// CENAIM INFORMA
15 de abril del 2002
Boletín Informativo No.54

Residuos de antibióticos en camarones: LÍMITES RESIDUALES Y DETECCIÓN DE FENICOLES

La seguridad de los alimentos destinados al consumo humano, es un tema que en la actualidad ha sobrepasado las esferas científicas, llegando a ser una preocupación de los consumidores. La inclusión de drogas en alimentos utilizados para el cultivo de camarones, puede dejar residuos que aparecen en sus tejidos.

La problemática de la presencia de residuos de drogas (antibióticos) en camarones no es reciente. En octubre de 1990, muestreos realizados en los mercados de Bangkok establecen la presencia de hasta el 37% de residuos de ácido oxolínico y oxitetraciclina, en muestras de *P. monodon*. A inicios de 1991, las autoridades japonesas detectan residuos de antibióticos en camarón importado desde Tailandia, y amenazan con prohibir el ingreso del crustáceo. También en 1999 la autoridad de salud del puerto de Southampton establece la presencia de respuesta microbiana residual en un 24% de muestras de camarón procesado; detectándose además, residuos de trimetoprim y bajos niveles de gentamicina.

En Agosto del 2001, la autoridad de salud Alemana detecta residuos de cloranfenicol en un cargamento de camarón procedente de China. A paso seguido se confirma la presencia de residuos de este antibiótico en cargamentos de camarón procedentes de Vietnam e Indonesia. Resultado de este hallazgo, el mercado europeo en septiembre del mismo año, establece la obligatoriedad en la inspección del camarón importado desde los paises mencionados. La FDA a inicios del 2002 incrementa los controles de inspección de los productos acuícolas y realiza un llamado de alerta al no uso de drogas prohibidas en acuacultura y su prohibición directa.

Límites residuales para Fenicoles

El gobierno ecuatoriano, como respuesta a las regulaciones y monitoreos impuestos a las importaciones de camarón, oficializó mediante Acuerdo Ministerial (No.006) del 29 de Enero de 2002, la prohibición del uso del cloranfenicol y comercialización de productos "expresamente prohibidos para su uso en esta actividad"-acuícola-.

Para aunar esfuerzos en el entendimiento y aplicación de la prohibición oficializada, hemos elaborado en el presente un resumen de las normativas aplicadas en la legislación europea y norteamericana referente a la residualidad de los fenicoles en productos para consumo humano.

En términos generales, los fenicoles se caracterizan por ser bacteriostáticos, con mecanismos de acción basados en la inhibición de la síntesis proteica de la célula bacteriana. Los miembros que conforman este grupo de antibióticos son: Cloranfenicol, Tiamfenicol y Florfenicol.

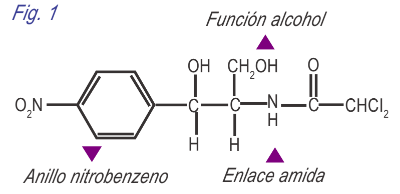
Cloranfenicol (CAP)

Originalmente aislado de *Streptomyces venezuelae*, el CAP es un antibiótico de amplio espectro frecuentemente utilizado en la producción de animales por sus excelentes propiedades bacterianas y farmacocinéticas. Este antibiótico es muy efectivo pero puede inducir anemia aplástica y producir otros desórdenes sanguíneos a niveles muy reducidos (trazas). Estos efectos adversos han determinado la prohibición del CAP para el tratamiento de animales usados en la producción de alimento.

Como se ilustra en la figura 1, el CAP presenta un anillo nitrobenzeno, un enlace amida y una función alcohol. La presencia del anillo nitrobenzeno es relevante debido a que este origina la formación de aminas arómaticas, las cuales pueden ser carcinogénicas. El grupo alcohol sirve como un grupo funcional, facilitando la formación de esteres que mejoran la hidrosolubilidad del antibiótico.

El cloranfenicol base tiene muy baja solubilidad en agua pero es altamente soluble en lípidos. Las sales de palmitato presentan características similares de solubilidad a diferencia de las de succinato, misma que es altamente soluble en agua.

Fig. 1



Tianfenicol (TAP)

El tianfenicol, antibiótico derivado del CAP difiere en sus características por su marcada solubilidad en agua. La estructura química del TAP se diferencia de la del CAP por la presencia de un grupo sulfa en reemplazo del grupo nitro. Este antibiótico presenta probada efectividad contra bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, siendo especialmente activo en bacterias anaeróbicas.

En una de las últimas versiones (EMEA/MRL/505/98) de la EMEA (The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Veterinary Medicines Evaluation Unit), el comité europeo recomendó la inclusión del tianfenicol dentro del Anexo III (sustancias con LMR provisionales) de la regulación del consejo (ECC) No. 2377/90 en acuerdo con los siguientes valores expresos:

Sustancia:	*Tianfenicol*
Marcador:	*Tianfenicol*
Especie:	*Peces*
LMRs*:	*50 µg/kg*
Tejido:	*Músculo y piel*
Provisiones:	*Normativa provisional. Expira: 01/01/2001*

**Límite máximo residual*

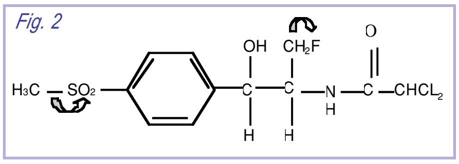
LA FDA no incluye este antibiótico dentro de las drogas aprobadas para el uso en medicina veterinaria (FDA approved Animal Drugs Products).

Las precauciones de empleo de este antibiótico incluyen el riesgo de la presencia de anemia hemolítica por manejo del mismo.

Florfenicol (FF)

Al igual que su antecesor, este es un antibiótico sintético de amplio espectro, igualmente relacionado con el CAP, pero de este último se diferencia en 2 aspectos fundamentales. La presencia de un grupo *p*-metil sulfonilo en reemplazo del grupo nitro, y la de un radical fluor en reemplazo del grupo oxídrilo en la función alcohol terminal primaria del CAP (ver figura 2). El FF es altamente soluble en lípidos lo cual se refleja en una distribución extensiva hacia los tejidos animales.

Fig. 2



Este antibiótico es similar en su mecanismo de acción a la del CAP, esto es, la inhibición de la enzima peptidil transferasa. Sin embargo, cepas bacterianas resistentes al CAP y al TAP han demostrado, por el contrario, ser altamente sensibles a la inhibición causada por este representante fluorado.

La EMEA clasifica al florfenicol (EMEA/MRL/760/00-Final) dentro del Anexo I de la regulación del consejo (EEC) No. 2377/90. Es decir, dentro de las sustancias farmacológicamente activas para las que hay un LMR establecido (ver tabla 2).

LA FDA incluye al florfenicol como droga aprobada para su uso en medicina veterinaria. Siendo esta aprobación específica para el control de enfermedades respiratorias en ganado vacuno.

Elaborado por Nelson Montoya V., M.Sc.

CENAIM INFORMA
Boletín Informativo No.54
15 de abril del 2002

Residuos de antibióticos en camarones:
LÍMITES RESIDUALES Y DETECCIÓN DE FENICOLES

(Continuación)

Sustancia:	*Florfenicol*
Marcador:	*Suma de florfenicol y su metabolito florfenicol amina*
Especie:	*Peces*
LMRs*:	*1000 µg/kg*
Tejido:	*Músculo y piel*
Provisiones:	

Tabla 2 — **Límite máximo residual*

En este punto y en referencia al Acuerdo Ministerial No. 006, cabe destacar que la prohibición se hace expresa para el componente CLORANFENICOL y no extensiva para los otros integrantes de la familia de los fenicoles: TIANFENICOL y FLORFENICOL. De la literatura revisada, la normativa internacional (EMEA y FDA) clasifica a éstos dos últimos fenicoles como antibióticos aprobados para **uso terapeútico**; ésto es, aplicación del antibiótico una vez confirmada la presencia de los signos clínicos de la enfermedad a concentración y tiempo definidos.

La normativa europea clasifica al tianfenicol, como una droga con aprobación provisional (hasta enero del 2001) para su uso terapeútico en el cultivo de peces; mientras que el Florfenicol se encuentra dentro de las sustancias con LMR establecido. Por el contrario la FDA no clasifica al Tianfenicol pero si lo hace para caso del Florfenicol, indicando la aplicación terapeútica específica para ganado vacuno. Finalmente, resaltamos el hecho de que las aprobaciones europeas aquí mencionadas rezan específicamente -en su uso terapeútico- para la producción de peces y **no de camarones**.

Detección de residuos de cloranfenicol

Valores específicos de LMR para cloranfenicol en alimentos aún no han sido establecidos. El CAP en las normativas FDA (USA) y EMEA (EU) es regulado mediante un valor específíco de "*Cero Tolerancia*". Este valor esta directamente relacionado con el estándar de detección gubernamental, por lo tanto varía en función de la normativa, así para el caso de la EU este nivel es de menos de y/o tan bajo como 0.01 ppb y de menos de 5 ppb para USA.

En las últimas dos décadas númerosos métodos han sido descritos para la detección y confirmación de residuos de CAP en alimentos y materiales biológicos. Con fines de chequeo, métodos inmunoquímicos relativamente rápidos y baratos han sido descritos; así como, un método basado en reacciones antígeno-anticuerpo (ELISA) disponible a nivel comercial. Estos métodos permiten la determinación cuantitativa de cloranfenicol mediante enzimoinmunoensayo competitivo en microplaca. El método ELISA ha sido descrito por la FDA y se encuentra dentro de la lista de procedimientos oficiales para el "*chequeo*" de la presencia CAP en productos comestibles.

La aplicación de métodos cromatográficos como la cromatografía de gases (GC) y líquidos (HPLC) para la determinación de CAP han sido desarrollados y utilizados desde 1970. Los procedimientos de preparación de la muestra en estos métodos involucran extracción con solventes y procesos de partición con mezcla de solventes. La FDA estima dentro de sus métodos oficiales el análisis "*confirmatorio*" de residuos de CAP en camarones mediante procedimientos por cromatografía de gases (GC) descritos en el journal de la AOAC internacional (Munss *et al*., 1994; Pfenning *et al*., 2000).

Como alternativas de mayor sensitividad, adicionalmente se han evaluado combinaciones de los métodos descritos. Así, mediante el método de cromatografía de afinidad se ha logrado estimar límites de detección tan bajos como 0.1 ppb. No obstante, métodos como éste implican procedimientos minuciosos y prolongados de limpieza mediante extracción en fase sólida y columnas de inmunoafinidad seguido del análisis mediante cromatografía líquida (HPLC).

La diferenciación y aplicación de los métodos descritos para cuali-cuantificar la presencia de residuos de antibióticos en alimentos, esta basada en la capacidad de detección y prácticidad del método para medir niveles trazas en el tejido objetivo; así los límites de detección estimados para las pruebas detalladas se encuentran dentro de rangos promedios de 0.5 - 5 ppb (ELISA) y 0.7 - 5 ppb (GC). Los métodos cromatográficos en términos generales no son de fácil aplicación comparados con los métodos inmunoquímicos.

En términos de aplicación de uno u otro método, cabe resaltar que varios son los factores que pueden incidir en la performance y resultados arrojados por pruebas analíticas como las detalladas. La aplicación de métodos en matrices (tejido animal, fluido corporal, producto comestible, etc) diferentes a las originalmente especificada por la prueba, puede, definitivamente traer como consecuencias variación en sus resultados, así como en los límites de detección originalmente descritos. Debemos estar concientes que los "*test kits*" evaluados para la detección de CAP en alimentos, han sido desarrollados para mediciones en tejidos de animales terrestres, productos comestibles (huevos) y fluidos corporales (orina y leche). Inconsistencias en las pruebas de ELISA para el chequeo de CAP en camarones, a nivel nacional han sido reportadas, debido a posibles reacciones cruzadas con Tianfenicol y Florfenicol. Reportes como este concuerdan con resultados observados en estudios comparativos de metodologías para la determinación de residuos de antibióticos mediante ELISA. Así, la Universidad Suiza de Ciencias Agrícolas (Uppsala), reporta que la prueba sobrestimó niveles inferiores a 10 ppb y subestimó valores superiores a 250 ppb de sulfadimetazina y enrofloxacina en leche.

En este sentido debemos entender que la aplicación de los métodos oficiales existentes para la determinación de CAP en tejido de camarones -caso USA (FDA)-, basa el uso de ELISA como un método presuntivo de niveles residuales del antibiótico (CAP) y GC para la confirmación de la presencia de estos residuos. Mientras que la EU especifica el uso de HPLC y verificación mediante espectrofotometría de masas (MS). En general, debemos mencionar que las normativas aquí enunciadas estipulan y exigen el uso de métodos cromatográficos para la cuali-cuantificación de residuos de drogas en la mayoría de productos para consumo humano.

Al momento la problemática relacionada con la estimación de valores reales de residualidad de CAP y nitrofuranos en alimentos para consumo humano, es parte de las discusiones mantenidas por el grupo de expertos de la Global Aquaculture Alliance (GAA). La determinación de estos valores, sin duda alguna, será una herramienta de gran ayuda al momento de escoger el método analítico más idóneo para la determinación de residuos de estos antibióticos en camarones. CENAIM a más de sus esfuerzos de desarrollo tecnológico y estudios farmacocinéticos en el campo de los antibióticos, también viene manteniendo intercambio de información con el principal del grupo GAA, esto es con el Dr. G. Chamberlain presidente de la GAA.

Uno de los pronunciamientos de la GAA en una de sus últimas reuniones establece que para disernir la aplicación de las normativas aplicadas a residuos de fármacos, se deben inicialmente esclarecer las diferencias entre niveles de detección y tóxicidad del fármaco en humanos. Esto es, las normativas deben basarse en estudios reales de niveles de toxicidad y no ser un reflejo del avance tecnológico logrado. En este contexto, la GAA aclara que los niveles de residualidad establecidos por la EU para el cloranfenicol no estan basados en información toxicológica reciente, explicándose que la normativa es un reflejo del avance logrado en la tecnología de detección y la aplicación del principio de precautelación (Reunión GAA, Bruselas - Abril 24, 2002).

Elaborado por Nelson Montoya V., M.Sc.