
DETERMINACIÓN DE NIVELES RESIDUALES DE TETRACICLINA EN CANALES BOVINAS POR LA TÉCNICA DE ELISA EN EL FRIGORÍFICO *FRIOGAN* (LA DORADA)

Jackeline Franco¹
Marlyn Romero Peñuela²
Gonzalo Taborda³

RESUMEN

En las políticas sanitarias colombianas se estableció la importancia del control de residuos de medicamentos veterinarios, considerando la preocupación mundial por sus implicaciones en salud pública. El trabajo buscó detectar y cuantificar las concentraciones de residuos de tetraciclinas en músculo de 114 animales sacrificados en *FRIOGAN* (La Dorada, Caldas) por ELISA, siendo referencia los LMR de la Unión Europea (100 ppb) y del Codex Alimentarius (200 ppb). El 61,5% de las muestras presentaron concentraciones superiores a 100 ppb y el 23,7% a 200 ppb. Los resultados sugieren que fallan las Buenas Prácticas en la Administración de Medicamentos en la producción primaria y que existen falencias en la inocuidad cárnica.

Palabras clave: LMR, residuo de medicamento, tetraciclina, inocuidad, ELISA.

DETERMINATION OF RESIDUAL TETRACYCLINE LEVELS IN BOVINE CARCASSES BY MEANS OF ELISA IN THE *FRIOGAN* SLAUGHTERHOUSE (LA DORADA, CALDAS, COLOMBIA)

ABSTRACT

The Colombian sanitary policies have established the importance in the control of veterinary medicines residues, considering the world-wide concern due to its public health implications. The objective of this research was to detect and to quantify, by means of ELISA, the tetracycline residue concentrations in the muscle of 114 slaughtered animals at the Friogan slaughterhouse (La Dorada-Caldas), using the MRL of the European Union (100 ppb) and the Codex Alimentarius (200 ppb) as reference. The results showed that 61.5% of the samples presented concentrations above 100 ppb and 23.7% above 200 ppb. These results suggest that the Good Practices of Medicine Administration are failing, and that there are errors in meat innocuousness.

Key words: MLR, medicine residues, tetracycline, innocuousness, ELISA.

¹ Estudiante del Programa de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de Caldas. A.A. 275, Manizales, Caldas, Colombia. Tel: (6) 8781516, e-mail: jackie07@hotmail.com

² Profesor Departamento de Salud Animal, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Caldas. A.A. 275, Manizales, Caldas, Colombia. Tel: (6) 8781516, e-mail: marlyn.romero@ucaldas.edu.co

³ Profesor Departamento de Química, Universidad de Caldas. A.A. 275, Manizales, Caldas, Colombia. Tel: (6) 8781500, e-mail: gtaborda@ucaldas.edu.co

Trabajo financiado por la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad de Caldas.

INTRODUCCIÓN

En Colombia actualmente se busca implementar una política sanitaria y de inocuidad para la cadena de la carne bovina, cuyo objetivo es proteger la salud pública y la sanidad animal, aumentar la competitividad del sector productivo y fortalecer la admisibilidad de sus productos en los mercados internacionales (1, 2).

Dentro de los limitantes identificados en materia de inocuidad, se encuentra la deficiencia del sistema de inspección, vigilancia y control para identificar, controlar y prevenir los peligros biológicos, ambientales y químicos de la cadena agroalimentaria cárnica (2). Con relación a los peligros químicos, es de resaltar la importancia de los medicamentos veterinarios, por su amplio uso en la producción primaria con propósitos terapéuticos, profilácticos y/o productivos (1, 3, 4, 5); como también por la presencia de los residuos o sus metabolitos, que pueden estar presentes en la carne y otros tejidos, cuando su uso es inapropiado (6).

Los residuos de estas sustancias o sus metabolitos en la carne u otros alimentos de origen animal, pueden causar efectos adversos a los consumidores como hipersensibilidad (3, 7), inhibiciones terapéuticas (8) y resistencia microbiana (9, 10, 11, 12). De otra parte, algunos medicamentos usados como promotores de crecimiento pueden afectar la calidad de la carne, porque incrementan la producción de tejido conectivo y la fracción insoluble de colágeno intermuscular, disminuyendo la terneza (3). Se ha descrito además, que interfieren en algunos procesos de fermentación de la carne, esenciales en la industrialización de los productos cárnicos madurados (10).

Uno de los principales residuos de antibióticos evaluados en alimentos son los del grupo de las tetraciclinas (7), porque son ampliamente usados por su capacidad bacteriostática contra una gran variedad de microorganismos patógenos, para el tratamiento de mastitis en bovinos o en

adición de dosis subterapéuticas en el alimento del ganado con fines profilácticos (4, 13).

En la literatura se han descrito diversos métodos analíticos para la estimación de residuos de antibióticos. De acuerdo con la comisión del Codex Alimentarius (14), se clasifican en tres tipos: Tipo I, Tipo II y Tipo III.

Los métodos analíticos Tipo I, denominados métodos de referencia o confirmatorios, son aquellos que ofrecen el mayor grado de confiabilidad en la cuantificación e identificación del analito (14), entre los cuales se encuentra la cromatografía combinada con espectrometría de masa, detector de arreglo de diodos o detector de fluorescencia (15). El Límite de Detección (LD) de este método está estimado entre 20 y 30 $\mu\text{g kg}^{-1}$, dependiendo si el analito es *oxitetraciclina*, *tetraciclina*, *clortetraciclina* o *doxiciclina*, y la recuperación que pueden alcanzar estos métodos oscila entre 97% y 107% (16, 17). A pesar de su alto desempeño, presentan como desventaja la dificultad para analizar grandes volúmenes de muestras en cortos periodos de tiempo, lo que es indispensable para llevar a cabo programas de vigilancia y control (15).

Los métodos Tipo II, permiten determinar la concentración del analito pero no su identificación exacta, por lo que se requiere realizar un segundo análisis para dicha determinación (14). Entre ellos se encuentra la cromatografía líquida con detector UV y la cromatografía en capa fina (10, 15). Ésta permite analizar simultáneamente varias muestras sobre la misma placa, con un costo relativamente bajo, y una selectividad y sensibilidad aceptables. Sin embargo, requiere laboriosas etapas de tratamiento de muestra y purificación con el fin de evitar interferencias, lo que incrementa el tiempo de análisis y su costo (16).

El Tipo III de los métodos analíticos, son aquellos que determinan ausencia o presencia de un compuesto y se denominan de tamizaje o de barrido (14). En esta categoría se incluyen

los métodos microbiológicos y los ensayos de inhibición de enzimas. Dichos métodos son los más útiles en los programas de control por su capacidad de manejar un alto número de muestras, comodidad y bajo costo (15, 18). Los métodos microbiológicos, han sido tradicionalmente empleados para la detección de residuos de antibióticos y se basan en la inhibición del crecimiento bacteriano, principalmente del *Bacillus Stearothermophilus*, y *B. Subtilis* sembrado en un medio con pH 6, tiene un LD de 1 ng para *doxicilina*, 8 ng para *oxitetraciclina* y 5 ng para *tetraciclina* (17). Estos métodos microbiológicos son menos específicos y sensibles que los basados en técnicas inmunoquímicas, porque existen múltiples sustancias que pueden ocasionar inhibición bacteriana, pudiendo generar falsos positivos (16). Respecto a los ensayos inmunoquímicos, el formato más usado para la determinación de residuos es el ELISA, ha sido descrito como la técnica más práctica para el tamizaje de residuos químicos en alimentos y materiales biológicos; presenta valores de sensibilidad altos, teniendo en cuenta que los límites de detección confiables de este procedimiento se sitúan en rangos de 6 a 60 ppb, también es selectivo, sencillo, rápido y de bajo costo (16). La FDA (*Food and Drugs Administration Agency*) incluye esta técnica en la lista de procedimientos oficiales para la determinación de tetraciclinas en productos comestibles (19).

Atendiendo la necesidad de asegurar los estándares sanitarios internacionales por parte de los productos pecuarios colombianos, se está actualizando la legislación sanitaria del país relacionada con la residualidad de medicamentos (20, 21). En el año 2005, el Consejo Nacional de Política Económica y Social de Colombia (CONPES) estableció como política de la cadena cárnica y láctea, el desarrollo de programas oficiales de control de residuos y contaminantes químicos a cargo del Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA) y del

Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) (1, 2, 20). También, planteó mejorar la capacidad diagnóstica en inocuidad con planes de muestreo y equipos de alta tecnología que amplíen el espectro de detección (1, 2), acciones que vienen siendo adelantadas por el Laboratorio Nacional de Insumos Pecuarios (LANIP) (20). Además, se han promulgado decretos para la creación y puesta en funcionamiento del Plan Nacional de Residuos, reglamentación acerca de medicamentos veterinarios y contaminantes químicos no autorizados en ganado que son regulados con base en el Codex Alimentarius (20).

A pesar de este esfuerzo legislativo, aún se desconoce el estatus sanitario actual del país en materia de residuos de antibióticos (20, 21), y no se cuenta con sistemas de diagnóstico establecidos para dicho fin (21). Principalmente porque las investigaciones y determinaciones de la residualidad en Colombia no habían correspondido a una política nacional sino a esfuerzos aislados y esporádicos de particulares y de diferentes universidades que buscaban realizar aportes al estudio de esta problemática (20, 21).

Se evidencia así la necesidad de desarrollar estudios que constituyan un soporte científico para el desarrollo de programas de vigilancia y control de residuos químicos en los alimentos destinados al consumo nacional y para exportación (20). Motivo por el cual, se planteó como objetivo del presente trabajo detectar y cuantificar los residuos de estos antimicrobianos en músculo diafragmático de ganado bovino beneficiado en *FRIOGAN* (La Dorada), dando un soporte al diagnóstico de la situación con respecto a los Límites Máximos de Residuos (LMR) establecidos internacionalmente por el Codex Alimentarius (CA) (22) y la Unión Europea (UE). También se buscó relacionarlos con la presencia de lesiones meritorias de decomiso.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestra

En julio de 2007, se tomaron un total de 138 muestras de músculo diafragmático de bovinos sacrificados en FRIOGAN (*Frigoríficos Ganaderos de Colombia S.A.*), situado en La Dorada (Caldas). Se realizó un muestreo aleatorio simple de los lotes que ingresaron diariamente al frigorífico de acuerdo a la norma CAC/GL 33-1999 del CA (23). Se escogieron 4 lotes al azar, que comprendían animales de la misma procedencia y el mismo sexo. Usando como referencia un 95% de probabilidad para detectar una incidencia de los residuos no conformes en el lote del 10%, se tomaron 29 muestras primarias por cada lote seleccionado. A los animales seleccionados se les realizó la inspección *ante-mortem* y *post-mortem*, cuyos resultados se registraron en el formato respectivo.

Siguiendo el procedimiento establecido por el CA (23), que permite el análisis de productos primarios como la carne o productos alimenticios considerados despojos –como el hígado y los riñones–, se recolectaron 500 gramos de músculo diafragmático bovino, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante del *kit* comercial de ELISA utilizado. Las muestras se almacenaron en bolsas herméticas y se mantuvieron congeladas a -20°C hasta su procesamiento en el laboratorio.

Procesamiento de la muestra

114 de las muestras de músculo diafragmático se analizaron con el *kit* de ELISA comercial (*Ridascreen® Tetracyclin, R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany*), siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de descongelar a temperatura ambiente la muestra de músculo diafragmático, se eliminó la grasa y se homogeneizó. De esta matriz se tomaron 5 gramos (g) y se mezcló con 25 mililitros (ml) de *buffer McIlvain*. A continuación, se agitó durante 20 minutos y se centrifugó por 10 minutos, repitiendo dos veces el proceso. Los extractos

centrifugados se mezclaron y se pasaron a través de papel filtro; este filtrado se purificó mediante columnas de extracción en fase sólida SPE (*RIDA® C18 column R2002 R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany*), previamente activadas con metanol al 100% y agua destilada grado reactivo. El residuo se eluyó con ácido oxálico/metanol (1,8 g/L).

Ensayo Inmunoabsorbente Ligado A Enzima (ELISA)

La determinación cuantitativa de tetraciclina se realizó mediante ensayo inmunoensayo competitivo en microplaca de *kit* comercial de ELISA (*Ridascreen®, Tetracyclin*), donde los contenedores de la microplaca estaban recubiertos con proteína conjugada. A éstos, se adicionaron en orden: la muestra o los estándares, el anticuerpo de anti-tetraciclina, un conjugado de anticuerpo marcado con enzima, el sustrato, y finalmente el cromógeno. La adición de una solución *stop* cambió el azul en amarillo, lo que permitió su determinación espectrofotométrica a 450 nm. Las microplacas se montaron con 6 estándares para la curva de calibración, un blanco de muestra y dos muestras fortificadas. La lectura de la prueba se realizó en lector de ELISA (*Multiskan EX, Labsystem 355*).

Validación

Se prepararon cuatro soluciones fortificadoras (150 ppb, 100 ppb, 50 ppb y 20 ppb). Éstas fueron añadidas a muestras previamente homogeneizadas y pesadas de músculo de feto de ternero a término, de una vaca gestante al momento del sacrificio. Estas soluciones se mantuvieron a -20°C . La validación de la técnica se realizó utilizando un *kit* de ELISA (*Ridascreen®, Tetracyclin*), dividido en partes iguales y montados en momentos diferentes.

Análisis Estadístico

Se construyó una base de datos en *EXCEL 6.0*. Para la validación estadística de los resultados se utilizó la estadística descriptiva usando el programa *WIN EPISCOPE 2.0*.

RESULTADOS

Para establecer los niveles de aceptación de las muestras evaluadas se tomaron como referencia los LMR recomendados por el CA (200 ppb) y la UE (100 ppb). La técnica ELISA permitió identificar alguno de los principios del grupo de las tetraciclinas en las 114 muestras evaluadas (Tabla 1).

De acuerdo a los criterios anteriormente mencionados, el 61,5% (n=70) de las muestras de músculo con residuos detectables de *oxitetraciclina* superaron el LMR de la UE y el 23,7% (n=27) excedieron el límite del CA (Figuras 1 y 2).

Tabla 1. Distribución de las muestras de acuerdo su concentración de residuos de oxitetraciclina en partes por billón (ppb).

Concentración (ppb)	No.	%
1 - 50	2	1,8
51 - 100	42	36,8
101 - 150	33	28,9
151 - 200	10	8,8
201 - 250	6	5,2
251 - 300	8	7,0
301 - 500	10	8,8
501 - 1000	2	1,8
1001 - 2000	1	0,9
TOTAL	114	100

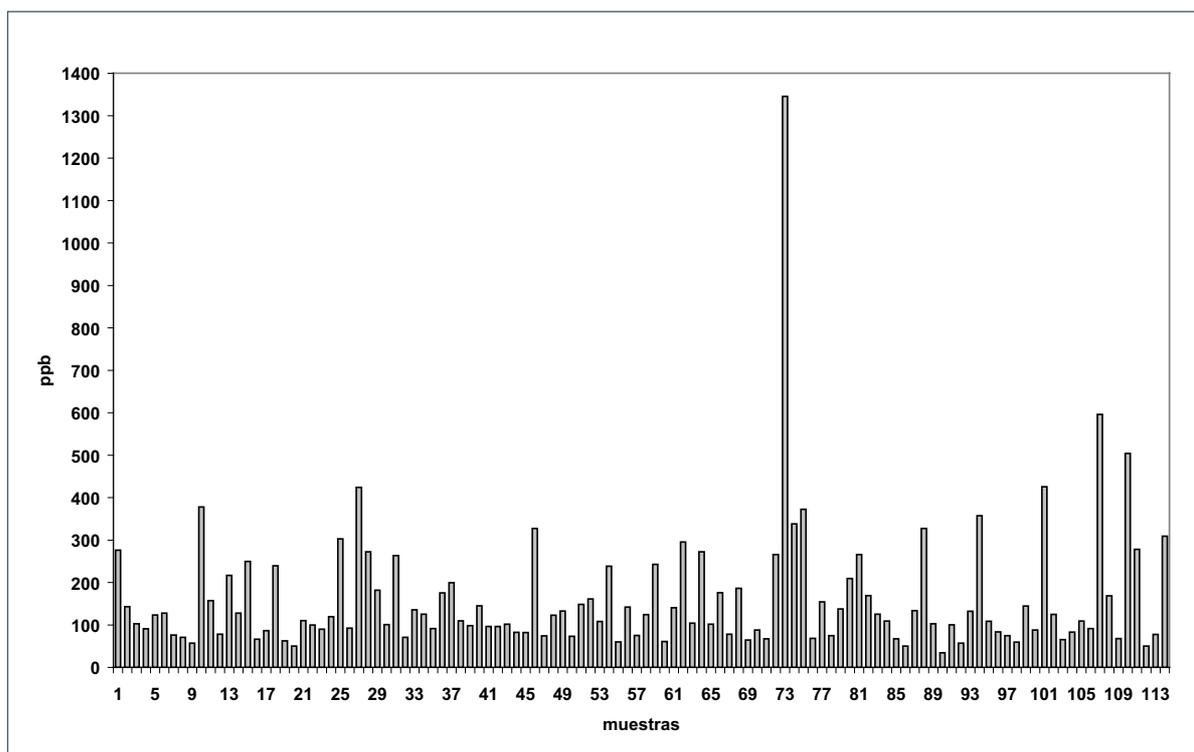


Figura 1. Concentraciones detectables de *oxitetraciclina* en la muestras de músculo diafragmático en comparación con el LMR establecido por la Unión Europea (100 ppb).

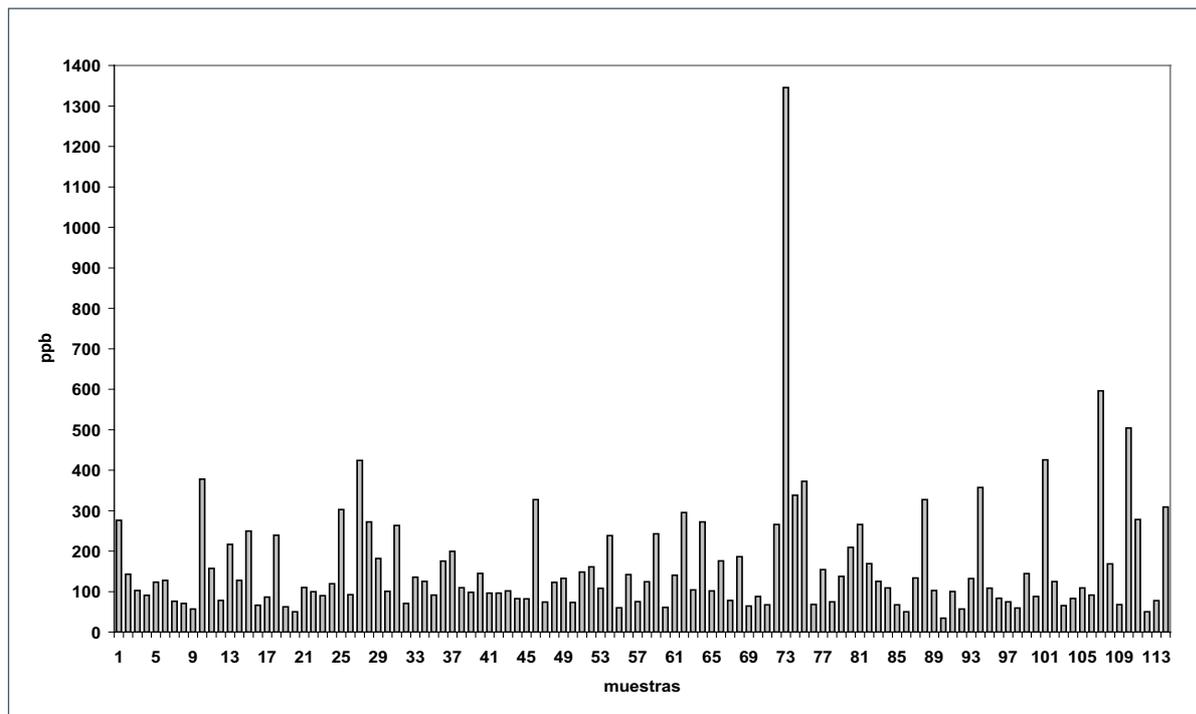


Figura 2. Concentraciones detectables de *oxitetraciclina* en la muestras de músculo diafragmático en comparación con el LMR establecido por el Codex Alimentarius (200 ppb).

El grupo evaluado pertenecía a la raza cebú y procedía de sistemas productivos de ceba. Estuvo conformado por 48 novillos, 35 toretes, 5 toros y 26 vacas.

El 74,5% de los animales (n=85/114) no presentó lesiones macroscópicas meritorias de decomiso, mientras que el 25,5% restante (n=29/114) presentó problemas respiratorios y hepáticos

en la inspección *post-mortem*, con dictamen de decomiso parcial.

De las muestras que presentaron un nivel de residuos superiores a 100 ppb (n=70), a 16 se les efectuó decomiso parcial por lesiones como enfisema, neumonía y pulmón hemorrágico; y en menor medida a absceso hepático, edema, cirrosis y regurgitación (Tabla 3).

Tabla 3. Correlación de la condición contra el diagnóstico de la inspección.

	Total	E	%	AH	%	N	%	ED	%	PH	%	R	%	C	%
TOTAL	16	5	31,3	1	6,25	4	25	1	6,25	4	25	1	6,25	2	12,5
NV	5	2	40	0	0	1	20	0	0	1	20	1	20	1	20
TT	3	1	33,3	1	33,3	1	33,3	0	0	0	0	0	0	0	0
T	2	1	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	50
V	6	1	16,7	0	0	2	33,3	1	16,7	3	50	0	0	0	0

E: Enfisema; AH: Absceso Hepático; N: Neumonía; ED: Edema; PH: Pulmón Hemorrágico; R: Regurgitación; C: Cirrosis. NV: Novillo; TT: Torete; T: Toro; V: Vaca.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se observó una alta proporción de muestras con concentraciones superiores a los LMR utilizados como punto de referencia, donde 61,1% fueron superiores a 100 ppb y 23,75% a 200 ppb. Esto concuerda con los resultados presentados por Muriuki *et al.* (24), quienes obtuvieron un 20% de las muestras con residuos de *oxitetraciclina* superiores a 200 ppb en cinco plantas de beneficio de la ciudad de Nairobi. También corresponde a los resultados de Arango (2001) (25), quien estableció la presencia de estos mismos residuos en leche cruda y pasteurizada en la ciudad de Manizales, mediante el uso de la técnica de difusión estándar *Delvotest*. De un total de 111 muestras analizadas, se obtuvieron 26 muestras (23,4%)

con valores por encima de los LMR y 36 muestras con niveles críticos o en límites tolerables.

Es de resaltar que la presencia de residuos de *oxitetraciclina* superiores a los LMR en músculo diafragmático fue más frecuente en animales sin lesiones macroscópicas comparados con aquellos que presentaron alguna lesión (Tabla 2), esto fue concordante con los resultados presentados por Gesche y Emilfork (26). Este fenómeno se puede vincular a que en los procesos infecciosos se puede encontrar residuos de antibióticos a nivel renal o hepático por ser órganos a los que un medicamento llega rápidamente por dinámica farmacológica, mientras que en animales tratados por periodos de tiempo prolongados ya se han desarrollado depósitos musculares.

Tabla 2. Presencia de concentraciones de *oxitetraciclina* superiores a LMR en músculo diafragmático de acuerdo con la inspección *post-mortem*.

	No.	> 100 ppb	%	> 200 ppb	%
Decomisos	29	16	22,8	6	22,2
Normales	85	54	77,2	21	77,8
Total	114	70	100	27	100

Los resultados del presente trabajo sugieren que en los sistemas de producción primaria se están incumpliendo las buenas prácticas en la administración de medicamentos, y que las plantas de beneficio no cuentan con un sistema de inspección sanitaria de la carne basada en el análisis de riesgo (27). A pesar de que la legislación colombiana ha actualizado la normatividad relacionada con la inocuidad de la cadena cárnica y ha propuesto desarrollar el Plan Nacional de Control de Residuos de Medicamentos Veterinarios y Contaminantes para la carne (2), aún se desconoce la problemática real relacionada con los residuos de los medicamentos veterinarios y sus implicaciones en la salud pública.

Es necesario hacer énfasis en que actualmente existe una preocupación por parte de las

autoridades de salud pública mundial relacionada con el uso inadecuado de antibióticos en animales de abasto público, que ha propiciado el surgimiento y la diseminación de bacterias y genes resistentes que pueden ser transmitidos de animales a humanos a través de la cadena alimenticia (9, 12, 28). Teniendo en cuenta que ciertos antibióticos empleados en los animales son idénticos o están relacionados con los utilizados en medicina humana, la resistencia bacteriana confiere mayor virulencia a los microorganismos implicados en relación con las infecciones de bacterias susceptibles (9, 11, 28). Se ha reconocido este fenómeno, principalmente en bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos como la *Salmonella*, *Campylobacter*, y *Escherichia coli* (8, 11, 12, 28).

CONCLUSIONES

Los resultados nos permiten sugerir que es necesario fortalecer la implementación de las Buenas Prácticas Pecuarias (BPP), para minimizar el riesgo en la producción primaria (29). Así mismo, se debe reducir la necesidad de administrar antibióticos, mediante el mejoramiento de las prácticas de higiene y de control de enfermedades (11, 28); siendo necesario además, el compromiso por parte de los veterinarios y los productores para el uso prudente de los antibióticos, por una parte soportado en las técnicas de diagnóstico de enfermedades, y por el otro por la optimización de las buenas prácticas de producción y el respeto a los tiempos de retiro establecidos para cada medicamento (9, 28). Las políticas nacionales

deben acompañar este esfuerzo, limitando la venta y distribución de antibióticos sin prescripción médica, estableciendo programas de vigilancia epidemiológica, estrategias de educación para los productores y los veterinarios (11).

AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren expresar su agradecimiento a la Vicerrectoría de Investigaciones y Postgrados de la Universidad de Caldas, al Laboratorio de Producción Porcina de la Universidad de Caldas, al Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) Seccional Manizales, al Laboratorio Nacional de Insumos Pecuarios (LANIP), y al Frigorífico FRIOGAN (La Dorada).

REFERENCIAS

1. Consejo Nacional de Política Económica y Social. 2005. Documento Conpes 3375. Política nacional de sanidad agropecuaria e inocuidad de alimentos para el sistema de medidas sanitarias y fitosanitarias. Bogotá, Colombia.
2. Consejo Nacional de Política Económica y Social. 2005. Documento Conpes 3376. Política sanitaria y de inocuidad para las cadenas de la carne bovina y de la leche. Bogotá, Colombia.
3. Reig M, Toldrá F. Veterinary drug residues in meat: Concerns and rapid methods for detection. *Meat Science* 2007;78:60-67.
4. CanchoGrande B, García M, Simal J. El uso de los antibióticos en la alimentación animal: perspectiva actual. *Cienc. Tecnol. Aliment.* 2000;3(1):39-47.
5. Norrung B, Buncic S. Microbial safety of meat in the European Union. *Meat Science* 2008;78:14-24.
6. Senyuva H, Özden T, Sarica D. HPLC determination of oxytetracycline residue in cured meat products. *Turk. J. Chem.* 2000;24:395-400.
7. McEvoy J. Contamination of animal feedstuffs as a cause of residues in food: a review of regulatory aspects, incidence and control. *Anal. Chim. Acta* 2002;473:3-26.
8. Organización Mundial de la Salud (OMS). 2001. Estrategia mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos. Suiza.
9. Sofos J. Challenges to meat safety in the 21st century. *Meat Science* 2008;78-13.
10. Toldrá F, Reig M. Methods for rapid detection of chemical and veterinary drug residues in animal foods. *Trends Biotechnol.* 2006;17:482-489.

11. Organización Mundial de la Salud. 13-17 October 1997. The medical impact of antimicrobial use in food animals. Report of a WHO meeting. Berlin, Germany.
12. Teuber M. Veterinary use and antibiotic resistance. *Curr. Opin. Microbiol.* 2001;4:493-499.
13. Pérez de Ciriza J, Huarte A, Saiz I, Ozcáriz M, Purroy M. Residuos de sustancias inhibidoras en carnes. *Anales Sis. San Navarra* 1999;22(3):231-238.
14. Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias. 1997. Comisión del Codex Alimentarius: Manual de procedimiento. Décima edición. Roma. ISBN 92-5-304014-9.
15. San Martín, B, Cañón, H. Métodos de análisis para el control de residuos químicos en productos de origen animal. *TecnoVet* 2000;6(2).
16. Pastor-Navarro N, Maquieira A, Puchades R. Nuevos inmunoensayos para el análisis de residuos de tetraciclinas en mieles. *CTC Alimentación.* 2007;32:12-17.
17. De Wasch K, Okerman L, Croubels S, De Brabander H, Van Hoofa J, De Backerb P. Detection of residues of tetracycline antibiotics in pork and chicken meat: correlation between results of screening and confirmatory tests. *Analyst* 1998;123:2737-2741.
18. Okerman L, Croubels S, Cherlet M, De Wasch K, De Backer P, Van Hoof J. Evaluation and establishing the performance of different screening tests for tetracycline residues in animal tissues. *Food Additives and Contaminants* 2004;21(2):145-153.
19. Montoya N. Métodos de *screening* y confirmación para la detección de antibióticos: cloranfenicol y nitrofuranos. *Panorama Acuícola Magazine* 2004:2-24.
20. Lozano M, Arias D. Residuos de fármacos en alimentos de origen animal: panorama actual en Colombia. *Rev Colomb Cienc Pecu* 2008;21:121-135.
21. Márquez D. Residuos químicos en alimentos de origen animal: problemas y desafíos para la inocuidad alimentaria en Colombia. *Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 2008;9(1):124-135.
22. Codex Alimentarius. 2005. Límites máximos de residuos para medicamentos veterinarios en los alimentos. CAC/LMR 02. 1-25p.
23. Codex Alimentarius. 1999. Métodos de muestreo recomendados para la determinación de residuos de plaguicidas a efectos del cumplimiento de los LMR. CAC/GL 33. 1-22p.
24. Muriuki F, Ogara W, Njeruh F, Mitema E. Tetracycline residue levels in cattle meat from Nairobi slaughter house in Kenya. *J. Vet. Sci.* 2001;2:97-101.
25. Arango S. Detección de residuos de antibióticos en leche cruda y pasteurizada de la ciudad de Manizales mediante el uso de la técnica de difusión estándar *Delvotest*. Universidad de Caldas. 2001. Trabajo de Grado. Colombia.
26. Gesche E, Emilfork C. Residuos de antimicrobianos en canales de vacas. *Archi. Med. Vet.* 1998;30(2):137-143.
27. Codex Alimentarius. 2005. Código de prácticas de higiene para la carne. CAC/RCP 58.
28. Tollefson L, Karp B.E. Human health impact from antimicrobial use in food animals. *Med. Mal. Infect.* 2004;34:514-521.
29. Woodward K. Assessment of user safety, exposure and risk to veterinary medicinal products in the European Union. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2008;50:114-128.