



Por Nelson Montoya, M.Sc.

ANÁLISIS DE RESIDUOS DE CLORANFENICOL Y NITROFURANOS

El antibiótico de amplio espectro Cloranfenicol (CAP) y los Nitrofuranos (NF) categorizados como probables “carcinogénicos y/o mutagénicos” son regulados en las legislaciones norteamericana (FDA) y europea (EMEA) mediante norma prohibitiva y precautelaria de “Cero Tolerancia”. Esto es, un valor de concentración relacionado con el límite de detección del método analítico recomendado y que varía en función del estándar de detección gubernamental.

DETECCIÓN DE RESIDUOS

La estimación de residuos de antibióticos en alimentos de origen animal es realizada mediante dos tipos de métodos: “Screening” y Confirmatorios. Los métodos de “screening” (microbiológicos: multiplate test, inmunoensayos: ELISA, cromatografía líquida: HPLC, sistema de ensayo receptor: CHARM II) son ensayos presuntivos que tienen como objetivo identificar la presencia de una y/o varias drogas en una muestra sospecha. Las ventajas de estos métodos son, una mínima extracción y procedimientos de limpieza, son relativamente económicos y de fácil aplicación. Sus desventajas son: presentar un rango amplio, y no específico de espectro de sensibilidad y especificidad.

Sí las pruebas de “screening” arrojan resultados positivos para cualquier antibiótico sujeto a verificación, las políticas de residuos de antibióticos que actualmente rigen en las fronteras, especifican la aplicación “obligatoria” de métodos confirmatorios. Los métodos para la confirmación de residuos de antibióticos son: HPLC, LC-MS y LC/MS/MS (Liquid Chromatography/Mass Spectrophotometry/Mass Spectrophotometry). A diferencia de los métodos de screening, las características principales de los métodos confirmatorios son la elevada capacidad de cuantificación, especificidad y sensibilidad.

RESIDUOS DE CLORANFENICOL

El uso de este antibiótico en el tratamiento de animales destinados a la producción de alimentos para humanos es ilegal. Al momento no existe información suficiente para establecer un “marcador traza” que refleje la cantidad total de residuos de la droga luego del tratamiento (ver boletín anterior). Por ello, el análisis y reporte de residuos de este antibiótico se basa en la detección directa de la molécula activa: **Cloranfenicol**.

El CAP en las normativas europea y norteamericana es regulado mediante un valor específico de “Cero Tolerancia”; ésto es un nivel inferior a 0.1(EMEA) y 0.3 ppb (FDA).

Métodos de “Screening”

Si bien, los niveles de detección del método “multiplate” reúne los requerimientos de la UE para el LMR de muchos de los antibióticos analizados por esta prueba, ésta no es apta para la detección de drogas prohibidas como el cloranfenicol, nitrofuranos y/o nitroimidazoles. En la práctica el método de ELISA es el método de elección para el screening de residuos de CAP en alimentos. Los límites de detección confiables de estos procedimientos se sitúan en rangos de 1 a 10 ppb. No obstante y a pesar de que el método, ha sido descrito por la FDA en la lista de procedimientos oficiales para el “screening” de CAP en productos comestibles, se han reportado numerosas inconsistencias en los resultados durante su aplicación.

Los sistemas de radio receptor como el CHARM II son muy sensitivos (0.3 ppb) para sulfonamidas, cloranfenicol, tetraciclinas, aminoglucósidos específicos y macrólidos. Pero reacciones no específicas (falsos-positivos) han sido reportadas en la detección y confirmación de antibióticos mediante este método.

El sistema HPLC debido a su alta especificidad, sensibilidad y rango cuantitativo, permite una elevada confiabilidad y disminución de resultados falsos-positivos, pudiéndose obtener límites de detección cercanos a 1 ppb en análisis de multiresiduos de antibióticos. Sin embargo, los tiempos de análisis, costos de reactivos y dificultad de aplicación a gran escala, son las desventajas que cuentan al momento de su elección como método de screening.

Métodos confirmatorios

Recientemente Canadá y la UE incluyeron en sus métodos el sistema LC/MS/MS para detectar niveles de CAP inferiores a 0.1 ppb; siendo ésta la forma de verificación de residuos de antibióticos prohibidos en los productos de China y Vietman, con las consecuencias por todos conocidas. Al momento la FDA también ha modificado y validado su metodología LC/MS/MS, para confirmar los niveles de CAP en camarones, crawfish y miel a niveles de 0.3 ppb, colocando de esta forma la metodología americana en línea con los métodos de Canadá y UE. Hoy en día, el sistema LC/MS/MS es el método aplicado por las entidades de control para la confirmación de CAP y otros antibióticos incluidos en la categoría “Cero Tolerancia”.

RESIDUOS DE NITROFURANOS

La principal característica residual de los NF, es su rápido metabolismo hacia metabolitos de alta capacidad de enlace con proteínas del organismo. Consecuentemente, las drogas parientes de los

NF son rápidamente metabolizadas y no detectables en un corto tiempo luego del tratamiento. En contraste, sus residuos (complejo metabolito-proteína) son detectables durante mucho tiempo luego del tratamiento con la droga.

El análisis de residuos de estos antibióticos se centra en la detección de sus metabolitos (AOZ-proteína, AMOZ-proteína, AHD-proteína, SEM-proteína) y la respectiva droga pariente (Furazolidona, Furaldona, Nitrofurantoina, Nitrofurazona). Así las normativas EMEA y FDA estiman niveles residuales totales inferiores a 0.3 ppb.

Métodos de “Screening”

A diferencia del CAP, la determinación de los metabolitos persistentes de los NF han demostrado poca factibilidad para su estimación mediante ensayos microbiológicos y/o reacciones antígeno-anticuerpo. Hasta el momento tampoco se cuenta con reportes de análisis de estos metabolitos mediante el sistema de ensayo receptor.

El sistema HPLC es el método de elección, para el “screening” de los complejos formados por los metabolitos de la Furazolidona y Nitrofurazona. Mediante este sistema se pueden lograr detecciones simultáneas a niveles confiables de detección tan bajos como 1 ppb. Antes de la aplicación del método, un factor a considerar es que, debido a la naturaleza compleja de la unión metabolito-proteína, su evaluación resulta complicada debido al número de tratamientos químicos requeridos para liberar los residuos enlazados. La complejidad anotada, ha incidido en el avance tecnológico y la disponibilidad de métodos que permitan la evaluación rápida de estos metabolitos.

Métodos confirmatorios

El método de mayor simpleza con que se cuenta al momento para la determinación de los metabolitos de NF es el sistema HPLC. Sin embargo este método puede sufrir considerables interferencias provenientes de la matriz (tejidos) a analizar. El método tampoco reúne las características exigidas por la UE a los procedimientos analíticos confirmatorios aplicados en el análisis de sustancias prohibidas. Si bien al momento no existe un método referencial para la confirmación de los metabolito de NF y sus respectivas drogas parientes, basados en las características de elevada sensibilidad y especificidad el sistema LC/MS/MS es ampliamente recomendado y aplicado para la estimación de estas drogas. Este método permite la estimación de niveles cercanos a 0.08 ppb.