

Detección de residuos de enrofloxacin por microbiología (prueba de inhibición del crecimiento) y ELISA en cuyes (*Cavia porcellus*) en la provincia de Jauja, Perú

Detection of enrofloxacin residues by microbiological (growth inhibition test) and ELISA in guinea pigs (*Cavia porcellus*) in the province of Jauja, Peru

Cesar Martin Leyva-Molina¹, Mariel Aybar Espinoza¹, Andrea Carhuallanqui Pérez¹, Daphne Doris Ramos Delgado¹

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo detectar la posible presencia de enrofloxacin en cuyes destinados al consumo humano en la provincia de Jauja, Región Junín, Perú. Para la detección de enrofloxacin se tomaron muestras de hígado, riñón y diafragma de 200 cuyes de dos mataderos de la provincia de Jauja. La detección de residuos de antibióticos se realizó utilizando la prueba microbiológica de Inhibición del Crecimiento en las tres muestras, obteniéndose resultados negativos en todas ellas. Se tomaron al azar 30 de estas muestras y se analizaron mediante la prueba de ELISA con un kit comercial específico para enrofloxacin en muestras de hígado, obteniéndose 26.7% (8/30) de muestras positivas, con concentraciones entre 1.11 y 35.1 µg/kg. Los resultados demuestran la presencia de residuos de enrofloxacin en concentraciones permitidas por las normativas sanitarias en cuyes destinados al consumo humano.

Palabras clave: cuyes, enrofloxacin, residuos, inhibición del crecimiento, ELISA

¹ Laboratorio de Salud Pública y Salud Ambiental, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

² E-mail: cesar.leyva@unmsm.edu.pe

El artículo es derivado del trabajo de tesis del Bach. Cesar Martin Leyva Molina intitulado «Detección de enrofloxacin en cuyes (Cavia porcellus) destinados al consumo humano en la provincia de Jauja, Región Junín, Perú» para optar el título profesional de Médico Veterinario en la Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Recibido: 29 de noviembre de 2019

Aceptado para publicación: 25 de julio de 2020

Publicado: 29 de septiembre de 2020

ABSTRACT

The present study aimed to detect the possible presence of enrofloxacin in guinea pigs slaughtered for human consumption in the province of Jauja, Junín Region, Peru. For the detection of enrofloxacin, samples of liver, kidney and diaphragm were taken from 200 guinea pigs from two slaughterhouses of Jauja. The detection of antibiotic residues was performed using the microbiological test of Growth Inhibition in the three samples, obtaining negative results in all of them. Then, 30 liver samples were selected at random and analysed by a commercial ELISA kits specific for enrofloxacin, obtaining 26.7% (8/30) positive samples with concentrations between 1.11 and 35.1 µg/kg. The results showed the presence of residues of enrofloxacin in concentrations allowed by sanitary regulations in guinea pigs intended for human consumption.

Key words: guinea pigs, enrofloxacin, residues, growth inhibition, ELISA

INTRODUCCIÓN

El cuy (*Cavia porcellus*) contribuye en la alimentación del poblador rural andino, y su crianza se ha convertido en un negocio rentable en la sierra central (Inforegión, 2017). Sin embargo, las enfermedades infecciosas limitan los índices de producción en su crianza, debido a esto los antibióticos son utilizados para el control de bacterias. Los médicos veterinarios son los encargados de prescribirlos y su uso está determinado según las indicaciones de las autoridades competentes (MGAP, 2015).

Los residuos de antibióticos en alimentos están asociados a problemas de la salud, como reacciones alérgicas, tóxicas y a generación de resistencias bacterianas (Errecalde, 2004; SENASA, 2017). En Perú, el Ministerio de Agricultura y Riego (MINAGRI) indica que solo se deben administrar antibióticos a animales destinados al consumo cuando sea estrictamente necesarios y con la asesoría y autorización de un médico veterinario (MINAGRI, 2009). Chauca (1997) recomienda diferentes antibióticos para enfrentar infecciones en cuyes, mas no indica el momento adecuado para su utilización sin generar residuos en las carcasas. La enrofloxacin es un antibiótico ampliamente utilizado en granjas

de cuyes por su efectividad y fácil manejo de administración (Revelo *et al.*, 2012).

El Perú es un país miembro de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), la cual muestra sus normativas mediante el Codex Alimentarius (CA). El CA indica los Límites Máximos Residuales (LMR) de antibióticos que son permitidos en alimentos, pero los cuyes no han sido considerados una especie de estudio para esta normativa. Sin embargo, existen publicaciones que recomiendan diferentes antibióticos para el tratamiento de enfermedades bacterianas en cuyes (Chauca, 1997; Richardson, 2008; Shomer *et al.*, 2015).

En 2011, el Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA) comenzó con la evaluación de residuos de antibióticos en carcasas de cuyes, detectando residuos de furazolidona y furaltadona entre 2013 y 2015 (SENASA, 2016). En 2017 se detectó residuos de enrofloxacin y ciprofloxacina por primera vez en muestras de carcasas de cuyes provenientes de Cajamarca, Lima y Tacna (SENASA, 2017). Asimismo, Ampuero (2018) realizó un análisis microbiológico no específico (inhibición de crecimiento) detectando muestras con presencia de residuos de antibióticos en carcasas de cuyes procedentes de Lima, Chiclayo y Cajamarca.

El consumo de cuy se ha incrementado a nivel nacional, representando una importante fuente de ingresos para los pequeños y medianos productores (Álvarez, 2014). Sin embargo, al no realizarse un adecuado monitoreo de la comercialización de esta especie, se podría estar consumiendo carcasas con residuos de antibióticos, como la enrofloxacin; sobre todo de aquellos que son administrados de manera inadecuada y sin la asesoría de un veterinario (Revelo *et al.*, 2012; MINAGRI, 2009). El presente estudio tuvo como objetivo detectar la presencia de residuos de enrofloxacin en cuyes faenados en la provincia de Jauja mediante la prueba microbiológica de Inhibición del Crecimiento (IC) y del ELISA.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño Experimental

El presente estudio utilizó la prueba microbiológica de Inhibición del Crecimiento (IC) para seleccionar muestras positivas a la presencia de residuos de antibióticos. Las muestras positivas se analizaron con la prueba de ELISA para determinar si estos residuos correspondían a enrofloxacin.

Las muestras fueron obtenidas de mataderos de cuyes de la provincia de Jauja, región Junín, Perú. El procesamiento de las muestras se realizó en el Laboratorio de Salud Pública y Salud Ambiental (LSPSA) de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (FMV-UNMSM).

Tamaño de Muestra

El tamaño de muestra se determinó mediante la fórmula de poblaciones infinitas (Aguilar, 2005). Se consideró un 50% de probabilidad de encontrar residuos de antibióticos en carcasas de cuyes faenados, con un nivel de confianza del 95%, un error permisible del

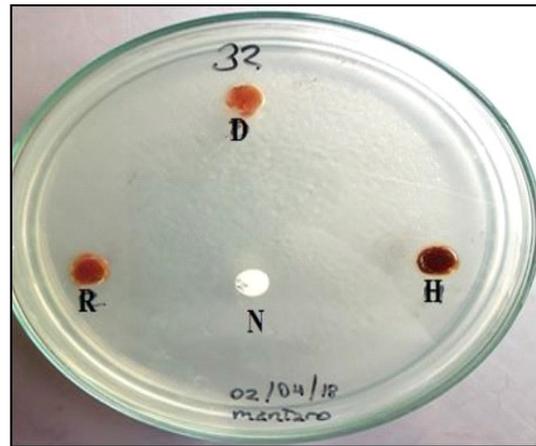


Figura 1. Distribución de las muestras de diafragma (D), hígado (H) y riñón (R) de cuyes acompañadas del disco control de neomicina (N) en placa Petri con agar Mueller Hinton (MH)

7% y una población estimada de 259 552 cuyes en la provincia de Jauja (INEI, 2012). Se obtuvo un tamaño de muestra de 200 carcasas.

Toma de Muestra

Las muestras fueron obtenidas de dos mataderos ubicados en los distritos de El Mantaro y Acolla, ambos en la provincia Jauja. Los animales procedían de ocho granjas ubicadas en los distritos de El Mantaro (2), Acolla (2), Sincos (2), Jauja y Yauyos, provincia de Jauja. Los muestreos empezaron en enero de 2018, recolectando muestras semanales de 25 carcasas seleccionadas al azar (150 en el primer matadero y 50 en el segundo) con ayuda de una tabla de números aleatorios (Díaz, 2009). De cada animal se colectó el hígado, riñón y músculo diafragma, según el protocolo descrito por Moreno (2003), dando un total de 600 submuestras que fueron colocadas en bolsas de polietileno de primer uso y trasladadas en cajas térmicas con geles refrigerantes (4 °C) al LSPSA-FMV-UNMSM.

Inhibición del Crecimiento (IC)

A partir de caldo Tripticasa Soya (TSB) con *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) se embebió un hisopo estéril para sembrarlo en placas con agar Mueller Hinton (MH). Asimismo, se tomó 1 g de cada submuestra (músculo diafragma, riñón e hígado) para ser trituradas.

Se realizaron orificios circulares de 5 mm de diámetro distribuidos de forma equidistante en el agar MH para colocar cada una de las submuestras. Con un ansa estéril se introdujo en cada uno de los orificios las muestras trituradas de hígado, riñón y diafragma pertenecientes a un mismo animal hasta completar todo el espacio dentro de cada orificio (Figura 1). En cada placa con MH se colocó en la parte central un disco control de Neomicina (30 mg), y se incubó a 37 °C por 24 h. Una muestra fue considerada positiva si presentó un halo ≥ 2 mm (Moreno, 2003).

Prueba de ELISA

Se seleccionaron en forma aleatoria 30 hígados (este órgano presenta la más alta concentración de enrofloxacin [Sultan, 2014]). Se utilizó 1 g de cada hígado para determinar la concentración de enrofloxacin, utilizando el kit MaxSignal® Enrofloxacin ELISA, siguiendo las indicaciones del fabricante. La existencia de residuos de enrofloxacin se basó en los valores de absorbancia relativa (%) de los estándares, a partir de los cuales se obtuvo una curva de calibración para determinar la concentración de residuos de enrofloxacin en cada muestra.

RESULTADOS

Las pruebas de IC de las muestras de hígado, riñón y diafragma resultaron negativas a la presencia de residuos de antibióticos (0%, 0/200). El screening microbiológico comprobó su validez por la formación del halo de inhibición que rodeó al disco control de

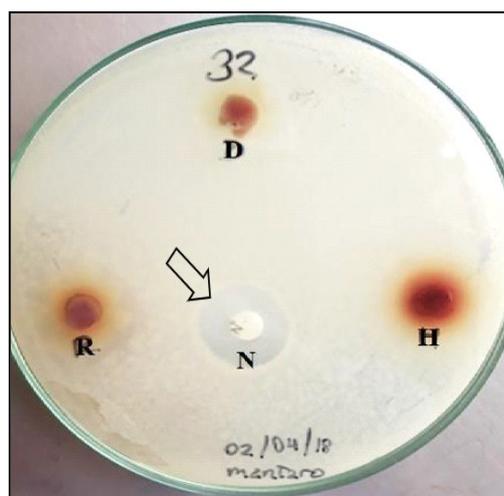


Figura 2. Resultado de la prueba de inhibición de crecimiento microbiano de muestras de diafragma (D), hígado (H) y riñón (R) de cuyes con el disco control de neomicina (N) en placa Petri con agar Mueller Hinton (MH)

neomicina (Figura 2).

Al resultar todas las muestras negativas a la prueba de IC se seleccionó al azar 30 muestras de hígado (Shahid *et al.*, 2007), para continuar con la metodología experimental. Se obtuvo un 6.7% (8/30) de muestras positivas a la presencia de residuos de enrofloxacin con la prueba de ELISA, con concentraciones que variaron entre 1.11 y 35.10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Figura 3).

DISCUSIÓN

El resultado negativo a la presencia de residuos de antibióticos en muestras de diafragma, hígado y riñón de cuyes destinados al consumo en la provincia de Jauja concuerda con los resultados obtenidos por Ampuero (2018) en la vecina ciudad de Huancayo. No obstante, se han reportado residuos de antibióticos en cuyes destinados a consumo humano mediante la prueba de IC en las regiones costeras de La Libertad (83%) y Lambayeque (36%) (Ampuero,

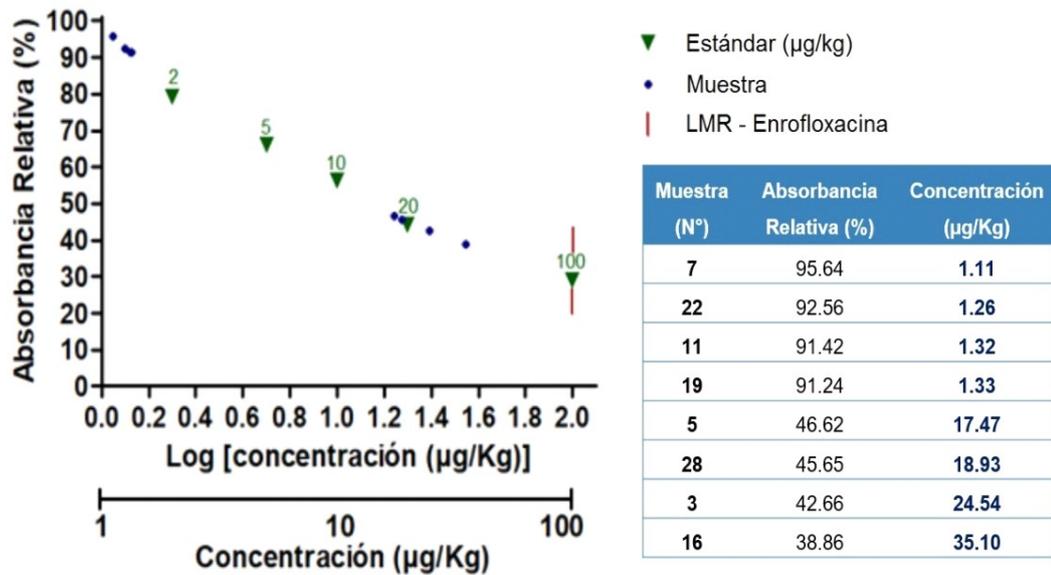


Figura 3. Resultados de la prueba de ELISA para la detección de residuos de enrofloxacin en hígado de cuyes

2018). Estudios de farmacocinética en conejos determinaron que luego de la administración oral de 5 mg/kg de enrofloxacin existe un tiempo medio de residencia (TMR) de 8.5 h en el plasma sanguíneo (Broome *et al.*, 1991).

La prueba de IC que realizó en el presente trabajo utilizó como cepa de evaluación al *Bacillus subtilis* ATCC 6633, cepa sensible a enrofloxacin a una concentración de 30 µg (Okerman *et al.* 2007). Esta concentración es la quinta parte del LMR establecido para enrofloxacin (100 µg/kg) según la Unipon Europea – UE (Sultan, 2014). No obstante, existen limitantes como el pH y la correcta difusión de la muestra en el agar que pueden producir una variación en la detección de los residuos utilizando la prueba de IC con *Bacillus subtilis* ATCC 6633 como cepa de prueba (Okerman *et al.*, 2007).

La prueba microbiológica de IC utilizada en el presente estudio está basada en la sensibilidad a antibióticos de la cepa *Bacillus subtilis* ATCC 6633, la cual es sensible a enrofloxacin a una concentración de 30 µg (Okerman *et al.* 2007). El LMR establecido para enrofloxacin según las normativas de la Unión Europea - UE es de 100 µg/kg (Sultan, 2014), por lo que la detección de residuos mediante la prueba IC ayuda a determinar productos inocuos. Sin embargo, existen limitantes como el pH y la correcta difusión de la muestra en el agar que pueden producir pequeñas variaciones en las concentraciones que se detectan utilizando esta cepa en la prueba de IC (Okerman *et al.*, 2007).

Para continuar con la metodología experimental se seleccionaron 30 muestras de hígado como órgano de referencia de la carcasa para realizar la prueba de ELISA,

con el objetivo de comparar sus resultados con los obtenidos en la prueba microbiológica, obteniéndose 26.7% (8/30) de muestras positivas con valores entre 1.11 y 35.1 µg/kg, los cuales se encuentran por debajo del LMR de enrofloxacin (100 µg/kg) establecido por la European Food Society Authority – EFSA (2019). Comparando los resultados obtenidos en ambas pruebas para estas muestras se observó la menor sensibilidad que posee la prueba de IC frente a la prueba de ELISA. Se debe considerar que el kit de ELISA posee un 100% de sensibilidad a residuos de enrofloxacin y un límite mínimo de detección de 1 µg/kg (MaxSignal, 2013). Si bien la prueba de ELISA posee ventajas como una mayor sensibilidad y la cuantificación indirecta de residuos *versus* una prueba microbiológica como la prueba de IC que únicamente indica la presencia o ausencia de alguna sustancia inhibitoria del crecimiento microbiano, esta implica una mayor inversión económica, además de precisar equipos de laboratorio que comúnmente no se encuentran disponibles en los mataderos locales (Moreno, 2003).

Clanjack *et al.* (2011) buscaron detectar la presencia de residuos de enrofloxacin en carne de pollos utilizando la prueba de IC con la cepa *Escherichia coli* ATCC 10 536 y la prueba de ELISA utilizada en el presente estudio, sin encontrar diferencias entre ambas pruebas hasta 24 horas posteriores a la administración de enrofloxacin. Por otra parte, Ramatla *et al.* (2017) evaluaron la presencia de residuos de antibióticos en carne de porcino, vacuno y aves usando la prueba de IC, ELISA, Cromatografía en Capa Fina (TLC) y Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), concluyendo que la prueba de ELISA tiene un mayor potencial para el monitoreo de residuos de antibióticos.

Actualmente, el SENASA realiza el monitoreo de la presencia de residuos de antibióticos en carcasas de animales destinadas al consumo humano utilizando técnicas más sofisticadas como el Cromatografía Líquida asociada a Espectrometría de Masas (LC-MS/MS), pero lamentablemente no cu-

bre un amplio número de muestras que brinden representatividad en diferentes regiones, debido a la demanda de recursos que implica la utilización de esta técnica. Sin embargo, SENASA ha encontrado residuos de enrofloxacin en carcasas de cuyes procedentes de Cajamarca, Lima y Tacna, con valores superiores al LMR para estos metabolitos (SENASA, 2017). Por otro lado, Álvarez (2014) menciona que existe un incremento en la exportación de carcasas de cuyes y que esta requiere cumplir con estándares establecidos para la salud de los consumidores, debiéndose evaluar la presencia de residuos de antibióticos.

En el presente estudio se trabajó bajo las normativas establecidas por la UE sobre el uso de enrofloxacin en animales de abasto, que indican que el LMR de enrofloxacin es de 100 µg/kg (EMA, 2002), comprobándose que las concentraciones detectadas en cuyes no son de riesgo para el consumidor y se pueden considerar aptas para el consumo.

CONCLUSIONES

- Las concentraciones de enrofloxacin en carcasas de cuyes de la provincia de Jauja, Perú, se encuentran por debajo del Límite Máximo Residual (LMR) establecido por la Unión Europea.
- La prueba de Inhibición de Crecimiento (IC) sigue siendo un método confiable para detectar residuos de antibióticos que no cumplan con las normativas establecidas.

LITERATURA CITADA

1. **Aguilar-Barojas S. 2005.** Fórmulas para el cálculo de la muestra en investigaciones de salud. *Salud en Tabasco* 11: 333-338.
2. **Alvarez S. 2014.** Situación actual y perspectivas de la exportación de carne de cuy (*Cavia porcellus*). Tesis de In-

- geniero Zootecnista. Lima: Univ. Nacional Agraria La Molina. 44 p.
3. **Ampuero J. 2018.** Determinación de residuos y antibióticos en músculo, hígado y riñón de cuy de crianza intensiva en cuatro ciudades del país. Tesis de Médico Veterinario Zootecnista. Lima: Univ. Científica del Sur. 55 p.
 4. **Broome R, Brooks D, Babish J, Copeland D, Cozelman G 1991.** Pharmacokinetic properties of enrofloxacin in rabbits. *Am J Vet Res* 52: 1835-1841.
 5. **Chauca L. 1997.** Producción de cuyes (*Cavia porcellus*). Roma, Italia: FAO. 120 p.
 6. **Èlanjak E, Smajloviæ M, Èaklovica F, Alagiæ D, Èaklovica K, Smajloviæ A. 2011.** Detection of enrofloxacin residues in chicken meat by microbiological (growth inhibition test) and ELISA method after experimental prophylactic and therapeutic application. *MESO* 13: 198-205.
 7. **Díaz V. 2009.** Metodología de la investigación científica y bioestadística para profesionales y estudiantes de ciencias de la salud. Santiago de Chile: Finis Terrae. 586 p.
 8. **[EFSA] European Food Society Authority. 2019.** Glossary. [Internet]. Available in: <https://www.efsa.europa.eu/en/glossary-taxonomy-terms>
 9. **[EMA] European Medicine Agency. 2002.** Committee for Veterinary Medicinal Products. Enrofloxacin. Summary report. [Internet]. Available in: https://www.ema.europa.eu/en/documents/mrl-report/enrofloxacin-modification-bovine-porcine-poultry-summary-report-2-committee-veterinary-medicinal_en.pdf
 10. **Errecalde JO. 2004.** Uso de antimicrobianos en animales de consumo: incidencia del desarrollo de resistencia en salud pública. Roma: FAO. 71 p.
 11. **[INEI] Instituto Nacional de Estadística e Informática. 2012.** IV Censo Nacional Agropecuario. [Internet]. Disponible en: <http://censos.inei.gob.pe/cenagro/tabulados/>
 12. **Inforegión. 2017.** Junín: crianza de cuyes se convierte en un «boom» en el valle del Mantaro. [Internet]. Disponible en: <http://www.inforegion.pe/241660/junin-crianza-de-cuyes-se-convierte-en-un-boom-en-el-valle-del-mantaro/>
 13. **[MGAP] Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. 2015.** Buenas prácticas de uso de medicamentos veterinarios. Uruguay: MGAP. 30 p.
 14. **[MINAGRI] Ministerio de Agricultura y Riego. 2009.** Residuos químicos en carnes y su relación con la normatividad. Lima: MINAGRI. Disponible en: <https://www.minagri.gob.pe/portal/download/pdf/direccionesyoficinas/dgca/residuos-quimicos-en-carnes.pdf>
 15. **MaxSignal. 2013.** Enrofloxacin ELISA Test Kit manual Catalog#:1017. Bioo Scientific Corp. 10 p.
 16. **Moreno B. 2003.** Higiene e inspección de carnes. Vol II. Madrid, España: Díaz de Santos. 493 p.
 17. **Okerman L, Noppe H, Cornet V, De Zutter L. 2007.** Microbiological detection of 10 quinolone antibiotic residues and its application to artificially contaminated poultry samples. *Food Addit Contam* 24: 252-257. doi: 10.1080/02652030600988020
 18. **Ramatla T, Ngoma L, Adetunji M, Mwanza M. 2017.** Evaluation of antibiotic residues in raw meat using different analytical methods. *Antibiotics* 6: 34. doi: 10.3390/antibiotics6040034
 19. **Revelo AF, Tobar-Torres MJ, Benavides-Melo JC, Astaiza JM 2012.** Estudio de utilización de medicamentos recomendados por almacenes agropecuarios para explotaciones cuyícolas de Pasto, Nariño, Colombia. *Rev Colomb Ciencias Químicas Farm* 41: 143-156.
 20. **Richardson V. 2008.** Diseases of domestic guinea pigs. 2° ed. Oxford: Blackwell Science. 153 p.
 21. **Shahid M, Siddique M, Sajjad-Ur-Rehman, Hameed S, Hussain A. 2007.** Evaluation of a microbiological growth inhibition assay as a screening

- test for the presence of antibiotic residues in poultry meat. *Am J Food Technol* 2: 457-461. doi: 10.3923/ajft.2007.457.461
22. **Shomer N, Holcombe H, Harkness J. 2015.** Biology and diseases of guinea pigs. 3rd ed. *Lab Anim Med* 2015: 247-283. doi: 10.1016/B978-0-12-409527-4.00006-7
23. **Sultan I. 2014.** Detection of enrofloxacin residue in livers of livestock animals obtained from a slaughterhouse in Mosul City. *J Vet Sci Technol* 5. doi: 10.4172/2157-7579.1000168
24. **[SENASA] Servicio de Sanidad Agraria. 2016.** Plan anual de monitoreo de contaminantes en alimentos agropecuarios. Lima: SENASA. 136 p.
25. **[SENASA] Servicio de Sanidad Agraria. 2017.** Plan anual de monitoreo de contaminantes en alimentos agropecuarios. Lima: SENASA. 130 p.
26. **Sultan I. 2014.** Detection of enrofloxacin residue in livers of livestock animals obtained from slaughterhouse in Mosul City. *J Vet Sci Technol* 5: 2-4. doi: 10.4172/2157-7579.1000168