
Residuos de sustancias inhibidoras en carnes

Residues of inhibitory substances in meats

J.A. Pérez de Ciriza, A. Huarte, I. Saiz, M.T. Ozcáriz, M.T. Purroy

INTRODUCCIÓN

La utilización de antibióticos con fines terapéuticos o profilácticos tanto en medicina humana como en veterinaria referida a animales de compañía, ha contribuido a mantener la salud pública. Su uso en animales productores de alimentos proporciona, de igual modo, innegables ventajas al promover el crecimiento y por tanto mejorar la producción, al mismo tiempo que facilita el control de sus enfermedades. En las explotaciones actuales, convive una gran cantidad de animales confinados en un pequeño espacio que favorece el rápido contagio de enfermedades. La prevención incluyendo antibióticos en la alimentación, es una buena práctica ganadera. Los antibióticos se añaden al pienso en dosis subterapéuticas durante periodos de tiempo prolongados, ya que esta forma de dosificación permite tratar al mismo tiempo a toda la población. Este procedimiento se puede utilizar en algunos casos de tratamiento terapéutico, puesto que en este tipo de explotaciones sería imposible actuar tratando a cada individuo por separado¹.

Los productos terapéuticos, utilizados para el tratamiento de las enfermedades, deben ser medicamentos autorizados prescritos mediante la correspondiente receta veterinaria. Después de su utilización es necesario respetar un periodo de supresión antes de utilizar los productos alimenticios obtenidos a partir de ellos, para que el producto antiinfeccioso haya sido eliminado y no queden residuos, o que éstos se encuentren por debajo de sus límites máximos fijados.

Algunos de estos medicamentos poseen una actividad doble, ya que al controlar la flora intestinal mejoran también el aprovechamiento del alimento ingerido, actuando por tanto como promotores del crecimiento. En última instancia, los beneficios los alcanza el consumidor, que encuentra disponibles con mayor facilidad proteínas de origen animal².

Como consecuencia de todo esto, existe el riesgo de que los residuos de medicamentos o sus metabolitos persistan en el animal y en los alimentos obtenidos a partir de él, llegando a la cadena de alimentación humana. Esto tiene importantes

ANALES Sis San Navarra 1999, 22 (Supl. 3): 231-238.

Instituto de Salud Pública.

Correspondencia:

José Antonio Pérez de Ciriza Marco
Instituto de Salud Pública
C/ Leyre, 15
31003 Pamplona
Tfno. 948 423453
Fax 948 423474

repercusiones en la calidad de los alimentos y sobre todo en el campo de la salud pública. Aunque los problemas de toxicidad aguda son poco probables, pueden llegar a producirse reacciones alérgicas en individuos sensibles. Igualmente hay que considerar la presión que ejercen estos residuos sobre la flora intestinal, favoreciendo la proliferación de microorganismos con resistencia natural o adquirida. Por otro lado alguna de estas sustancias puede tener carácter carcinogénico, incluso teratogénico, o simplemente conducir a procesos degenerativos que aceleran el envejecimiento³.

Para evitar todos estos problemas, es preciso en primer lugar disponer de medicamentos de calidad, lo que implica compromiso entre eficacia y mínimo residuo. Por otro lado, su utilización debe ser correcta, lo que implica un correcto control veterinario y farmacéutico. Se debe procurar que estos fármacos no se utilicen en medicina humana y a su vez modificarlos cada dos o tres años con el fin de no crear resistencias. Un aspecto importante es la fijación de límites máximos de residuos en alimentos, es decir incluir normas de fabricación, venta y empleo, en la legislación. Pero para implementar una legislación respecto al uso de un producto determinado, es condición indispensable disponer de un método de detección de dicho producto. Esto lleva implícito el desarrollo de técnicas analíticas que permitan comprobar esta presencia y su adecuación a los niveles permitidos.

Entre los componentes más ampliamente utilizados en la práctica veterinaria y en la crianza de animales se encuentran las tetraciclinas, las sulfamidas y el cloranfenicol.

Para articular de forma completa el control de residuos, se establece por RD 1262/89⁴ y como adecuación a la Normativa Europea, el Plan Nacional de Investigación de Residuos en Animales y en las Carnes Frescas (PNIR), en el que se establecen las medidas de control aplicables respecto a las sustancias y sus residuos en animales vivos y sus productos. El establecimiento de un procedimiento

comunitario de fijación de límites máximos de residuos, a través del Reglamento 2377/90 del Consejo⁵, se justifica en los avances científicos que permiten su determinación a niveles cada vez más bajos, en la protección de la salud y en la ordenación y libre circulación de los productos en los distintos mercados. La Directiva 23/96/CE⁶ establece una nueva clasificación de los residuos y los alimentos en los que deben ser controlados.

Por todo lo anterior, se pretende poner a punto unas técnicas analíticas para la determinación cuantitativa de tetraciclinas, sulfamidas y cloranfenicol en los diferentes tejidos animales. Se parte de la utilización de una técnica microbiológica de cribado, investigando en las muestras "positivas" las sustancias específicas. Posteriormente se deberá establecer distribución y evolución de los resultados determinados. La confirmación cuantitativa de los resultados positivos, facilitaría una actuación eficaz estableciendo las adecuadas medidas sanitarias preventivas. Las muestras positivas son analizadas simultáneamente por el laboratorio del Centro Nacional de Alimentación de Majadahonda (CENA).

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras

Para realizar el trabajo se han utilizado las muestras recogidas por el Programa Nacional de Investigación de Residuos para la detección de inhibidores microbianos durante los años 1996 a 1998. La distribución fue la siguiente: 505 muestras en 1996, 271 muestras en 1997 y 263 muestras en 1998. Sólo las 60 muestras valoradas como positivas en la técnica microbiológica se han utilizado para la determinación de sulfamidas y tetraciclinas. No se han podido realizar en todas las muestras los análisis en función de la cantidad disponible de muestra ya que una alícuota se enviaba al CENA para su estudio. De aquellas de las que se disponía de suficiente cantidad, se efectuó más de una determinación para valorar su distribución y evolución. Se utilizaron también 311 muestras durante los tres años para efectuar la

determinación de cloranfenicol mediante la técnica de ELISA.

Técnica de cribado de las cuatro placas modificada a cinco placas

Permite detectar la presencia de inhibidores del crecimiento bacteriano en músculo, hígado y riñón de las especies de abasto. Se trata de una técnica de difusión en agar en la que las muestras se sitúan sobre la superficie de varias placas que contienen *Bacillus subtilis* BGA o *Micrococcus luteus* ATCC 9341 o *E. Coli* ATCC 11303 inoculados en medios de cultivo con diferentes pH. Se utiliza una placa de pH 6, una de pH 7,2 y una de pH 8 inoculadas con *B. subtilis*, una de pH 8 con *M. luteus* y una de pH 7,2 inoculada con *E. coli*. Se utilizan también discos de control situados en posiciones opuestas. Si la muestra contiene inhibidores, éstos difunden alrededor de aquellas provocando la aparición de zonas de inhibición del crecimiento del microorganismo sembrado. Se establece un mínimo de, al menos, 2 mm de anchura de la zona de inhibición, para considerar que existe alguna sustancia inhibidora en la muestra⁷.

Cloranfenicol mediante ELISA

El método permite la determinación cuantitativa de cloranfenicol mediante ensayo inmunoenzimático competitivo en microplaca. La técnica es aplicable al análisis de carne y leche. Está basado en la reacción antígeno-anticuerpo utilizando los pocillos de la microplaca recubiertos con el anticuerpo específico anti-cloranfenicol. Se adiciona enzima conjugado, patrón y muestra. El cloranfenicol libre y el conjugado al enzima compiten por unirse al anticuerpo anticloranfenicol. Cualquier anticuerpo no unido es eliminado en los procesos de lavado. Posteriormente se añade el sustrato y el cromógeno y se procede a su incubación. El enzima conjugado que ha quedado unido transforma al cromógeno incoloro en azul. La adición de una solución de parado vira el azul a amarillo lo que permite su determinación espectrofotométrica a 450 nm. La densidad óptica es inversamente proporcional al logaritmo de la concentración de cloranfenicol en la muestra. Los valores de absorbancia obtenidos para los patrones

y las muestras se expresan como porcentajes respecto al blanco y se representan en un sistema de coordenadas semilogarítmico frente a la concentración de cloranfenicol. La curva de calibrado es lineal entre 50 y a 350 ng/l (ppt). Esta técnica tiene un límite de detección de 100 ng/l para muestras de carne. El porcentaje de recuperación obtenido es aproximadamente del 76%.

Tetraciclinas por HPLC- DIODE-ARRAY

El método de basa en una extracción y purificación sobre fase reversa y un análisis cromatográfico con ácido oxálico en la fase móvil⁸. Las muestras utilizadas se conservan sin triturar y en congelación hasta la realización del análisis. Después de descongelar, se elimina la grasa y se tritura pasando al proceso de extracción. Todo el material debe ser previamente homogeneizado con tampón Macilvaine/EDTA. La muestra se mezcla con esta solución tamponada y se homogeneiza en stomacher. A continuación se centrifuga repitiendo tres veces el proceso. Los extractos centrifugados se purifican mediante cartuchos C18 previamente activados. Las tetraciclinas se eluyen con ácido oxálico. El residuo que queda tras evaporar a sequedad en corriente de nitrógeno se redissuelve en ácido oxálico/metanol y se inyecta en el cromatógrafo. Para la realización de los análisis se utiliza un cromatógrafo líquido Waters con inyector automático, sistema de bombeo cuaternario y detector de Diode-Array. El procesador de datos es Millennium 2100. La columna utilizada es Hibart RT, Lichrosorb RP-8(250*4).

La fase móvil es ácido oxálico 0,01M en agua/ acetoniitrilo/metanol (8/3/1,5). El flujo es de 1,2 ml/min. La determinación de tetraciclina y doxyciclina se realiza a 360 nm y la de clortetraciclina y oxytetraciclina a 350 nm. La detección de las mismas se realiza mediante la asignación de los correspondientes tiempos de retención, que en estas condiciones se encuentran entre los 2.803 minutos para la oxytetraciclina y los 4.377 para la doxyciclina. En la figura 1 se muestra un

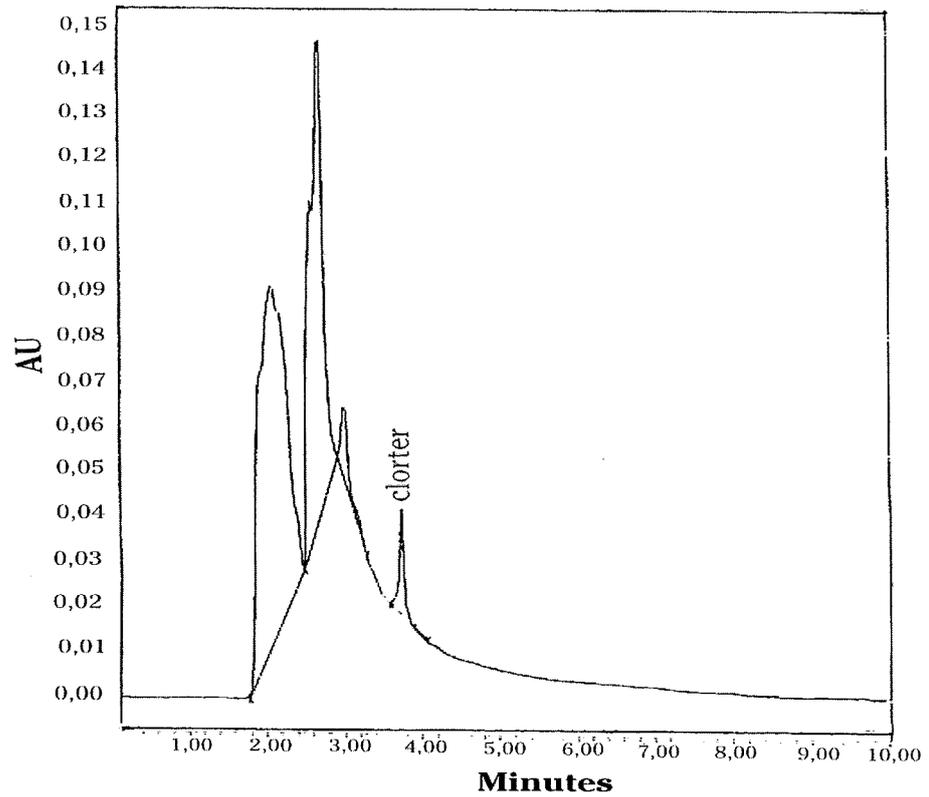


Figura 1. Cromatograma de una muestra positiva a clortetraciclina.

cromatograma de una muestra positiva a clortetraciclina.

La cuantificación de los niveles de tetraciclinas presentes en las muestras se realiza construyendo rectas de regresión para cada una de las tetraciclinas a partir de concentraciones de 400, 800, 1600 y 3200 ppb.

Los límites de detección, se sitúan entre 60 y 90 ppb. para todas ellas. Las recuperaciones obtenidas son: Tetraciclina: 85,2%; Doxitetraclina: 71,0%; Oxitetraclina: 84,6%; Clortetraciclina: 74,2%

Sulfamidas por HPLC-DIODE-ARRAY

El método se basa en la extracción de los residuos de las sulfamidas presentes en la muestra utilizando la técnica de matriz de dispersión en fase sólida

(MSPD)⁹. Se utiliza un soporte sólido lipofílico (C18) y se extrae con diclorometano para su posterior determinación por HPLC. El material C18 debe acondicionarse con hexano y diclorometano secándolo con vacío. Las muestras de hígado y riñón deben ser triturados en el momento del análisis previa eliminación de las partes grasas visibles. Se mezcla con el material C18 y se homogeneizan con mortero hasta que el tejido está totalmente disgregado en el soporte sólido. La mezcla se compacta, se lava con hexano y se eluyen las sulfamidas con diclorometano. El eluido se evapora a sequedad en corriente de nitrógeno y se redisuelve en acetonitrilo/tampón acetato 0,01M a pH 5,3 (15/85). Este extracto debe ser filtrado antes de su inyección en el cromatógrafo.

Se utiliza el mismo equipo cromatográfico que en el caso de las tetraciclinas con una columna Symmetri-C8 (4,6*250). La fase móvil es de acetato 0,01M/Acetonitrilo (15/85). El flujo es de 0,7 ml/min. La detección se realiza a 272 nm, mediante la asignación de los correspondientes tiempos de retención, que en estas condiciones se encuentran entre los 7.195 min para la Sulfadiacina-SDZ y los 17.712 min para la Sulfadimetoxina-SAMX. En la figura 2 se muestra un cromatograma de un patrón de sulfamidas.

La cuantificación se realiza construyendo rectas de regresión para cada sulfamida a partir de patrones de concentraciones 250, 500, 1000 y 2000 ppb.

Los límites de detección están entre 28 y 90 ppb para todas ellas. Las recuperacio-

nes obtenidas son: Sulfadiazina: 72,4%; Sulfametacina: 69,6%; Sulfatiazol: 71,0%; Sulfametoxipiridacina: 78,8%; Sulfapiridina: 65,8%; Sulfaquinoxalina: 76,6%; Sulfadimetoxina: 74,2%.

La confirmación se realiza por comparación de los espectros con los correspondientes a patrones. El criterio para la aceptación de los espectros es el referido a la Decisión de la Comisión 89/610/CE¹⁰.

RESULTADOS

En la tabla 1 se recogen los resultados de los análisis realizados con las diferentes técnicas utilizadas, así como el número de muestras positivas o con la sustancia detectada para cada una de ellas y de estas el número de las que sobrepasan los Límites Máximos de Residuos.

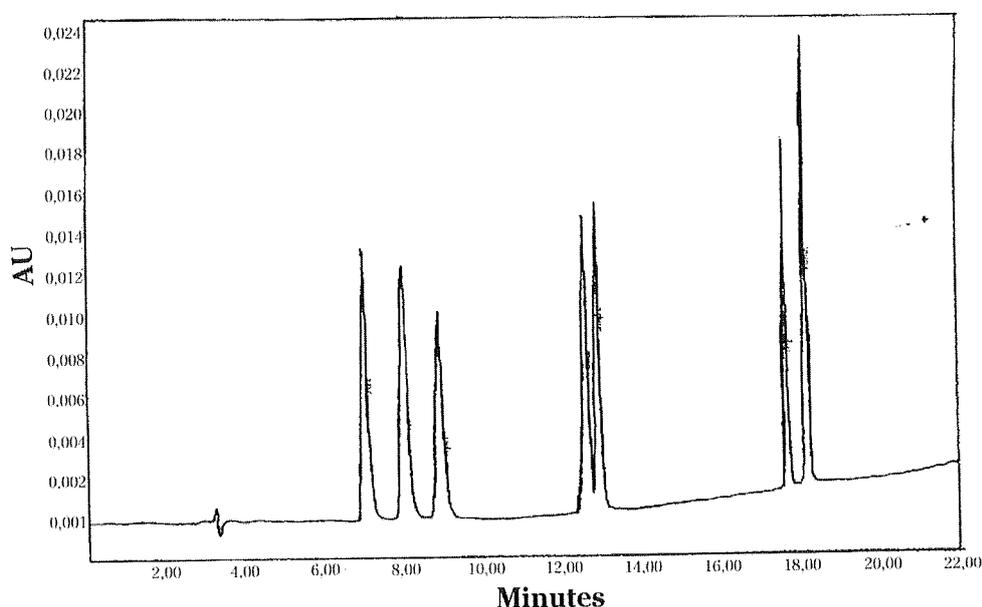


Figura 2. Cromatograma de un patrón de sulfamidas.

Tabla 1. Resultados de análisis de residuos.

Análisis	Nº Muestras	Nº Positivos / Presencia	>LMR
Test de inhibición	1039	60	
Cloranfenicol	311	0	0
Sulfamidas	48	0	0
Tetraciclinas	32	12	4

En la tabla 2 se presentan las muestras que han resultado positivas a clortetraciclina con los resultados de los análisis iniciales y los resultados finales obtenidos después de haber sido conservadas en

congelación durante de un año. Se acompañan también de los resultados obtenidos por el CENA para las mismas muestras y se indican los resultados que superan el LMR.

Tabla 2. Concentración de clortetraciclina en µg/kg.

Nº muestra	Análisis iniciales			Al año	
	Media	R. Cena	%V. Cena	Media	%v.
1	502	440	-14,1%	220	47%
2	374	415	9,9%	208	53%
3	235	240	2,1%	120	23%
4	278	260	-6,9%	130	41%
5	348	310	-12,3%	155	34%
6	163	150	-8,7%	75	18%
7	196	165	-18,8%	82	32%
8	197	200	1,5%	100	17%
9	540	580	6,9%	-	-
10	128	<100	0,0%	-	-
11	131	<100	0,0%	-	-
12	135	105	-28,6%	-	-

DISCUSIÓN

Este trabajo se planteó para investigar las sustancias presentes en la carne puestas de manifiesto a través de los test de inhibición de crecimiento bacteriano. No obstante el número de "positivos" en estos tests, no representa la incidencia de muestras con residuos de sustancias inhibidoras ya que su gran sensibilidad hace que niveles de residuos no confirmables puedan ser responsables de inhibiciones. También hay inhibiciones debidas a sustancias endógenas generadas durante el almacenamiento de las muestras y no relacionadas con las sustancias en estudio.

La primera técnica específica puesta a punto para la investigación fue la de análisis de tetraciclinas en la que se adaptaron algunos procesos para mejorar la recuperación y el límite de detección del análisis. Con todas las modificaciones se consiguió llegar a unas recuperaciones del 71 al 85% algo mejores que del 67 al 83% publicado por Onji y col¹¹ en JAOAC. Los límites de detección obtenidos (60 a 90 mg/Kg) se mantienen por debajo de los Límites Máximos de Residuos y los coeficientes de variación, del 3 al 6% se pueden considerar inferiores a los obtenidos habitualmente,

cuando se trabaja en este tipo de residuos en tejidos animales.

También se montó la determinación de sulfamidas partiendo de una extracción basada en la matriz de dispersión en fase sólida (MSPD), simplificando el proceso analítico para utilizar un único análisis cromatográfico con gradiente y dejando la cuantificación restringida a las siete sulfamidas más frecuentes. Las recuperaciones obtenidas a partir de muestras enriquecidas (65-78%) son comparables a los publicados en los trabajos de Walker y col¹² (42-85%) aunque algo más homogéneas. Los límites de detección se sitúan por debajo de los LMR publicados para estas sustancias en cualquier tipo de tejidos (100mg/Kg). Los coeficientes de variación situados entre el 2 y el 6% también son adecuados para la realización del estudio.

La investigación de cloranfenicol por enzimoimmunoensayo ha puesto de manifiesto la nula incidencia de esta sustancia, no necesitando por tanto ningún análisis de confirmación. También, en un informe que realizó el Gobierno Vasco¹³ con resultados de las campañas de 1990 y 1991, se detecta una muestra con residuo de 97 analizadas. Como conclusión se puede

resaltar la ausencia de residuos de cloranfenicol en las 311 muestras analizadas.

El análisis de tetraciclinas ha detectado la presencia de clortetraciclina en 12 de las 32 muestras investigadas, lo que representa un 37,5% de las muestras analizadas, lejos del 83% de confirmaciones en residuos de tetraciclinas declarado por Calderón y col¹⁴ en el CENA durante los años 1994 y 1995. Diez de las muestras correspondían a hígado y dos eran riñones, siendo 11 de ovino y la restante de equino, no detectándose residuos en muestras de porcino o bovino.

Hay que resaltar como conclusión que sólo 4 muestras superan el Límite Máximo de Residuos lo que representa el 0,38% de las muestras sometidas a estudio. Este porcentaje se sitúa entre el 0,48% que declara el MAF de Nueva Zelanda¹⁵ y el 0,13% que informan las autoridades de Gran Bretaña¹⁶. En cuanto a productos existe gran diferencia con los resultados obtenidos por la FDA en 1993 ya que encontraba oxitetraciclina (10%) y tetraciclina (4%) no citándose detecciones de clortetraciclina¹⁷.

La variación entre los resultados obtenidos en distintas submuestras no se pueden considerar significativas valorando el coeficiente de variación de la técnica. La desviación media con los valores obtenidos en el CENA puede estimarse del 5%, que aunque tampoco puede considerarse significativa, pudiera relacionarse con la rapidez en la realización de nuestros análisis.

En relación a los porcentajes de variación de las concentraciones en las muestras después de permanecer almacenadas en congelación durante un año se comprueba una disminución media del 35%. Este valor que se puede destacar como conclusión, establece la desaparición de aproximadamente la tercera parte de los residuos en un periodo anual, pero en sentido contrario indicaría la mínima degradación en los periodos habituales de análisis.

La determinación de sulfamidas en 48 muestras no detectándose residuos en ninguna de ellas, ha puesto de manifiesto una gran diferencia con los datos declarados por la Comunidad Autónoma Vasca, donde se sitúa en el 4% las muestras que supera-

ban el LMR en el periodo 1992 a 1995¹³. El Ministerio de Agricultura de Nueva Zelanda¹⁶ baja sensiblemente el porcentaje de identificación y declara que el 1,27% de los animales investigados superan el LMR. La inexistencia de residuos referida a las 1039 muestras iniciales, es reseñable como conclusión, e impide cualquier investigación adicional sobre su distribución o evolución.

Finalmente hay que valorar la estrategia analítica desarrollada, las dificultades encontradas y las carencias puestas de manifiesto y que habría que estudiar. Es evidente que con la baja incidencia que presentan los residuos de sustancias inhibidoras en carnes es necesaria una técnica como el test de inhibición del crecimiento microbiano. Después, al investigar las muestras "positivas" se plantean dificultades ya que en nuestra Comunidad, se dispondría de 2 ó 3 muestras para analizar al mes. Esto en realidad supone analizar cada muestra de forma individual, y al incluir cambio de sistema cromatográfico en el mismo equipo una gran pérdida de recursos. Hay que añadir que habría que completar el sistema para poder determinar otros grupos de sustancias como b-lactámicos, aminoglucósidos, macrólidos, quinolonas y nitrofuranos. Todos estos grupos tienen gran interés ya que algunos presentan gran importancia a nivel general y otros para alguna especie animal en concreto.

Por ello, teniendo en cuenta las condiciones analíticas que algunos requieren, el número de muestras a investigar y la limitada repercusión que en este tipo de control con muestreo aleatorio representa la rapidez, es evidente que se debe implantar una estrategia que agrupe muestras de cada grupo analítico. Esto se puede tener en un laboratorio especialmente dedicado que asuma el análisis de todos los grupos de sustancias, o separando en laboratorios especializados alguna de las sustancias citadas.

BIBLIOGRAFÍA

1. ZAMARREÑO A. 1993. Caracterización farmacocinética y niveles de residuos de clenbuterol en corderos de raza rasa.

2. O.M.S. Evaluación de ciertos residuos de fármacos de uso veterinario en los alimentos. Serie de informes técnicos 799. 36º Informe del Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios.
3. O.M.S. Evaluación de ciertos residuos de fármacos en alimentos. Serie de informes técnicos 832. 40º Informe del Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios.
4. DOCE. Aprueba el Plan Nacional de Investigación de Residuos en Animales y en las Carnes Frescas. Real Decreto 1262/1989.
5. DOCE. Establece un procedimiento de fijación de los límites máximos de medicamentos veterinarios de origen animal. Reglamento nº 2377/90 de la Directiva del Consejo.
6. DOCE. Establece medidas de control aplicables respecto a las sustancias y sus reiduos en los animales vivos y sus productos. Directiva del Consejo de 29 de Abril. (96/23/CE), 1996.
7. The Reveurs de Lange. Método de determinación de tetraciclinas en tejido por HPLC-Diode - Array. Centro Nacional de Alimentación. Instituto de Salud Carlos III, 1994.
8. The Reveurs de Lange. Método de determinación de tetraciclinas en tejido por HPLC-Diode - Array. Centro Nacional de Alimentación. Instituto de Salud Carlos III, 1994.
9. Determinación de sulfamidas en tejidos de animales. Laboratorio de Salud Pública. Departamento de Sanidad. Gobierno Vasco, 1995.
10. DOCE. Establece métodos de referencia y la lista de laboratorios nacionales de referencia para la detección de residuo. Directiva del Consejo (89/610/CE), 1989.
11. Onji Y, UNO M, TANIGAWA K. Liquid chromatographic determination of tetracycline residues in meat and fish. J Assoc Off Anal Chem 1984; 67: 1135-1137.
12. WALKER LV, WALSH JR, WEBBER SS. High performance liquid chromatography of sulphonamides extracted from bovine and porcine muscle by solid phase dispersion. J Chromatography 1992; 595: 179-184.
13. Gobierno Vasco. Residuos de medicamentos de uso veterinario. Vigilancia de la contaminación química de los alimentos en la Comunidad Autónoma Vasca 1990-1995. 1997; 112-117.
14. CALDERON V, BERENQUER JA et al. Post-screening of antibiotic residues in meat and Kidney samples. Centro Nacional de Alimentación. Instituto de Salud Carlos III. Majadahonda, 1995.
15. ARMITAGE K. Residue monitoring annualt. Ministry of Agriculture and food. Nueva Zelanda, 1997.
16. Ministry of Agriculture. Fisheries and food. Gran Bretaña. Veterinary medicine residues. Annual Report on Surveillance for Veterinary Residues 1987.
17. WEBB Y, PAIGE J. Residues in food animals. Regulatory and veterinary possibility. FDA vet 1993; 8: 5-6.