

El excesivo uso de los antibióticos a nivel mundial es el aplicado en animales. Esta condición exige estudios como este para poner en evidencia los peligros que supone para la salud pública (N. del E.)

Detección de residuos de Enrofloxacin en muestras de músculo de ganado bovino comercializados en mercados minoristas de la Zona Norte de Lima, Perú

*Bianca Esparza¹, Daphne León¹,
Bárbara Escudero¹, Carlos Shiva²,
Néstor Falcón¹*



Resumen

El objetivo del estudio fue determinar la presencia de residuos del antibiótico enrofloxacin que superen los Límites Máximos de Residuos (LMR), en muestras de músculo de ganado bovino de mercados minoristas en la zona norte de Lima Metropolitana. La investigación fue de tipo transversal descriptivo. Se recolectó 30 muestras de 60 g de carne (músculo) de un total de 11 mercados minoristas, entre los meses de enero y febrero del año 2017. Se utilizó un gramo de cada muestra para cuantificar la cantidad de residuos de antibióticos presentes mediante un kit comercial (ELISA) basado en una competencia colorimétrica. A partir de los resultados se determinó la frecuen-

cia de muestras positivas que se encontraban por encima de 30 ppb, LMR permisibles establecidos por la Dirección General de Salud Ambiental del Ministerio de Salud del Perú (DIGESA - MINSA). Se encontró dos muestras positivas (con valores de 49,91 y 50,07 ppb) lo que representó el 7% de muestras positivas al antibiótico enrofloxacin. Estos resultados evidencian que no se respetaría el periodo de retiro de los tratamientos con este antibacteriano, por lo que se requiere mejorar el control de estas prácticas a fin de asegurar la inocuidad de los alimentos que son destinados a consumo humano.

Palabras clave: residuos antibióticos, enrofloxacin, bovino, Lima.

1 Laboratorio de Epidemiología y Salud Pública en Veterinaria.

2 Laboratorio de Microbiología e Inmunología Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Introducción

La creciente demanda de productos de origen animal ha exigido a la industria ganadera mejorar la eficiencia alimenticia, la tasa de aumento de peso y la cura de enfermedades en animales, lo que a su vez ha hecho que los productores busquen alternativas que favorezcan estos propósitos y entre ellos se ha considerado el uso de medicamentos como los antibióticos (Crawford, 1985). Si bien su uso no está prohibido en la ganadería, este debe realizarse en forma racional y prudente, respetando el denominado periodo de retiro (DIGESA, 2016).

El periodo de retiro es el tiempo necesario para que los residuos, con finalidad toxicológica, alcancen en los animales los niveles considerados como seguros para ser consumidos por los humanos (DIGESA, 2016). Adicionalmente, el Codex Alimentarius indica la necesidad de que un producto alimenticio, obtenido de un animal al que se le ha administrado un medicamento veterinario, posea una concentración máxima de residuos legalmente permitida la que se denomina Límites Máximos de Residuos (LMR) de medicamentos veterinarios (FAO/OMS, 2019).

Los residuos pueden generar en el consumidor efectos negativos, como la resistencia antimicrobiana en bacterias patógenas o una interrupción de la flora intestinal normal del humano;

además, pueden provocar efectos tóxicos crónicos por la exposición prolongada de niveles mínimos de antibióticos, así como reacciones tóxico-alérgicas hacia los residuos (Doyle, 2006; Gratacos, 2007).

Uno de los productos más utilizados en la ganadería en Lima - Perú es la enrofloxacin, la que se emplea para problemas de diarreas y neumonías (Solimano *et al.*, 2011). Aunque su uso es exclusivo en veterinaria, no se puede descartar que su llegada a las personas a través del alimento, pueda crear algún problema de salud como alergias, vómitos, diarrea, náuseas, y otra sintomatología. Por ello, el objetivo del estudio fue determinar la presencia de residuos del antibiótico enrofloxacin que superen los LMR, en muestras de músculo de ganado bovino en mercados minoristas en la zona norte de Lima Metropolitana.

Materiales y Métodos

El estudio correspondió a una investigación transversal descriptiva. Durante los meses de enero a marzo del 2017, se recolectaron 30 muestras de músculo de ganado bovino de mercados minoristas de los distritos de la zona norte de Lima (Carabayllo, Puente Piedra, San Martín de Porres, Comas, Los Olivos e Independencia). La evaluación de las muestras se realizó en el Laboratorio de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (FAVEZ - UPCH).

El tamaño de muestra se determinó mediante

Límite máximo residual LMR (ppb) µg/kg en músculo		
Quinolonas	EU	FDA
Enrofloxacin (pollos, pavos)	30	300
Enrofloxacin (ganado)	30	-
Difloxacin (pollos, pavos)	300	-
Marbofloxacin (cerdo)	150	-

Tabla 1. Niveles de tolerancia de antibióticos en comidas estipuladas por la Unión Europea (EU) y la administración de drogas y alimentos de USA (FDA).



Muestras recolectadas de los mercados en bolsa Ziploc.

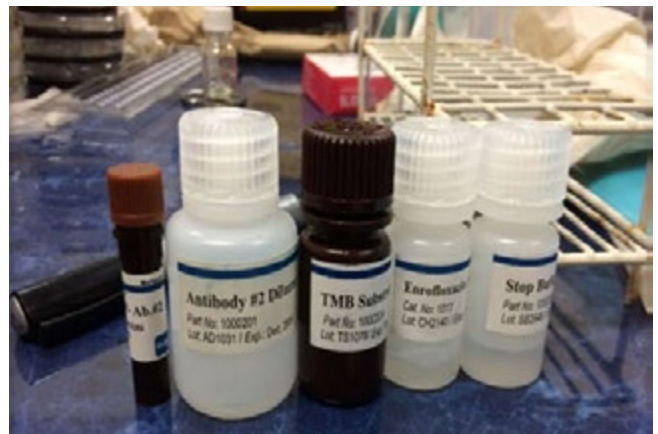
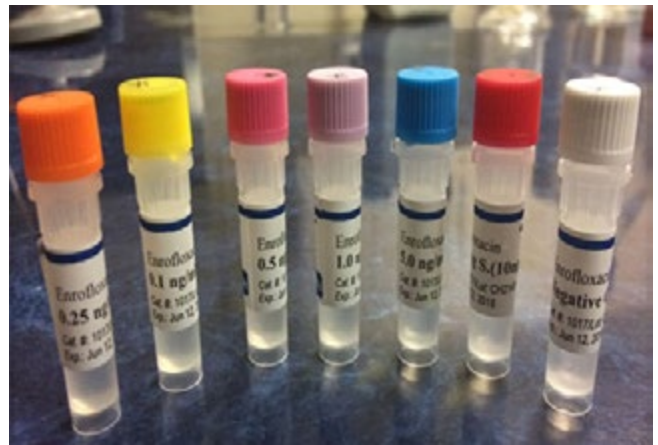


Pesaje de 1 g de muestra de carne

el criterio de prevalencia límite, con un límite de detección de 10% y un nivel de confianza de 95%. De cada mercado se recolectó entre 1 a 5 muestras de músculo de acuerdo al tamaño y número de puestos del mercado.

Las muestras de 60 g del músculo de la pierna (músculo cuádriceps femoral) fueron depositadas en bolsas individuales estériles rotuladas con información de número y procedencia. Estas fueron colocadas en un recipiente conservadores y mantenido en temperatura de refrigeración (entre 4 °C a 8 °C) durante el traslado al laboratorio, en donde se almacenaron en congelación a -20 °C hasta el día de su procesamiento. Para el procesamiento de las muestras, primero se descongeló la carne, después se removió la grasa visible y se homogeneizó con un mortero. Luego se pesó un gramo de la muestra homogeneizada y se colocó en tubos Falcon de 40 ml.

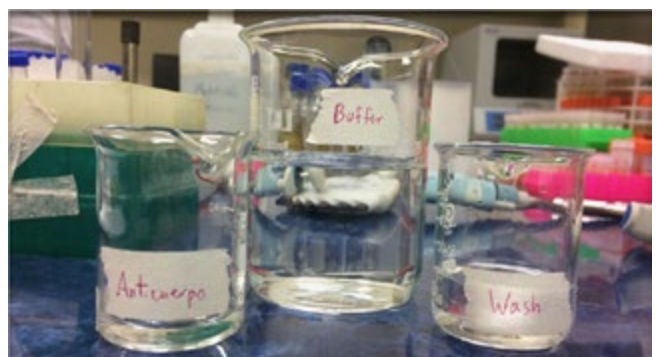
Para la detección de residuos de enrofloxacin se utilizó el kit MaxSignal® Enrofloxacin ELISA Test Kit (Two-Step). Para su uso se necesitó pre-



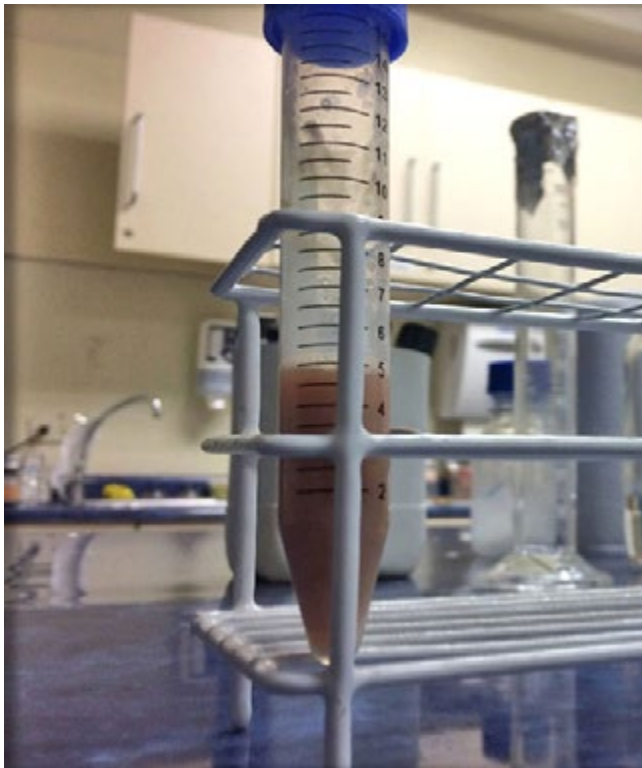
Componentes del MaxSignal™ Enrofloxacin ELISA Test Kit.

viamente preparar cuatro reactivos que no formaron parte del kit.

- 1) Para la preparación de "1X Buffer Extracción de Muestra": se mezcló 1 volumen "X Sample Extraction Buffer" con 9 volúmenes de agua destilada.
- 2) Para la preparación de "35% Metanol/Buffer para extracción de muestra": se mezcló 6.5 volúmenes "1X buffer extracción de muestra" con 3.5 volúmenes de 100% metanol.



Preparación de reactivos.



Primera parte del procedimiento KIT Elisa

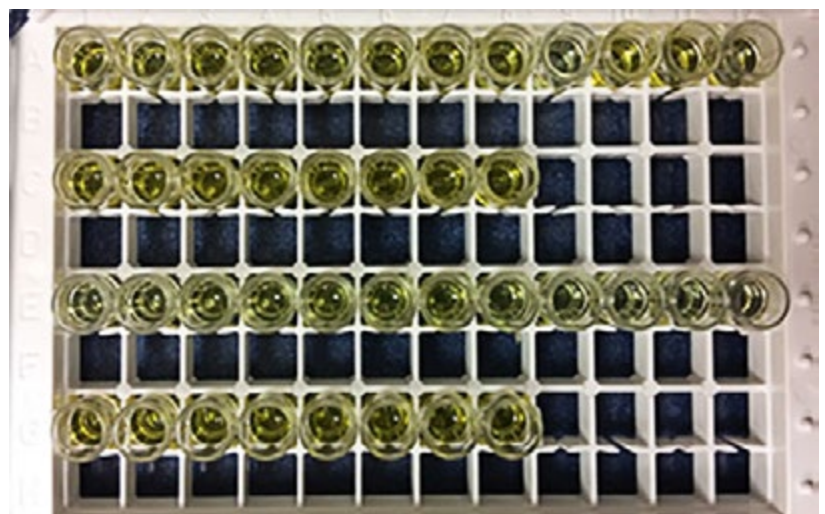
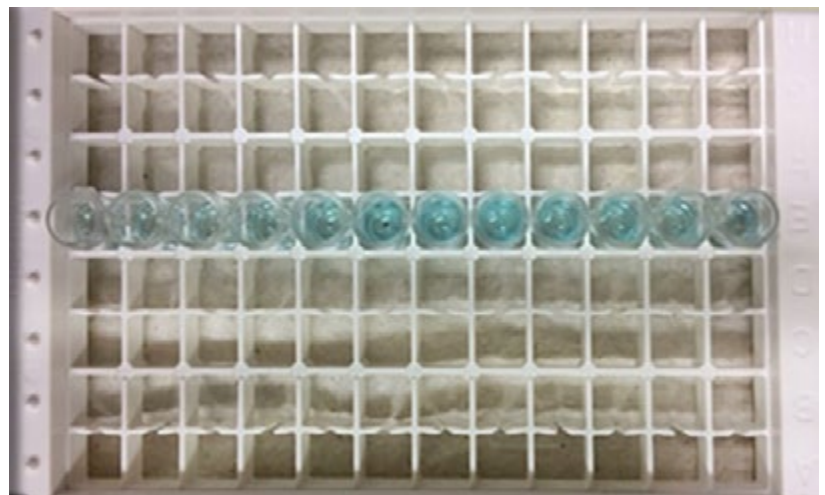
vo y se añadió 25 μ l de “Buffer de extracción de carne II” y 1.5 ml de “35% Metanol/ Buffer extracción de muestra” y se colocó al agitador vórtex por 10 minutos. Se tomó 50 μ l del sobrenadante para el ensayo.

Se añadió 50 μ l de los “estándares de enrofloxacin” (controles) a siete pocillos de la placa de micro titulación, así como 50 μ l del sobrenadante de las 30 muestras en otros 30 pocillos. A continuación, se añadió 100 μ l de “Anticuerpo #1” a cada pocillo y se mezcló lentamente la placa por 1 minuto. La placa se incubó por 30 minutos a una temperatura de 20 °C- 25 °C. Después, se aspiró la solución de la placa y se descartó todo el líquido para poder lavar los pocillos 3 veces con 250 μ l de “1X Solución de lavado”. Luego de lavar, se invirtió la placa y se secó suavemente con papel

3) Para la preparación de “1XHRP-Anticuerpo conjugado #2”: para ello se mezcló 1 volumen de “100 X HRP- anticuerpo conjugado #2” con 99 volúmenes de “anticuerpo # 2 diluyente”.

4) Para la preparación de “1X Solución de lavado”: se mezcló 1 volumen de “20 X Solución de lavado” con 19 volúmenes de agua destilada.

Luego, se siguió el protocolo indicado por el fabricante del kit. A cada muestra se añadió 4 ml de “35% Metanol/ Buffer para extracción de muestra” y 50 μ l de “Buffer de extracción de carne I”. Luego se colocaron los tubos Falcon al agitador vórtex por 10 minutos a máxima velocidad. Después se centrifugaron los tubos Falcon por 5 minutos a 4000 rpm a una temperatura de 20 °C - 25°C. Se transfirió 0.5 ml del sobrenadante a un tubo Falcon nue-



Segunda parte del procedimiento KIT Elisa.

toalla. Se añadió 150 µl de “1X Anticuerpo #2” a cada pocillo. Se incubó la placa por 30 minutos a una temperatura de 20 °C - 25 °C. Luego, nuevamente, se aspiró la solución de la placa y se descartó todo el líquido, se lavó los pocillos 3 veces con 250 µl de “1X Solución de lavado”, se invirtió la placa y se secó suavemente con papel toalla. Después, se añadió 100 µl de “TMB substrato” a cada pocillo y se mezcló manualmente por 1 minuto. Luego, se incubó la placa por 15 minutos a una temperatura de 20 °C - 25 °C y se añadió 100 µl de “Buffer Stop” a cada pocillo para parar la reacción enzimática. Finalmente, se esperó 2 minutos antes de colocarla en el lector ELISA con 450 nm de longitud de onda.

A partir de los resultados, se determinó la frecuencia de muestras con residuos de enrofloxacin y se cuantificó los residuos en PPB. Se definió la frecuencia de muestras que se encontraban por encima de los LMR establecidos en la Norma Técnica Sanitaria que establece los LMR de 100 ppb para el antibiótico enrofloxacin en alimentos de consumo humano (NTS N°120-MINSA/DIGESA-V.01) (DIGESA, 2016).

Resultados

Se recolectó cuatro muestras de los mercados del distrito de Carabayllo, cinco de Comas, dos de Independencia, tres de Los Olivos, nueve de Puente Piedra, y siete de San Martín de Porres. Entre las 30 muestras recolectadas, se encontró que dos tenían valores superiores a los LMR estipulados por DIGESA para el antibiótico enrofloxacin (100 ppb), representando el 7% de las

	N° MUESTRAS	%
< al límite max.	28	93
> al límite máx.	2	7
	30	

muestras estudiadas. Estas muestras fueron obtenidas de mercados pertenecientes a los distritos de Puente Piedra (149.91 ppb) y San Martín de Porres (150.07 ppb).

Discusión

Los resultados del estudio encuentran muestras positivas a enrofloxacin con lo que se demuestra que estos productos están llegando al consumo humano y consecuentemente se hace necesario una vigilancia epidemiológica más exhaustiva a fin de evitar que residuos farmacológicos lleguen a las personas a través de la vía digestiva. Según Woodward (2009), la presencia de residuos farmacológicos en los alimentos sugiere que es necesario realizar un fortalecimiento de las buenas prácticas pecuarias (BPP), para minimizar este riesgo en la producción primaria.

La presencia de residuos de enrofloxacin se ha reportado en diferentes partes del mundo. En América, se realizó un estudio por Canet-Elgueta *et al.* (2018) en Guatemala, el cual determinó 5% de muestras positivas a residuos de quinolonas en muestras de carne bovina obtenida en mercados municipales. En Venezuela, Molero-Saras *et al.* (2007) detectaron presencia de residuos del compuesto enrofloxacin/ciprofloxacina en dos plantas beneficiadoras del municipio San Francisco del estado Zulia; así mismo, a través de una encuesta, 51% de los productores mencionaron la preferencia por la enrofloxacin por su doble acción profiláctica y terapéutica. El estudio realizado por Chiriboga, E., *et al.* (2017) encontró resultados que oscilaban entre 2.44 a 12.35 µg/kg, en la ciudad de Ambato, Ecuador. En Brasil se detectó entre 8.63 y 12.25 µg/kg en mataderos en Rio de Janeiro (Panzenhagen *et al.*, 2017).

Asimismo, en otras partes del mundo también se han encontrado residuos de enrofloxacin en productos de origen animal destinados a consumo humano. Un estudio realizado en Urmia, Irán, realizado por Mashak (2017) detectó enrofloxacin en muestras de ganado y pollos en más del 53% de las muestras. En Kosovo, Aliu *et*

al. (2014) detectaron la presencia de residuos de quinolonas en muestras de carne, siendo la detección de enrofloxacin 6.7% la más alta en comparación a ciprofloxacina (5.6%) y flumequin (3.4%).

A pesar de los beneficios que presentan los medicamentos veterinarios, estos pueden generar serios problemas, ya que un uso indiscriminado puede alterar la calidad de los productos de origen animal (Rokka *et al.*, 2005). Los principios activos pueden dejar residuos en los tejidos animales y si los productos derivados de los animales son destinados al consumo directo pueden llegar a los consumidores y generar una serie de efectos adversos (Botana, Landoni & Martin, 2002).

Estos efectos adversos en la población humana pueden ser directos (toxicidad de riñón, hígado, médula, oído y efectos teratógenos) o indirectos (alergias y fenómenos de resistencia bacteriana). La toxicidad por residuos de medicamentos no es aguda, es poco frecuente que una persona se enferme por consumir algunas veces un alimento de origen animal con residuos de medicamentos; sin embargo, la manifestación se genera a largo plazo cuando existe un consumo sostenido de productos con residuos (Grande *et al.*, 2000).

Es importante resaltar que, si bien el uso de medicamentos es necesario para la producción animal y muchas veces los productos derivados tienen residuos, estos no deberían superar los LMR para evitar la presentación de los efectos adversos. En Perú existe la Norma Técnica Sanitaria que establece los LMR de medicamentos veterinarios en alimentos de consumo humano (NTS N°120-MINSA/DIGESA-V.01). Según esta norma, los organismos competentes para la vigilancia del tema son la Dirección General de Salud Ambiental (DIGESA), el Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA) y el Servicio Nacional de Sanidad Pesquera (SANIPES). Así mismo, la norma establece que los tres organismos deben contar con sistemas de vigilancia sanitaria

que permitan prevenir, identificar y eliminar riesgos a lo largo de la cadena alimentaria. Sin embargo, esta norma no menciona cómo detectar o en qué momento determinar la presencia de antibióticos en carcasas, siendo este tema de suma importancia para tomar medidas adecuadas para el control adecuado de residuos de antibióticos.

Para la vigilancia sanitaria se requiere tomar muestras para identificar y cuantificar los residuos en los productos derivados de animales. Entre las técnicas utilizadas para este fin, se encuentran disponibles pruebas inmunoenzimáticas (ELISA) que cuantifican antibióticos específicos (Moreno, 2003). Esta técnica tiene la ventaja de ser más económica que las pruebas instrumentales como HPLC, RIA y CG-EM. Además, es una prueba precisa, con alta sensibilidad, de aplicación sencilla y rápida, que necesita de una sola lectura para el análisis de varias muestras (Cultek, 2006)

A pesar de que la elección del tejido no fue la ideal para el análisis de la enrofloxacin, se obtuvo dos muestras con resultados por encima de los LMR establecidos por DIGESA. Se sugiere analizar muestras de hígado y riñón para la detección de enrofloxacin en futuros trabajos, ya que las enrofloxacinas son metabolizadas en estos órganos. Olatoye y Ehinmowo (2000) encontraron que el hígado es el órgano que presenta los niveles más altos de detección, seguido del riñón y después el músculo.

Los resultados de esta investigación corroboran la grave preocupación por el uso indiscriminado de antibióticos, la cual ha generado una gran atención por parte de agencias reguladoras y sobre todo en el área de la salud pública. La exposición humana a productos animales que tienen niveles considerados de residuos de antibióticos puede generar, inducir y transferir resistencia a patógenos humanos, así como problemas inmunológicos y trastornos de la flora intestinal (Chang., *et al.* 2015).

Se necesita continuar con investigaciones que

generen evidencias del estado sanitario de los productos de origen animal en el Perú. Los residuos de medicamentos representan una amenaza para la salud de las personas y en el caso de los antibióticos, la resistencia es un factor adicional. Para controlar y prevenir este problema se hace necesario contar con sistemas de vigilancia y trazabilidad desde las diferentes competencias de los organismos de control. Otro factor importante es el fortalecimiento de las buenas prácticas pecuarias, para hacer un

uso responsable de los antibióticos; esto incluye no hacer uso de ellos sin prescripción médica, minimizar o eliminar su uso por razones no terapéuticas y en caso fuese necesario utilizarlos, respetar los periodos de retiro.

Agradecimientos

A Beca de Estímulo Fernando Porturas Plaza, otorgada por la Universidad Peruana Cayetano Heredia, que financió la investigación.

Referencias Bibliográficas

1. Aliu, H., & Sulaj, K. (2014). Screening of quinolone antibiotic residues in beef sold in Kosovo. *Albanian Journal of Agricultural Sciences*.
2. Botana López, L. M., Landoni, M. F., & Martín-Jiménez, T. (2002). *Farmacología y terapéutica veterinaria*. McGraw-Hill Interamericana.
3. Canet-Elgueta, M. J., Davila, A., Hernández, R., & Lepe-López, M. (2018). Detección de residuos de quinolonas en carne bovina de venta en los mercados municipales de la Ciudad de Guatemala. *Ciencia, Tecnología y Salud*, 5(2), 189-195.
4. Chang, Q., Wang, W., Regev-Yochay, G., Lipsitch, M., & Hanage, W. P. (2015). Antibiotics in agriculture and the risk to human health: how worried should we be? *Evolutionary applications*, 8(3), 240-247.
5. Chiriboga, E., & Paola, V. (2017). Estudio piloto sobre el análisis de residuos de antibióticos en pechuga de pollos comercializados en la ciudad de Ambato (Bachelor's thesis).
6. Crawford, L.M. (1985). The impact of residues on animal food products and Human Health. *Rev Sci tech O⁹ int Epiz* 4: 669-685.
7. CULTEK. (2006). Soluciones ELISA. Recuperado el 30 de mayo de 2017, de Protocolos y Técnicas: <http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Soluciones-ELISA-protocolos.pdf>
8. Dirección General de Salud Ambiental (DIGESA). (2016). Norma sanitaria que establece los límites máximos de residuos (LMR) de medicamentos veterinarios en alimentos de consumo humano. NTS N°120-MINSA/DIGESA-V.01 Disponible en: <https://www.senasa.gob.pe/senasa/descargasarchivos/2014/11/RM-372-2016-MINSA-con-NTS-120-MINSA-DIGESA-v01-LMR-Medicamentos.pdf>
9. Doyle, M., Beauchat, L., Montville, T. 2001. *Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers*. 2a edición. Ed. ASM Press. Washington DC.
10. Grande, B. C., Falcón, M. G., & Gándara, J. S. (2000). El uso de los antibióticos en la alimentación animal: perspectiva actual the use of antibiotics in animal feeds: an actual perspective o uso Dos antibióticos na alimentación animal: perspectiva actual. *CYTA-Journal of Food*, 3(1), 39-47.
11. Gratacós Cubarsí, M. (2008). Desarrollo de métodos rápidos para el análisis de residuos en producción animal. Universitat de Girona.
12. Mashak, Z., MojaddarLangroodi, A., Mehdizadeh, T., Ebadifathabad, A., & HoomanAsadi, A. (2017). Detection of quinolones residues in beef and chicken meat in hypermarkets of Urmia, Iran using ELISA. *Iran Agricultural Research*, 36(1), 73-77.
13. Molero-Saras, G. L., Pérez-Arévalo, M. D. L., Sánchez-Villalobos, A. J., Prieto, Y. C., & Arrieta-Mendoza, D. (2007). Residuos de Enrofloxacin en canales de pollos procedentes de cuatro plantas beneficiadoras, Municipio San Francisco, Estado Zulia, Venezuela. *Revista Científica*, 17(4), 412-416.
14. Moreno García, B. (2003). *Higiene e inspección de carnes*. Vol II. Ediciones Díaz de Santos.
15. Olatoye, I. O., & Ehinmowo, A. A. (2010). Oxytetracycline residues in edible tissues of cattle slaughtered in Akure, Nigeria. *Nigerian Veterinary Journal*, 31(2), 93-102.
16. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO)/ Organización Mundial de Salud (OMS). (2019). Límites máximos de residuos (LMR). En: FAO/OMS. *Codex Alimentarius*. Disponible en: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/maximum-residue-limits/es/>
17. Panzenhagen, P. H. N., Aguiar, W. S., Gouvêa, R., de Oliveira, A. M., Barreto, F., Pereira, V. L., & Aquino, M. H. C. (2016). Investigation of enrofloxacin residues in broiler tissues using ELISA and LC-MS/MS. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 33(4), 639-643.
18. Rokka, M., Eerola, S., Perttilä, U., Rossow, L., Venäläinen, E., et al. (2005) He residue levels of narasin in eggs of laying hens fed with unmedicated and medicated feed. *Mol Nutr Food Res* 49: 38-42.
19. Solimano, G., Fernández, C., Evaristo, R., & Falcón, R. (2011). Antibacterianos de empleo frecuente en ganado bovino destinado a la producción de leche y carne en Lima, Perú. *Una Salud Rev Sapuvet Salud Públ*, 2, 81-94
20. Woodward, K. N. (2009). Surveillance for veterinary residues. *Veterinary Pharmacovigilance*, 587. 