

Desarrollo de una solución pionera de autocontrol en animales vivos para minimizar la presencia de residuos de antibióticos en la cadena alimentaria del área POCTEFA

Rafael Pagán Tomás, IP TESTACOS

Director del Instituto Agroalimentario de Aragón – IA2

pagan@unizar.es



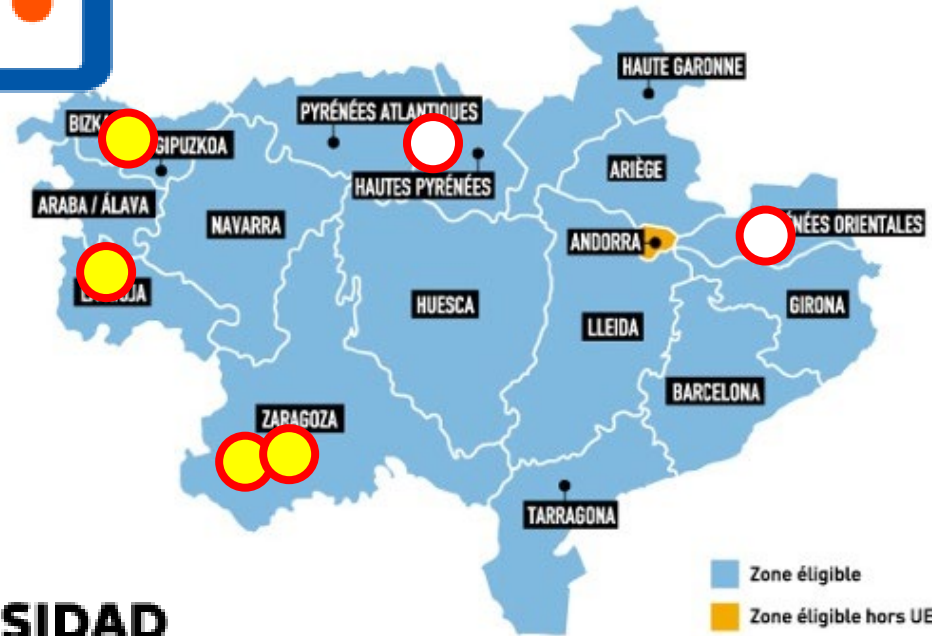
Proyecto cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER),



Interreg
POCTEFA
TESTACOS



ZELU



OBJETIVOS

- Crear un banco de muestras biológicas de referencia.
- Desarrollar **nuevos sistemas analíticos** que pongan al alcance del sector ganadero un fácil **autocontrol** de estos residuos **en animal vivo**.



RESULTADOS



Article

Is Blood a Good Indicator for Detecting Antimicrobials in Meat? Evidence for the Development of In Vivo Surveillance Methods

María Jesús Serrano ¹, Olga Mitjana ¹, Cristina Bonastre ¹, Alicia Laborda ¹, María Victoria Falceto ¹, Diego García-Gonzalo ¹, Eunate Abilleira ², Janire Elorduy ², Alain Bousquet-Melou ³, Luis Mata ⁴, Santiago Condón ¹ and Rafael Pagán ^{1,*}

¹ Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2 (Universidad de Zaragoza-CITA), 50013 Zaragoza, Spain; mjserran@unizar.es (M.J.S.); omitjana@unizar.es (O.M.); cbonastr@unizar.es (C.B.); alaborda@unizar.es (A.L.); vfceto@unizar.es (M.V.F.); Diego.Garcia@unizar.es (D.G.-G.); scondon@unizar.es (S.C.)

² Ministry of Health of the Basque Government, Office of Public Health and Addictions, Public Health Laboratory, 20013 Guipuzkoa, Spain; e-abilleira@euskadi.eus (E.A.); j-elorduy@euskadi.eus (J.E.)

³ INTHERES, Université de Toulouse, INRA, ENVT, 31300 Toulouse, France; a.bousquet-melou@envt.fr

⁴ Department of R&D, ZEULAB S.L., 50197 Zaragoza, Spain; lmata@zeulab.com

* Correspondence: pagan@unizar.es; Tel.: +34-976762675



Article

Optimization and Validation of a New Microbial Inhibition Test for the Detection of Antimicrobial Residues in Living Animals Intended for Human Consumption

María Jesús Serrano ¹, Luis Mata ², Diego García-Gonzalo ¹, Alejandra Antón ², Pedro Razquin ², Santiago Condón ¹ and Rafael Pagán ^{1,*}

¹ Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2, Universidad de Zaragoza-CITA, 50013 Zaragoza, Spain; mjserran@unizar.es (M.J.S.); dgarcia@unizar.es (D.G.-G.); scondon@unizar.es (S.C.)

² Department of R&D, ZEULAB S.L., 50197 Zaragoza, Spain; lmata@zeulab.com (L.M.); aanton@zeulab.com (A.A.); prazquin@zeulab.com (P.R.)

* Correspondence: pagan@unizar.es; Tel.: +34-97-676-2675

RESULTADOS

SOLUCIÓN: IR UN PASO ATRÁS EN LA CADENA ALIMENTARIA Y LLEVAR A CABO EL TEST DE CRIBADO EN ANIMAL VIVO

Explorer-Blood



QuinoScan-Blood



OBJETIVOS

- Crear un banco de muestras biológicas de referencia.
- Desarrollar **nuevos sistemas analíticos** que pongan al alcance del sector ganadero un fácil **autocontrol** de estos residuos **en animal vivo**.
- Realizar **un amplio estudio de la incidencia de la presencia de residuos antibióticos en carne** para tomar conciencia de la problemática en nuestra región.
- Proponer nuevas medidas de control y gestión al sector alimentario para ofrecer alimentos más saludables al consumidor.



RESULTADOS

Food Control 138 (2022) 109033



ELSEVIER

Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Food Control

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodcont



Antimicrobial residue assessment in 5,357 commercialized meat samples from the Spain-France cross-border area: A new approach for effective monitoring

M.J. Serrano^a, J. Elorduy^b, I. Zabaleta^{b,c}, G. Istamboulie^{d,e}, E. González-Fandos^f, A. Bousquet-Mélou^g, L. Mata^h, C. Aymard^{d,e}, A. Martínez-Laorden^f, J. Da Silva-Guedes^f, M. Lacroix^g, D. García-Gonzalo^a, S. Condón^a, E. Abilleiraⁱ, R. Pagán^{a,*}

^a Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2, Universidad de Zaragoza-CITA, 50013, Zaragoza, Spain

^b Ministry of Health of the Basque Government, Office of Public Health and Addictions, Public Health Laboratory, 48160, Derio, Spain

^c Basque Foundation for Health Innovation and Research BIOEF, 48902, Barakaldo, Spain

^d Perpignan University Via Domitia, Biocapteurs-Analyse-Environnement, 66860, Perpignan, France

^e Laboratoire de Biodiversité et Biotechnologies Microbiennes, USR 3579 Sorbonne Universités (UPMC) Paris 6 et CNRS Observatoire Océanologique, 66650, Banyuls-sur-Mer, France

^f Department of Food Technology, CIVA Research Center, University of La Rioja, 26006, Logroño, Spain

^g INTHERES, Toulouse University, INRAE, ENVT, 31300, Toulouse, France

^h Department of R&D, ZEULAB S.L., 50197, Zaragoza, Spain

ⁱ Ministry of Health of the Basque Government, Office of Public Health and Addictions, Public Health Laboratory, 20013, Donostia, Spain

1. INTRODUCCIÓN

2. MATERIAL Y MÉTODOS

MUESTREO

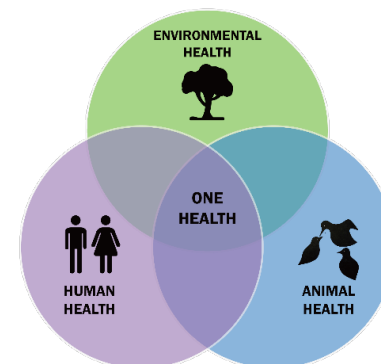
SCREENING

CONFIRMACIÓN POR QTOF

1. Explorer[®]

2. QuinoScan[®]

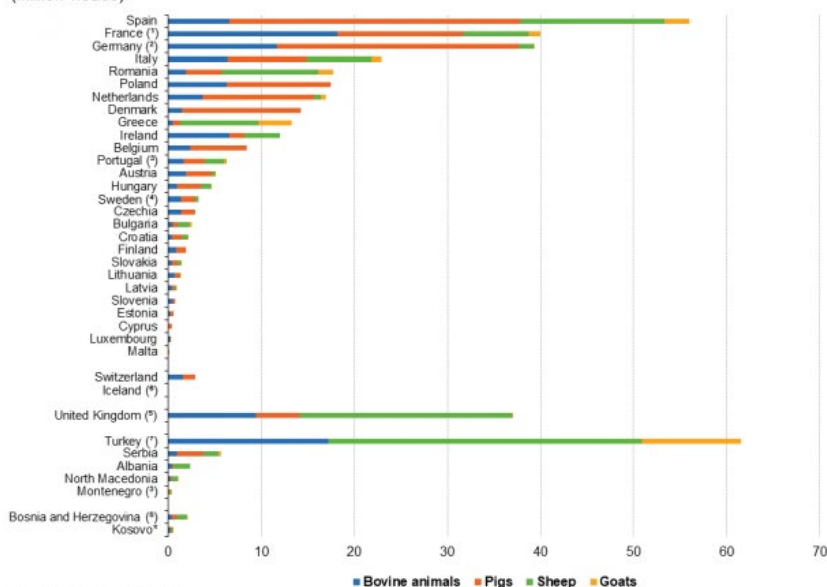
3. Resultados del cribado



3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

España y Francia son los mayores productores de carne de la Unión Europea de acuerdo a su cabaña ganadera (Eurostat, 2020).

Livestock population, 2019
(million heads)



(*) Bovine animals, provisional.

(*) Goats, estimate.

(*) Provisional.

(*) Sheep, provisional.

(*) Goats, provisional.

(*) 2018 data.

(*) Cattle, 2018. Sheep and goats, 2017.

(*) Estimates.

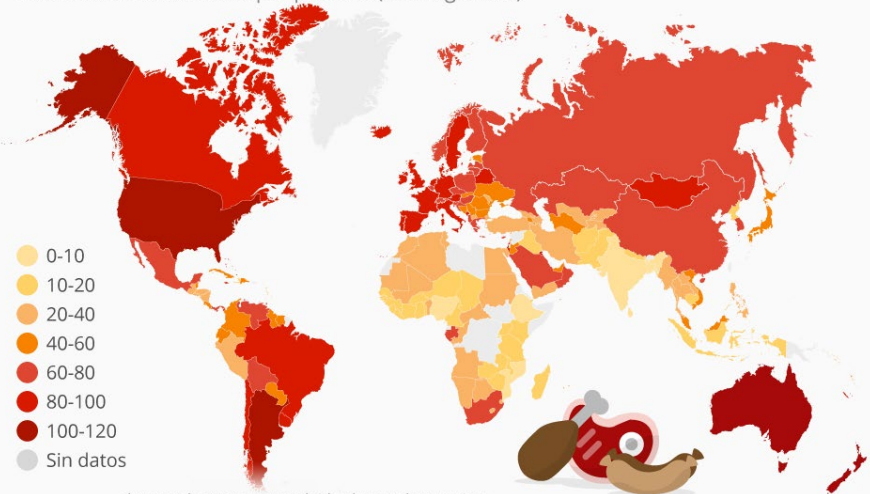
* This designation is without prejudice to positions on status, and is in line with UNSCR 1244 and the ICJ Opinion on the Kosovo Declaration of Independence.

Source: Eurostat (online data codes: apro_mt_lscat1, apro_mt_lspig, apro_mt_lssheep and apro_mt_lsgoat)

Además, se encuentran entre los mayores consumidores de carne en el mundo (FAO, 2018).

Los países más carnívoros del mundo

Consumo anual de carne por persona (en kilogramos)*



* Datos de 2014-2013. Excluido el pescado y marisco

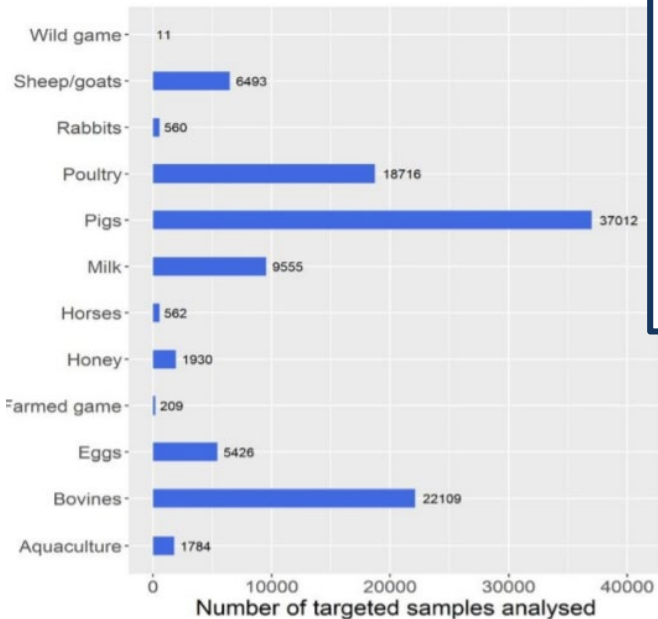
Fuente: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura vía Our World in Data



Monitoreo de acuerdo al Reglamento de ejecución EU 2021/808

Método de cribado
Método confirmatorio

Interreg
POCTEFA
TESTACOS



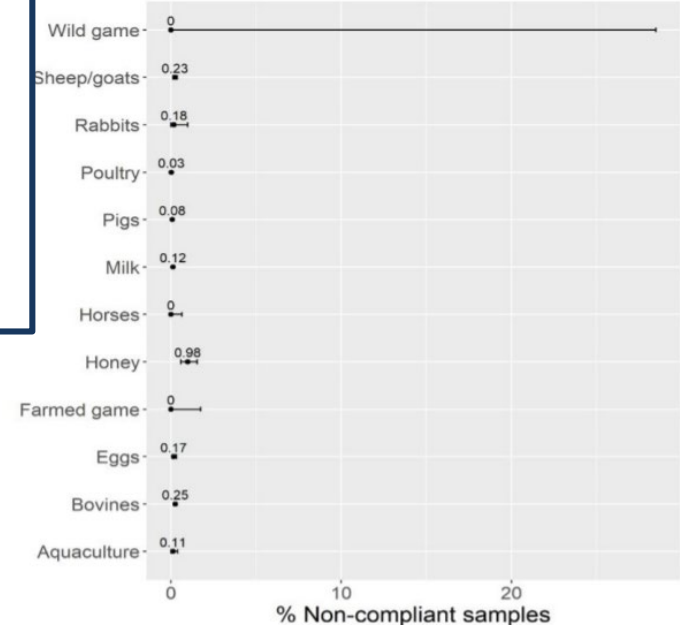
TECHNICAL REPORT



APPROVED: 5 January 2021
doi:10.2903/sp.efsa.2021.EN-1997

Report for 2019 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal products

European Food Safety Authority



0,14% de muestras no conformes
Mayor incidencia en miel (0,98%)

1. INTRODUCCIÓN

2. MATERIAL Y MÉTODOS

MUESTREO

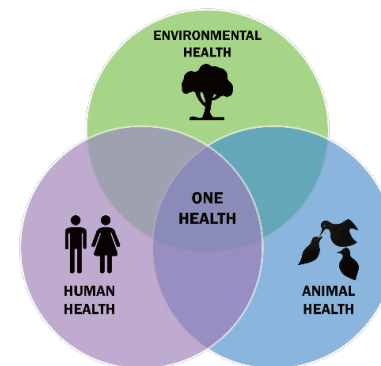
SCREENING

CONFIRMACIÓN POR QTOF

1. Explorer[®]

2. QuinoScan[®]

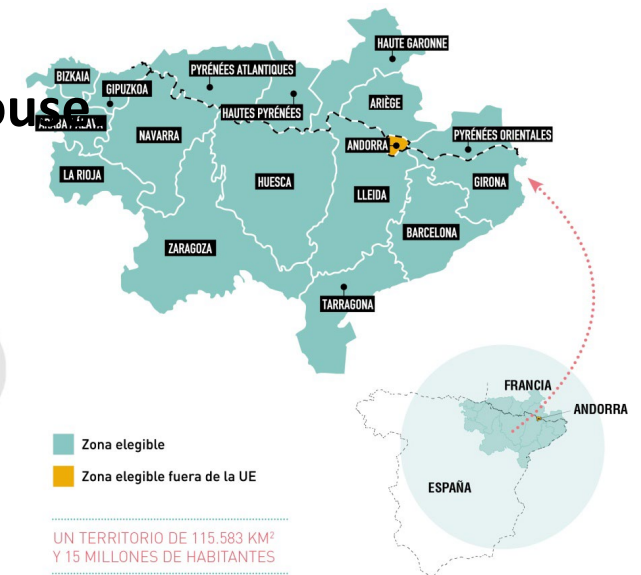
3. Resultados del cribado



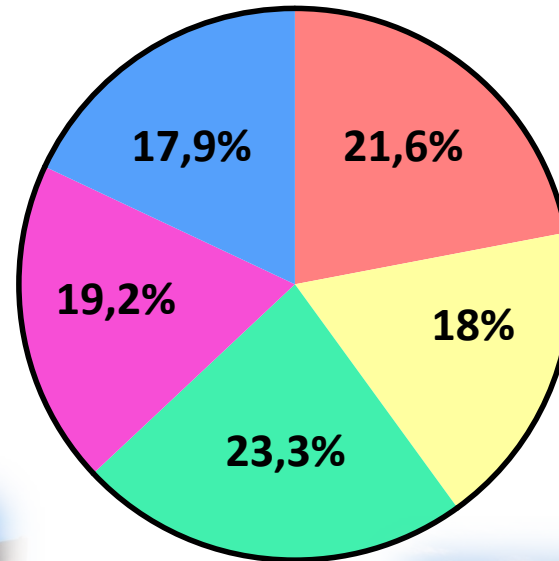
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudio sobre la calidad de la carne en el área POCTEFA

- Se recogieron un total de **5.357** muestras de carne comercializada.
- Ciudades: **Zaragoza, Bilbao, Logroño, Perpignan y Toulouse**
 - 12 especies animales.
 - Diferente tipología de detallista.
 - Diferente procedencia.



PORCENTAJE DE MUESTRAS RECOGIDO EN CADA UNA DE LAS CIUDADES

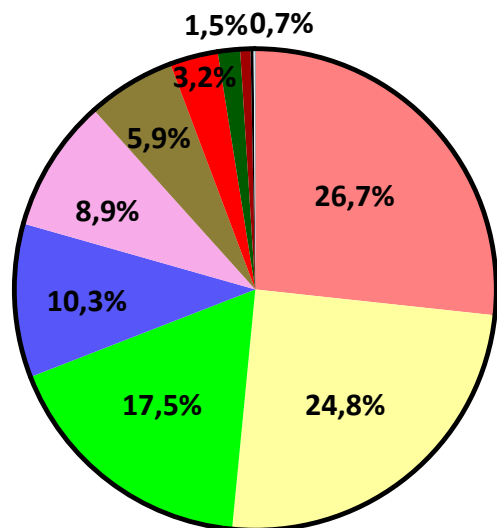


- Zaragoza
- Bilbao
- Logroño
- Toulouse
- Perpignan

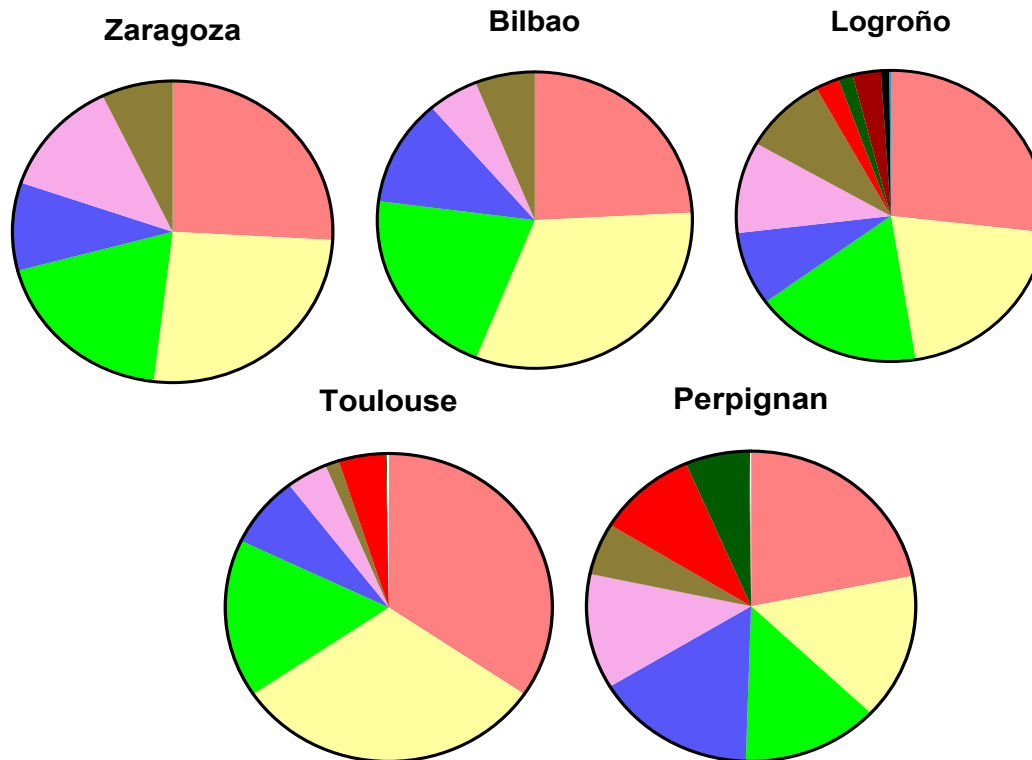


PORCENTAJE DE MUESTRAS ADQUIRIDAS POR ESPECIE (TOTAL)

Y EN CADA CIUDAD

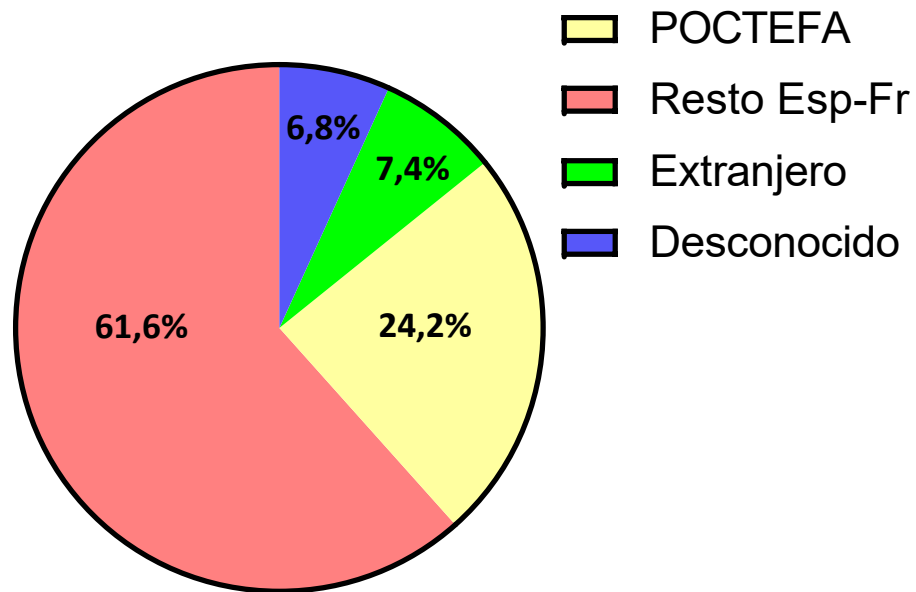


- Vacuno
- Pollo
- Pato
- Cerdo
- Pavo
- Cordero
- Conejo
- Caballo
- Codorniz
- Pintada
- Cabra
- Perdiz

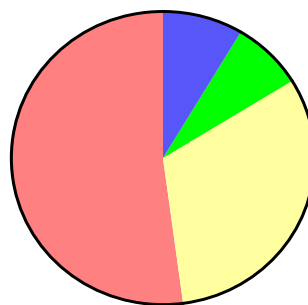


PORCENTAJE DE MUESTRAS ADQUIRIDAS POR ORIGEN (TOTAL)

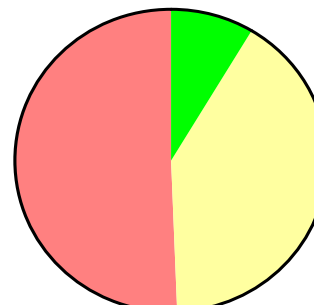
Y EN CADA CIUDAD.



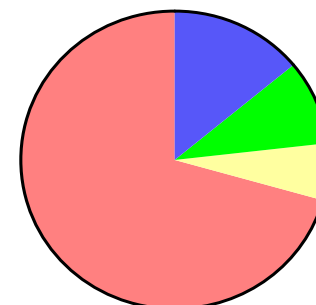
Zaragoza



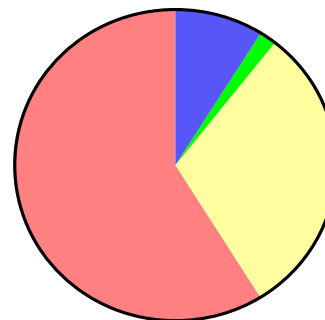
Bilbao



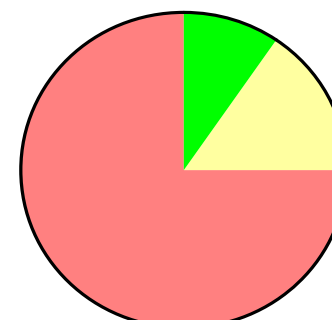
Logroño



Toulouse



Perpignan



1. INTRODUCCIÓN

2. MATERIAL Y MÉTODOS

MUESTREO

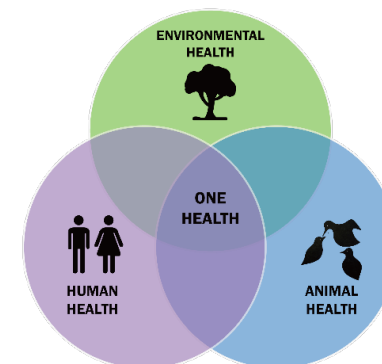
SCREENING

CONFIRMACIÓN POR QTOF

1. Explorer®

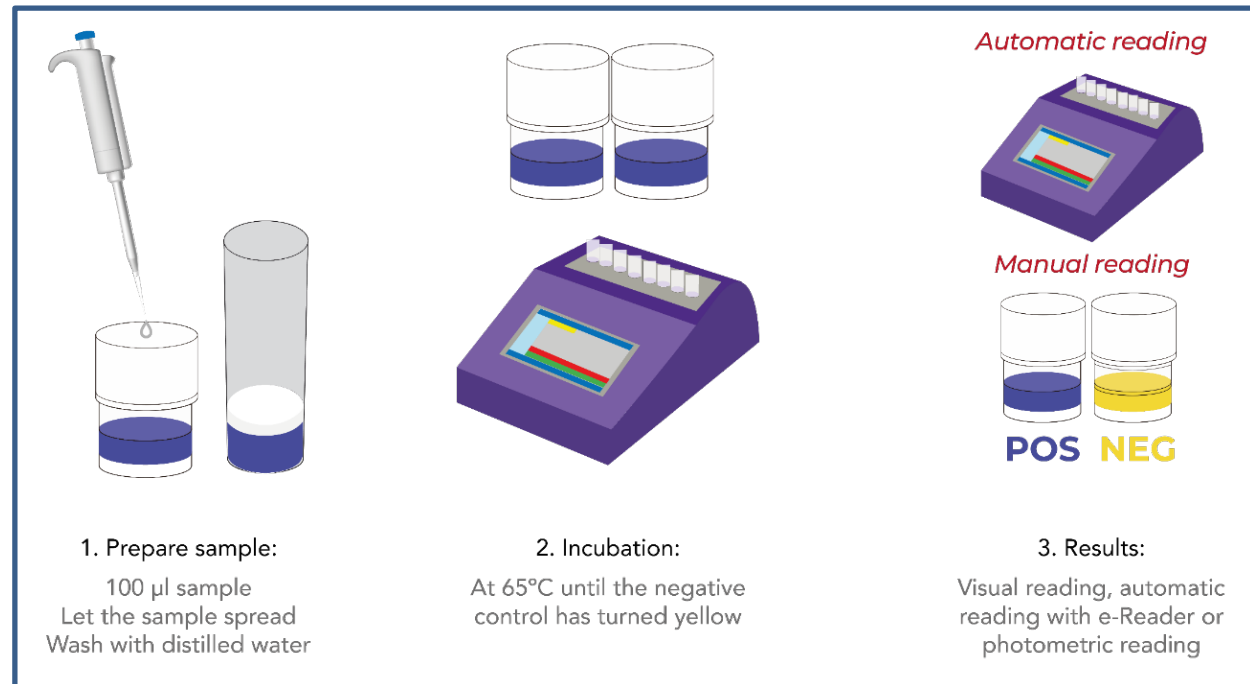
2. QuinoScan®

3. Resultados del cribado



3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- Las 5357 muestras recogidas se analizaron por Explorer®.
- Basado en la inhibición del crecimiento de *G. stearothermophilus*.



**3,5% de muestras
positivas al test biológico**

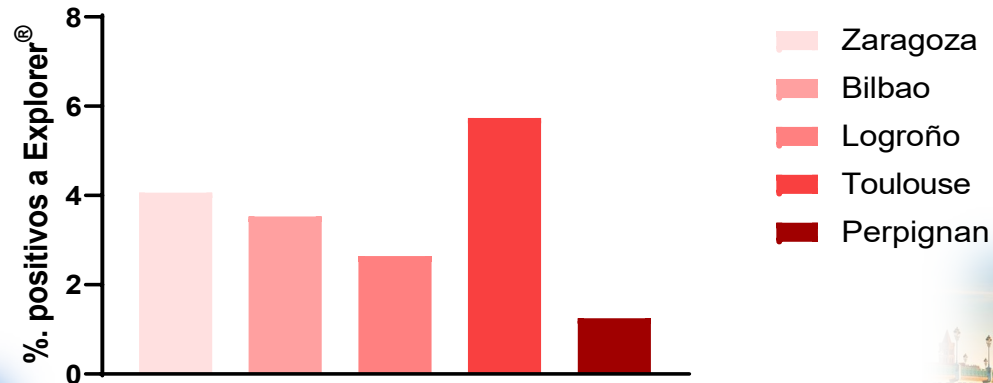
**Número y porcentaje de
muestras positivas a Explorer
por ciudad y especie.**

	Zaragoza		Bilbao		Logroño		Toulouse		Perpignan		TOTAL	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Vacuno	7	2,3	3	1,3	4	1,2	5	1,4	0	0	19	1,3
Pollo	14	4,7	7	2,3	5	1,9	25	7,8	1	0,7	52	3,9
Cerdo	10	4,6	12	5,9	2	0,9	11	6,4	0	0	35	3,7
Pavo	7	6,4	5	4,5	6	5,8	12	15,6	5	3,3	35	6,3
Cordero	5	3,4	3	6	2	1,6	0	0	1	0,9	11	2,3
Conejo	4	4,8	4	6,8	1	0,9	0	0	3	5,8	12	3,8
Pato					11	35,5	5	10,4	0	0	16	9,2
Caballo					0	0	0	0	2	3,3	2	2,5
Codorniz					0	0					0	0
Cabra					2	18,2					2	18,2
Pintada							1	50	0	0	1	25
Perdiz					0	0					0	0
TOTAL	47	4,1	34	3,5	33	2,6	59	5,7	12	1,3	185	3,5

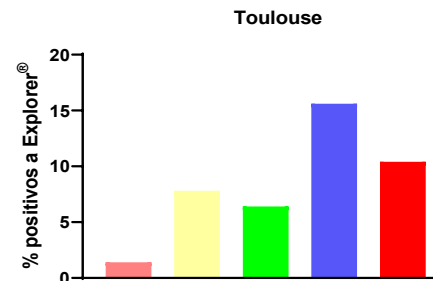
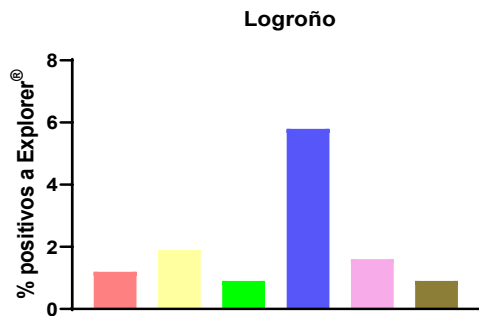
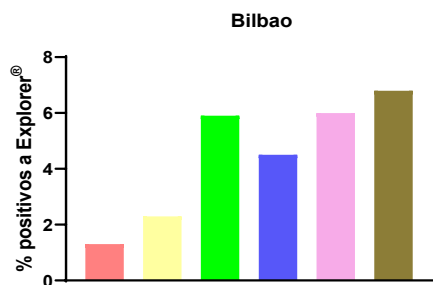
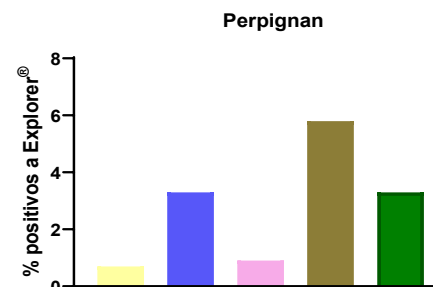
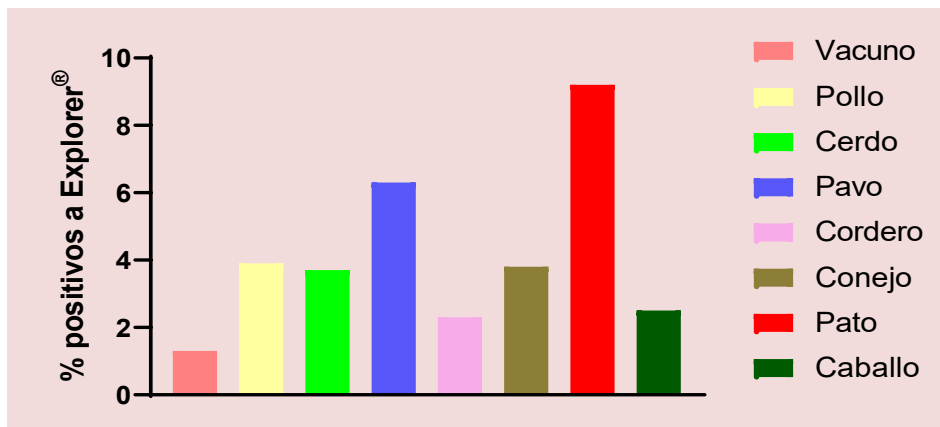
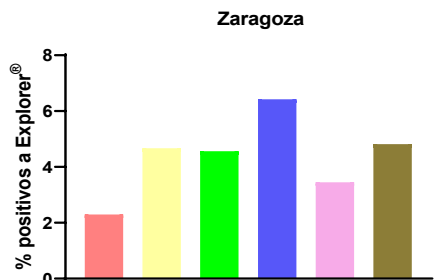
**Número y porcentaje de
muestras positivas a Explorer
por ciudad y origen.**

	Zaragoza		Bilbao		Logroño		Toulouse		Perpignan		TOTAL	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
POCTEFA	14	3,8	13	3,3	1	1,3	6	1,9	1	0,7	35	2,7
Resto de España-Francia	25	4,2	19	3,9	25	2,8	30	5,0	9	1,3	109	3,3
Extranjero	3	3,4	2	2,4	3	2,6	1	5,6	2	2,2	11	2,8
Desconocido	5	4,0			4	2,3	22	23,9			30	8,2
TOTAL	47	4,1	34	3,5	33	2,6	59	5,7	12	1,3	185	3,5

PORCENTAJE DE MUESTRAS POSITIVAS A EXPLORER EN CADA UNA DE LAS CIUDADES

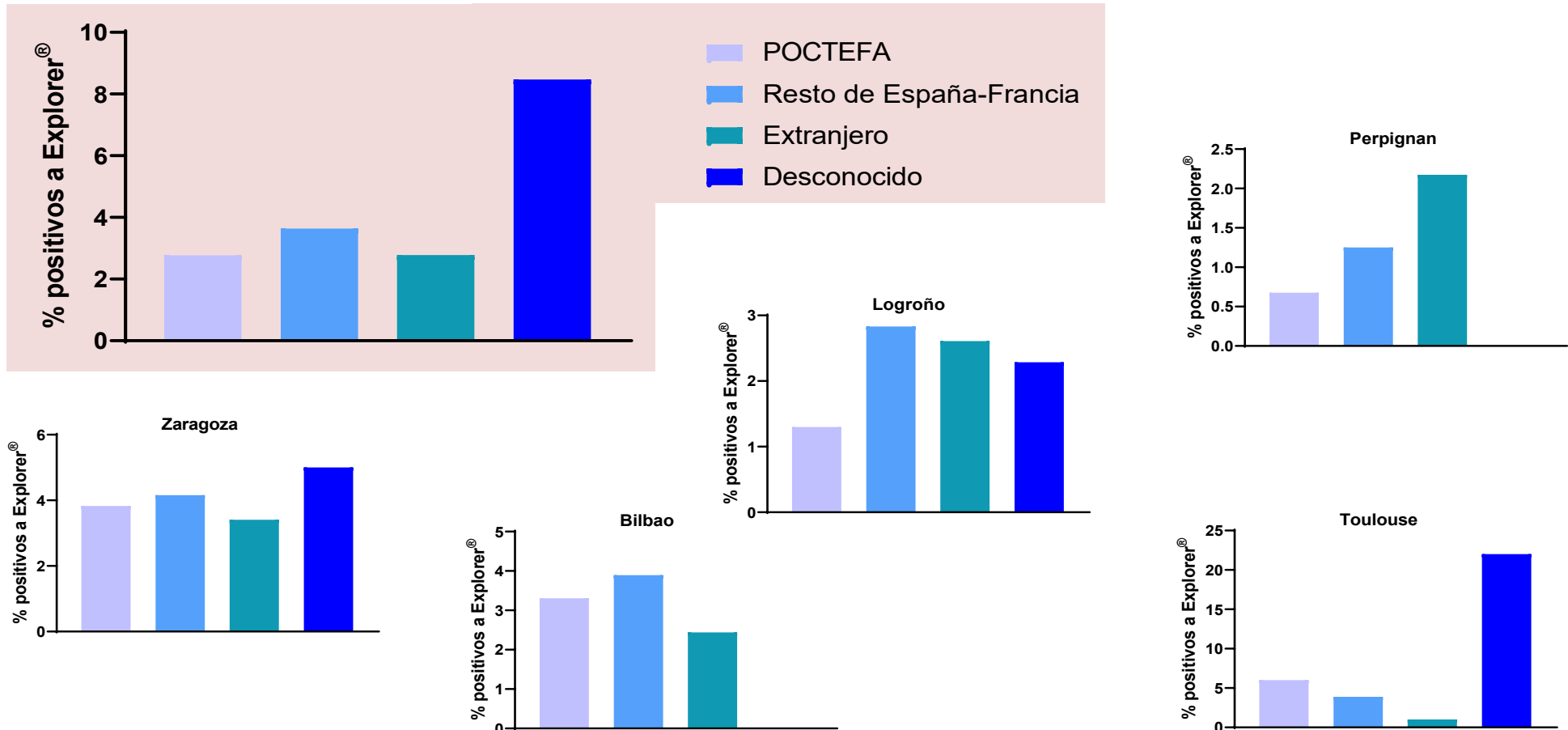


PORCENTAJE DE POSITIVOS A EXPLORER POR ESPECIES*



*Respecto al número de muestras de cada especie adquiridas. No se incluyen aquellas especies con un tamaño muestral no significativo ($n \leq 50$).

PORCENTAJE DE POSITIVOS A EXPLORER POR ORIGEN*



*Respecto al número de muestras de cada procedencia adquiridas.

SUMMARY PROCEDURE RESUMEN DEL PROCEDIMIENTO

1. Add 200 μ L of sample, mix and introduce the strip
 Añade 200 μ L de muestra, mezcla e introduce la tira

2. Incubate 6 min at 40°C
 Incuba 6 min a 40°C

3. Read the results
 Lee los resultados

Visual results interpretation
 Interpretación visual de los resultados

Objective reading with IRIS
 Lectura objetiva con IRIS

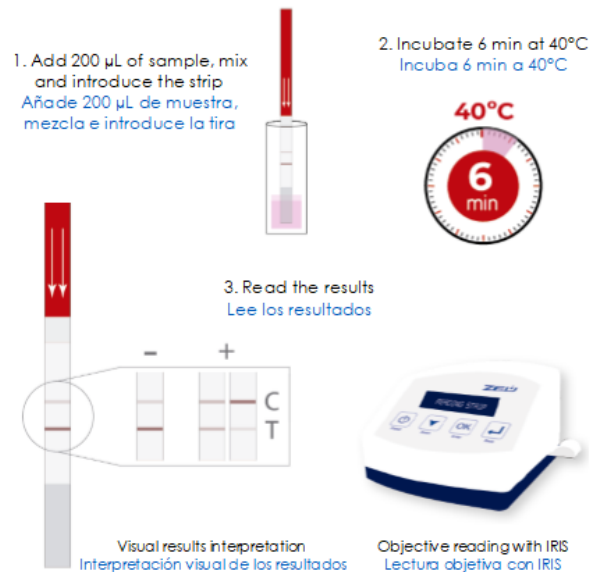
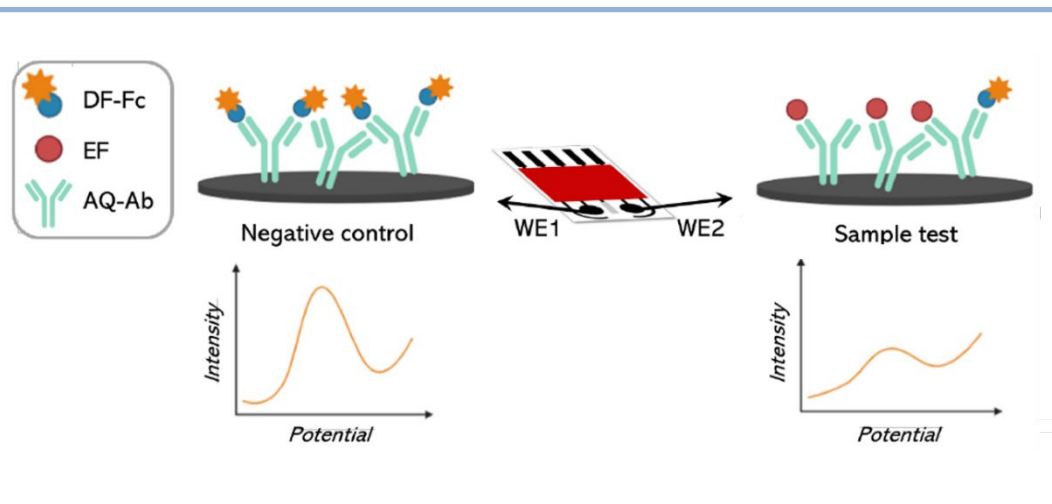



Fig. 1



Fig. 2

Como *G. stearotherophilus* (Explorer) no es sensible a las quinolonas, TODAS las muestras se analizaron por otros dos métodos específicos: QuinoScan y un biosensor



**0,3% de muestras
positivas a QuinoScan**

Número y porcentaje de
muestras positivas a
QuinoScan por ciudad y
especie.

	Zaragoza		Bilbao		Logroño		Toulouse		Perpignan		TOTAL	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Vacuno	0	0	0	0	2	0,6	1	0,3	1	0,5	4	0,3
Pollo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0
Cerdo	0	0	0	0	2	0,9	1	0,6	0	0	3	0,3
Pavo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0
Cordero	0	0	0	0	2	1,6	0	0	0	0	2	0,4
Conejo	1	1,2	1	1,7	0	0	0	0	2	3,8	4	1,3
Pato					0	0	0	0	2	2,1	2	1,2
Caballo					0	0	0	0	0	0	0	0,0
Codorniz					0	0					0	0,0
Cabra					0	0					0	0,0
Pintada							0	0	0	0	0	0,0
Perdiz					0	0					0	0,0
TOTAL	1	0,1	1	0,1	6	0,5	2	0,2	5	0,5	15	0,3

Número y porcentaje de
muestras positivas a
QuinoScan por ciudad y
origen.

	Zaragoza		Bilbao		Logroño		Toulouse		Perpignan		TOTAL	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
POCTEFA	1	0,0027	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,0770
Resto de España-Francia	0	0	1	0,0020	6	0,6795	2	0,3306	5	0,6944	14	0,4245
Extranjero	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Desconocido	0	0			0	0	0	0			0	0
TOTAL	1	0,0009	1	0,0010	6	0,4800	2	0,1944	5	0,5208	15	0,2800

**3,8% de muestras
positivas al cribado
(Explorer+QuinoScan)**

Número y porcentaje de
muestras positivas al cribado
(Explorer+QuinoScan) por
ciudad y especie.

	Zaragoza		Bilbao		Logroño		Toulouse		Perpignan		TOTAL	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Vacuno	7	2,3	3	1,3	6	1,8	6	1,7	1	0,5	23	1,6
Pollo	14	4,7	7	2,3	5	1,9	25	7,8	1	0,7	52	3,9
Cerdo	10	4,6	12	5,9	4	1,8	12	7,0	0	0,0	38	4,0
Pavo	7	6,4	5	4,5	6	5,8	12	15,6	5	3,3	35	6,3
Cordero	5	3,4	3	6,0	4	3,1	0	0,0	1	0,9	13	2,7
Conejo	5	6,0	4*	8,5	1	0,9	0	0,0	4*	9,6	16	5,0
Pato	0		0		11	35,5	5	10,4	2	2,1	18	10,4
Caballo	0		0		0	0,0	0	0,0	2	3,3	2	2,5
Codorniz	0		0		0	0,0	0		0		0	0,0
Cabra	0		0		2	18,2	0		0		2	18,2
Pintada	0		0		0		1	50,0	0	0,0	1	25,0
Perdiz	0		0		0	0,0	0		0		0	0,0
TOTAL	48	4,2	34	3,6	39	3,1	61	5,9	16	1,8	198	3,8

*se ha eliminado una muestra de conejo de Bilbao y una de Perpignan porque daban positivo a los dos test.

Número y porcentaje de
muestras positivas al cribado
(Explorer+QuinoScan) por
ciudad y origen.

	Zaragoza		Bilbao		Logroño		Toulouse		Perpignan		TOTAL	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
POCTEFA	15	4,1	13	3,3	1	1,3	6	1,9	1	0,7	36	2,8
Resto de España-Francia	25	4,2	19*	4,1	31	3,5	32	5,3	13*	1,9	123	3,7
Extranjero	3	3,4	2	2,4	3	2,6	1	5,6	2	2,2	11	2,8
Desconocido	5	5,1			4	2,3	22	23,9			30	8,2
TOTAL	48	4,2	34	3,6	39	3,1	61	5,9	16	1,8	198	3,8

*se ha eliminado una muestra de origen "resto de España y Francia" de Bilbao y una de Perpignan porque daban positivo a los dos test.

1. INTRODUCCIÓN

2. MATERIAL Y MÉTODOS

MUESTREO

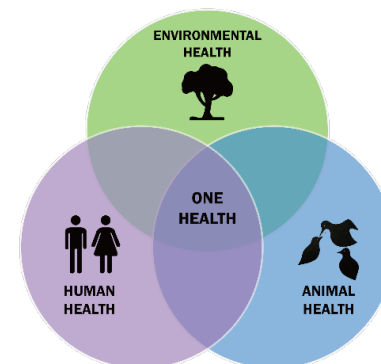
SCREENING

CONFIRMACIÓN POR QTOF

1. Explorer®

2. QuinoScan®

3. Resultados del cribado



3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- Análisis de los 198 positivos por cromatografía QTOF (Quadrupole Time of Flight)
- Laboratorio de Salud Pública del Gobierno Vasco



Muestras con concentraciones cercanas (morado) o superiores al

LMR (rojo),

Ciudad	Especie	Identificación	Antimicrobiano	Concentración (ppb)
ZARAGOZA	Cordero	Z_201130_L_01	Sulfadiazina	81,89
BILBAO	Cordero	B_200707_L_05	Sulfadoxina	96,4
			Oxitetraciclina	21,7
LOGROÑO	Cordero	L_200602_L_47	Enrofloxacin	218,8
			Ciprofloxacina	34,34
	Cabra	L_200307_G_05	Sulfadiazina	164,3
	Cabra	L_200528_G_07	Doxiciclina	813
TOULOUSE	Cerdo	T-200218-P-02	Sulfadimetoxina	110
	Cerdo	T-200218-P-03	Enrofloxacin	88
PERPIGNAN	Conejo	P_200302_R_01	Sulfadimetoxina	80
	Conejo	P_200520_R_01	Sulfadimetoxina	187

0,1% > LMR



0,17% > IC LMR



**Hay un elevado porcentaje de muestras positivas
a Explorer[®] que no se confirman por QTOF:**

¿Qué está pasando?



3,8% vs
0,1%

Muestras positivas
al cribado con
residuos de
antimicrobianos
(QTOF)

El 15,2% de las
muestras
positivas al
cribado contienen
residuos de
antimicrobianos

CIUDAD	Identificación	Especie	Explorer	QuinoScan	Molécula	Concentración (ppb)
ZARAGOZA	Z_200106_CH_26	Pollo	+	-	Doxiciclina	<LD
	Z_201029_CH_24	Pollo	+	-	Doxiciclina	25,46
	Z_201109_CH_23	Pollo	+	-	Doxiciclina	<LD
	Z_200122_P_04	Cerdo	+	-	Doxiciclina	<LD
	Z_200928_P_29	Cerdo	+	-	Doxiciclina	9,24
	Z_200225_L_01	Cordero	+	-	Sulfadiazina	12,4
	Z_200831_L_01	Cordero	+	-	Sulfadiazina	14,68
	Z_201130_L_01	Cordero	+	-	Sulfadiazina	81,89
	Z_200928_T_14	Pavo	+	-	Doxiciclina Enrofloxacina	<LD 10,42
	Z_201109_T_04	Pavo	+	-	Doxiciclina	<LD
	Z_200225_R_01	Conejo	+	-	Sulfadimetoxina	22,7
	Z_200907_R_06	Conejo	-	+/-	Enrofloxacina	6,84
	BILBAO	B_200908_CH_11	Pollo	+	-	Lincomicina
B_200707_L_05		Cordero	+	-	Sulfadoxina Oxitetraciclina	96,4 21,7
B_200728_T_02		Pavo	+	-	Doxiciclina	7,05
B_200804_R_04		Conejo	+	+	Enrofloxacina	39,5
LOGORÑO	L_200803_CH-151	Pollo	+	-	Doxiciclina	27,71
	L_200218_L_16	Cordero	+	-	Sulfadiazina	56,2
	L_200527_L_42	Cordero	-	+	Enrofloxacina	9,7
	L_200602_L_47	Cordero	-	+	Enrofloxacina Ciprofloxacina	218,8 34,34
	L_210115_T103	Pavo	+	-	Doxiciclina	6,6
	L_200307_G_05	Cabra	+	-	Sulfadiazina	164,3
	L_200528_G_07	Cabra	+	-	Doxiciclina	813
TOULOUSE	T_200928_C_05	Pollo	+	-	Sulfadimetoxina	12,5
	T_201123_C_09	Pollo	+	-	Doxiciclina	31,5
	T_200218_P_02	Cerdo	+	-	Sulfadimetoxina	110
	T_200218_P_03	Cerdo	-	+	Enrofloxacina	88
T_200114_T_02	Pavo	+	-	Sulfadimetoxina	<LD	
PERPIGNAN	P_200302_R_01	Conejo	+	+	Sulfadimetoxina	80
	P_200520_R_01	Conejo	+	-	Sulfadimetoxina	187

Análisis por QTOF de 138 muestras negativas al cribado

-Análisis por cromatografía QTOF de 138 muestras negativas al cribado.

-Elegidas al azar.

Código muestra	Especie	Antimicrobiano detectado	Concentración (ppb)
B_200127_C_06	Pollo	Doxiciclina	21
B_200127_T_07	Pavo	Doxiciclina	15
B_200127_R_13	Conejo	Enrofloxacino	< 10
		Oxitetraciclina	< 20
B_200127_P_36	Cerdo	Lincomicina	14
B_200210_T_16	Pavo	Doxiciclina	< 20
B_200615_O_06	Cordero	Sulfadiazina	16,2
B_200623_T_19	Pavo	Doxiciclina	13
Z_201202_R_01	Conejo	Oxitetraciclina	20,9
Z_201202_CH_05	Pollo	Norfloxacino	7,3
Z_201202_P_04	Cerdo	Doxiciclina	11,5
Z_201201_P_10	Cerdo	Dicloxacilina	10,9
Z_201202_R_02	Conejo	Oxitetraciclina	11
Z_201202_P_06	Cerdo	Doxiciclina	33,5
		Lincomicina	7,8
Z_201109_CH_25	Pollo	Flumequina	31,6
Z_201109_T_09	Pavo	Doxiciclina	8,27
Z_201109_L_11	Cordero	Doxiciclina	<20
Z_201109_R_05	Conejo	Oxitetraciclina	9,8

	Total	Residuos QTOF	%
Vacuno	26	0	0,0
Pollo	51	3	5,9
Cerdo	24	4	16,7
Pavo	19	4	21,1
Cordero	10	2	20,0
Conejo	7	4	57,1
Pato	1	0	0,0
TOTAL	138	17	12,3

El 12,3% de las muestras negativas al cribado contienen residuos de antimicrobianos

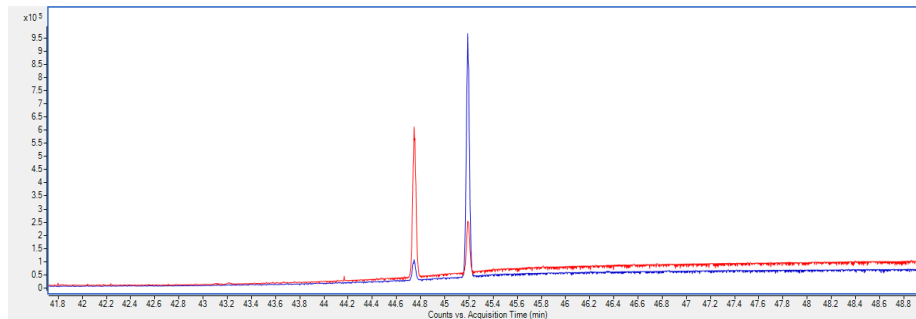


**Hay un elevado porcentaje de muestras positivas
a Explorer[®] que no se confirman por QTOF:**

HIPÓTESIS

- Compuestos naturales: aceites esenciales
- Degradación de antibióticos: metabolitos activos

- ✓ Se ha demostrado que aceites esenciales que se añaden a la alimentación y se pueden encontrar en músculo tienen un efecto inhibitorio de *G. stearotherophilus* a niveles de mg/Kg (MIC) (Voundi *et al.*, 2015).
- ✓ Se ha encontrado carvacrol y timol en músculo y suero sanguíneo a niveles de $\mu\text{g/Kg}$. Es posible que concentraciones a nivel bajo produzcan retrasos en el viraje pero no inhibición completa.



Overlap of extracted ion 135 m/z of a standard mixture (0,001 mg/L) of carvacrol and thymol (red) and sample Nov CH-32 (blue) acquired using HS-SPME-GC-MS in SCAN/SIM mode,



- ✓ Se ha descrito inhibición del microorganismo a concentraciones de 200 ppb para aceites como carvacrol, orégano y cinemaldheído.

Se llevaron a cabo las MICs de aceites esenciales comúnmente utilizados en alimentación animal:

1. Carvacrol
2. Orégano
3. Cinemaldheído
4. Cineole
5. P-cymol
6. Thymus
7. Limonene

	1000 ppm	600 ppm	400 ppm	200 ppm	100 ppm	Blanco
Carvacrol 1	P	P	P	N	N	N
Carvacrol 2	P	P	P	P	N	N
Carvacrol 3	P	P	P	N	N	N
Orégano 1	P	P	N	N	N	N
Orégano 2	P	P	P	P	N	N
Orégano 3	P	P	P	N	N	N
Cinemaldheído 1	P	N	N	N	N	N
Cinemaldheído 2	P	P	N	N	N	N
Cinemaldheído 3	P	P	N	N	N	N

CONCLUSIÓN: A pesar de que los aceites esenciales se acumulan en músculo, no lo hacen las concentraciones que serían inhibitorias para Explorer[®]. **NO son responsables de la inhibición del test.**



**Hay un elevado porcentaje de muestras positivas
a Explorer[®] que no se confirman por QTOF:**

HIPÓTESIS

- Compuestos naturales: aceites esenciales
- Degradación de antibióticos: metabolitos activos

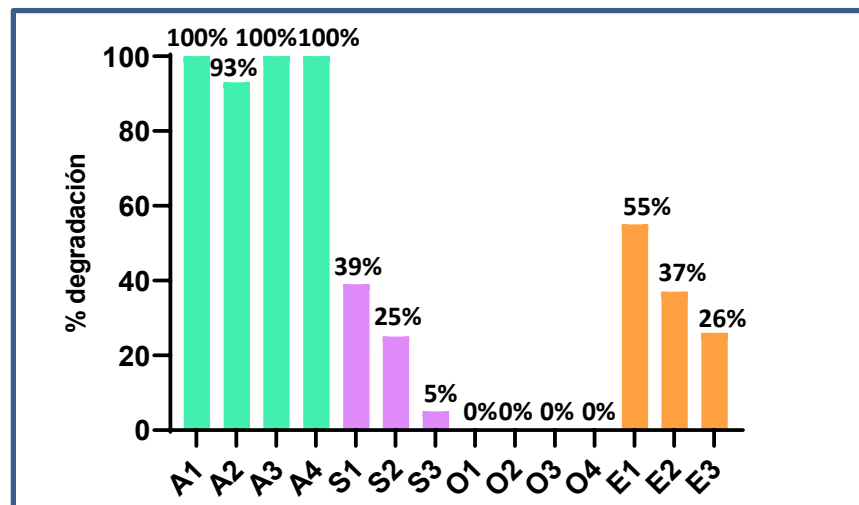
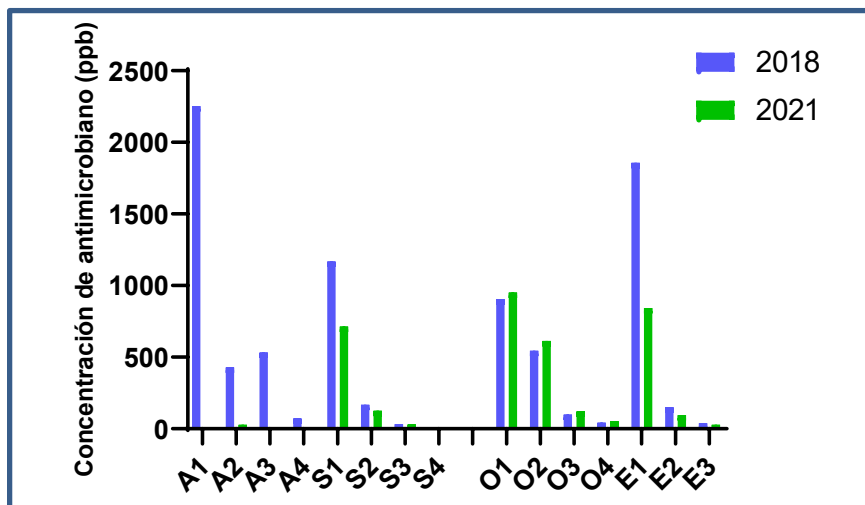
Introduction

Chicken meat is a very popular food commodity around the world, and its consumption has increased over the last decades in many countries. The veterinary drugs are inevitably used for therapeutic or disease-preventive reasons in parallel with promoting growth [1]. The use of antimicrobial agents for growth promotion purposes in farm animals was prescribed in the mid-1950s. Since then tetracycline,

✓ La degradación de ciertos antibióticos en músculo durante el almacenamiento en congelación ya ha sido descrita en estudios previos.

✓ Para evaluar el efecto del almacenamiento sobre la estabilidad de los antimicrobianos, se analizaron 14 muestras:

- Contaminadas de forma natural con antimicrobianos
- Caracterizadas por cromatografía
- Mantenido tres años en congelación a -20°C.



BTScan®: detección metabolitos tetraciclinas

- **Test cualitativo** para la detección de β -lactámicos (**ELISA** de competición).
- Los β -lactámicos se degradan con facilidad y se eliminan rápidamente de músculo: no contamos con muestras adecuadas para su evaluación.



- Amoxicilina:
 - Muestras que inicialmente (2018) tenían más de 2000 ppb de amoxicilina y que hoy (2021) tienen concentraciones no detectables por QTOF, siguen siendo positivas a Explorer y a BTScan.

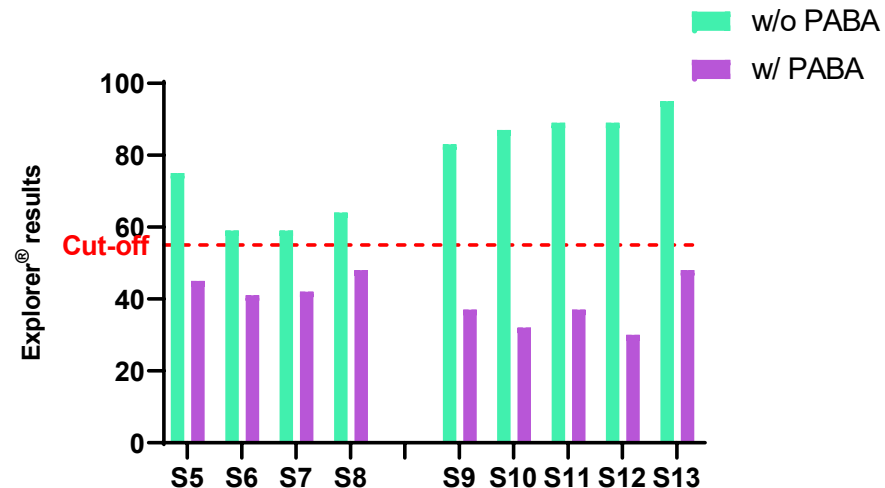
	LC-MS/MS		Explorer®		BTScan® 1/5
	2018	2021	2018	2021	2021
A1	2254	< CCB	+	+	+
A2	429	29	+	+	+
A3	532	< CCB	+	+	±
A4	72	< CCB	+	+	±

CONCLUSIÓN: aunque el compuesto original (amoxicilina) se ha degradado, sigue habiendo metabolitos biológicamente activos.

Prueba PABA: detección metabolitos sulfamidas

- Las **sulfamidas** son compuestos bacteriostáticos que actúan inhibiendo la síntesis del DNA bacteriano.
- **PABA** (ácido paraminobenzóico): antagonista competitivo de las sulfamidas. El PABA compite con las sulfamidas por su unión a una enzima implicada en la síntesis del ácido fólico, precursor de purinas, ácidos nucleicos y DNA.
- Si se añade PABA a una muestra con metabolitos activos de sulfamidas, la inhibición a Explorer® se **revertirá**.
- Muestras que en 2018 contenían concentraciones de sulfametoxipiridazina detectables y actualmente están por debajo del LD de la cromatografía, siguen siendo positivas a Explorer. Tras la adición de PABA, negativizan.

CONCLUSIÓN: Existen metabolitos activos de las sulfamidas no detectables por QTOF que son responsables de la inhibición de Explorer®.





CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Desfase entre el 3,8% de positivos al screening y el 0,1% de confirmados por QTOF. HIPÓTESIS:

- Otros inhibidores: aceites esenciales.
 - Aunque se hallaron en músculo, la concentración fue insuficiente para ser responsable de la inhibición del test.
- Degradación de antibióticos.
 - Se describió degradación de diversa intensidad dependiendo del antimicrobiano.
- **Metabolitos biológicamente activos.**
 - Las pruebas de PABA y BTScan confirman la presencia de metabolitos activos de sulfamidas y β -lactámicos incluso en muestras por debajo del límite de detección de la técnica cromatográfica:

Existen metabolitos biológicamente activos procedentes de las moléculas originales, responsables de la inhibición de Explorer®, y que por tanto, podrían seguir causando todos los problemas derivados de una mala gestión de los residuos de antimicrobianos: alergias, disbiosis intestinales, antibiorresistencias, etc.

CONCLUSIONES

TEST BIOLÓGICO vs TEST QUÍMICO

Si el objetivo es cumplir con los estándares legales actuales, el método confirmatorio de tipo químico será el de elección. Sin embargo, si la finalidad del test es proteger la salud de los consumidores, el resultado del test biológico debería ser el que prime.



Análisis de la presencia de residuos de antibióticos en carne comercializada en la región POCTEFA

*Rafael Pagán Tomás, IP TESTACOS
Director del Instituto Agroalimentario de Aragón – IA2
pagan@unizar.es*

