

**UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS  
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y  
ZOOTECNIA**



**Evaluación de residuos de enrofloxacin en carne de pollo  
comercializado en el mercado La Hermelinda de la ciudad de Trujillo**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:**

**MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**NADIA LISETT VILLALOBOS SIPAN**

**TRUJILLO, PERÚ**

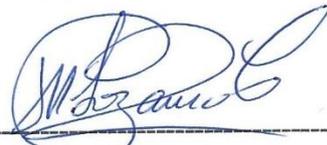
**2018**

La siguiente tesis ha sido revisada y aprobada por el siguiente Jurado:



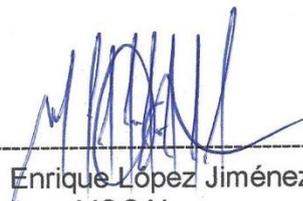
---

M.V. Mg. Roberto Briones Cabellos  
PRESIDENTE



---

M.V. Mg. Angélica Mery Lozano  
SECRETARIA



---

M.V. Enrique López Jiménez  
VOCAL



---

M.V. Ciro Meléndez Tamayo  
ASESOR

## **DEDICATORIA**

A mi esposo por su apoyo incondicional y el interés para que estudie y me desarrolle en todos los aspectos de mi vida, gracias por mostrarme que todo lo que me proponga lo puedo lograr, que con esfuerzo y perseverancia todo es posible.

A mi familia hermanos y en especial a mis padres, que sin ellos mi vida no existiría, gracias por sus consejos y cariño.

## **AGRADECIMIENTO**

A mi familia, por brindarme su apoyo en cada etapa de mi vida.

A los Dres. Ciro Meléndez Tamayo, Roberto Briones Cabellos, Enrique López Jiménez, por su apoyo y fundamental guía en la realización de este proyecto.

A mis profesores que con sus experiencias y consejos me formaron en los cinco años de mi carrera universitaria.

A Dr. César Llaqué Quiroz, por su confianza y apoyo brindado el tiempo que hice mis prácticas pre profesionales.

A mi querida amiga Fiorella Cabanillas por su apoyo incondicional.

## ÍNDICE

	Página
CARATULA.....	i
APROBACION POR JURADO DE TESIS .....	ii
DEDICATORIA .....	iii
AGRADECIMIENTO .....	iv
ÍNDICE .....	v
ÍNDICE DE CUADROS.....	vii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	viii
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. REVISIÓN DE BIBLIOGRAFÍA .....	4
2.1. Enrofloxacin .....	4
2.1.1. Espectro .....	4
2.1.2. Farmacodinámica .....	4
2.1.3. Farmacocinética .....	5
2.1.4. Metabolismo y excreción .....	5
2.1.5. Concentración plasmática en pollos .....	6
2.1.6. Tiempo de retiro .....	6
2.2. Aplicación en la producción avícola.....	7
2.3. Aplicación Sanitaria .....	7
2.4. Aplicación como promotor de crecimiento .....	7
2.5. Reglamentos (FDA o OMS) normativas.....	8
2.6. Residuos de antibióticos .....	8
2.7. Límites máximos permitidos para los principales antibióticos en carne de ave .....	9
2.8. Resistencia antimicrobiana y daños en la salud humana .....	9
2.9. Características de los métodos de análisis de residuos de medicamento veterinario.....	10
2.10. Método de ELISA (Enzyme Linked ImunoSorbent Assay) .....	11
2.11. Método de análisis Test de ELISA Enrofloxacin .....	12

III. MATERIALES Y MÉTODOS .....	14
3.1 Área de investigación y toma de muestras. ....	14
3.2 Tamaño de muestra. ....	14
3.3 Proceso de muestreo.....	14
3.4 Variable independiente .....	14
3.5 Variable dependiente .....	15
3.6 Materiales .....	15
3.6.1 Material biológico:.....	15
3.6.2 Equipos empleados .....	15
3.6.3 Otros materiales: .....	15
3.7 Métodos .....	16
3.7.1 Preparación de muestra .....	16
3.7.2 Protocolo ELISA .....	16
3.8 Análisis de datos.....	17
IV. RESULTADOS .....	19
V. DISCUSIÓN .....	21
VI. CONCLUSIONES.....	23
VII. RECOMENDACIONES .....	24
VIII. BIBLIOGRAFÍA .....	25
IX. ANEXOS .....	29

## ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Límites máximos permitidos para los principales antibióticos en carne de ave, establecidos por el Ministerio de Salud del Perú.....	9
Cuadro 2. Contenido de enrofloxacin en muestras de carne de pechuga de Pollos (ug/kg) .....	19
Cuadro 3. Nivel de contaminación por enrofloxacin en carne de pechuga de pollos.....	20

## ÍNDICE DE ANEXOS

	Página
Anexo 1. Muestra de pechuga de pollo .....	29
Anexo 2. Muestras de pechuga de pollo con metanol y centrifugadas ....	29
Anexo 3. Kit de ELISA Max Signal.....	29
Anexo 4. Lector Biotek EL X800 .....	29

## RESUMEN

El presente estudio, tuvo como objetivo determinar la presencia de residuos del antibiótico enrofloxacin en la carne de pollo comercializada en el mercado La Hermelinda del distrito de Trujillo, Provincia de Trujillo, La Libertad, Perú.

La metodología empleada en este proyecto fue a través de la prueba de ELISA y se utilizaron 25 muestras de carne de pollo (pechuga), las que se recolectaron a lo largo de 25 días; las muestras fueron congeladas para posteriormente medir los niveles de enrofloxacin con el método indicado.

Los resultados obtenidos nos indican la presencia del antibiótico en un 56% de las muestras y en un 44% de las mismas no se detectaron residuos. Los niveles variaron en un rango de 0.00  $\mu\text{g}/\text{kg}$  a 41.20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Sin embargo, los residuos detectados están dentro del límite máximo permitido por la norma sanitaria de medicamento veterinarios en alimentos de consumo humano, que especifica para carne de 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  Norma Técnica de Salud N° 120-MINSA/DIGESA-V.01.

Se concluye que a pesar de encontrar restos de enrofloxacin en carne de pechuga de pollo, estos se encuentran dentro del límite de seguridad para la alimentación humana.

## **ABSTRACT**

The objective of the present study was to determine the presence of residues of the enrofloxacin antibiotic in chicken meat sold in the La Hermelinda market of Trujillo district, Trujillo province, La Libertad, Peru.

The methodology used in this project was through the ELISA test and 25 samples of chicken meat (breast) were used, which were collected over 25 days; the samples were frozen to subsequently measure enrofloxacin levels with the indicated method.

The results obtained indicate the presence of the antibiotic in 56% of the samples and in 44% of them, no residues were detected. The levels varied in a range from 0.00 µg/kg. To 41.20 µg/kg However, the detected residues are within the maximum limit allowed by the sanitary norm of veterinary drugs in foods for human consumption, which specific for meat of 100 µg/kg. Technical Health Standard N°120–MINSA/DIGESA–V.01.

It is concluded that despite finding enrofloxacin residues in chicken breast meat, these are within the safety limit for human food.

## I. INTRODUCCIÓN

Junto con la globalización y el vertiginoso cambio a nivel tecnológico y mejora en la calidad de vida de las personas, día a día surge la búsqueda y satisfacción de nuestra alimentación a través de alimentos inocuos y saludables. Según la FAO inocuidad de los alimentos engloba acciones encaminadas a garantizar la máxima seguridad posible de los alimentos. Cuando se habla de inocuidad de los alimentos se hace referencia a todos los riesgos, sean crónicos o agudos, que pueden hacer que los alimentos sean nocivos para la salud del consumidor. Por lo tanto el apropiado control en el proceso, bioseguridad, adecuada trazabilidad e higiene y buenas prácticas de manufactura constituyen los principales requerimientos (Carlos y Alvarado, 2010).

El uso de medicamentos veterinarios es esencial durante la crianza de animales productores de alimentos. Estos productos son empleados con fines terapéuticos y preventivos en caso de infecciones o enfermedades no contagiosas y en otros casos se aplican como promotores del crecimiento (Kilinc y otros, 2007). En los últimos años el sector agroalimentario en todo el mundo se ha enfrentado a la diseminación de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos en los que intervienen, entre otros agentes, residuos de medicamentos veterinarios; lo cual pone de manifiesto el manejo indebido de los fármacos durante las prácticas agropecuarias y el incumplimiento de los tiempos de retiro de los medicamentos (Lozano y otros, 2008).

Sin embargo, los antibióticos constituyen uno de los agentes farmacológicos peor usados, siendo administrados en muchas ocasiones de forma irracional y en dosis inadecuadas. El empleo indiscriminado de estos productos puede acompañarse de complicaciones tales como reacciones alérgicas, superinfecciones, retrasos en la identificación del

germen causal; quizás, una de las complicaciones más importantes es la aparición de gérmenes antibiótico–resistentes que, a su vez, crea la necesidad cada vez mayor de nuevas drogas (Canalejo y Coruña, 1990).

La resistencia a los antibióticos es un grave problema de salud pública en diferentes partes del mundo, debido a que muchas enfermedades han de dejado de responder a los antibióticos de uso común (Montalvo y otros, 2004), tanto por su uso excesivo como por la falta de nuevos agentes en el mercado (Serrano, 2009). La aplicación a gran escala de los antibióticos conlleva una presión selectiva que ha favorecido la diseminación de cepas bacterianas resistentes, Fernández (2009). Esto se debe a que los genes de resistencia pueden provenir de mutaciones espontáneas y quedar fijadas genéticamente (Trolldenier, 1980)

Algunas drogas veterinarias son potencialmente tan peligrosas que la FDA (Food and Drugs Administration) prohíbe totalmente su uso en animales de consumo, son el caso del cloranfenicol y los nitrofuranos. La administración prolongada o sobredosificación de nitrofuranos produce problemas en la fertilidad, cardíacos y reducción de la producción mientras que los residuos de cloranfenicol pueden producir en el humano anemia aplásica que puede llegar a ser letal. Los residuos de cloranfenicol y sus metabolitos son encontrados en todos los tejidos comestibles, leche y huevos (Falcón y otros, 2009).

Si bien el uso de medicamentos con fines terapéuticos, profilácticos y promotores de crecimiento en animales destinados al consumo humano resulta benéfica tanto en términos económicos como sanitarios al mejorar la rentabilidad de las explotaciones ganaderas y el bienestar animal, los residuos de esos medicamentos pueden llegar al consumidor a través de la cadena alimenticia produciéndole efectos nocivos como reacciones alérgicas resistencia bacteriana y otras formas de toxicidad aguda, así

como efectos más sutiles pero con efectos notables en la salud pública, como la perturbación de la flora bacteriana intestinal (Diez y Calderón, 2009).

La normativa de los antibióticos permitidos como aditivos así como los límites máximos de residuos (LMR) de antibióticos para cada alimento según especie y tejido de procedencia, la Unión Europea (UE) tiene establecido el Reglamento 2758/99 Pérez, (2005) el cual sirve de base para algunos países que aún no poseen sus propios reglamentos acordes a su realidad no siendo el caso de Estados Unidos quien cuenta con su propio reglamento al igual que otros países de Latinoamérica como Argentina y Uruguay Pérez (2005), en el Perú ya existe la Norma Técnica de Salud N° 120 (Ministerio de Salud y la Dirección Regional de Salud) que establece los límites máximos permisibles de medicamentos veterinarios en alimentos cárnicos y derivados como huevo y leche (Ministerio de Salud, 2016).

Debido a lo expuesto y por la importancia del tema, se plantea la realización de este estudio con el fin de determinar los niveles de enrofloxacin en carcaza de pollo comercializado en el mercado La Hermelinda de la ciudad de Trujillo, que es uno de los principales pues un 20% de la población hace su compra directa de productos de primera necesidad en este mercado y gran parte de los mercadillos zonales y bodegas, se abastecen de este gran mercado con productos de primera necesidad para atender la población, sumando entre ambos el 58% (UPAO 2010).

## II. REVISIÓN DE BIBLIOGRAFÍA

### 2.1. Enrofloxacin

La enrofloxacin es un derivado del ácido carboxílico y su nombre químico es 1-ciclopropil-7-(4-etil-1-piperazinil)-6-fluoro-1,4-dihidro-4oxo-3ácido quinolincarboxílico. Se encuentra en forma de cristal y tiene color amarillo pálido. Su punto de fusión se encuentra entre 219-221°C y es ligeramente soluble en agua. Se debe proteger de la luz solar y no congelar (Sumano y Ocampo, 2006).

#### 2.1.1. Espectro

La enrofloxacin tiene un amplio espectro de acción. Es notablemente eficaz contra una gran variedad de bacilos gramnegativos (*Escherichia coli*, *Salmonella spp*, *Haemophilus spp*, *Pasteurella spp*), con excepción de *Pseudomona aeruginosa*. Resulta menos potente contra bacterias grampositivas como los *Streptococcus spp*, *Staphylococcus spp* y la *Erysipelotrix rhusiopathiae*, pero de cualquier manera su eficacia es clínicamente cuantificable. Tiene una acción importante contra micoplasmas, aún a muy bajas concentraciones (Concentración mínima inhibitoria, CMI = 0.01-0.5 mg/mL), (Sumano y Gutierrez, 2000)

#### 2.1.2. Farmacodinámica

La enrofloxacin y su metabolito activo (ciprofloxacina), actúan como bactericidas porque inhiben la girasa de DNA (topoisomerasa II) y evitan la duplicación bacteriana; la respiración y la división celular se detienen, se interrumpen procesos celulares y se altera la integridad de la membrana.

Las fluoroquinolonas, como es el caso de la enrofloxacin, entran en la célula por porinas y se acumulan rápidamente en las bacterias, algunas de éstas, son capaces de rechazar la entrada del fármaco por un sistema de transporte dependiente de energía, pero la eficacia de las fluoroquinolonas depende de su concentración (Sumano y Ocampo, 2006).

Tienen un efecto posantibiótico, por el cual, se inhibe la proliferación de los patógenos. La girasa de DNA de animales superiores y mamíferos no es afectada por las fluoroquinolonas. La enrofloxacin es bactericida con su concentración mínima inhibitoria (Sumano y Ocampo, 2006).

### **2.1.3. Farmacocinética**

La adición del grupo etilo en la molécula de enrofloxacin mejora su absorción, pero disminuye su actividad contra *Pseudomonas sp.* La enrofloxacin muestra potencia y cinética muy parecidas a la danofloxacin, aunque se ha puesto menos énfasis en su distribución en tejido pulmonar. La enrofloxacin salió al mercado antes que la danofloxacin, y por ello, se conoce más sobre sus usos. Cuando se administra por vía oral tiene biodisponibilidad alta y logra una buena penetración a los tejidos. Se absorbe rápidamente en especies monogástricas y en becerros (Sumano y Ocampo, 2006).

### **2.1.4. Metabolismo y excreción**

Las fluoroquinolonas son eliminadas del organismo principalmente por metabolismo hepático y excreción renal. Por lo general son parcialmente metabolizadas en el hígado, y excretadas en bilis y orina a altas concentraciones de droga activa (droga inalterada o metabolito activo). Las rutas metabólicas comunes de estos agentes son la de

alquilación, glucuronización, oxidación, sulfoxidación, acetilación y ruptura del anillo piperazínico (1, 4). En animales la excreción renal es variable, aunque ocurre filtración glomerular para la fracción no ligada, y también secreción tubular activa. La filtración glomerular y la secreción tubular permiten alcanzar altas concentraciones urinarias. El proceso de secreción tubular es sensible al probenecid, y la excreción urinaria disminuye en el fallo renal. El porcentaje de excreción varía entre especies (Otero y otros, 2000).

#### **2.1.5. Concentración plasmática en pollos**

La concentración plasmática promedio en pollos a las 6, 12 y 24 h. después de administrar VO, una dosis de 25 ppm de enrofloxacin, en agua de bebida fueron de 0.241, 0.317 y 0.381 µg/ml respectivamente, y después de una dosis de 50 ppm, a las 6, 12 y 24h, fueron de 0.204, y 0.240 µg/ml, en ese orden (Sumano y Ocampo, 2006).

#### **2.1.6. Tiempo de retiro**

Es el período apropiado de abstención de un cierto fármaco de uso veterinario, con el fin de ceñirse al límite máximo de residuos asignado, constituye una responsabilidad de la autoridad nacional, definido como el intervalo transcurrido entre el momento de la última administración de un fármaco de uso veterinario y el momento en que el animal se puede sacrificar sin peligro como fuente de alimentos o que se puede consumir leche o los huevos sin que causen daño. En pollos y pavos se recomienda un tiempo de retiro de 7 y 10 días respectivamente (Rico y Ferraro, 2013)

La FDA (Federal Drug Administration), prohíbe en EUA el uso de enrofloxacin inyectable en animales destinados al consumo humano. No es recomendable utilizarla en vacas lecheras o que estén próximas a parir.

En caso de ser utilizadas, debe hacerse bajo vigilancia de un veterinario (Sumano y Ocampo, 2006).

## **2.2. Aplicación en la producción avícola.**

Los eventos que se desarrollan dentro una producción avícola con respecto al inicio de una enfermedad infectocontagiosa se da de manera inmediata, por esta razón, no se medica en función a un diagnóstico preciso, sino como respuesta a percepción empírica de esta, guiándose el médico veterinario por algunos signos y síntomas (Sumano y Gutierrez, 2000).

## **2.3. Aplicación Sanitaria**

Se ha documentado que para que la enrofloxacin y las fluoroquinolonas tengan una mayor eficacia, se les debe medicar en forma de bolo, con esta maniobra se procura lograr una concentración plasmática máxima ( $C_{pmax}$ ) en el menor tiempo posible ( $T_{max}$ ). Es ésta, una de las razones por las cuales resulta incongruente el uso de la enrofloxacin en premezclas (Sumano y Gutierrez, 2000).

## **2.4. Aplicación como promotor de crecimiento**

Las premezclas son consideradas como una presentación farmacéutica equivocada, susceptible de generar la aparición de cepas bacterianas resistentes a los antibacterianos más potentes de la historia, las fluoroquinolonas en general y en especial la enrofloxacin (Sumano y Gutierrez, 2000).

## **2.5. Reglamentos (FDA o OMS) normativas**

La Food Drugs Administration (FDA) y el Servicio de Inocuidad e Inspección de Alimentos (FSIS) del USDA, están a cargo de la regulación y el control de los residuos de antibióticos en la carne de res, de aves de corral y en los productos derivados del huevo. Se emplea estrategias para evitar que los residuos de antibióticos que superan una tolerancia establecida entren en el abastecimiento alimentario. Incluye pruebas de medicamentos aprobados y no aprobados cuyo uso se conoce o se sospecha en animales utilizados para producción de alimentos. El FSIS toma muestras de la carne para verificar si hay residuos e informa a la FDA. La Organización Mundial de la Salud, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, la Oficina Internacional de Epizootias y otras 14 organizaciones internacionales gubernamentales y no gubernamentales y sociedades profesionales han elaborado un marco de recomendaciones para reducir el uso excesivo y erróneo de antimicrobianos en los alimentos animales, a fin de proteger la salud humana (Organización Mundial de la Salud, 2005).

## **2.6. Residuos de antibióticos**

Los residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal generan productos de baja calidad y constituyen un riesgo para la salud de los consumidores, produciendo toxicidad aguda o crónica, efectos mutagénicos y carcinogénicos, desórdenes en el desarrollo corporal, reacciones alérgicas y fenómenos de resistencia bacteriana, entre otros (Lozano y otros, 2008).

## 2.7. Límites máximos permitidos para los principales antibióticos en carne de ave

Los límites máximos permisibles de antibióticos para productos cárnicos provenientes de ave, los que se muestran en el Cuadro 1, el cual se presenta a continuación:

Cuadro 1. Límites máximos permitidos para los principales antibióticos en carne de ave, establecidos por el Ministerio de Salud del Perú.

Principio activo	Residuo marcador	Especie animal	Matriz	(LMR)* (µg/kg)
Enrofloxacin	Suma de Enrofloxacin y de Ciprofloxacina	Aves	Músculo	100
			Piel Grasa	100
			Hígado	200
			Riñón	300

(NTS N°120–MINS/DIGESA,2016)

\*LMR= Limite Residual Máximo

## 2.8. Resistencia antimicrobiana y daños en la salud humana

La resistencia de las bacterias está en aumento, amenazando nuestra capacidad de tratar algunas de las enfermedades infecciosas más mortíferas. Enfermedades tales como la tuberculosis (TB), que se creía bajo control, resultan cada vez más difíciles de tratar, porque los medicamentos son menos eficaces, agotando constantemente el arsenal de medicamentos disponibles (Organización Mundial de la Salud, 2000).

Los riesgos para la salud humana son cada vez mayores, y se tornan evidentes cuando una sustancia cancerígena como el nitrofurano pasa de la carne de pollo a los seres humanos. Pero también hay otras sustancias

utilizadas en las raciones de alimentación para animales, que tienen graves efectos secundarios. Por ejemplo, el residuo de sustancias de la familia de la penicilina, puede provocar reacciones alérgicas en algunas personas; el uso prolongado y altas dosis de neomicina, gentamicina y estreptomicina, pueden tener efectos secundarios como sordera y problemas renales; la tetraciclina, puede empeorar una enfermedad renal. El trimetoprim está contraindicado para recién nacidos, mujeres embarazadas o personas con problemas renales (Minagri, 2009).

En un estudio realizado en Tacna nos indica que el 100% de las muestras de músculo e hígado de pollo, presenta un nivel de residuos de sulfamidas no superior a los límites máximos de residuos (LMR) permitidos por las normas internacionales, esto indicaría que posiblemente esta droga sea de mayor uso por los avicultores, pero que así mismo no se está respetando los periodos de retiro de dicha droga de 05 a 07 días y que igualmente podría ser causante de problemas sobre todo de resistencia bacteriana (Barrios, 2012).

## **2.9. Características de los métodos de análisis de residuos de medicamento veterinario**

Según el Codex Alimentarius, los métodos se pueden clasificar según la información y detalles analíticos, facilitados con respecto a la cuantía y al carácter del analito o analitos de interés (Pérez, 2005) son de tres tipos:

### **a) Tipo I**

Cuantifican el volumen de un analito específico o una clase de analitos e identifican positivamente el analito, por lo que ofrece el mayor grado de fiabilidad en lo que respecta a la cuantificación e identificación de la estructura del analito en el tipo de interés. Estos métodos pueden constituir un procedimiento único el que determinan tanto la concentración como la

identidad del analito o ser una combinación de métodos para cuantificar y confirmar la estructura del residuo de un medicamento veterinario. Por ejemplo: Técnica Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

### **b) Tipo II**

Determinan la concentración de un analito en el tipo de interés, pero no permiten una identificación inequívoca de la estructura. Estos métodos pueden emplearse también para verificar la presencia de un compuesto o clase de compuestos. Dos métodos de este tipo pueden facilitar información oportuna para un método del Tipo I cuando aplican procedimientos químicos diferentes. Por ejemplo: Prueba de ELISA.

### **c) Tipo III**

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

## **2.10. Método de ELISA (Enzyme Linked ImunoSorbent Assay)**

Elisa se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes

(antígeno o anticuerpo) marcado con una enzima e insolubilizado sobre un soporte (inmunoabsorbente) la reacción antígeno–anticuerpo quedará inmovilizada y, por tanto, será fácilmente revelada mediante la adición de un sustrato específico que al actuar la enzima producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o un colorímetro.

Los diferentes tipos de ELISA son los que se enumeran a continuación:

- **Anticuerpos marcados:**
  - ELISA Directo
  - ELISA Indirecto
  - ELISA sándwich *f*
  - Doble (DAS) *f*
  - Heterólogo (HADAS)
  
- **Antígeno marcado**
  - ELISA competitivo

### **2.11. Método de análisis Test de ELISA Enrofloxacino**

La enrofloxacin es una fluoroquinolona que inhibe la actividad de la ADN girasa bacteriana. Fue el primer antimicrobiano de fluoroquinolona que se utilizó en infecciones veterinarias por *E. coli*, *Salmonella*, *Pasteurella*, *Mycoplasma* y *Hemophilus*. Los LMR para la suma de enrofloxacin y su metabolito activo ciprofloxacino se han establecido en 100 µg / kg (ppb) para el tejido muscular y la grasa, y 100 µg / kg (ppb) para la leche. Max Signal Enrofloxacin ELISA kit, permite a las agencias gubernamentales, fabricantes de alimentos y organizaciones de aseguramiento de la calidad para detectar la Enrofloxacin y su principal

metabolito ciprofloxacino a un nivel tan bajo como 0.5 ppb en varios tipos de muestras y para satisfacer las necesidades de los clientes acerca de la seguridad de alimentos. Max Signal Enrofloxacin ELISA kit de prueba proporciona un método de extracción único, que es precisa, rápida, rentable y fácil de usar, las características del kit son (Stephan y otros, 2008):

- La extracción de enrofloxacin de pienso, miel, carne, leche, tejido, huevos embrionarios, suero y orina puede ser terminada en 10–30 minutos con una alta tasa de recuperación de 75% – 95%.
- Un ensayo ELISA rápido (menos de 2 horas con respecto al número de muestras).
- Alta reproducibilidad

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Área de investigación y toma de muestras.**

Las muestras fueron tomadas de los puestos de venta de carne de pollo del Mercado la Hermelinda, durante el mes de junio y los análisis de ELISA se realizaron en el Laboratorio Microclin SRL de la ciudad de Trujillo.

#### **3.2 Tamaño de muestra.**

El diseño del muestreo toma como referencia el trabajo de Barrios (2012) en el que se realizó un muestreo no probabilístico de la población. Para nuestro estudio se tomaron un total de veinticinco muestras.

#### **3.3 Proceso de muestreo**

El muestreo se realizó aleatoriamente en los diferentes puestos de expendio de pollo en el mercado La Hermelinda, a lo largo de 25 días, para incrementar la posibilidad de encontrar residuos de antibióticos.

Se adquirieron 25 muestras de 50 gramos c/u, de músculo de pechuga. Las muestras se empacaron en bolsas de polietileno de primer uso debidamente rotuladas y luego se congelaron a  $-18 \pm 1$  °C hasta que fueron analizadas.

#### **3.4 Variable independiente**

- Uso de enrofloxacin en la producción de pollos.

### **3.5 Variable dependiente**

- Nivel de residuos de enrofloxacin en carne de pollo.

### **3.6 Materiales**

#### **3.6.1 Material biológico:**

- Muestras de carne de pollo

#### **3.6.2 Equipos empleados**

- Lector Biotek EL X 800
- Centrifugadora
- Micropipetas

#### **3.6.3 Otros materiales:**

- Bolsas de polietileno.
- Guantes descartables.
- Cajas térmicas.
- Tijeras y pinzas.
- Etiquetas.
- Tubos de ensayo descartables
- Kit de ELISA

### 3.7 Métodos

#### 3.7.1 Preparación de muestra

- a. Se eliminó la grasa de la muestra.
- b. Se trituro la pechuga de pollo de forma homogénea.
- c. Pesar 1.0 g de la muestra de pollo triturada
- d. En un tubo ensayo descartable se agregó un gramo de muestra de carne y se añadió 4 ml de metanol al 35%.
- e. Se centrifugo por 10 minutos a máxima velocidad 4000 rpm.
- f. Después se agregó 0.5 ml del sobrenadante al vial,
- g. Se añadió al vial 0.5 ml. de extracción de carne II (dilución de 10x a 9 volúmenes con agua destilada, kit), más 1.5 mL de metanol al 35%
- h. Se toma 50  $\mu$ L del sobrenadante para el ensayo.

Nota: Dilución con factor 10.

#### 3.7.2 Protocolo ELISA

- a. Se añadió 50  $\mu$ L de cada uno de los estándares de enrofloxacina en duplicado en diferentes pocillos.
- b. Se adiciono 50  $\mu$ L de cada muestra por duplicado en diferentes pocillos de muestra
- c. Se agregó 50  $\mu$ L del anticuerpo # 1 (kit) y mezclar bien, agitando manualmente la placa de forma suave durante 1 minuto.
- d. Se incubo la placa durante 30 minutos a temperatura ambiente (20 – 25 °C).
- e. Se decantó y se aspiró la solución de los pocillos y se desechó el líquido. Se lavó la placa 3 veces, con 250  $\mu$ L 1x solución de lavado(kit). Después del último lavado, se invierta la placa y suavemente y se colocó la placa seca sobre toallas de papel

secante.

- f. Se añadió 150  $\mu\text{L}$  de 1 x anticuerpo # 2 a cada pocillo e incubo por 30 minutos a temperatura ambiente.
- g. Se decantó y aspiró la solución de los pocillos y desecho el líquido. Se lavó la placa 3 veces con 250 ml de solución de lavado 1x. y después del último lavado, se invirtió la placa y suavemente se colocó la placa seca sobre papel secante.
- h. Se agregó 100  $\mu\text{L}$  de sustrato TMB (Tetrametil–Bencidina) kit, después de añadió el sustrato, se mezcló la solución agitando suavemente la placa en forma manual durante 1 minuto mientras se incubaba.
- i. Después se incubo por 15 min. a temperatura ambiente (20 – 25°C) se añadió 100  $\mu\text{L}$  Del tampón de parada (kit) para detener la reacción enzimática
- j. Fue leída inmediatamente después de la adición de tampón de parada en un lector de placas con 450 nm. Longitud de onda. (Lector: BIOTEK X800)

### **3.8 Análisis de datos**

Con los resultados obtenidos en el laboratorio a través de la técnica de ELISA, permitió hacer una comparación de los niveles de enrofloxacin encontrados con el límite máximo permitido para este producto establecido por la Norma Sanitaria N° 120–MINS/DIGESA–V.01, además estos valores se expresan en valores de frecuencia, porcentajes, promedios y gráficos estadísticos.

Para una mejor expresión de los resultados y teniendo en cuenta otros trabajos realizados, se optó por calificar los resultados en las siguientes categorías:

		( $\mu\text{L} / \text{kg}$ )
- 0	: Sin contaminación.....	0–0
- $\leq$ LMR	: Nivel bajo de contaminación...	01–100
- $>$ LMR	: Nivel alto de contaminación....	101 a más.

#### IV. RESULTADOS

En el Cuadro 2 se muestran los resultados de residuos de enrofloxacin encontrados en las muestras de carne de pollo, mediante la prueba de ELISA, donde se observa que los valores encontrados varían entre 0 µL /Kg y 41.20 µL /Kg, el cual podemos visualizar en el Anexo 9

Cuadro 2. Contenido de enrofloxacin en muestras de carne de pechuga de Pollos (µg/kg).

N° Muestras	µg/kg	N° de muestras	µg/kg
1	0.00	14	0.40
2	0.00	15	0.00
3	0.00	16	1.80
4	0.80	17	0.00
5	41.2	18	0.60
6	0.20	19	0.20
7	0.00	20	0.00
8	0.00	21	6.60
9	0.00	22	27.80
10	0.20	23	0.20
11	0.00	24	0.40
12	0.00	25	2.00
13	0.40		

Tal como se indica en el Cuadro 3, de un total de 25 muestras evaluadas, 14 mostraron nivel de contaminación baja por enrofloxacin, lo que corresponde a un 56%, mientras que el 44% muestras no tuvieron ningún residuo de enrofloxacin.

Cuadro 3. Nivel de contaminación por enrofloxacin en carne de pechuga de pollos

<b>Nivel de contaminación</b>	<b>Frecuencia</b>	<b>%</b>
Sin contaminación	11	44
Baja contaminación	14	56
Alta contaminación	0	0
Total	25	100

## V. DISCUSIÓN

En el presente trabajo, se evidenció la presencia de niveles de enrofloxacin en la carne de pechuga de pollo comercializada en el mercado La Hermelinda en un 56% de las muestras, lo que coincide con lo reportado por Barrios (2012), en un estudio realizado en la ciudad de Tacna, donde encontró que el 85% de las muestras de carne de pollo analizadas por HPLC (cromatografía líquida de alta resolución) contenía residuos de flouroquinolonas, familia a la que pertenece la enrofloxacin.

Estos resultados también coinciden con lo encontrado por Albújar (2015), quien analizó muestras de hígado de pollos comercializados en el mercado Modelo de Piura, donde encontró que el 34.69% de los hígados, contenían residuos de alguno de cuatro antimicrobianos (tetraciclinas, sulfametoxazol/trimetropin y gentamicina), analizados por el método de las tres placas.

En este estudio, el máximo valor encontrado fue de 41.2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , el cual, se encuentra dentro del límite permisible establecido en la Norma Técnica Peruana que establece un rango máximo de 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de músculo de pollo. Estos resultados, son inferiores a lo encontrado por Barrios (2012) en Tacna, quién reportó que el 35% de las muestras de carne de pollo tenían valores superiores al límite máximo de residuo para fluoroquinolonas e igualmente son inferiores con lo reportado por Azañero y Chiroque (2010), quienes encontraron en el Cercado de Lima el 100% de las muestras de carne de pollo con residuos superiores al límite residual máximo para norfloxacin y 50% para ciprofloxacina.

El nivel de contaminación de la pechuga de pollo, con residuos de antibióticos obtenidos en este trabajo es del 56%, lo que se contrapone a lo mencionado por Lozano y Arias (2008), quienes nos dicen, que la carne

debe estar libre de medicamentos veterinarios para ser un alimento inocuo, ya que la presencia de estos residuos provoca problemas de salud al humano, tales como: reacciones alérgicas, la generación de cepas bacterianas resistentes y su transmisión, lesiones óticas, hepáticas y renales, sordera congénita, afecciones endocrinas y la genotoxicidad y generación de anemia aplásica.

Con respecto a la resistencia bacteriana ocasionada por el consumo de alimentos contaminados por estas drogas, el MINSA (2010), nos informa, que la Dirección General de Medicamentos, Insumos y Drogas, ha creído convenientes considerar levofloxacino (fluoroquinolona), única y exclusivamente para el tratamiento de pacientes con tuberculosis multidrogaresistentes; esta droga pertenece a la misma familia que la enrofloxacin por lo que podemos inferir que los residuos presentes en la carne de pollo pueden estar influyendo en la resistencia a esta droga en humanos.

## **VI. CONCLUSIONES**

Después de comprobarse presencia de residuos de enrofloxacin en tejido muscular de pollos (pechuga) por medio del método ELISA, se puede concluir que no se están respetando los períodos de retiro del o de los productos utilizados, en la producción de esta especie.

Al encontrar que el 56% de las muestras contenían residuos de enrofloxacin, hace sospechar que lo mismo puede estar ocurriendo con el resto de antibióticos.

## **VII. RECOMENDACIONES**

Realizar más estudios en los cuales se analicen otros tipos de antibióticos en carne de pollo que se expende en diferentes lugares de la ciudad de Trujillo.

Realizar evaluaciones de residuos de antibióticos en otros órganos y tejidos comestibles de las aves como hígado y grasa.

A nivel de ejercicio profesional, se debe respetar el período de retiro de estas drogas para evitar la presencia de residuos que pueden afectar la salud.

Alertar a SENASA y DIGESA para que cumplan el rol encomendado en las labores de inspección y control y evitar los peligros para la salud.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

Albujar, R. 2015. Residuos de antimicrobianos en hígados de pollo comercializados en el mercado Modelo de Piura por el método biológico de las tres placas. Facultad de Zootecnia. Universidad Nacional de Piura.

Azañero, G. y Chiroque, M. 2010. Detección y cuantificación de residuos antimicrobianos en tejido muscular de pollo en cuatro mercados de Lima Cercado. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional de San Marcos.

Barrios, L. 2012. Estudio de los niveles de residuos de antibióticos en músculo e hígado de pollos beneficiados en la ciudad de Tacna, Perú. Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann.

Canalejo, J. y Coruna A. 1990. Protocolos de Tratamiento elaborados por la comisión clínica de profilaxis y terapéutica antibiótica, Ed. Instituto Nacional de Saude.

Cancho, G.; García, F. y Simal, G. 2000. El uso de los antibióticos en la alimentación animal: Perspectiva actual. Ciencia y Tecnología.

Carlos, F. y Alvarado, A. 2010. Seguridad alimentaria en alimentos de origen animal: Residuos químicos (parte 1) Laboratorio Bioservice Srl.

Diez, P. y Calderón, N. 2009 The Reveurs de Lange. Empleo de antibióticos en veterinaria Recuperado de:

<http://www.cfnavarra.es/salud/anales/textos/vol22/suple3/pdf/26resi.pdf>

Falcon, N.; Ortega C.; Gorniak S.; Villamil C.; Rios C. y Simon M. 2009. El problema de la resistencia a antibióticos en salud pública. Grupo de trabajo: Residuos y Consecuencias del uso de Drogas en Medicina Veterinaria. Proyecto Sapuvetnet III.

Kilinc, B.; Meyer, C. y Hilge, V. 2007. Evaluation of the EEC four-plate test and Premi test for screening antibiotic residues in trout (*Salmo trutta*). *International Journal of Food Science & Technology*, 42(5):625–28.

Lozano, A.; María, C.; Arias, M. y Diana C. 2008. Residuos de fármacos en alimentos de origen animal: Panorama actual en Colombia.

Ministerio de Agricultura y Riego, 2009 Residuos químicos en carnes y su relación con la normatividad,

Ministerio de Salud del Perú. DIGEMID 2010 Petitorio Nacional Único de Medicamentos Esenciales 2010.

Ministerio de Salud 2016. Norma Sanitaria que Establece los Límites Máximos de Residuos de Medicamentos Veterinarios en Alimentos de Consumo Humano.

Gimeno, O. y Ortega, C. 2007. Resistencia bacteriana a los antibióticos: implicaciones en salud pública veterinaria. *Revista de Salud Pública Veterinaria (Bolivia)*, 2(1):8–9.

Orozco, B. y Velásquez, R. 1999. Determinación de residuos de tetraciclina. *Revista Científica*, 1–5 p.

Organización Mundial de la Salud (OMS). 2005. Perspectivas políticas de la OMS sobre medicamentos. La contención de la resistencia a los antimicrobianos. Ginebra (WHO/PSM/2005.1)

Otero, J.; Mestorino, N.; Errecalde, J. 2000, Enrofloxacin una fluoroquinolona de uso exclusivo veterinaria Parte II farmacocinética y toxicidad, 1. Departamento de Salud Pública Veterinaria. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Litoral 2 Cátedra de Farmacología, Farmacotecnia y Terapéutica. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

Pérez, J. 2005. Ensayos de familiarización en la técnica de detección de residuos de antibióticos y sulfamidas en músculo esquelético animal por el método de las cuatro placas. Buenos Aires: Universidad de Belgrano.

Rico, S. y Ferraro, D. 2013. Residuos de Medicamentos Veterinario, Asociación Pro-calidad de leche y sus derivado (APROCAL).

Serrano, D. 2002. Biodisponibilidad de los antimicrobianos en los nuevos sistemas de producción. Recuperado de: <http://www.apavic.com>.

Stephan, G.; Thayer y Charles W. 2008. Serologic. Procedures. En: A Laboratory Manual For The Isolations, Identification And Characterizacion Of Avian Pathogens. 5<sup>th</sup> Edition.

Sumano, L. y Ocampo, C. 2006. Farmacología Veterinaria. 3 ed. México. McGraw– Hill; 228

Sumano, L. y Gutierrez, L. 2000. Problemática del uso de enrofloxacin en la Avicultura de México. Departamento de Fisiología y Farmacología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F.

UPAO (Universidad Privada Antenor Orrego) 2010. Estudio de Mercados y Supermercados Trujillo, julio 2010. Elaborado por INVESTIGA.

Recuperado de:

[http://www.upao.edu.pe/upload/recursos/investiga/estudios/2010/INFORME\\_MERCADOS\\_Y\\_SUPERMERCADOS.pdf](http://www.upao.edu.pe/upload/recursos/investiga/estudios/2010/INFORME_MERCADOS_Y_SUPERMERCADOS.pdf)

Trolledenier, H. 1980. Antibióticos en medicina veterinaria. Ed. Acribia. Zaragoza

## IX. ANEXOS



Anexo 1. Muestra de pechuga de Pollo.



Anexo 2. Muestras de pechuga de Pollo con metanol y centrifugadas.



Anexo 3. Kit de ELISA Max Signal.



Anexo 4. Lector Biotek EL X800.