inhibidoras del crecimiento microbiano en huevos de gallina destinados al consumo humano en Lima Metropolitana.

## VII. LITERATURA CITADA

1. **Adams, R. 2004.** Farmacología y Terapéutica veterinaria. Editorial Acribia S.A. 2da edición, 8va edición inglesa. España. pp: 7, 13, 15, 17, 23, 853, 854, 875- 876, 901, 903, 931, 932, 935, 937, 939, 946, 948, 951, 953, 954, 961, 966.
2. **Aerts, M. M. L., Hogenboom, A. C. and Brinkman, U. A. Th. 1995.** Analytical strategies for the screening of veterinary drugs and their residues in edible products. J. Chromatogr. 667, 1-20.
3. **Alvarado, J.C. 1997.** Antibióticos y Quimioterápicos. 1era edición. Lima - Perú. pp. 10-13.
4. **Anhalt, G.1977.** Physiologie der Eientstehung und Einlagerung antibakterieller Wirkstoffe. Arch. Gefluegelk. 41, 232-237.
5. **Anadon, A. 2007.** Antibióticos de uso veterinario y su relación con la seguridad alimentaria y salud pública. Disponible: <http://www.racve.es/actividades/antibioticos+arturo+anadon.htm>
6. **Amsterdam, A. 1996.** Susceptibility Testing of Antibiotics in Liquid Media. In: Lorian, V. (ed.) Antibiotics in Laboratory Medicine. Williams & Wilkins, MA, USA, pp. 52-111.
7. **Asociación Peruana de Avicultura (APA). 2006.** Cuadros estadísticos. Producción y Consumo de Huevos 1990-2006. Disponible: [http://www.apavic.com/html/sections/cuadros/cuadro\\_11.asp](http://www.apavic.com/html/sections/cuadros/cuadro_11.asp)

8. **Aronson, A.; Martínez-Larranaga, M.R. y Díaz, M.J. 1985.** Pharmacokinetics of tetracycline in chickens after intravenous administration. *Poultry Sci* 64: 2273-2279.
9. **Aureli, P., Ferrini, A. M. and Mannoni, V. 1996.** Presumptive identification of sulphonamide and antibiotic residues in milk by microbial inhibitor tests. *Food Control*. 7: 165-168.
10. **Avrain, L; Humbert, F; L'Hospitalier, R; Sanders, P; Verzozy-Rozard, Ch, Kempf, I. 2003.** Antimicrobial resistance in *Campylobacter* from broilers: association with production type and antimicrobial use. *Vet Microbiol*. 96: 267-276.
11. **Balmonde, M. 2006.** Mitos y Verdades sobre el Huevo. *Actualidad Avípecuaria* 1(1): 16 – 18.
12. **Barlett, J.G., 1990.** *Clostridium difficile*: Clinical considerations. *Rev. Infect. Dis.* 12: S244.
13. **Barry, A. L. 1976.** Agar diffusion: general considerations. In: Barry, A. L. (ed.) *The antimicrobial susceptibility test: principles and practices*. Lea & Febiger, Philadelphia, PA, USA, pp. 163-179.
14. **Barry, A. L. and Effinger, L. J. 1974.** Performance of Mueller-Hinton agars prepared by three manufacturers. *J. Am. Clin. Pathol.* 62, 113-117.
15. **Bartels, H., Angersbach, H. and Klare, H. J. 1972.** Nachweis von Hemmstoffen bei Tieren aus Normalschlachtungen. *Fleischwirtsch.* 4: 479-482.
16. **Bates, J., J. Z. Jordens, and D. T. Griffiths. 1994.** Farm animals as a putative reservoir for vancomycin-resistant enterococcal infection in man. *J. Antimicrobial Chemotherapy* 34: 507–516.
17. **Bell, D. J.; Freeman, B. M. 1971.** *Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl*; Academic Press: London, U.K. ISBN 0-12-085003-6, Vol. 3.
18. **Bentley, O.E. 1993.** Comparative efficacy of neomycin and oxytetracycline alone and in combination against concurrent salmonellosis and pasteurellosis in swine. *Veterinary Medicine/Small Animal Clinician*. March: 409-414.

19. **Berdy, J. 1974.** Recent developments of antibiotic research and classification of antibiotics according to chemical structure. *Adv. Appl. Microbiol.* 18, 309-406.
20. **Beuchat, L. R. and Golden, D. A. 1989.** Antimicrobials occurring naturally in foods. *Food Technol.* pp. 134-142.
21. **Bielecka, M., Baldock, J. D. and Kotula, A.W. 1981.** Determination of antibiotics in meat using *Bacillus stearothermophilus* spores. *J. Food Prot.* 44, 194-200.
22. **Blom, L. 1975.** Plasma Half-Lives and the Excretion into Egg-White and yolk of Three Sulphonamides and Pyrimethamine after Medication of Laying Hens. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 37: 79-93.
23. **Board on Agriculture (BOA). 1999.** The use of drugs in Food Animals. Benefits and Risks. Washington. D.C. pp. 69-87.
24. **Bogaerts, R. and Wolf, F. 1980.** A standardized method for the detection of residues of anti-bacterial substances in fresh meat. *Fleischwirtsch.* 60, 672-674.
25. **Booth, J.M and Harding, F. 1986.** Testing for antibiotic residues in milk. *Vet. Rec.* Vol. 119:565-569.
26. **Braham, R., Black, W. D., Claxton, J. and Yee, A. J. 2001.** A rapid assay for detecting sulfonamides in tissues of slaughtered animals. *J. Food Prot.* 64, 1565-1573.
27. **Bugyei, K., Black, W., McEwen, S. and Meek, A. H. 1994.** Detecting oxytetracycline residues in chicken tissues using the Delvotest P system. *J. Food Prot.* 57, 141-145.
28. **Bustamante, J. 1997.** Producción Avícola. 2da edición. UNMSM-FMV. Lima - Perú. pp: 179-182
29. **Buxade, C. 1987.** La Gallina Ponedora. Sistemas de explotación y técnicas de producción. Edit Mundi Prensa. Madrid. pp. 382- 387, 461 – 488.
30. **Chávez, E. 2008.** Utilidad de una prueba microbiológica en la detección de residuos de sustancias inhibidoras del crecimiento bacteriano en orina de bovinos. Tesis Pregrado. Facultad de Medicina Veterinaria - UNMSM. Lima – Perú.

- 31. Codex Alimentarius. 2008.** Codex Alimentarius. Disponible:  
[http://www.codexalimentarius.net/web/index\\_es.jsp](http://www.codexalimentarius.net/web/index_es.jsp)
1. **Codex Alimentarius. 2009.** Comisión del Codex Alimentarius. Límites Máximos de Residuos para Medicamentos Veterinarios en los Alimentos actualizado en la 32ª Sesión de la Comisión del Codex Alimentarius Commission - Julio del 2009.
  2. **Colegio Médico Veterinario del Perú (CMVP). 2006.** Vademecum Veterinario 2006 - 2008. 3ra edición. Lima - Perú. pp. 73 - 477.
  3. **Cooper, K. E. 1972.** The theory of antibiotic diffusion zones. Kavanagh, F. W. (ed.) Analytical Microbiology, Vol. II. Academic Press, New York, NY, USA, pp. 13-30.
  4. **Corry, J. E. L., M. R. Sharma, and M. L. Bates. 1983.** Detection of antibiotic residues in milk and animal tissues: Fermentation failure due to residues. In Antibiotics: Assessment of Antimicrobial Activity and Resistance. A. D. Russell, ed. New York: Academic Press. pp. 349–370
  5. **Croubles, S., Baert, K., Okerman, L., Robbrecht, V., Aerden, L. and De Backer, P. 1999.** The detection of residues of doxycycline in porcine kidney and muscle tissue: correlation between results of microbiological screening and confirmation tests. Vlaams Diergeneesk. Tijdschr. 68, 22-26.
  6. **Cullors, J.S., A. Van Eenennaam., J. Dellinger., L. Perani., W. Smith., L. Jensen. 1992.** Antibiotic residue assays: Can they be used to test milk from individual cows? Vet. Med. 87 (5): 477-494.
  7. **Currie, D., Lynas, L., Kennedy, D. G. and McCaughey, J. 1998.** Evaluation of a modified EC four plate method to detect antimicrobial drugs. Food Addit. Contam. 15, 651-660.
  8. **Curso de Actualización Producción y Tecnología Avícola. 2007.** Situación del Rubro avícola en el país, la región y el mundo. Disponible:  
[http://www.fagro.edu.uy/~ira/web/AVI\\_Curso%20actualizacion%20avicola%202007%20clase%201.pdf](http://www.fagro.edu.uy/~ira/web/AVI_Curso%20actualizacion%20avicola%202007%20clase%201.pdf)
  9. **Choi, J. Yee, A. Thompson, D., Samoluk, J. and Mitchell, M. 1999.** Determination of fluoroquinolone residues in animal tissues using *Escherichia coli* as indicator organism. J. AOAC. Int. 82, 1407-1412.

- 10. Chopra, I. y Roberts, M. 2001.** Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, June. 65(2) 232-2602.
- 11. Davey, L.A; Ferber, M.T y Kaye, B. 1985.** Comparison of the serum pharmacokinetics of a long acting and conventional oxytetracycline injection. *Vet. Rec.* 117(17): 426-429
- 12. De Zutter, L., Koenen-Dierick, K. and van Hoof, J. 1985.** Detection of antimicrobial residues in slaughtered animals. II. Sensitivity of some detection methods to different antibiotics. *Vlaams Diergeneesk. Tijdschr.* 54, 445-454.
- 13. Demicoli, N. 2007.** Growth Inhibition Test for Antimicrobials. Training Course on Screening and Confirmatory Methods for Veterinary Drug Residues. An activity under the FAO project. Food and Veterinary Regulatory Division Malta.
- 14. Dhillon, A, S., Roy, P; Lauerman, L., Schaberg, D., Weber, S., Bandli, D., Wier, F. 2004.** High Mortality in Egg Layers as a Result of Necrotic Enteritis Avian Diseases: Vol. 48, No. 3, pp. 675–680.
- 15. Dieter, H., Grosch, W. 1985.** *Química de los Alimentos.* Editorial Acribia. España. p: 433-442.
- 16. Dijkstra J.W. 1997.** *J. Vet. Pharmac. Therap.* 20 (suppl. 1) 199.
- 17. Dipeolu, M.A. D., Eruvbetine, E.B., Oguntona, O.O., Bankole., y K.S. Sowunmi. 2005.** Comparison of Effects of Antibiotics and Enzyme inclusion in Diets of Laying Birds. *Archivos de zootecnia* 54 (205): 3-1.  
Disponible:  
[http://www.uco.es/organiza/servicios/publica/az/php/img/web/05\\_14\\_10\\_01ComparisonDipeolu.pdf](http://www.uco.es/organiza/servicios/publica/az/php/img/web/05_14_10_01ComparisonDipeolu.pdf)
- 18. D´Marino, S. 2005a.** El ILH informa: El mito del “Colesterol” y las bondades de este regalo de la naturaleza. *Mundo Avícola y Porcino.* Mayo-Junio. pp. 8
- 19. D´Marino, S. 2005b.** El alimento huevo. *Revista Mundo Veterinario.* Año 3 (8): 12-15.

- 20. Donoghue, D.J. 2001.** Mechanisms regulating drug and pesticide residue uptake by egg yolks: development of predictive models. *World's Poultry Science Journal*, Vol 57, December 2001, pp. 373-380.
- 21. Donoghue, D.J., Hairston, H., Gaines, S.A., Bartholomew, M.J. and Donoghue, A.M. 1996.** Modeling residue uptake by eggs. 1. Similar drug residue patterns in developing yolks following injection with ampicillin or oxytetracycline. *Poultry Science* 75:321-328.
- 22. Doyle, M.E. 1996.** Veterinary Drug Residues in Processed Meats — Potential Health Risk. Food Research Institute. University of Wisconsin—Madison. pp: 2-6. Disponible: [http://fri.wisc.edu/briefs/FRIBrief\\_VetDrgRes.pdf](http://fri.wisc.edu/briefs/FRIBrief_VetDrgRes.pdf)
- 23. Dulin, A.M., White, C.A., y Thaker, N.H. 1998.** Detection of Antibiotic and Sulfonamide Residues in Meat Tissue by Commercially Available Immunoassay Kits. USDA/FSIS Microbiology Laboratory Guidebook, 3rd Edition. Chapter 35. pp: 1.
- 24. Ebrecht, A. 1982.** Verbesserung des Hemmstofftestes durch Zusatz von Trimetoprim zum Nachweis von Sulfonamiden. *Archiv für Lebensmittelhygiene* 33: 109-115.
- 25. El Korchi, G. 2006.** Farmacocinética y Eficacia de la Oxitetraciclina tras su administración intramuscular en bovino. Depleción Tisular. Universidad Autónoma de Barcelona Facult Med Vet. pp. 9-29, 32-33. Disponible: [http://www.tdr.cesca.es/TESIS\\_UAB/AVAILABLE/TDX-0629107-132946//glk1de1.pdf](http://www.tdr.cesca.es/TESIS_UAB/AVAILABLE/TDX-0629107-132946//glk1de1.pdf)
- 26. El Peruano, 2007.** Normas Legales. Aprueban Reglamento del Sistema Avícola. Noviembre 1. pp: 356401-356412. Disponible: [http://www.senasa.gob.pe/RepositorioAPS/0/0/JER/SAN\\_AVI/Peruano%20del%2001%20de%20noviembre%20del%202007.pdf](http://www.senasa.gob.pe/RepositorioAPS/0/0/JER/SAN_AVI/Peruano%20del%2001%20de%20noviembre%20del%202007.pdf)
- 27. El Peruano. 2008.** Normas Legales. Decreto Legislativo que aprueba la Ley de inocuidad de Alimentos. pp: 375002-375008. Disponible: [http://www.senasa.gob.pe/RepositorioAPS/0/0/JER/SECCION\\_NOR\\_AGROA/DL%201062--.pdf](http://www.senasa.gob.pe/RepositorioAPS/0/0/JER/SECCION_NOR_AGROA/DL%201062--.pdf)
- 28. Ellerbroek, L. 1991.** Zum mikrobiologischen Nachweis der Chinoloncarbonsäurederivate Enrofloxacin, Ciprofloxacin und Flumequin, *Fleischwirtsch.* 71, 187-189.

- 29. Erasmuson, A. F., Cairns, E. R. and O’Kane, B. O. 1998.** Bicarbonate as an interference in *B. stearothermophilus* assays. *Analyst* 123, 2497-2499.
- 30. Errecalde, J. 2004.** Uso de antimicrobianos en animales de consumo, incidencia del desarrollo de resistencias en la salud pública. FAO. pp. 4, 18, 19, 31, 36. Disponible:  
<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/007/y5468s/y5468s00.pdf>.
- 31. Fabiansson, S. and Rutegård, Å. 1979.** A modified method for the detection of antibiotic residues in slaughter animals. *Acta Vet. Scand.* 20, 477-491.
- 32. FAO, OMS. 2006.** Qué es el Códex Alimentarius. 3ra edición. pp: 11, 25
- 33. FAO, OMS. 2009.** Nota informativa sobre el JECFA. Secretaría Mixta FAO/OMS del JECFA. Disponible:  
[ftp://ftp.fao.org/ag/agn/agns/J7596S\(text\)02%201%20.pdf](ftp://ftp.fao.org/ag/agn/agns/J7596S(text)02%201%20.pdf)
- 34. Fernández Suárez, A. 2003.** Residuos de medicamentos veterinarios en alimentos de origen animal. Énfasis alimentación. Año IX, Nº1 febrero-marzo: 40-47.
- 35. Fernández, T. 2007.** Técnicas Microbiológicas de Residuos Inhibidores. Xornada Técnica do Leite. Disponible:  
<http://www.atlanticocongresos.com/leitecru2007/12.pdf>
- 36. Fuselier, R., Cadieu, N., y Maris, P.** S.T.A.R: Screening Test for Antibiotic Residues in Muscle of a European Collaborative Study. A.F.S.S.A. Community Reference Laboratory for Residues of Veterinary Drugs BP 90203 - 35302 FOUGERES Cedex - FRANCE. Disponible:  
[http://www.euroresidue.nl/ER\\_IV/Contributions%20A-H/Fuselier%20444-448.pdf](http://www.euroresidue.nl/ER_IV/Contributions%20A-H/Fuselier%20444-448.pdf)
- 37. Gatacros, M. 2007.** Desarrollo de métodos rápidos para el análisis de residuos en producción animal. Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries. Universitat de Girona. pp: 29.
- 38. Gatica, C., Gesche, E. 2007.** “Método de las 5 placas” para la detección de residuos de antibacterianos en leche. *Rev. Cientif. FCV-LUZ.* 17(3): 231–238.

- 39. Gesche, E. 1986.** Detección de residuos de antibióticos en carne. Técnica del *Bacillus subtilis* BGA, Monografías de Medicina Veterinaria 8: 1-5.
- 40. Gesche, E. y Emilfork, C. 1998.** Residuos de antimicrobianos en canales de vacas. Arch. med. vet. 30 (2) pp. 137-143. Disponible: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0301-732X1998000200014&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-732X1998000200014&lng=es&nrm=iso) >. ISSN 0301-732X.
- 41. Glisson, J. 1995.** Uso de las Fluoroquinolonas en la Industria Avícola. Mundo Avícola y Porcino. 3(1). Págs 16-20.
- 42. Gómez J de J, Mosqueda A y Ocampo L. 1991.** Terapéutica Avícola. 2da. Ed UNAM. México.
- 43. Goodman & Gilman, 2007.** Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. Editorial McGraw Hill. 11va edición. pp. 1095, 1155, 1143.
- 44. Griffin, D. 2006.** Live Animal Swab Test (LAST) Pre-Harvest Antibiotic Screening Test (PHAST). University of Nebraska, Great Plains Veterinary Educational Center. pp: 2, 12. Disponible: <http://gpvec.unl.edu/bqa/PHAST-AbScreen-06r.pdf>
- 45. Haapapuro, E. R., N. D. Barnard, and M. Simon. 1997.** Review—Animal waste used as livestock feed: Dangers to human health. Preventive Medicine 26:599–602.
- 46. Haasnoot, W., Stouten, P., Cazemier, G., Lommen, A., Nouws, F. M. and Keukens, H. J. 1999.** Immunochemical detection of aminoglycosides in milk and kidney. Analyst 124, 301-305.
- 47. Hafez, H. M. 1991.** Factors influencing Drug Residues in Poultry Products: A review. Arch. Gefluegelk. 55, 193-195.
- 48. Heinert, H., van Der Wall, G. and Brehmer, H. 1976.** Lysozym-Ursache von unspezifischen Reaktionen im mikrobiologischen Hemmstofftest. Arch. Lebensmittelhyg. 27, 55-60.
- 49. Heitzman, R. J. 1994.** Veterinary drug residues. Residues in food producing animals and their products: reference materials and methods. 2nd ed. Commission of the European Communities. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK.
- 50. Hernández-Arteseros, J. A., Compano, R., Ferrer, R. and Prat, M. D. 2000.** Application of principal component regression to luminescence

data for the screening of ciprofloxacin and enrofloxacin in animal tissues. Analyst 125, 1155-1158.

- 51. Hildebrandt, G., R. Meister, O. Dornheim, J. Schnüll und D. Kusch. 1984.** Antibiotika und Sulfonamidnachweis mit dem Biologischen Hemmstofftest. Fleischwirtschaft 64: 846-852.
- 52. Holmberg, S. D., J. G. Wells, and M. L. Cohen. 1984.** Animal-to-man transmissions of antimicrobial-resistant Salmonella: Investigations of U.S. outbreaks, 1971–1983. Science 225:833–835.
- 53. Huber, W. G., Carlson, M. B. and Lepper, M. H. 1969.** Penicillin and antimicrobial residues in domestic animals at slaughter. J. Am. Vet. Med. Assoc. 154, 1590-1595.
- 54. Huber, W.G. 1988.** Veterinary Pharmacology & Therapeutics. 6th Ed. pp 839
- 55. Ilender Corp. 1999.** La lucha antiinfecciosa: antibióticos. Notas Científicas N° 1. Disponible:  
<http://www.ilender.com.pe/servicios/publicaciones/notas/antibiotico1.pdf>
- 56. Ilender Corp. 2000.** Segunda Parte: La lucha antiinfecciosa Resistencia a los Antibióticos. Notas Científicas N° 1. Disponible:  
<http://www.ilender.com.pe/servicios/publicaciones/notas/antibiotico2.pdf>
- 57. Ilender Corp. 2005.** Lincomicina: Vanguardia antibiótica. Rev Mundo Avícola y Porcino. Marzo-Abril. pp:10-14
- 58. Indecopi, 2009.** Biblioteca virtual del Indecopi. Normas Técnicas Peruanas. Huevos. Disponible:  
[http://www.bvindecopi.gob.pe/wcircu/query.exe?cod\\_user=wwwcircu&key\\_user=wwwcircu&base=02&periodo=1&fmt=01&nreg=200&lang=%24&idioma=all&boolexp=huevos&trunca=%24&conect1=\\*%24&boolexp2=&trunca=%24](http://www.bvindecopi.gob.pe/wcircu/query.exe?cod_user=wwwcircu&key_user=wwwcircu&base=02&periodo=1&fmt=01&nreg=200&lang=%24&idioma=all&boolexp=huevos&trunca=%24&conect1=*%24&boolexp2=&trunca=%24)
- 59. Inglis, J. M., Katz, S. 1977.** Improved Microbiological Assay Procedures for Dihydrostreptomycin Residues in Milk and Dairy Productst. Applied and environmental microbiology, 35 (3): 517-520.
- 60. Instituto de Estudios del Huevo. 2009.** Disponible:  
<http://www.institutohuevo.com/scripts/index.asp>

- 61. Instituto Nacional de Salud (INS). 2002.** Manual de Procedimientos para la Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana por el Método de Disco Difusión. Serie de Normas Técnicas N°30. Lima
- 62. Kan, C. A.; Jacobs, J. G. 1998.** Bepalen van de verdelingscoefficient van een aantal sulfonamiden over water/organisch oplosmiddel, alsmede de verdeling over dooier/wit na toediening via voer aan leghennen; ID-DLO Internal Report 98.001, 1998; pp. 37
- 63. Katz, S.E. and C.A. Fassbender. 1972.** Improved procedures for the determination of residues of tetracycline in milk, milk products, chicken, muscle, liver and eggs. Bulletin for Environmental Contamination and Toxicology. 8:229-236.
- 64. Katz, S.E. y Levine, P.R. 1978.** Determination of neomycin residues in eggs and stability of residues after cooking. J Assoc Off Anal Chem. Sep; 61 (5):1103-6.
- 65. Kan, C. A; Petz, M. 2000.** Residues of Veterinary Drugs in Eggs and Their Distribution between Yolk and White. Symposium on Agrochemical Residues in Eggs. Pp. A-G.
- 66. Kennedy, D.G; McCracken, R.J. Cannavan, A; Hewitt S.A. 1998.** Use of Liquid Chromatography mass-spectrometry in the analysis of residues of antibiotics in meat and milk. J. Chromatogra. A. 812 (1-2): 77 – 98.
- 67. Keukens, H.J., Erts M.M.L, and Tragg, W. 1992.** Analytical Strategy for the Regulatory Control of Residues of Chloramphenicol in Meat: Preliminary Studies in Milk. J. of AOAC International. Vol. 75, N° 2.
- 68. Koenen-Dierick, K. and De Beer, J. O. 1998.** Optimization of an antibiotic residue screening test, based on inhibition of *Bacillus subtilis* BGA, with experimental design. Food Addit. Contam. 15, 528-534.
- 69. Kondo, F., Tsai, C.-E., Hamada, E., Lin, S.-Y. & Saitanu, K. 1993.** A continuous, simple and rapid method for the detection, extraction and identification of residual antibacterial agents in meat. Microbios 73, 237-247.
- 70. Korkeala, H., O. Sorvettula, O. Mäki-Petäys and J. Him. 1982.** Comparison of different agar diffusion methods for the detection of antimicrobial residues in slaughter animals. Acta Veterinaria Scandinavica 23: 407-415.

71. **Korsrud, G. and MacNeil, J. D. 1988.** Evaluation of the Swab Test On Premises, the Calf Antibiotic and Sulfa test, and a microbial inhibitor test with standard solutions of 22 antibiotics. *J. Food Prot.* 51, 43-46.
72. **Korsrud, G., Salisbury, C. D. C, Fesser, A. and MacNeil, J. 1995.** Laboratory evaluation of the Charm Farm Test for antimicrobial residues in meat. *J. Food Prot.* 58, 1129-1132.
73. **Korsrud, G. O., Salisbury, C. D. C., Rhodes, C. S., Papich, M. G., Yates, W. D. G., Bulmer, W. S., MacNeil, J. D., Landry, D. A., Lambert, G., Yong, M. S. and Ritters, L. 1998.** Depletion of penicillin G residues in tissues, Development of microbiological methods for the detection and identification of antimicrobial residues in meat, plasma, and injection sites of market pigs injected intramuscularly with procaine penicillin G. *Food Addit. Contam.* 15, 421-426.
74. **Kreager, K. 1995.** Uso de Antibióticos en la Industria de Ponedoras Comerciales de Estados Unidos. *Rev. Avicultura Profesional.* 13 (1): 8-14
75. **Levetzow, R. 1978.** Zur Entwicklung eines EG-Standards für den Nachweis von Hemmstoffen in Fleisch. *Die Fleischwirtschaft* 58: 868-870.
76. **Lindsay, D.G. 1983.** Monitoring and testing for residues of therapeutics in meat. *The Veterinary Record* 112: 469-471.
77. **Lloyd, D. and van der Merwe, D. 1987.** The use of a diffusion test for the detection of antibiotics in the tissues of slaughter stock. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 58, 183-186. *Bull Vet Inst Pulawy* 50, 367-371.
78. **Lohajová, L., Nagy, J., Rozanska, H., Popelka, P., y Jevinová, P. 2006.** Suitability of STAR and premitest for the detection of Amoxicillin Residues in Laying Hens.
79. **Lorian, V. 1996.** Antibiotics in Laboratory Medicine. Disk Susceptibility Test. Edit Williams & Wilkins. 4ta edic. pp: 5-9.
80. **Lott, A. F., Smither, R. and Vaughan, D. R. 1985.** Antibiotic identification by high voltage electrophoresis bioautography. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 68, 1018-1020.
81. **Lucas, E. 2000.** Características Generales de Los Medicamentos de Uso Veterinario del Codex para el establecimiento de Límites Máximos

de Residuos (LMR). Disponible:

<http://www.rlc.fao.org/es/nutricion/codex/pdf/medvet.pdf>

82. **Lyons, R. W., C. L. Samples, H. N. DeSilva, K. A. Ross, E. M. Julian, and P. J. Checko. 1980.** An epidemic of resistant Salmonella in a nursery: Animal-to-human spread. *J. Am. Med. Assoc.* 243:546–547.
83. **Mack O, N; Donald D, B. 1998.** Manual de Producción Avícola. Edit Manual Moderno. 3ra edición. México. pp: 697
84. **Maekawa, M. 2008.** Detección de Residuos de Oxitetraciclina en Huevos de Gallinas Medicadas Bajo Vía Oral y en Diferentes dosis. Tesis Pregrado. Facultad Medicina Veterinaria - UNMSM. Lima – Perú.
85. **Martínez, M. 1998.** Use of Pharmacokinetics in Veterinary Medicine. III: Physicochemical Properties of Pharmaceuticals. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1998, 213, 1274-1277.
86. **McCracken, A., O'Brien, J. J. and Campbell, N. 1976.** Antibiotic residues and their recovery from animal tissues. *J. Appl. Bacteriol.* 41, 129-135. Bielecka, M., Baldock, J. D. and Kotula, A.W. 1981. Determination of antibiotics in meat using *Bacillus stearothermophilus* spores. *J. Food Prot.* 44, 194-200.
87. **McCracken, R. J., Spence, D. E. and Kennedy, D. G. 2000.** Comparison of extraction techniques for the recovery of veterinary drug residues from animal tissues. *Food Addit. Contam.* 17, 907-914.
88. **Memo/ 02/66. 2002.** Preguntas y respuestas de los antibióticos en pienso Questions and Answers on antibiotics in feed. Brussels, 25 March. Disponible: <http://www.adiveter.com/ftp/articles/articulo338.pdf?PHPSESSID=87741228bf6e40e8e65c17b33725e75d>
89. **Minnassian, M. 2007.** Criterios generales para el establecimiento de límites máximos de residuos y períodos de restricción en productos veterinarios. Coordinación General de Productos Farmacológicos, Veterinarios y Alimentos para Animales- SENASA. Argentina. Disponible: [www.sada.org.ar/Articulos/Tecnicos/residuos.htm](http://www.sada.org.ar/Articulos/Tecnicos/residuos.htm)
90. **Moats, W. 1997.** Advances in Determination of Antibiotic Residues. *J. AOAC. Int.* 80, 1-4.

91. ***Myllyniemi, A .2004.*** Development of microbiological methods for the detection and identification of antimicrobial residues in meat. University of Helsinki. Finland. pp: 13, 21-31, 34-37. Disponible: <http://ethesis.helsinki.fi/julkaisut/ela/elint/vk/myllyniemi/developm.pdf>
92. ***Niessen, W.M. 1998.*** Analysis of Antibiotics by liquid chromatography mass spectrometry. J. Chromatograph. A. 812 (1-2): 53 – 75.
93. ***Nouws, J. F. M., Broex, N. J. G., Den Hartog, J. M. P. and Driessens, F. 1988.*** The New Dutch Kidney Test. Arch. Lebensmittelhyg. 39, 133-156.
94. ***Nouws, J.M.F. 1981.*** Tolerances and detection of antimicrobial residues in slaughtered animals. Archiv für Lebensmittelhygiene 32:103-110.
95. ***Nouws, J. F. M., van Egmond, H., Loeffen, G., Schouten, J., Keukens, H., Smulders, I. and Stegman, H. 1998.*** Suitability of the Charm HVS and a microbiological multiplate system for detection of residues in raw milk at EU Maximum Residue Levels. Vet. Quart. 21, 21-27.
96. ***Okerman, L., van Hoof, J. and Debeuckelaere, W. 1998.*** Evaluation of the European Four-plate test as a tool for screening antibiotic residues in meat samples from retail outlets. J. AOAC. Int. 81, 51-56.
97. ***Okerman, L., Croubles, S., De Baere, S., van Hoof, J., De Backer, P. and De Brabander, H. 2001.*** Inhibition tests for detection and presumptive identification of tetracyclines, beta-lactam antibiotics and quinolones in poultry meat. Food Addit. Contam. 18, 385-393.
98. ***Okerman, L., Croubels, S., Cherlet, M., De Wasch, K., De Backer, P. and van Hoof, J. 2004.*** Evaluation and establishing the performance of different screening tests for tetracycline residues in animal tissues. Food Addit. Contam. 21(2), 145-153.
99. ***Okolo, M.I.O. 1986.*** Bacterial drug resistance in meat animals. A review. International Journal Zoonosis. 13: 143-152.
100. ***Opielinski, K. 2007.*** Ultrasonic Parameters of Hen´s Egg. Molecular and Quantum Acoustics vol. 28 pp: 204-206.

101. **Ortega, P.M. 1988.** Empleo de antibióticos en alimentos para animales y sus consecuencias sobre la Salud Pública. La Revista de Investigación Clínica 40: 463-472.
102. **Ortega, R. 2003.** El huevo en la alimentación. Mundo Avícola y Porcino Febrero-Marzo (44) pp. 9 - 11.
103. **Pajares, E. 2003.** Residuos de Medicamentos Veterinarios. Disponible: [http://www.uam.es/personal\\_pdi/ciencias/eeymar/default\\_archivos/TRABAJOSTOXICOLOGIAPDF/RESIDUOSVETERINARIOSESTERPAJARES.pdf](http://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/eeymar/default_archivos/TRABAJOSTOXICOLOGIAPDF/RESIDUOSVETERINARIOSESTERPAJARES.pdf)
104. **Pascual, M R; Calderón, V. 2000.** Microbiología Alimentaria Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas. Editorial Díaz de Santos. 2da edición. pp: 210 – 214.
105. **Pastor-Navarro, N; A. Maquieira; R. Puchades. 2007.** Nuevos inmunoensayos para el análisis de residuos de tetraciclinas en mieles. CTC Alimentación. N°32
106. **Pérez de Ciriza, J.A., Huarte, A., Saiz, I., Ozcáriz, M.T., Purro, M.T. 1999.** Residuos de Sustancias Inhibidoras en Carnes. ANALES Sis San Navarra Vol. 22, Suplemento 3. pp: 233.
107. **Prescott, J.F., and Baggot, J.D. 1993.** Tetracyclines. In Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine, 2da edición. pp: 215 - 228.
108. **Reeves, P. 1965.** The bacteriocins. Bacteriol. Rev. 29. pp: 24-45.
109. **Reese, R.E. y Douglas, R. G. 1987.** Técnicas de Laboratorio. Editorial Díaz de Santos. pp: 19-40.
110. **Residue Guideline N°26.** Veterinary drug residue analytical methods. Australian Government, Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority. Disponible: <http://www.apvma.gov.au/guidelines/rgl26.shtml>
111. **Residue Guideline N°31. 2004.** Residues in Poultry Tissues and Eggs. pp: 1-7. Disponible: <http://www.apvma.gov.au/guidelines/downloads/rgl31.pdf>
112. **Residuos de Medicamentos de Productos Veterinarios.** pp: 112,154. Disponible: [http://www.osanet.euskadi.net/r85-2906/es/contenidos/informacion/sanidad\\_alimentaria/es\\_1247/adjuntos/vigila9516a.pdf](http://www.osanet.euskadi.net/r85-2906/es/contenidos/informacion/sanidad_alimentaria/es_1247/adjuntos/vigila9516a.pdf)

- 113. Rieutord, A., Prognon, P., Brion, F. and Mahuzier, G. 1997.** Liquid chromatographic determination using lanthanides as time-resolved luminescence probes for drugs and xenobiotics: advantages and limitations. *Analyst* 122, 59R-66R.
- 114. San Martín, B; Moraga, R. 1996.** Evaluación de la técnica microbiológica con *Bacillus subtilis* BGA para la identificación de residuos de antimicrobianos en leche bovina. *Avances de Medicina Veterinaria*, Vol.11, N°1, Enero- Junio.
- 115. San Martín, B. 1998.** Antibióticos y sulfas en sistemas de crianza intensiva. *Revista Tecno Vet.* Año 4 N°2. Agosto. Disponible: [http://www.tecnovet.uchile.cl/CDA/tecnovet\\_articulo/0,1409,SCID%253D9503%2526ISID%253D457,00.html](http://www.tecnovet.uchile.cl/CDA/tecnovet_articulo/0,1409,SCID%253D9503%2526ISID%253D457,00.html)
- 116. San Martín, B; Cañón, H. 1999.** Antimicrobianos en medicina veterinaria: ¿Cómo se puede evitar la resistencia bacteriana? *Revista Tecnovet.* Año 5. N°2. Chile. Disponible: [http://www.tecnovet.uchile.cl/CDA/tecnovet\\_articulo/0,1409,SCID%253D9692%2526ISID%253D460,00.html](http://www.tecnovet.uchile.cl/CDA/tecnovet_articulo/0,1409,SCID%253D9692%2526ISID%253D460,00.html)
- 117. San Martín, B; Cañón, H. 2000.** Métodos de análisis para el control de residuos químicos en productos de origen animal. *Revista Tecnovet.* Año 6. N°2. Chile. Disponible: [http://www.tecnovet.uchile.cl/CDA/tecnovet\\_articulo/0,1409,SCID%253D11534%2526ISID%253D463,00.html](http://www.tecnovet.uchile.cl/CDA/tecnovet_articulo/0,1409,SCID%253D11534%2526ISID%253D463,00.html)
- 118. Schoevers, E. J., Terlouw, M., Pijpers, A. and Verheijden, J. H. M. 1994.** An image analysis system: an objective and accurate alternative for reading the agar diffusion test. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 17, 38-42.
- 119. SENASA, 2009a.** ¿Qué es Senasa? Disponible: [http://www.senasa.gob.pe/0/modulos/JER/JER\\_Interna.aspx?ARE=0&PFL=0&JER=88](http://www.senasa.gob.pe/0/modulos/JER/JER_Interna.aspx?ARE=0&PFL=0&JER=88)
- 120. SENASA, 2009b.** Insumos Agropecuarios e Inocuidad Agroalimentaria. Preguntas frecuentes. Disponible: [http://www.senasa.gob.pe/0/modulos/JER/JER\\_Interna.aspx?ARE=0&PFL=3&JER=177](http://www.senasa.gob.pe/0/modulos/JER/JER_Interna.aspx?ARE=0&PFL=3&JER=177)

121. **Serrano, L. 2002a.** Biodisponibilidad de los Antimicrobianos en los Nuevos Sistemas de Producción. Disponible:  
<http://www.apavic.com/html/sections/presentaciones/biodisponibilidad.asp>
122. **Serrano, L. 2002b.** Actualización en Farmacocinética en Avicultura. AMEVEA. Primer Seminario Internacional 6, 7 y 8 de marzo del 2002. Lima- Perú. Disponible:  
<http://www.apavic.com/html/sections/presentaciones/amevea2.asp>
123. **Settepani, J.A. 1984.** The hazard of using chloramphenicol in food animal. JAVMA- 184: 930.
124. **Seymour, E. H., Jones, G. M. and McGilliard, M. L. 1988.** Comparisons of on-farm screening test for detection of antibiotic residues. J. Dairy Sci. 71, 539-544.
125. **Somogyi, A. 1984.** Survey of animal drugs with carcinogenic properties. Food Addit. Contam. 1:81–87.
126. **Sumano, H., Ocampo, L. 2006.** Farmacología Veterinaria. 3ra edición. Edit Mc Graw Hill Interamericana. pp: 46, 51, 52, 90-93, 128, 129, 138, 148, 170, 171, 210, 211, 236 - 247 300, 301.
127. **Stolker, A.A., Brickman, U.A. 2005.** Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth promoting agent in food producing animals. J. Chromatogra. A. 1067(1-2): 15-53
128. **Subasinghe, R., Alderman, D.** Basic overview of the regulatory procedures for authorisation of veterinary medicines with emphasis on residues in food animal species. FAO. pp: 6, 7, 15. Disponible:  
<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/004/AC343E/AC343E00.pdf>
129. **Sumano, H., Gutierrez, L. 2000.** Veterinaria México (31) pp: 80 - 91
130. **Sumano, L.H. et al. 2001.** J. Vet. Pharmac. Therap. 24, 309 - 313
131. **Tritschler, J. P., Duby, R. T., Oliver, S. P. and Prange, R. W. 1987.** Microbiological screening tests to detect antibiotic residues in cull dairy cows. J. Food Prot. 50, 97-102.
132. **Tsai, C.-E. y Kondo, F. 2001.** Improved agar diffusion method for detecting residual antimicrobial agents. J. Food Prot. 64, 361- 366.

- 133. USDA. 1984.** Performing the Calf Antibiotic and Sulfa Test. United States Department of Agriculture. A Self-Instructional Guide, Food Safety and Inspection Service, Washington, D. C., USA.
- 134. USDA. 2005.** Performing the Swab Test on Premises (STOP) For Detection of Antibiotic Residues in Livestock Kidney Tissue. Current Revision May 2005. United States Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service Office of Policy, Program and Employee Development. Washington, D. C., USA. Disponible:  
<http://www.fsis.usda.gov/PDF/STOP.pdf>
- 135. Van Schothorst, M. and Peelen-Knol, G. 1970.** Detection and identification of some antibiotics in slaughter animals. Neth. J. Vet. Sci. 3, 85-93.
- 136. Van Schothorst, M. and van Leusden, F. 1972.** Evaluation of the kidney test for the detection of antibiotic residues in slaughter animals. Tijdschr. Diergeneesk. 97, 1043-1047.
- 137. Vilca, M.A. 2006.** Huevos y Productos de Huevo. Tecnología, Inspección e Higiene de Alimentos. UNMSM- FMV.
- 138. Wasserman, B.P. 1984.** Thermostable enzyme production. Food Technology. 38(2):78-89.
- 139. Witte, W., and I. Klare. 1995.** Glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* outside hospitals: A commentary. Microbial Drug Resist. 1:259–263.
- 140. Williams, K. C., Blaney, B. J. and Mahwinney, H. 1992.** Bacterial inhibitory residues in pigs fed mouldy grain. Aust. Vet. J. 69, 38-39.
- 141. WHO (World Health Organization). 1997.** The Medical Impact of Antimicrobial Use in Food Animals. Report of a WHO Meeting. Berlín, Alemania. Disponible:  
<http://whqlibdoc.who.int/hq/1997/WHO EMC ZOO 97.4.pdf>
- 142. WHO (World Health Organization). 2002.** Use of antimicrobials outside human medicine and resultant antimicrobial resistance in humans. Fact sheet N° 268. Disponible :  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs268/en/>

- 143. WHO (World Health Organization). 2008.** Resistencia a los antimicrobianos transferida por animales productores de alimentos. INFOSAN Nota informativa N° 2/2008 – Resistencia a los antimicrobianos. 7 Marzo. pp: 1-6. Disponible: [http://www.panalimentos.org/files/No\\_02\\_Antimicrobial\\_Mar08\\_ES.pdf](http://www.panalimentos.org/files/No_02_Antimicrobial_Mar08_ES.pdf)
- 144. XOT 10.** Glossary of Terms and Definitions (Residues of Veterinary Drugs in Foods) Disponible: [http://www.euro.who.int/Document/Fos/Def\\_E.pdf](http://www.euro.who.int/Document/Fos/Def_E.pdf)
- 145. Yamada, Y., Sasaki, J., Matsuzaki, T. and Shiiki, K. 1981.** Influence of medium and diluent pH and diffusion time on antibiotic bioassay. Tokai J. Exp. Clin. Med. 6, 23-33.
- 146. Zaldívar, R. 2006.** Fosfomicina. Eficiente Alternativa contra Infecciones Bacterianas Rebeldes. Actualidad Avipecuaria. Año 1. (1):25-27.
- 147. Ziv G, et al. 1997.** J. Vet. Pharmac. Therap. 20 (suppl. 1) 183 – 184, 194-195.

## VIII. APÉNDICES O ANEXOS

**APENDICE 1.** Clasificación química de los antimicrobianos, algunos ejemplos, modo de acción y espectro simplificados (Fuente: Errecalde, 2004)

<b>Grupo</b>	<b>Miembros</b>	<b>Modo de acción</b>	<b>Espectro</b>
<b>Beta lactámicos: Penicilinas</b>	Penicilina G	inhiben síntesis de pared	Bacterias G+
	Penicilina V	Idem	Idem
	Cloxacilina	Ídem	Estafilococos productores de penicilinasa
<b>Beta lactámicos: Cefalosporinas</b>	Ampicilina	Idem	Bacterias G+ y G-\
	Carbenicilina	Idem	P. aeruginosa
	Cefaloridina	Inhiben síntesis de pared	Bacterias G+ y G-
	Cefalexina	Idem	Idem agregando actividad frente a Estafilococos productores de penicilinasa
	Cefuroxima	Ídem	Ídem con menos actividad frente a G+ y más frente a G-
	Moxalactam	Ídem	Bacterias G+ Enterobacterias
	Ceftiofur Cefoperazona	Ídem Ídem	Ídem Pseudomonas aeruginosa
<b>Beta lactámicos: Inhibidores de la Beta lactamasa</b>	Ácido clavulánico	Se une a la beta lactamasa inactivándola	Gérmenes productores de beta lactamasa
	Sulbactam	Ídem	Ídem
	Tazobactam	Ídem	Ídem
<b>Beta lactámicos: Carbapenems</b>	Imipenem-cilastatina	Inhiben síntesis de pared	G+ y G- aerobios y anaerobios
<b>Beta lactámicos:</b>	Aztreonam	Ídem	Gram negativos aerobios
<b>Monobactams Aminoglucósidos</b>	Estreptomina	Inhiben síntesis proteica porción 30 S ribosomal	Bacterias G-
	Kanamicina	Idem	Idem
	Neomicina	Idem	Idem
	Gentamicina	Idem	Idem
<b>Aminociclitoles</b>	Espectinomicina	Idem	Bacterias G- y micoplasmas
<b>Azúcares complejos o Lincosamidas</b>	Lincomicina	Inhiben síntesis proteica porción 50S ribosomal	Bacterias G+, anaerobios y micoplasmas
	Clindamicina	Ídem	Ídem
	Pirlimicina	Idem	Idem
<b>Rifamicinas</b>	Rifampicina	Inhib e ARN polimerasa	Bacterias Gram positivas micobacterias

<b>Péptidos</b>	Polimixina B	Desorganizan membrana	Pseudomonas aeruginosa
	Colistín	Idem	Idem
<b>Gluco péptidos</b>	Vancomicina	Inhibe síntesis de pared	Bacterias G+ y G-
	Teicoplanina	Idem	Idem
	Avoparcina	Idem	Idem
<b>Estreptograminas</b>	Virginamicina	Inhibe peptidil transferasa	Bacterias G+ aerobias y anaerobias
<b>Macrólidos</b>	Eritromicina	Inhibe síntesis proteica porción 50S ribosomal	Bacterias G+ y G-
	Oleandomicina	Idem	Idem
	Tilosina	Idem	Idem
	Espiramicina	Idem	Idem
	Tilmicosina	Idem	Idem
<b>Fenicoles</b>	Cloranfenicol	Inhibe síntesis proteica porción 50S ribosomal	Bacterias G+ y G- rickettsias y chlamydias
	Tianfenicol	Idem	Idem
	Florfenicol	Idem	Idem
<b>Tetraciclinas</b>	Oxitetraciclina	Inhibe síntesis proteica porción 30S ribosomal	Bacterias G+ y G-, Rickettsias, chlamydias y algunos protozoos
	Doxiciclina	Idem	Idem
	Minociclina	Idem	Idem
<b>Sulfonamidas</b>	Sulfanilamida	Interfieren síntesis de ácido fólico	Bacterias G+, G- y coccidios
	Sulfadiazina	Idem	Idem
	Sulfatiazol	Idem	Idem
	Ftalilsulfatiazol	Idem	Idem
<b>Diaminopirimidinas</b>	Trimetoprima	Interfieren síntesis de ácido tetrahidrofólico	Bacterias G+, G- aerobias
	Baquiloprima	Idem	Idem
<b>Fluoroquinolonas</b>	Enrofloxacina	Inhiben ADN girasa	Bacterias Gram positivas y Gram negativas
	Danofloxacina	Idem	Idem
	Marbofloxacina	Idem	Idem
	Sarafloxacina	Idem	Idem
<b>Ionóforos</b>	Monensina	Alteran flujo de membrana	Coccidiosis, promoción del crecimiento
	Salinomicina	Idem	Idem
<b>Nitrofuranos</b>	Nitrofurazona	Previenen traslación ARN mensajero	Bacterias Gram positivas y Gram negativas
	Furazolidona	Idem	Idem
<b>Nitroimidazoles</b>	Metronidazol	Disrupción del ADN	Anaerobios
	Dimetridazol	Idem	Idem

## APENDICE 2. Periodo de Retiro para Fármacos Antimicrobianos de Uso Avícola

<b>TABLA 2</b> <b>PERIODO DE RETIRO PARA FARMACOS ANTIMICROBIANOS DE USO AVÍCOLA</b>			
Fármaco	Administración vía alimento	Administración vía agua de bebida	Administración vía parenteral
Acido nalidixico		20 días	30 días
Acido oxolinico		3 días	3 días
Ampicilina		15 días	30 días
Amoxicilina		2 días	2 días
Josamicina		5 días	5 días
Apramicina			15 días
Bacitracina	ningún día		
Ceftiofur			5 días
Cloranfenicol *		30 días	30 días
Clortetraciclina	5 días	30 días	30 días
Colistina		5 días	5 días
Danofloxacina		5 días	5 días
Dihidroestreptomina			30 días
Enrofloxacina		5 días	5 días
Eritromicina **	2 días	30 días	30 días
Espectinomina		5 días	5 días
Espiramicina		6 días	6 días
Estreptomina			30 días
Flumequina		1 día	1 día
Furaltadona		5 días	7 días
Furazolidona	5 días		
Gentamicina			20 días
Kanamicina			63 días + 15 días
Kitasamicina	2 días	2 días	
Lincomicina+	ningún día		5 días
Neomicina	5 a 14 días	5 días pollo de engorda 14 días en ponedoras	15 a 20 días
Nistatina	ningún día		
Nitrofurazona	5 días	5 días	
Novobiocina+	4 días		
Oxitetraciclina*	3 a 5 días	30 días	30 días
Sulfaquinoxalina	10 días	5 a 10 días	
Sulfamonometoxina	5 días	15 días	15 días
Sulfaclorpiridazina	5 días	5 días	
Sulfadoxina	5 días	5 días	
Sulfadimetoxina	5 días	5 días	
Sulfadiazina		5 días	5 días
Sulfamerazina		5 días	5 días
Sulfas + trimetoprim		5 días	5 días
Tiamulina	5 días	5 días	5 días
Tilosina		5 días	5 días

\* No consumir huevos de aves tratadas hasta 24 horas post-tratamiento

\*\* No administrar niveles superiores a 200 g/ ton de alimento en aves ponedoras para consumo

+ Según información del Feed Stuffs de EUA.

Fuente: Gómez J de J. *Terapéutica Avícola*. México, 1991.

**APENDICE 3. Composición nutricional huevo de gallina**

<b>HUEVOS DE GALLINA (composición por 100 g de porción comestible)</b>			
	<b>Huevo</b>	<b>Yema</b>	<b>Clara</b>
<b>Agua (g)</b>	<b>74,5</b>	<b>51,7</b>	<b>88</b>
<b>Energía (kcal)</b>	<b>162</b>	<b>353</b>	<b>49,1</b>
<b>Proteínas (g)</b>	<b>12,7</b>	<b>16,1</b>	<b>11,1</b>
<b>Carbohidratos (g)</b>	<b>0,68</b>	<b>0,3</b>	<b>0,7</b>
<b>Almidón (g)</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>Azúcares sencillos (g)</b>	<b>0,68</b>	<b>0,3</b>	<b>0,7</b>
<b>Lípidos (g)</b>	<b>12,1</b>	<b>31,9</b>	<b>0,2</b>
<b>AGS (g)</b>	<b>3,3</b>	<b>9,5</b>	<b>----</b>
<b>AGM (g)</b>	<b>4,9</b>	<b>13</b>	<b>----</b>
<b>AGP (g)</b>	<b>1,8</b>	<b>5,5</b>	<b>----</b>
<b>Colesterol (mg)</b>	<b>410</b>	<b>1260</b>	<b>0</b>
<b>C 18.1 A. oleico (g)</b>	<b>4,4</b>	<b>11,7</b>	<b>----</b>
<b>C 18.2 A. linoleico (g)</b>	<b>1,6</b>	<b>4,8</b>	<b>----</b>
<b>C 18.3 A. linolénico (g)</b>	<b>0,098</b>	<b>0,26</b>	<b>----</b>
<b>Fibra vegetal (g)</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>Alcohol (g)</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>Tiamina (mg)</b>	<b>0,11</b>	<b>0,29</b>	<b>0,022</b>
<b>Riboflavina (mg)</b>	<b>0,37</b>	<b>0,4</b>	<b>0,32</b>
<b>Equivalentes de Niacina (mg)</b>	<b>3,3</b>	<b>4,2</b>	<b>3,4</b>
<b>Vitamina B6 (mg)</b>	<b>0,12</b>	<b>0,3</b>	<b>0,012</b>
<b>Eq. Folato dietético (µg)</b>	<b>51,2</b>	<b>159</b>	<b>9,2</b>
<b>Vitamina B12 (µg)</b>	<b>2,1</b>	<b>2</b>	<b>0,1</b>
<b>Vitamina C (mg)</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0,3</b>
<b>Pantoténico (mg)</b>	<b>1,8</b>	<b>3,7</b>	<b>0,14</b>
<b>Vitamina A (µg)</b>	<b>227</b>	<b>886</b>	<b>0</b>
<b>Retinol (µg)</b>	<b>225</b>	<b>881</b>	<b>0</b>
<b>Carotenoides (µg)</b>	<b>10</b>	<b>29</b>	<b>0</b>

<b>Vitamina D (µg)</b>	<b>1,8</b>	<b>5,6</b>	<b>0</b>
<b>Vitamina E (µg)</b>	<b>1,9</b>	<b>5,5</b>	<b>0</b>
<b>Vitamina K (µg)</b>	<b>8,9</b>	<b>2</b>	<b>0,01</b>
<b>Calcio (mg)</b>	<b>56,2</b>	<b>140</b>	<b>11</b>
<b>Fósforo (mg)</b>	<b>216</b>	<b>590</b>	<b>21</b>
<b>Hierro (mg)</b>	<b>2,2</b>	<b>7,2</b>	<b>0,2</b>
<b>Iodo (µg)</b>	<b>12,7</b>	<b>12</b>	<b>6,8</b>
<b>Cinc (mg)</b>	<b>2</b>	<b>3,8</b>	<b>0,02</b>
<b>Magnesio (mg)</b>	<b>12,1</b>	<b>16</b>	<b>12</b>
<b>Sodio (mg)</b>	<b>144</b>	<b>51</b>	<b>170</b>
<b>Potasio (mg)</b>	<b>147</b>	<b>138</b>	<b>154</b>
<b>Manganeso (mg)</b>	<b>0,071</b>	<b>0,13</b>	<b>0,04</b>
<b>Cobre (mg)</b>	<b>0,065</b>	<b>0,35</b>	<b>0,006</b>
<b>Selenio (µg)</b>	<b>10</b>	<b>19</b>	<b>5,4</b>

Fuente: <http://www.institutohuevo.com/scripts/composicion.asp>

**APENDICE 4. Producción y Consumo de Huevos Años 1990-2006. Perú**

AÑO	PROM. MES GALL. POSTURA (MILES)	PRODUCCION (T.M.)	CONSUMO PER CAPITA (UNIDADES)	KG./HAB. POBLACION AÑO (MILLONES)
-----	---------------------------------	-------------------	-------------------------------	-----------------------------------

1990	7,413	109,014	80	5.0	21,753
1991	7,942	116,788	84	5.3	22,180
1992	7,667	112,754	80	5.0	22,597
1993	6,604	97,118	68	4.2	23,009
1994	6,964	115,900	79	4.9	23,421
1995	8,519	144,200	97	6.0	23,837
1996	7,326	130,000	86	5.4	24,258
1997	7,893	149,400	97	6.1	24,681
1998	7,698	154,468	98	6.2	25,104
1999	8,005	161,291	101	6.3	25,525
2000	8,076	162,280	100	6.3	25,939
2001	8,619	152,242	92	5.8	26,347
2002	8,382	181,601	109	6.8	26,749
2003	9,454	181,783	107	6.7	27,148
2004	8,834	175,464	102	6.4	27,547
2005	9,739	182,347	104	6.5	27,947

NOTA : - 325 HUEVOS POR GALLINA

- 16 HUEVOS POR KILO

FUENTE: O.E.A. (1982-1989)

C.P.H. (1990/1992 ABRIL)

S.I.P. (1993-1994)

O.I.A. (1995-2000)

ELABORACION : APA

**APENDICE 5.** Screening Test Estándar de tipo microbiológico para la Detección de Residuos de Antimicrobianos en Carne, Leche y Huevos.

**5.1. Para tejidos de animales sacrificados:** Test de Inhibición tales como: (Korsrud, 1998; Myllienimi, 2004).

- Swab Test on Premises (STOP).
- Calf Antibiotic and Sulfa Test (CAST).
- Fast Antibiotic Screen Test (FAST).
- Antimicrobial Inhibition Monitor 96 (AIM-96) assay.
- German Three Plate Test.
- European Union Four Plate Test (FPT).
- New Dutch Kidney Test.
- Screening Test for Antibiotic Residues (STAR) (Fuselier *et al*).
- Premi test. [http://www.dsm.com/en\\_US/html/premitest/meat.htm](http://www.dsm.com/en_US/html/premitest/meat.htm) (DSM Premitest)

**5.1.1. Para Plasma:**

- Brilliant Black Reduction Test (BBRT)

**5.1.2. Para Orina:**

- Live Animal Swab Test (LAST)
- Premi test. [http://www.dsm.com/en\\_US/html/premitest/urine.htm](http://www.dsm.com/en_US/html/premitest/urine.htm) (DSM Premitest)

**5.2. Para Leche:**

- Screening Test for Antibiotic Residues (STAR) (Gaudin *et al*, 2004) (Método de las 5 placas)
- Delvotest Delvotest® SP - DSM Food Specialities  
[http://www.dsm.com/en\\_US/html/dfs/dairy-products-tests-delvotest.htm](http://www.dsm.com/en_US/html/dfs/dairy-products-tests-delvotest.htm)

- Copan Copan Milk Test - Copan Diagnostics Inc.  
[http://copanusa.com/products/cmt/cmt\\_broch.pdf](http://copanusa.com/products/cmt/cmt_broch.pdf)
- Eclipse R (ZEUInmunotec, Zaragoza)
- Técnica Microbiológica de Cilindros en Placa (San Martín y Moraga, 1996)
- Four Plate Test (FPT) (Jevinova, 2002)
- The International Dairy Federation (IDF) microbial inhibition test. (IDF, 1970; IDF, 1991).  
[http://www.fsai.ie/publications/other/Rapid\\_Test\\_Kits.pdf](http://www.fsai.ie/publications/other/Rapid_Test_Kits.pdf)
- The *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* disk assay (BSDA)

### **5.3. Para Huevos:**

- Premitest. [http://www.dsm.com/en\\_US/html/premitest/eggs.htm](http://www.dsm.com/en_US/html/premitest/eggs.htm) (DSM Premitest)