

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA.

TIEMPO DE DEGRADACIÓN DE ENROFLOXACINA EN
SEDIMENTO DE ESTANQUES DEDICADOS A LA
PRODUCCIÓN DE CAMARÓN.

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA:

JENY AGUILAR ACEVEDO

Asesores:

Dr. Héctor Sumano López

Dra. Lilia Gutiérrez Olvera

México, D.F.

2005



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIAS

A mi padre: Por que a lo largo de mi vida me ha enseñado el valor de la honestidad, la educación y que sin él nuestra familia no sería lo que es, además del cariño que nos brinda.

A mi madre: Por la fortaleza que tiene por que hasta en los momentos más difíciles nunca la he visto derrumbarse, por todo su cariño, apoyo que siempre nos ha brindado y el tiempo que nos sigue dedicando.

A mis Hermanas:

Janet: Por que a pesar de todo sé que saldrá adelante por que es una persona fuerte e inteligente y por el apoyo que me ha brindado como hermana mayor.

Gabriela: Por que sé que muy pronto logrará lo que se propone aunque algunas veces parezca difícil el camino por andar.

Yazmín: Por que es la que más ha soportado mi mal carácter, sabes que a pesar de todo puedes contar conmigo siempre aunque parezca lo contrario.

A Ángel Olivares Sánchez: Por que después de tanto tiempo sigue conmigo en las buenas y en las malas, su eterna paciencia, por todo el apoyo que me brinda y tiempo dedicado aunque parezca que algunas veces que no lo valoro.

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores.

Dr. Héctor Sumano López. Por creer en mis capacidades desde que era estudiante, amistad, apoyo y paciencia.

Dra. Lilia Gutiérrez Olvera. Por ser una persona amigable, por el tiempo dedicado a este trabajo.

Dr. Luís Ocampo Cambreros. Por el apoyo que me ha brindado desde que lo conozco y tiempo dedicado a la tesis.

A mis sinodales.

Dr. David Páez Esquilano. Por su apoyo en el las actividades del laboratorio de farmacología.

Dr. Rafael Suárez Castrejon. Por sus consejos impartidos en sus clases.

Dr. Ángel García. Por su paciencia en la revisión de este trabajo.

A mis amigos.

A Rita Aguilera. Por sus consejos, ayuda invaluable para el presente trabajo y amistad.

Dra. Ana Auro de Ocampo. Por la revisión de protocolo sin ser mi sinodal y trato amistoso.

A Silvia Reyes Cuayahuitl. Por su amistad, consejos y complicidad que comparte conmigo, consejos y apoyo en todo momento.

A Laura Hernández. Por su ayuda y amistad brindados.

III

CONTENIDO

	Página
Resumen	1
1. Introducción	2
2. Hipótesis	13
3. Objetivos	14
4. Material y Método	15
5. Resultados	20
6. Discusión	23
7. Referencias	28
8. Cuadros	34
9. Figuras	46

RESUMEN

JENY AGUILAR ACEVEDO. Tiempo de degradación de enrofloxacin en sedimento de estanques dedicados a la producción de camarón (bajo la dirección de: Dr. Héctor Sumano López y Dra. Lilia Gutiérrez Olvera).

México ocupa el sexto lugar mundial en la producción de camarón cultivado con un total de 45,151 toneladas. Durante la producción se utilizan en varias etapas una serie de antimicrobianos entre los cuales destaca la enrofloxacin. No existen datos en la literatura formal sobre la velocidad de degradación de la enrofloxacin en el sedimento de estanques utilizados para cultivo de camarón. Este dato es relevante dado que los camarones son medicados a través del alimento y tienen hábitos bentónicos por lo que pudiera ser posible el ingreso de la enrofloxacin en el sedimento a los camarones en un tiempo posterior al fin de su medicación y de la eliminación en primera instancia de los residuos de este antibiótico. Para estimar el tiempo en el que la enrofloxacin se degrada al tal grado de perder su actividad antimicrobiana se llevará a cabo por número de determinaciones de actividad antibacteriana de la enrofloxacin como medida directa de su concentración ya que para fluoroquinolonas este método ha sido descrito como similar a la confiabilidad que brinda la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de las 26 muestras trabajadas y considerando un límite de detección de $0.91 \mu\text{g/g}$. Se concluye que aún a los 15 días aún se detecta una concentración de $0.84 \pm 1 \mu\text{g/g}$. Este dato pudiera considerarse para determinar si los 30 días de tiempo de retiro que indica la NOM-EM-05 de Pesca debe revisarse.

Si se quiere llegar a una concentración por debajo de las permitidas como ingesta diaria admisible por organismos internacionales que es de aproximadamente de 100 ppb en músculo.

1. INTRODUCCIÓN:

Situación Actual de la Camaronicultura en México.

México es uno de los principales países productores de camarón cultivado en el mundo. Ocupó el sexto lugar después de Indonesia en el año 2004.* El cultivo de camarón en México inició desde 1985 y en la actualidad es la principal industria, en términos de ingreso acuícola del país. Cerca del 97% de las granjas camaroneras de México están situadas en el Golfo de California, en los estados de Sonora, Sinaloa y Nayarit** (1).

En 2002, los números oficiales señalaron que la producción de camarón fue de 45,151 toneladas. La importancia económica de esta actividad generó un valor aproximado de 2,165,729 millones de pesos para la economía mexicana. La camaronicultura ha crecido hasta tal punto que ahora contribuye aproximadamente con el 43.14% de la producción total del camarón en México de acuerdo con citas de la SIAP Y SAGARPA***. Para el 2004 México alcanzó un aumento significativo en su producción, se registró una producción récord superior a las 61 mil toneladas, cifra superior en 40% respecto al año anterior y casi el doble de lo registrado en el año 2000.****

Especies de Camarón encontradas en México.

Para ordenar el aprovechamiento de las especies de camarón en agua de jurisdicción federal de los Estados Unidos Mexicanos la Norma Oficial Mexicana 002-PESC-1993, menciona que de acuerdo con los resultados de los muestreos biológicos de camarón efectuados por el Instituto Nacional de la Pesca se dieron a conocer las especies más importantes de camarón de los sistemas lagunarios, estuarinos y aguas marinas encontradas en el Golfo de México y el Océano Pacífico las cuales son:

* <http://omega.ilce.edu.mx:3000/sites/ciencia/volumen2/ciencia3/0sec9.htm>

** <http://siap.sagarpa.gob.mx/ar.compesq.html>

*** <http://siap.sagarpa.gob.mx/ar.compesq.html>

**** <http://www.sagarpa.gob.mx/cgcs/boletines/2004/marzo/B078.html>

Golfo de México.- *Litopenaeus setiferus* (blanco), *Farfantepenaeus duorarum* (rosado) y *Farfantepenaeus aztecus* (café) **(2, 3)**.

Océano Pacífico.- *Litopenaeus stylirostris* (azul), *Litopenaeus vannamei* (blanco), *Penaeus californiensis* (café), *Penaeus penicillatus* **(2, 3)** (Véase cuadro 1).

Es importante mencionar que las especies que se encuentran comúnmente en las granjas camaronícolas son: *Litopenaeus stylirostris* y *Litopenaeus vannamei*, debido a que presentan algunas ventajas sobre las otras especies de camarones **(3, 4, 5)**.

Litopenaeus vannamei; esta especie es la que se cultiva en mayor proporción debido a que presenta tolerancia a amplios rangos de temperaturas y salinidad, puede crecer en salinidades muy bajas, presenta buenas condiciones de crecimiento, sobrevivencia, alto valor en el mercado y mayor resistencia al virus IHHN (Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa) con respecto *Litopenaeus stylirostris* **(4, 5)**.

Litopenaeus stylirostris; es una especie que se reproduce fácilmente en cautiverio y es resistente a amplios rangos de temperatura y salinidad **(4)**.

Sistemas de Cultivo de Camarón.

Los sistemas de cultivo de camarón se clasifican dependiendo del número de camarones (biomasa) en el estanque por cada metro cuadrado, de acuerdo con el grado de desarrollo tecnológico de operación y diseño técnico que tenga la granja camaronera, estos son: extensivo, semintensivo, intensivo e hiperintensivo **(4, 6)**.

En América Latina, el sistema de cultivo empleado en la camaronicultura es fundamentalmente semintensivo caracterizado por un consumo mediano-alto de insumos con perspectivas hacia la intensificación de las granjas **(6)**.

Extensivo.- En este se siembran de 1 a 2 camarones por metro cuadrado, los camarones son mantenidos en condiciones naturales sin alimentación complementaria, la semilla (larvas) por lo general es obtenida del medio natural, las producciones que se llegan a obtener de este sistema van de 250 hasta 900 kg/ha **(4, 6, 7)**.

Semiintensivo.- Se siembran de 6 a 10 camarones por metro cuadrado, los organismos están mantenidos en condiciones ambientales naturales, se les proporciona alimento complementario. La semilla se obtiene del medio natural o del cultivo larvario en condiciones controladas, las producciones obtenidas van de 400 a 1200 kg/ha por cultivo y el ciclo tiene una duración de 4 a 5 meses **(4, 6, 7)**.

Intensivo.- El número de camarones sembrados en este sistema, va de 20 a 40 por metro cuadrado; a estos ya se les proporciona alimento y aeración artificial. La semilla se obtiene a través de cultivo larvario en laboratorio, se llega a obtener un promedio de 2 a 6 toneladas de camarón por hectárea en un tiempo cercano a los 200 días **(4, 6, 7)**.

Hiperintensivo.- En el se siembran de 200 a 500 organismos por metro cuadrado; son mantenidos con alimentación artificial, aereación e intercambio continuo de agua. La semilla proviene de cultivos larvarios de laboratorio **(4, 6, 7)**.

En México según datos de Rosenberry **(8)** en los años de 1994 y 1996 los porcentajes encontrados en los diferentes sistemas de cultivo eran: extensivo 25%, semintensivo 65% e intensivo solo 10%. Por otra parte, Jory **(9)**, en el año 1998 menciona que los porcentajes eran los siguientes: extensivo 30%, semintensivo 60% e intensivo 5%.

Hábitat y Alimentación del Camarón.

La mayoría de las especies de camarones viven en aguas poco profundas de las plataformas marinas, gran parte de su vida transcurre en el fondo del mar o de las lagunas costeras, por lo que se dice que son especies bentónicas. Los hábitats que principalmente ocupan son pastos marinos, fango, arena, arrecifes coralinos, y otros fondos donde abunda el alimento. *

Un hábito común de los camarones *penéidos* es el enterramiento en el sedimento de estanques en todas sus etapas, esto lo utilizan para protegerse de sus predadores. La profundidad a la que se entierran depende del tamaño del camarón y factores como: la intensidad de la luz, la temperatura y el oxígeno disuelto ya que requieren un mínimo de 4 ppm **(4, 10)**.

Los hábitos alimenticios del camarón varían ya que es una especie omnívora además de sus diferentes estadios de desarrollo; en los primeros estadios (nauplio) no requiere alimentación externa se alimenta del vitelo del huevo; en los estadios de protozoa y primeras fases de misis se alimenta de fitoplancton sobre todo diatomeas, en la últimas fases de misis y poslarva se alimenta de zooplancton. Los camarones juveniles y adultos son organismos omnívoros **(4, 10)**.

En las granjas productoras de camarón y principalmente en aquellas en donde el tipo de producción es semiintensivo, intensivo e hiperintensivo, se proporciona alimento complementario a los camarones, balanceado en forma de “pellets” nutricionalmente adaptado a la etapa de vida en la que se encuentren los organismos **(11)**. En la actualidad en estas granjas se utilizan comúnmente los alimentos medicados y debido a que no se requiere de un manejo extra en los animales, a menudo se aplican antibióticos como método metafiláctico (tratamiento agresivo al primer indicio de enfermedad) o preventivo (se **medica**

* http://www.conabio.gob.mx/institucion/clonabio_espanol/doctos/camaron.html

empíricamente sin saber que hay una enfermedad. El término profiláctico (antes de que los animales se enfermen) es aplicado cuando se sospecha que se presentará una enfermedad ya que los camarones ya no se alimentan al presentarse la infección y entonces la medicación vía alimento es inútil **(12)**.

Cabe mencionar que en la NOM-EM-05-PESC-2002 queda prohibido aplicar tratamientos con antibióticos directos en el agua o a través de alimento balanceado medicado por lo menos treinta días antes de realizar la cosecha en unidades de Producción de Engorda de Camarón **(13)**.

Las bacterias del género *Vibrio* afectan a todas las especies de camarones *Penaeus* juveniles y adultos, algunos factores predisponentes para su aparición son: estrés por hacinamiento, manejo, muda y captura estas. Las epizootias causadas por estas bacterias pueden ser agudas, subagudas, o crónicas. Las proporciones de mortalidad pueden ser hasta del 100% en poblaciones afectadas **(14)**.

Los síntomas más visibles incluyen: signos conductuales como periodos de nado errático o desorientado alternados con periodos de letargo. Los signos clínicos varían con el tipo de infección, si presentan infección en cutícula, apéndices o branquias son lesiones localizadas de color café o negro; si se presenta una septicemia incluyen síntomas generales de estrés severo como opacamiento de músculo abdominal, expansión de los crómatoforos causando una coloración ligeramente más oscura en los camarones afectados, anorexia y debido a ello sus intestinos se observan vacíos y libres de heces, en ocasiones aparece una flexura dorsal del abdomen que forma un pico en el tercer segmento abdominal. En larvas y postlarvas los síntomas son melanización y necrosis de las puntas de los apéndices, presencia de gran número de enjambres de bacterias visibles en la hemocele de camarones moribundos **(4, 14,15)**.

Las especies de *Vibrios* que afectan a las especies de camarones *penaeus* son: *Vibrio sp*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *Pseudomonas sp.*, *Flavobacterium sp.*, y *Aeromonas sp.*, **(11, 14, 15)** *Vibrio harvey*, *V. fischeri*, **(4, 14, 15)** *V. mimicus*, *V. vulnificus*,**(15)** *V. fluvialis*, *V. cholerae*, *V. damasela* **(16)**. (Véase cuadro 2)

Cuando los camarones se contaminan con bacterias como *Vibrio cholera*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Aeromonas*, *Salmonella sp.*, pueden ocasionar enfermedades en el hombre. Esto puede prevenirse con la instrumentación de buenas prácticas de manejo, así como con tratamientos profilácticos usando algunos fármacos, lo cual no siempre es recomendable **(12)**.

Los peligros para el ser humano asociados con las bacterias patógenas provenientes de crustáceos producidos por acuicultura, se pueden dividir en dos categorías:

a) las bacterias del medio ambiente natural que se alojan en el animal

b) las bacterias introducidas como consecuencia de la contaminación con heces humanas o animales a través de la manipulación y elaboración posterior del producto. A menos que en la granja haya una fuerte influencia de aguas contaminadas con desechos fecales, o un uso intensivo de fertilizantes o animales que contaminen. La dosis infectiva de bacterias se adquiere generalmente durante el manejo poscosecha más que durante el cultivo, ya que en esta etapa la temperatura es más elevada y las condiciones de humedad y oxigenación son más favorables al crecimiento microbiano **(12)**.

Entre las bacterias del género *Vibrio*, se han clasificado al menos 12 que son patógenas al hombre. De éstas, las más importantes son: *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholera*, *Vibrio vulnificus*, *Staphylococcus aureus*, *Aeromonas hydrophila*, *Salmonella sp*, *Shigella sp* y *Escherichia coli*. Los 4 grupos patógenos de esta

última son: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enteroxigénica, *E. coli* enteroinvasiva, *E. coli* enterohemorrágica **(12, 17)**.

Uso de Antibióticos en Producción de Camarón.

La utilización de antibióticos en la camaronicultura generalmente se justifica para la prevención y el control de enfermedades de origen bacteriano. Cuando estos productos no son usados correctamente pueden generar la acumulación de residuos en las especies acuícolas que son cosechadas **(13, 18, 19)**.

La FDA (*Food and Drug Administration*) esta trabajando para aprobar el uso de algunos quimioterapéuticos en acuicultura. En el cultivo del camarón son los siguientes antibacterianos: oxitetraciclina, sarafloxacina y enrofloxacina para enfermedades bacteriana de peces y camarones. **(18)**. Un medicamento ya aprobado es trifluralin (Treflan®) usado como profiláctico en el cultivo de larvas de camarones comúnmente utilizado como fungicida a una dosis de 0.001 mg/kg.*

El uso de antibióticos es costoso y pueden ser dañinos si se usan de manera inapropiada. Algunos productos pueden contaminar el ambiente y los residuos de algunos medicamentos que se acumulan en el camarón pueden poner en peligro la salud del consumidor. El uso de los químicos terapéuticos, incluidos los antibióticos debe ser cauteloso y regulado **(20, 21)**. En caso de que se apliquen deben seguirse prácticas recomendadas por reglamentos nacionales e internacionales que describen el uso apropiado de productos tóxicos o potencialmente bioacumulables en el tejido del camarón y ambiente. Los productores deben trabajar con cautela cuando se trate de antibióticos, con el fin de prevenir la contaminación del medio ambiente, de los organismos y del hombre **(12, 22)**.

* <http://fao.org/drocep/meeting/003/w63se.htm#CHEMICALS>

Se recomienda que no se utilicen antibióticos como agentes profilácticos ya que esto ha sido la causa principal del desarrollo de **resistencias bacterianas**; además no se deben utilizar más de un antibiótico al mismo tiempo a menos que se tenga evidencia de que es un caso excepcional **(22)**. Con respecto a lo mencionado anteriormente no existe información de combinaciones de antibióticos en camarones **(18)**.

Es importante enfatizar que es importante conocer el comportamiento residual del antibiótico empleado, así como su farmacocinética durante el tratamiento terapéutico y el establecimiento de los tiempos de retiro para asegurar la ausencia de residuos químicos en los camarones **(23)**. En la NOM-005 se menciona que para el tratamiento de enfermedades bacterianas en la acuicultura existe una gran diversidad de antibióticos prohibidos, como el cloranfenicol y los nitrofuranos. Éstos integran a un grupo de compuestos antimicrobianos sintéticos, entre los que la furazolidona, es considerada de riesgo para la salud humana, debido a los metabolitos que se generan durante el metabolismo del fármaco en el animal vivo y los que se generan después del sacrificio del mismo **(13)**.

La Norma Oficial Mexicana de Emergencia NOM-EM-006-PESC-2004 generada por SAGARPA que establece los requisitos de sanidad acuícola para la producción de crustáceos acuáticos vivos, muertos, sus productos y subproductos, así como para su introducción a los Estados Unidos Mexicanos, establece que se pueden usar los siguientes antimicrobianos para la prevención y control de enfermedades en la producción de camarón: oxitetraciclina, sarafloxacina, enrofloxacina, florfenicol, fosfomicina, monensina, salinomicina, semduramicina, Algunos de estos con dosis sujetas a modificaciones como el florfenicol y la fosfomicina **(24)** (véase cuadro 3). La norma menciona que los fármacos listados, podrán ser restringidos para su uso en la camaronicultura, si posteriormente se demuestra por evidencia directa o por información documentada en revistas especializadas, que el fármaco genera algún daño al ambiente, a la salud pública, o está sujeto a alguna restricción internacional. En la norma citada no se detallan

los tiempos de residuos de los antibióticos listados en el camarón y tampoco en el sedimento de los estanques de producción. Empero en la norma se establece que se deben detallar estos datos individualmente para cada marca de cada antibacteriano **(24)**.

En la camaronicultura nacional, se prohíbe el uso de cloranfenicol y de furazolidona para la prevención y tratamiento de enfermedades **(13)**. En la NOM-005 se menciona que en las unidades de Producción de Engorda de Camarón, queda prohibido aplicar tratamientos con antibióticos, a través de alimento balanceado medicado o por la administración directa al agua, treinta días antes de realizar la cosecha **(13)**.

Uso de Fluoroquinolonas en la Camaronicultura.

Las fluoroquinolonas (FQ) son antibacterianos que han sido muy eficaces para combatir varias enfermedades bacterianas en la ganadería y acuacultura **(25)**.

En acuacultura las quinolonas representan el mayor grupo de antibióticos sintéticos usados en los últimos quince años como agentes profilácticos o terapéuticos administrados principalmente en el alimento, indicados para el tratamiento de varias especies bacterianas **(26)** como: *Vibrio harvey*, *V. alginolyticus*, **(25)** *V. parahemolyticus*, *V. fischeri*, *V. anguillarum*¹, *V. mimicus*, *V. vulnificus*, *V. fluvialis*, *V. cholerae*, *V. damsela*, *Pseudomonas sp* (FMVZ, UNAM) **(25, 26)**.

La adición del flúor y piperazinilo, a la columna básica de las quinolonas aumenta en general la actividad antibacterial de la molécula. El flúor aumenta la actividad contra bacterias Gram positivas como: *Clostridium sp*, *Staphylococcus sp*, *Streptococcus sp*, mientras el piperazino mejora su eficacia contra organismos Gram negativos como: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis* y otras. Las concentraciones mínimas inhibitorias para *Vibrios sp* es de (0.20 µg/ml) **(27)**.

En el cuadro 4 se muestran algunas concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) para fluoroquinolonas de tercera generación. En general, las quinolonas y en especial las de tercera generación se inactivan poco en presencia de hemolinfa y otros fluidos orgánicos **(28)**.

En un estudio realizado por Berge et al. **(29)** menciona en cuanto a la persistencia de las quinolonas que el ácido oxolinico no se encontró de forma persistente en los residuos de las granjas productoras de peces, este mostró una rápida pérdida de la actividad antibacteriana en comparación con la oxitetraciclina **(29)**.

Uso de Enrofloxacin en la Camaronicultura.

Hace más de veinte años la enrofloxacin se introdujo a México y gran parte de Latinoamérica. Este fármaco pertenece al grupo de las fluoroquinolonas de tercera generación derivado del ácido carboxílico que actúa inhibiendo a la girasa bacteriana. Se considera uno de los antibacterianos más potentes descubiertos y utilizados a la fecha en medicina veterinaria **(27, 30)**.

La enrofloxacin es una fluoroquinolona bactericida con excelente actividad contra bacterias Gram negativas y buena contra bacterias Gram positivas y *Mycoplasma sp.* ♦ No tiene afinidad por las células del hospedador. Resulta útil en el tratamiento de enfermedades producidas por bacterias intracelulares **(31)**. Permanece estable por años a una temperatura menor a los 30°C, se recomienda protegerla de los rayos ultravioleta debido a que es fotosensible♦. La enrofloxacin puede existir en 4 formas posibles (catión ácido, switerion,* ión básico en forma neutra no ionizada) dependiendo del pH en el cual se encuentre **(32)**. Solo se le comercializa y utiliza en medicina veterinaria **(33)**.

♦ <http://www.fda.gov/cvm>

♦ <http://www.fda.gov/cvm>

* switerion: molécula que posee tanto cargas positivas como negativas.

La FDA todavía no aprueba el uso de la enrofloxacin para tratar enfermedades bacterianas de camarones por ello aún no se tienen datos de MRLs (Maximum Residue Levels) para camarón y sedimento **(18)**, de igual manera *The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products* (EMA) no establece estos límites, pero cuenta con datos para las demás especies (véase cuadro 5).[♦] Además se ha demostrado experimentalmente la eficacia terapéutica de la enrofloxacin en la reducción de mortalidad causada por *Vibrio anguillarum* en la trucha arcoiris **(34)**.

Residualidad de Antibióticos en el Sedimento.

La principal preocupación que ha surgido al considerar el uso de agentes antibacterianos en acuicultura, es la posibilidad de que los residuos de estos puedan estimular la presencia de resistencia bacteriana. Los primeros trabajos de residualidad concluyen que la mayoría de estos fármacos estén ligados a diferentes partículas y al sedimento de los estanques. En granjas camaroneras en donde se utilizan antibióticos a bajas concentraciones, esto conduciría al desarrollo de cepas bacterianas resistentes al agente ^{*} **(35)**.

Algunos datos indican que del 70-80% de los fármacos administrados a camarón con el alimento terminan en el ambiente, principalmente en el sedimento y a una baja concentración. Esta persistencia aumenta los efectos ambientales desfavorables **(29)**. La persistencia de agentes antibacterianos en el sedimento ha inducido resistencia en bacterias que se encuentran en él y debido a ello algunos patógenos son capaces de sobrevivir por períodos extensos en el sedimento. En otras palabras, la presencia simultánea de agentes antibacterianos en el sedimento puede llevar a la selección de patógenos mutantes resistentes **(36)**.

[♦] <http://.emea.eu.int>

^{*} http://panoramaacuicola.com/noticia.php?art_clave=33

Los antibacterianos en acuicultura son proporcionados principalmente en alimento medicado en forma de *pellets*, el sobrante de la comida no ingerida por los organismos, aunado a la cantidad de fármaco que se pueda encontrar en las heces que éstos eliminan, alcanzan el fondo del estanque aumentando la concentración de antibióticos en el sedimento **(36)**.

Un manejo que se realiza en las granjas productoras de camarón es vaciar los estanques y dejarlos secos por aproximadamente 15-21 días para que el sol destruya todo lo encontrado en el sedimento y se descomponga más rápido la materia orgánica que pueda existir también, se puede agregar cal viva en el fondo del estanque para desinfección del mismo, esto se puede realizar entre cada ciclo de producción **(20)**.

Los estudios que se han realizado para estudiar la persistencia de antibióticos en sedimento han utilizado la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), que resulta ser más cara que la realizada en el presente estudio y que se basa en el análisis bacteriológico por difusión en placa. No obstante, Kung et al **(37)** demostraron que para enrofloxacin esta última técnica es tan confiable como el HPLC.

Hipótesis.

Es posible determinar la actividad antimicrobiana de la enrofloxacin en el sedimento proveniente de estanques rústicos de ciclos de producción de camarón en los que se utilizó enrofloxacin en el alimento para prevenir enfermedades y que la persistencia de enrofloxacin en dicho material es superior a dos semanas.

Objetivo.

Evaluar el tiempo de la actividad antimicrobiana de enrofloxacin en el sedimento proveniente de estanques rústicos de ciclos de producción de camarón en los que se utilizó enrofloxacin en el alimento.

Objetivo Específico.

Evaluar el tiempo de degradación de la enrofloxacin en el sedimento de los estanques rústicos de engorda de camarón de la granja Industrias camaronícolas S.A de C.V.

Material y Método.

Estanques.

Este bioensayo se realizó con la obtención de 26 muestras de sedimento tomadas en diversos tiempos como se muestran en el cuadro 6. Las muestras se tomaron de 1 estanque rústico provenientes de Industrias Camaronícolas S.A. de C.V. ubicada en las afueras de Ciudad Obregón, Sonora.

Medicación.

Se medicó con enrofloxacin en premezcla de alimento para camarón, se utilizó enrofloxacin comercial a razón de 4 kg/Ton de alimento. Cada 1 Kg de enrofloxacin comercial contiene 50 g de enrofloxacin lo que suma un total de 200 g de enrofloxacin /Ton. Los animales del estanque se medicaron durante 10 días. Tenían un peso promedio de 10 gramos, con una densidad de carga de 12 animales/m².

Las muestras se tomaron a partir del día 1 antes del inicio de la medicación y posteriormente los siguientes días como se muestra en el cuadro 6.

Las muestras de sedimento fueron tomadas de diversos puntos, medios y laterales del estanque y se congelaron hasta su análisis.

La especie explotada en este estudio fue: *Litopenaeus vannamei*.

Extracción de sedimento.

Se utilizó parte del método de extracción para enrofloxacin de Aranda Angela et al. (38) para las 26 muestras de sedimento que se describe a continuación.

- 1.- Se pusieron a secar las muestras de sedimento en cajas de petri durante 48 horas, hasta que se encontraron completamente secas.
- 2.- Se homogenizó cada muestra de sedimento y se tomó una muestra de 1 gramo.
- 3.- La muestra se colocó en un matraz de 20 ml y se le añadieron 5 ml de KOH 1 M, se micronizó durante 30 minutos y se dejó reposar durante 12 horas.
4. Se agitó y se filtró con un filtro de 45 μm , se añadieron 5 ml (KOH 1 M) para lavar las paredes del matraz.
- 5.- Lo recuperado se colocó en tubos de 15 ml y se desecaron estas muestras en baño María a 45 °C e inyección de oxígeno.
- 6.- Se hidrató la muestra con 5 ml (KOH 1 M), se filtró con un filtro de 20 μm y se desecó nuevamente.
- 7.- De nuevo se hidrató la muestra con 5 ml (KOH 1 M), se filtró con un filtro de 20 μm y desecó nuevamente.
- 8.- Se hidrató con 900 μl de agua destilada y 100 μl de KOH 1 M.
- 9.- Se le añadió 1 ml de acetonitrilo, se micronizó durante 10 minutos, se centrifugó a 4000 rpm, se extrajo la fase inferior y se congeló hasta su procesamiento por el método microbiológico basado en lo descrito por Bennet et al. (39)

Método de Bennet et al. (39)

Cultivo bacteriano.

Se utilizó una cepa bacteriana ATCC (*American Type Culture Collection*), y una *Escherichia coli* altamente sensible como microorganismo de prueba.

Estándar bacteriano.

En un tubo con tapón de rosca se colocaron 5 ml de agua destilada y una asada del cultivo bacteriano joven (resembrado 24 horas antes) de *Escherichia coli*; por

medio de los estándares de Mc Farland[♦] se realizaron los ajustes necesarios a la dilución para obtener una concentración al 0.5 de ésta escala. La turbidez al 0.5 de Mc Farland se obtuvo por medio de un espectrofotómetro a una transmitancia del 60-65%, la cual corresponde a una concentración bacteriana de 1×10^{14} .

Preparación de las placas o medio de cultivo.

El agar utilizado fue MacConkey (Bixon)[♦] preparado a razón de 50 g/l, siguiendo las indicaciones que marca el producto.

En un refractario tipo Pirex® de 21 X 20 cm. estéril se colocaron 300 ml de agar, se cuidó que no se formaran burbujas en la superficie ya que pudieron interferir con la lectura de los halos de inhibición, dejándose enfriar durante 10 minutos. Sobre el agar ya frío se colocaron 400 µl de la suspensión bacteriana y por medio de un hisopo estéril se distribuyó homogéneamente sobre todo el agar.

Preparación de las diluciones del estándar bacteriano.

Se pesaron 20 miligramos de estándar de enrofloxacin (98% de pureza), se colocó en un matraz y se aforó a 100 ml con agua desionizada (para su disolución es necesario agregar 0.5 ml de una solución de 0.1 N de NaOH, previo a la adición del agua desionizada). Se marcó un tubo de 15 mililitros con el número 0 y 9 tubos de 5 ml del 1 al 9, en el tubo numerado con el 0 se coloca 9 ml de agua desionizada y en los demás tubos se colocó 1 ml en cada uno. Del matraz se tomó 1 ml de la solución y se agregó en el tubo 0, se homogenizó, de este se tomó 1 ml y se agregó al tubo 1 este se homogenizó, se tomó 1 ml y se agregó al tubo 2 y así se continuó hasta completar los 9 tubos. En el cuadro 7 se muestra una relación de las diluciones obtenidas.

Lectura de las placas.

[♦] BioMérieux

[♦] Becton Dickinson de México, SA de CV.

Una vez preparada la placa y con ayuda de un sacabocados se realizaron a lo largo del refractario tres hileras de 10 pozos cada una. Colocando en cada pozo 100 μ l de cada una de las diluciones, realizándose por triplicado. Se realizaron 5 placas en el mismo día con la misma metodología con la finalidad de tener un total de 15 lecturas, se incubaron durante 24 horas a 37 °C. Transcurridas las 24 horas se realizaron las lecturas de milímetros de halo de inhibición por pozo y por placa, utilizando un Bernier digital para obtener mayor precisión.

Fortificación.

Se obtuvo tierra de los campos universitarios a la que se le sometió a un lavado con agua corriente y agitación por 48 horas para eliminar la presencia potencial de algún inhibidor de crecimiento bacteriano. Posteriormente se deseco el material en la estufa a 60° por el tiempo necesario.

Se tomaron muestras de 10 gramos de tierra y se fortificaron con erofloxacin base en las siguientes proporciones.

g. de tierra/ μg de enrofloxacin	Proporción
10 g de tierra/ 200 μ g enrofloxacin	20 μ g de enrofloxacin/ g tierra
10 g de tierra/ 100 μ g enrofloxacin	10 μ g de enrofloxacin/ g tierra
10 g de tierra/ 50 μ g enrofloxacin	5 μ g de enrofloxacin/ g tierra
10 g de tierra/ 25 μ g enrofloxacin	2.5 μ g de enrofloxacin/ g tierra
10 g de tierra/ 12.5 μ g enrofloxacin	1.25 μ g de enrofloxacin/ g tierra

Para fortificar se utilizó una solución de una dosis titulada con 200 mg de enrofloxacin en 100 ml de H₂O a un PH de 10 con KOH. De esta solución se toma 1 ml el cual contiene 2 mg de enrofloxacin que se pondrán en 10 ml.

Las diluciones realizadas para la fortificación se muestran a continuación.

Concentración Aplicada

2000 µg/ml

200 µg/ml

20 µg/ml

2 µg/ml

Procesamiento de las lecturas de los halos de inhibición.

Se obtuvieron media y desviaciones estándar del diámetro de halo de inhibición de cada una de las diluciones, a partir de los cuales y con ayuda de los programas Microcal Origin * y Excel[♥], se obtienen las gráficas de milímetros de halo de inhibición contra concentración y de la fortificación se obtiene porcentaje de recuperación y su desviación estándar.

* Microcal Origin versión 4.0 Scientific and Technical Graphics in Windows. Microcal Software Inc.

♥ Microsoft Excel. 1985-97

RESULTADOS DEL ESTÁNDAR DE ENROFLOXACINA

En el cuadro 8 muestra el promedio de la \pm Desviación Estándar (\pm DE) de los resultados obtenidos de las muestras por triplicado en $\mu\text{g/ml}$, datos que se grafican en la figura 1 que muestra la curva estándar de enrofloxacin, obtenida de la medida de los halos de inhibición vs concentración.

Resultados de Fortificación.

De las diluciones realizadas para la fortificación se utilizaron las siguientes 2000 µg/ml, 200 µg/ml, 20 µg/ml, 2 µg/ml de las cuales se obtuvieron los siguientes porcentajes de recuperación: 75, 73, 71.8, 66.6 respectivamente y las siguientes desviaciones estándar 5.8, 4.4, 7.9 y 9.5. Lo que se muestra en el cuadro 9.

En la figura 2 se muestran los mismos datos de porcentajes de recuperación y ± DE.

En el cuadro 10 se muestra los porcentajes de recuperación y las ± DE de las repeticiones de todas de las diluciones.

Y el promedio de los porcentajes de recuperación fueron: 75% ± 5.86 DE, 73 % ± 4.47 DE, 71.8 % ± 7.98 DE, 66.6 % ± 9.5 DE de cada dilución respectivamente.

Resultados de las muestras problema.

En el cuadro 11 se muestran el promedio \pm 1 DE de los resultados obtenidos de las muestras problema por triplicado en $\mu\text{g/g}$, datos que se grafican en la figura 3.

Ya que los datos no presentan una distribución normal y considerando todos los valores por tiempo de muestreo, en el cuadro 12 se presentan las diferencias estadísticas entre grupos por medio de la prueba de Kruskal-Wallis.

Teniendo como resultado los datos siguientes.

GRUPO DE COMPARACIÓN PRESENTAN DIFERENCIAS

ESTADÍSTICAS $P < 0.05$

4	1, 2, 3, 6 Y 7
5	2, 3, 4, 6 Y 7
6	1 Y 7
7	2 Y 3

En la figura 4 se presenta una extensión de la fase de decaimiento de los residuos de enrofloxacin con base en la pendiente $\beta = 0.13$ que tomaran los 4 últimos puntos de la figura 3. En ella se predice el tiempo en el que los residuos de enrofloxacin se acercan a cero ($0.001 \mu\text{g/g}$), nivel que éste por debajo de los MRL aceptados para enrofloxacin.

Discusión.

Se corrieron las muestras por triplicado según lo establecido en el método microbiológico de Bennet et al. (39) ya descrito. Es importante mencionar que el método de extracción con KOH no es específico para enrofloxacin y puede extraer otros metabolitos de quinolonas y compuestos afines con capacidad antibacteriana para obtener una mayor fineza en la extracción de la enrofloxacin se realizaron una serie de filtrados y se realizó una extracción con acetonitrilo para eliminar interferencias de otros productos con actividad antibacteriana. Es importante considerar que los métodos microbiológicos evalúan actividad/concentración antibacteriana, con lo cual también se detectan otros metabolitos activos que contengan alguna actividad antibacteriana.

La metodología utilizada difiere de los métodos químicos por HPL (cromatografía líquida de alta resolución) en cuanto a la detección de la fracción de enrofloxacin y sus metabolitos activos, pero no se puede extrapolar este dato a la concentración neta del anillo quinolónico. Sin embargo según Küng y el método utilizado y estandarizado por Bennet et al. (39) es confiable y de alta recuperación en sistemas biológicos. Como lo refleja la técnica microbiológica en las fracciones activas de la enrofloxacin, los datos obtenidos pueden ser considerados como relevantes para estimar el impacto de este antibiótico en la microflora y plancton de estanques naturales. Resultó evidente por la figura (3) que aún en el día 15 la concentración / actividad de enrofloxacin fue de **0.91 µg/g** y aunque esto puede resultar benéfico para la destrucción de patógenos en el sedimento de estanques, definitivamente puede modificar el ecosistema o microambiente del estanque en cuestión, ya para el día 18 posterior a la medicación el promedio de las concentraciones que se predicen pueden ser encontradas en el sedimento fueron de **0.001 µg/g** lo que indica una concentración mínima de enrofloxacin en el sedimento pero compatible con el valor de MRL aceptado internacionalmente. (Véase cuadro 5)

Cabe mencionar que en la figura **(3)** la gráfica indica que la muestra que se tomo un día antes de la medicación de los camarones no inicia en cero como pensamos debido a que se detectaron metabolitos de otros fármacos además de la enrofloxacina, ya que es común el uso de diversos fármacos antimicrobianos en la camaronicultura.

El uso común de antibióticos en esta disciplina se debe a que en los recientes años en México la camaronicultura ha tenido un crecimiento acelerado y cada vez es más común el establecimiento de cultivos de tipo intensivo y con ello el advenimiento de diversas enfermedades bacterianas y virales. Algunos de los fármacos que se han sido utilizado son: oxitetraciclinas, trimetroprim, sulfametoxazol, norfloxacina, ácido oxolinico, flumequina, sarafloxacina, florfenicol, fosfomicina, monensina, salinomicina, semduramicina y enrofloxacina. En algunos trabajos se menciona que esto puede llevar a la contaminación del ecosistema ya que se han encontrado residuos de algunos de estos antibióticos en agua y sedimento de los estanques productores de camarón por tiempo prolongado. **(29, 36)** En este sentido cabe destacar la importancia de este trabajo, amén de que apoya la visión antedicha.

Como ya se menciona en el apartado de residualidad de antibióticos en el sedimento, los factores más importantes a considerar son: que en el uso de agentes antibacterianos en acuicultura puedan estimular resistencia bacteriana debido a los residuos encontrados en el sedimento **(35)**. Además estos fármacos terminan en el ambiente a una baja concentración y esta persistencia puede aumentar los efectos ambientales desfavorables aunque se tiene poca información sobre el daño ambiental que producen los fármacos el sedimento se mencionan algunos como: La acumulación de residuos antibacterianos en los sedimentos tiene el potencial para inhibir la actividad microbiana y reducir la proporción de degradación de la materia orgánica y por tanto reciclar nutrientes, las proporciones del consumo de oxígeno, amonio y producción del sulfuros en los

sedimentos son dependiente de la actividad microbiana, * además se menciona que pueden ser afectados los procesos de nitrificación. *

Además de las consideraciones anteriores la persistencia de residuos de antibióticos puede fomentar resistencias en el estanque para futuras siembras sobretodo cuando la renovación del agua es lenta y deberá ponderarse el caso del peligro para la salud pública, si no se procura el resguardo de los camarones hasta que hayan eliminado por completo el antibiótico tanto en ellos como el sedimento ya que un número por determinar de ellos puede recontaminarse con enrofloxacin.

En la actualidad existe un debate internacional acerca de sí el uso de la enrofloxacin debe o no ser permitido principalmente pollos de engorda y aves comerciales por que pueden fomentar la transmisión de patógenos (*salmonella sp.* *Campilobacter sp* y *E. coli*) resistentes a otras fluoroquinolonas vg ciprofloxacina (27, 39).

Sin embargo, datos generados en los últimos 3 años en Estados Unidos, muestran que aunque la resistencia del *Campylobacter sp.* ha aumentado, las infecciones en humanos provocadas por éste microorganismo han disminuido considerablemente y a pesar de que el uso de enrofloxacin en aves ha ido inevitablemente en aumento (40). Esto ha sido presentado como argumento de que el uso de fluoroquinolonas en veterinaria no está promoviendo la aparición de problemas de resistencia de patógenos clave en salud pública (44).

La presencia de residuos de enrofloxacin en camarón generados por contacto con el sedimento puede facilitar la resistencia de patógenos clave ya mencionados.

* <http://www.fao.org/drocep/T0047F/t0047f0h.htm>

• <http://www.fao.org/docreco/field/003/AC407/AC407500.htm>

Existen datos que sugieren que en condiciones ideales para la aparición de variedades resistentes, sólo una de cada 1×10^{14} bacterias es potencialmente una mutante que puede modificar el sitio de acoplamiento de la enrofloxacin en la enzima topoisomerasa II y/o IV o bien presentar una actividad importante de las denominadas bombas de eflujo que expulsan al fármaco de la bacteria **(42)**. Sin embargo y por fortuna la resistencia a nivel clínico no parece depender de la transmisión de plásmidos de resistencia, lo que ha limitado la diseminación de cepas resistentes **(43)**.

De tal suerte que solamente tomando en cuenta los resultados aquí obtenidos, el periodo de retiro (colecta) del camarón medicado con enrofloxacin no puede ser inferior a **15 días** y seguramente debería de ser varios días más como lo sugiere la figura 4, quizá hasta los 30 días como los señala NOM-005 dada la variación biológica. El tiempo para eliminar los últimos residuos de enrofloxacin puede llegar a los 19 días ya que lo que se encuentra en el sedimento podrá haber sido reciclados por el camarón. Es importante reiterar que la mayoría de las especies de camarones viven en aguas poco profundas de las plataformas marinas y gran parte de su vida transcurre en el fondo del mar o de las lagunas costeras, por lo que se dice que son organismo bentónicos y los hábitas que principalmente ocupan son pastos marinos, fango, arena, arrecifes coralinos, y otros fondos donde abunda el alimento, * además que es un hábito común de los camarones de esta especie, es el enterramiento en el sedimento de estanques en todas sus etapas para protegerse de sus predadores, la profundidad depende del tamaño del camarón y factores como: la intensidad de la luz, la temperatura y el oxígeno disuelto **(4, 10)**.

Por todo lo ya mencionado a lo largo del trabajo las recomendaciones que se pueden derivar de este trabajo son:

* http://www.conabio.gob.mx/institucion/clonabio_espanol/doctos/camaron.html

- 1.- Si se va a medicar camarones, se debe hacer con asesoría de un especialista en la materia, para que se proporcionen las concentraciones adecuadas del fármaco a utilizar y por el tiempo idóneo para evitar resistencia de patógenos a éste.
- 2.- Ya que poco probable que la práctica del uso de antibacterianos en la camaronicultura disminuya si no al contrario que vaya en aumento es necesario el uso de agentes antibacterianos fácilmente degradables para tener una reducción en los impactos ambientales.
- 3.- Es necesario realizar estudios de residualidad de la enrofloxacin y demás medicamentos que son utilizados en camaronicultura, tanto en tejido de camarón como en sedimento, pero analizando una muestra considerable de *Peneidos* y sedimento dada la variación que se puede tener. Esto permitirá para entonces poder ofrecer un producto de calidad al mercado nacional e internacional.
- 4.- De los resultados de los estudios que se realicen verificar los días de retiro que deben tener los camarones que han sido medicados.
- 5.- Realizar más estudios de este tipo y si se hacen realizarlos con un número mayor de estanques.

Referencias Bibliográficas.

1.- Villa M. 1998. Perspectivas y Desarrollo de la Camaronicultura en el Sur de Sonora. Enfoque Acuícola. Año 1 N° 1 (Agosto 1998): 5-10

2.- Córdova Martínez Luis, Magallón Barajas Francisco, Naranjo Páramoy José, Porchas Cornejo Marco Antonio, Portillo Clark Guillermo. Efecto de la macroalga *Caulerpa sertularioides* en el desarrollo del camarón *Penaeus californiensis* (Decapoda: Peneidae) Rev. biol. trop v.47 n.3 San José set. 1999.

3.-NOM-002-PESC-1993 para ordenar el aprovechamiento de las especies de camarón en agua de jurisdicción federal de los Estados Unidos Mexicanos. Diario Oficial de la Federación. 24 de febrero de 1993.

4.-Martínez L. R. Camaronicultura; Bases técnicas y científicas para el cultivo de camarones peneidos: Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora: AGT EDITOR, S.A.: 1ª edición 1993, México, D.F. 3, 17, 20.

5.- Chin L, Lemos E, Paquette P. Intensive culture of shrimp *Penaeus vannamei* in floating cages: zootechnical, economic and environmental aspects, Aquaculture 164: 151-166.

6.- Álvarez Zoraya, Sánchez Roselena. Cultivo del Camarón con Carácter Social, Fundación para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología del Estado Falcón/Ministerio de Ciencia y Tecnología de Venezuela. Universidad Nacional Experimental "Francisco de Miranda". Falcón. Venezuela 2002.

<http://www.red-arpe.cl/document/paperRoselena.pdf>

7.- Billie R. De Walt. Camaronicultura, sociedad y ambiente en el Golfo de California: Informe para el Fondo Mundial para la Vida Silvestre. Octubre 2000.

<http://www.enaca.org/Shrimp/Case/LatinAmerica/Mexico/AMexGoCSp.pdf>.

8.- Rosenberry, B. (ed.) (1996), World Shrimp Farming 1996, (Annual Report,) Shrimp News International, San Diego, California, 164 pp.

http://www.fao.org/documents/show_cdr.asp?url_file=/docrep/003/w7499e/w7499e04.htm.

9.- Jory, D., Tomás Cabrera, Beatriz Polanco, José Millán, Jesús Rosas, Eugenio García, Roselena Sánchez, Manuel Useche, Rodrigo Agudo, and César Alceste. 1999. Aquaculture in Venezuela: Current Status and Perspectives. Journal of the World Aquaculture Society Magazine. Volume 30 (July 1999) No 3:20-67.

10.- Lee D O´C, Wickins, J.F. Crustacean Farming: New York Toronto: Jonh Wiley & Sans, Inc, 1992.

11.- Clay Jason, Tobey James, Vergne Philippe. Impactos Económicos, Ambientales y Sociales del Cultivo de Camarón en Latinoamérica. Reporte de manejo costero # 2202- Junio 1998.

http://www.crc.uri.edu/download/MAN_0034.PDF

12.- Chávez Sánchez María Cristina, Higuera Ciapara Inocencio. Manual de Buenas Prácticas de Producción Acuícola de camarón para la inocuidad alimentaria. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Unidad Mazatlán en Acuicultura y Manejo Ambiental y el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, SAGARPA. 2003.

http://www.oirsa.org/OIRSA/Miembros/Mexico/Decretos_Leyes_Reglamentos/Manuales/Manual-Camaron.pdf

13.- Norma Oficial Mexicana de Emergencia NOM-EM-05-PESC-2002. Que establece los requisitos y medidas para prevenir y controlar la dispersión de enfermedades de alto impacto y para el uso y aplicación de antibióticos en la camaronicultura nacional. Diario Oficial de la Federación 2002.

14.- Donald V. Lightner. *Vibrio* or bacterial disease. Environmental Research Laboratory University of Arizona Tucson, Arizona. pp. 42-47.

15.- Berthe Franck, Goarant Cyrille, Merien Fabrice , Mermoud Isabelle, Perolat Philippe. Arbitrarily Primed PCR To Type *Vibrio* spp. Pathogenic for Shrimp Appl Environ Microbiol. 1999 Mar; 65(3)1145-51.

16.- Reed Lou Ann, Shah Jaymin C., Siewicki Thomas C. Pharmacokinetics of oxitetracycline in the white shrimp, *Litopenaeus Setiferus*. Aquaculture 232 (2004) 11-28.

17.- Toro Marín Luis Geovanni. Informe Técnico, Distribución de los residuos de enrofloxacin en camarón blanco *Penaeus vannamei* alimentado con dietas medicadas a diferentes concentraciones. Guayaquil Ecuador 2000 – 2001.
<http://www.cenaim.espol.edu.ec/publicaciones/tesisc/T54.pdf>.

18.- Bell A. Thomas. Principals of shrimp Culture Chemotherapy. Word Aquaculture Society. 1992.

19.- Montoya Nelson, reyes Eduardo, Toro Luis. Acumulación/Eliminación de Oxitetraciclina en el Camarón Blanco *Litopenaeus vannamei*, y su Residualidad junto a la Erofloxacin en Dietas Artificiales para Camarones. Fudación SENAIM-ESPOL. 2002. El Mundo Acuícola. Vol 8, No 1. pp.34-37

20.- Claude E. Boyd, María C. Haws y Bartholomew W. Green. Buenas prácticas de manejo en el cultivo de camarón en Honduras. Asociación Nacional de

Acuicultores de Honduras (ANDAH). Centro de Recursos Costeros de la Universidad de Rhode Island. Universidad Auburn, Departamento de Pesquerías y Acuicultura. Marzo del 2001.

http://www.crc.uri.edu/download/SPSHR_4.PDF

21.- Honculada Primavera j. Shrimp Farming in the Asia-Pacific: Environmental and trade Issues and Regional Cooperation. Aquaculture Department, Southeast Asia Fisheries Development Center. 2000.

22.- Graslund Sra, Karlsson Karin, Wongtavatchai. Responsible use of antibiotics in shrimp farming. Aquaculture Asia. Julu-september 2002: Vol VII No. 3

23.- Montoya Nelson, Reyes Eduardo. Acumulación / Eliminación Oxitetraciclina en el Camarón Blanco *Litopenaeus Vannamei*, y su Residualidad en Dietas Artificiales. El Mundo Acuícola. Vol 8, No 1. pp.34-37

24.- NORMA Oficial Mexicana de Emergencia NOM-EM-006-PESC-2004, Que establece los requisitos de sanidad acuícola para la producción de crustáceos acuáticos vivos, muertos, sus productos y subproductos, así como para su introducción a los Estados Unidos Mexicanos. Diario Oficial de la Federación. Lunes 26 de Enero de 2004.

25.- Roybal J.E, Pfenning A.P, Turnipseed S.B, Walkel C.C. Concurrent determination of four fluoroquinolones in catfish, shrimp, and salmon by liquid chromatography with fluorescence. Journal of AOAC International 2002; 85:6: 1293-1301.

26.- Kijak P.J, Pfenning A.P, Roybal J.E, Turnipseed S.B. Use of ion-trap liquid chromatography-mass spectrometry to screen and confirm drug residues in aquacultured products. Analytica Chimica Acta 2003; 483: 373-386.

- 27.-** Sumano L.H. Quinolonas y Fluoroquinolonas en medicina veterinaria. Rev. Vet. Mex 1993;2:24-28.
- 28.-** Backhaus T, Grimme L.H, Scholze M. The single substance and mixture toxicity of quinolones to the bioluminescent bacterium *vibrio fischeri*. *Aquatic toxicology* 2000; 49: 49-61.
- 29.-** Berge John Arthur, Hektoen Halvor. Persistence of antibacterial agents in marine sediments. *Aquaculture* 133 (1995) 175-184.
- 30.-** Sumano L.H. The use of ciprofloxacin in veterinary proprietary products of enrofloxacin. *Vet Human Toxicol* 1994; 36:5: 476-477.
- 31.-** Baggot JD, Prescott JF. Antimicrobial therapy in veterinary medicine. 2nd Ed. USA: Iowa State University Press, Ames, Iowa. 1993.
- 32.-** Iztok Turel. The interactions of metal ions with quinolone antibacterial agents. *Coordination Chemistry Reviews*. 2002; 232: 27-47.
- 33.-** Errecalde N, Mestorino JO, Otero J.L. Enrofloxacin, una fluoroquinolona de uso exclusivo en veterinaria. Parte II Farmacocinética y toxicidad. *Analecta Veterinaria* 2001; 21: 42-49.
- 34.-** Cecchini S, Intorre L. Pharmacokinetics of enrofloxacin in the seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 182 (2000) 49-59
- 35.-** Acar J, Anthon F , Franklin A, Gupta R. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. 2001, 20 (3), 859-870

36.- Lunestad B.T, Samuelsen O.B. Stability of antibacterial agents in an artificial marine aquaculture sediment studied under laboratory conditions. *Aquaculture* 126 (1994) 283-290.

37.- Küng KJ, Riand L, Wanner M. Pharmacokinetics of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin after intravenous and oral administration of enrofloxacin in dogs. *J of Vet Pharm and Ther*: 1988; 16, (3). 462-468.

38.- Aranda Ángela, García Elena, Hooghuis Henny. Simple and sensitive determination of five quinolones in food by liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, 789 (2003) 373-381.

39.- Bennet J.B., Brodie J.L, Benner E. J. & Kirby, W.M. (1966) Simplified accurate method for antibiotic assay. Clinical specimens. *American Society of Microbiology*; 4, 170-177.

40.- Sumano LH, Gutiérrez OL. Problemática del uso de la enrofloxacin en avicultura en México. *Rev. Vet. Mex.* 2001; 3:41-8.

41.- Bayer's Submission of facts, information and analyses in response to the notice of opportunity for hearing. Bayer. Germany. 2001.

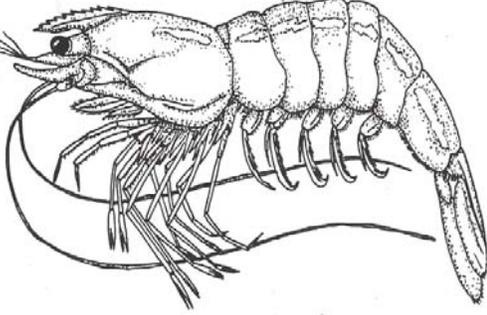
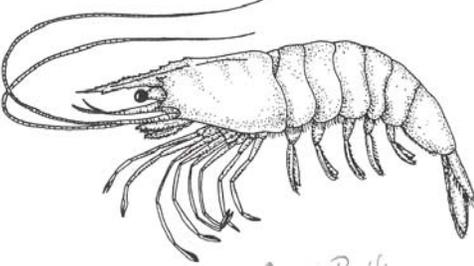
42.- Van Bambeke, Balzi E, Tulkens, P.M. Antibiotic efflux pumps. *Biochem Pharmacol.* 2000;60:457-470.

43.- Schimitz, FJ., Fluit, Ad C, Brisse, S., Verhoef, J. Molecular epidemiology of quinolone resistance and comparative in vitro activities of new quinolones against European *Staphylococcus aureus* isolates. *FEMS Immunology and Medical Microbiology.* 1999; 26:281-287.

44.- Bayer's Submission of facts, information and analyses in response to the notice of opportunity for hearing. Bayer. Germany. 2001.

Cuadro 1.

Especies de Camarón Encontradas en México.

Lugar de procedencia.	Especie de camarón	Figura
Golfo de México	<i>Litopenaeus setiferus</i> <i>Farfantepenaeus duorarum</i> <i>Farfantepenaeus aztecus</i>	
Océano Pacífico	<i>Litopenaeus stylirostris</i> <i>Litopenaeus vannamei</i> <i>Farfantepenaeus californiensis</i> <i>Sicyonia penicillata</i>	

Cuadro 2.
Especies de *vibrios* que Afectan a los Camarones y Sensibles a
Enrofloxacina

Sensibles		
<i>Vibrio alginolyticus</i>	<i>Vibrio fluvialis</i>	<i>Vibrio damasela</i>
<i>Vibrio mimicus</i>	<i>Vibrio parahemolyticus</i>	<i>Vibrio harvey</i>
<i>Vibro vulnificus</i>	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>Vibrio fischeri</i>
<i>Vibrio anguillarum</i>	<i>Pseudomonas spp</i>	

Cuadro 3.

Listado de Antibióticos Autorizados para su Uso en la Prevención y Control de las Enfermedades que Afectan al Camarón Cultivado.

Antibiótico (Agente activo)	Dosis (mg/kg de biomasa)*	Tratamiento (días)
Oxitetraciclina	120-240	7-12
Sarafloxacin	10-15	7-12
Enrofloxacin	10-15	7-12
Florfenicol	50-80	7-12
Fosfomicina	50-80	7-12
Monensina	200-400	7-10
Salinomicina	120-300	7-10
Semduramicina	50-150	7-10

Cuadro. 4

Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) para Fluoroquinolonas de Tercera Generación.

Bacteria	CMI ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Escherichia coli	0.06
<i>Klebsiella</i> spp	0.06
<i>Samonella</i> spp	0.03
<i>Proteus</i> spp	0.25
<i>Serratia marcescens</i>	0.12
<i>Citrobacter</i> spp	0.25
<i>Yersinia</i> spp	0.01
<i>Campylobacter</i> spp	0.25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.75
<i>Brucella canis</i>	0.25
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	0.50
<i>Moxarella bovis</i>	0.03
<i>Haemophilus</i> spp	0.02
<i>Pasteurella multocida</i>	0.008
<i>Pasteurella haemolytica</i>	0.06
<i>Vibrio parahaaemolyticus</i>	0.20
<i>Treponema hyodysenteriae</i>	4.00
<i>Bacillus cerus</i>	0.25
<i>Staphylococcus aeurus</i>	0.12
<i>Streptococcus</i> spp	0.75
<i>Corynebacterium pyogenes</i>	0.75
<i>Listeria monocytogenes</i>	1.75
<i>Erysipelothrix</i> spp	0.06
<i>Micoplasma</i> spp	0.25
<i>Actinobacillus</i> spp	0.03
<i>Bacteroides</i> spp	1.60
<i>Clostridium perfringens</i>	0.50

Cuadro. 5

EMA (The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products) MRLs para las Demás Especies Domésticas.

Sustancia activa	Residuo	Especie Animal	MRLs	Tejido	Otros comestibles
Enrofloxacin	Suma de enrofloxacin y ciprofloxacina	Bovinos, ovinos, caprinos	100 µg/kg 100 µg/kg 300 µg/kg 200 µg/kg 100 µg/kg	Músculo Grasa Hígado Riñón leche	
		Porcinos, conejos	100 µg/kg 100 µg/kg 200 µg/kg 300 µg/kg	Músculo Grasa Hígado Riñón	
		Aves	100 µg/kg 100 µg/kg 200 µg/kg 300 µg/kg	Músculo Piel+grasa Hígado Riñón	No se debe usar en animales productores de huevo para consumo humano.
		Toda la comida exceptuando las siguientes especies bovinos, ovinos, porcinos, caprinos, conejos y aves.	100 µg/kg 100 µg/kg 200 µg/kg 200 µg/kg	Músculo* Grasa Hígado Riñón	

Cuadro 6.

Días de muestreo y número de muestras tomadas.

Grupo	Día de muestreo	# de muestras
1	1 Previo a la medicación	3
2	5 Durante la medicación	4
3	10 Durante la medicación	4
4	1 Posteriores a la medicación	3
5	5 Posteriores a la medicación	4
6	10 Posteriores a la medicación	4
7	15 Posteriores a la medicación	4

Cuadro7.

Diluciones Obtenidas.

Material que lo contiene	Concentración del antibiótico	Dilución final del antibiótico
Matraz 100 ml	20mg	200 µg/ml
Tubo 0 con 9 ml agua desionizada	1 ml dilución anterior	20 µg/ml
Tubo 1 con 1 ml de agua desionizada	1 ml dilución anterior	10µg/ml
Tubo 2 con 1 ml de agua desionizada	1 ml dilución anterior	5 µg/ml
Tubo 3 con 1 ml de agua desionizada	1 ml dilución anterior	2.5 µg/ml
Tubo 4 con 1 ml de agua desionizada	1 ml dilución anterior	1.25 µg/ml
Tubo 5 con 1 ml de agua desionizada	1 ml dilución anterior	0.625 µg/ml
Tubo 6 con 1 ml de agua desionizada	1 ml dilución anterior	0.3125 µg/ml
Tubo 7 con 1 ml de agua desionizada	1 ml dilución anterior	0.15625 µg/ml
Tubo 8 con 1 ml de agua desionizada	1 ml dilución anterior	0.078125 µg/ml
Tubo 9 con 1 ml de agua desionizada	1 ml dilución anterior	0.0390625 µg/ml

Cuadro 8.

Media \pm 1 DE de los mm de halo de inhibición vs. concentración en $\mu\text{g/ml}$

logrados con la técnica de Bennet et al. (39).

Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Repeticiones						
	1	2	3	4	5	\bar{x}	\pm DE
0.0375	3.2	3.4	3	3.2	3.3	3.22	0.14
0.075	5	5.2	5.3	5.5	5	5.2	0.21
0.15	7.2	7	7.1	7.4	7.2	7.18	0.14
0.312	10	10.1	10.4	10.3	10.1	10.18	0.16
0.625	12.5	12.3	12.3	12.2	12.1	12.28	0.14
1.25	15.5	15.3	15.2	15	15.1	15.22	0.19
2.5	18.3	18.2	18.3	18.1	18	18.18	0.13
5	22	22.1	22.4	22	22.1	22.12	0.16
10	23.4	23	23.1	23.2	23.5	23.24	0.20
20	26.3	26.2	26.5	26	26.1	26.22	0.19
40	30	30.1	30.2	30.5	30.4	30.24	0.20

Cuadro 9.

Media del % de Recuperación y \pm DE de las 4 diluciones.

Concentración Aplicada	X de % de Rec.	DE del %
2000 $\mu\text{g/ml}$	75%	5.8630197
200 $\mu\text{g/ml}$	73%	4.472135955
20 $\mu\text{g/ml}$	71.8%	7.98122976
2 $\mu\text{g/ml}$	66.6%	9.502631215

Cuadro 10.

Porcentaje de recuperación de las diluciones.

Concentración Aplicada	Recuperación	% de Recup.
2000 µg/ml	1500	75
2000 µg/ml	1300	65
2000 µg/ml	1550	77.5
2000 µg/ml	1600	80
2000 µg/ml	1550	77.5
200 µg/ml	150	75
200 µg/ml	130	65
20 µg/ml	14	70
20 µg/ml	15	75
20 µg/ml	13	65
20 µg/ml	13	65
20 µg/ml	13	84
2 µg/ml	1.3	65
2 µg/ml	1.5	83
2 µg/ml	1.3	65
2 µg/ml	1.2	60
2 µg/ml	1.2	60

Cuadro 11.

Promedio \pm 1 DE de los resultados obtenidos en $\mu\text{g/g}$ de cada una de las muestras de sedimento evaluadas por triplicado.

Muestreo		Promedio de las concentraciones ($\mu\text{g/g}$)	\pm 1 DE
Grupo	Día de muestreo		
1	1 Previo	3.64	0.87
2	5 Durante	5.44	0.92
3	10 Durante	5.42	0.96
4	1 Posterior	9.34	1.02
5	5 Posteriores	7.56	1.24
6	10 Posteriores	6.47	1.03
7	15 Posteriores	0.91	0.84

Cuadro 12.

Diferencias estadísticas entre grupos ($P < 0.05$)

1	1	2	3	4	5	6	7
1	×	×	×	×	×	×	×
2	×	×	×	×	×	×	×
3	×	×	×	×	×	×	×
4	•	•	•	×	×	•	•
5	×	•	•	•	×	•	•
6	•	×	×	×	×	×	•
7	×	•	•	×	×	×	×

• DIFERENCIA
× NO DIFERENCIA

FIGURAS.

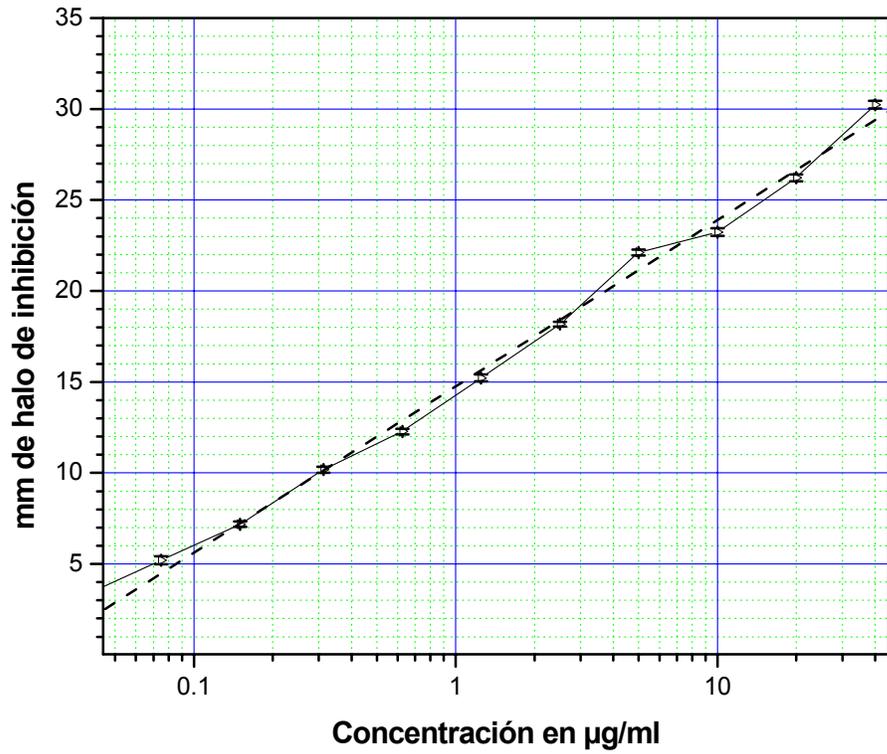


Figura 1. Media ± 1 DE de los mm de halo de inhibición vs. concentración en $\mu\text{g/ml}$ logrados con la técnica de Bennet *et al.* (39).

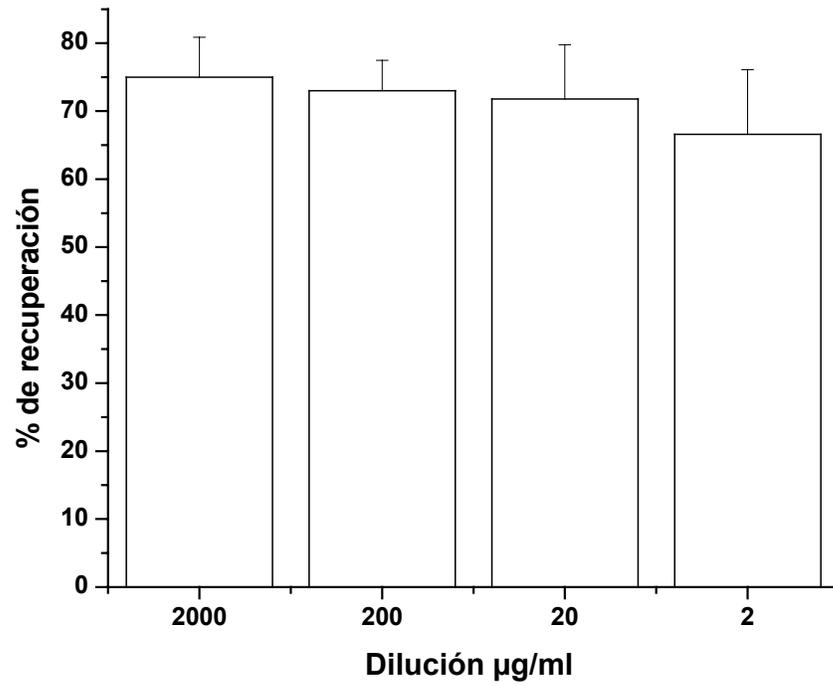


Figura 2. Porcentaje de recuperación de la fortificación.

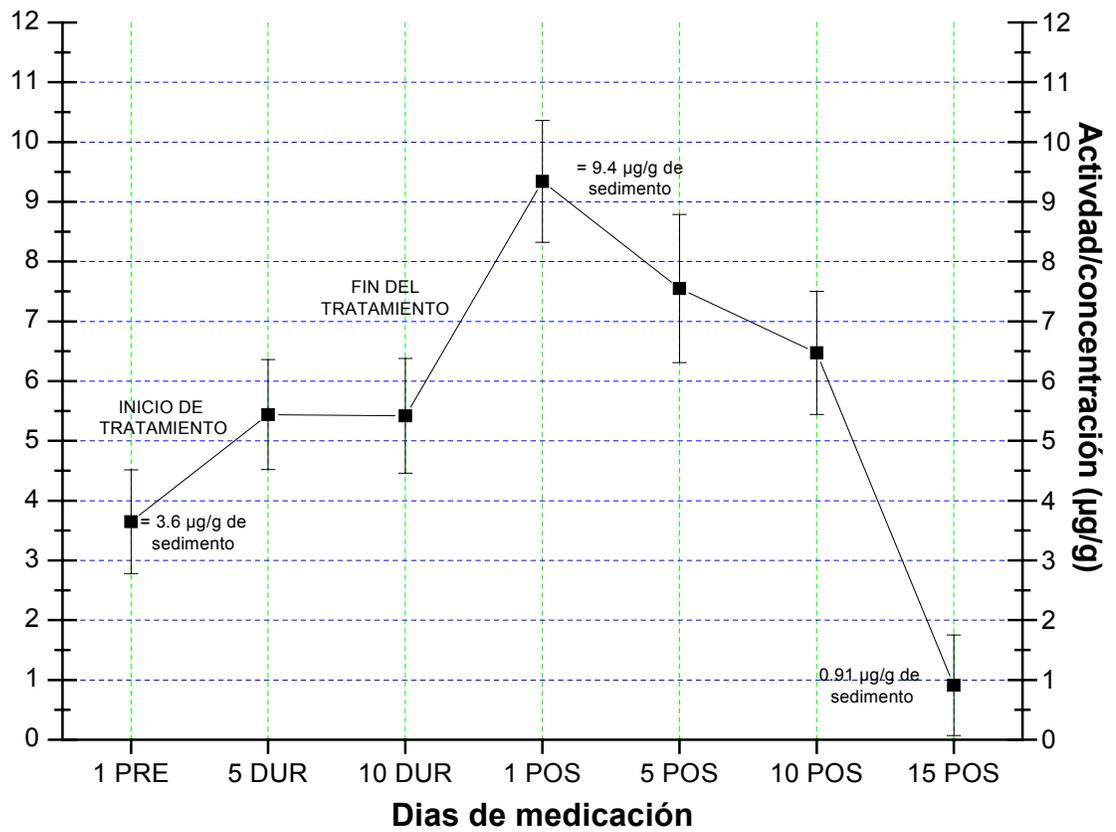


Figura 3. Promedio \pm DE de las concentraciones de enrofloxacin ($\mu\text{g/g}$) en cada uno de los periodos de muestreo.

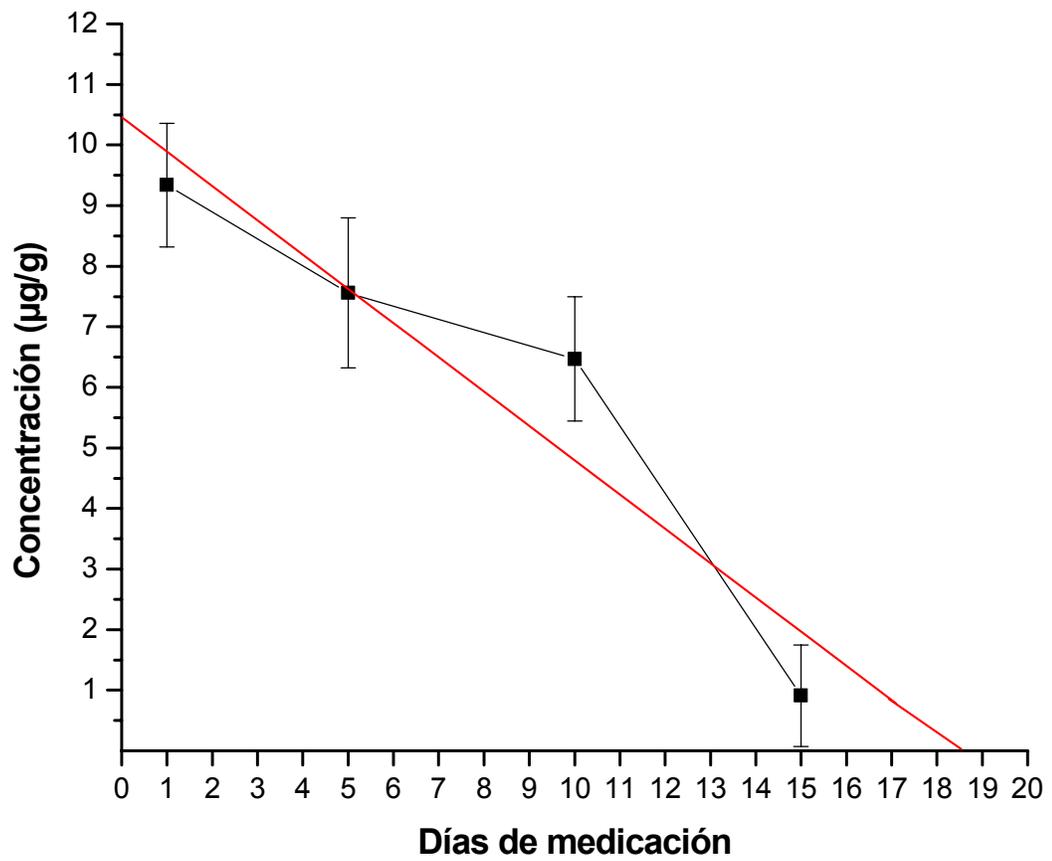


Fig 4. Extensión de la tasa de decaimiento de los residuos de enrofloxacin.