

ISBN 970-27-1045-6

APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE ELISA PARA LA DETERMINACIÓN DE CLENBUTEROL EN RETINA DE BOVINO

**Lixcea Hernández Contreras, Carlos Pacheco Gallardo,
Delia G. González Aguilar, Agustín Ramírez Alvarez.**

Departamento de Salud Pública, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara. Km. 15.5 Carret. Guadalajara-Nogales S/N, Predio Las Agujas, Zapopan, Jalisco
Pata correspondencia: cpgallar@cucba.udg.mx

Palabras clave: *clenbuterol, retina, ppt*

Introducción

Los residuos químicos en los alimentos de origen animal son indeseables desde el punto de vista de la inocuidad alimentaria. El Clorhidrato de Clenbuterol conocido comúnmente como Clenbuterol tiene la capacidad de interactuar con receptores adrenérgicos del sistema nervioso autónomo. En medicina veterinaria los β -agonistas han sido utilizados como broncodilatadores y tocolíticos especialmente en equinos y pequeñas especies.(Sumano 2002).

El clenbuterol es un medicamento que se presta al mal uso por la interacción entre su eficacia promotora del rendimiento productivo y su lenta velocidad de depuración. Al administrar una dosis de 10 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. de peso corporal durante 10 días se puede observar un efecto anabólico, identificando cambios metabólicos, disminuyendo la deposición de grasa y aumentando la masa muscular, efecto que pudiera padecer deseable, pero conlleva a problemas de salud pública al ingerir el humano dosis acumulativas de clenbuterol junto con la proteína animal. Existen medicamentos utilizados en medicina veterinaria y en medicina humana mucho más peligrosos y con un enorme potencial tóxico, pero como sucede con los medicamentos, el problema no es su uso sino el abuso motivado por ignorancia y ambición. En este caso se pueden inducir algunos efectos colaterales pasajeros en el consumidor (dolor de cabeza, temblores musculares, náuseas, taquicardia, etc.) si no se respetan los tiempos de retiro señalados de cuando menos dos semanas y de preferencia un mes para disminuir los residuos. (Sumano 2002)

La determinación de clenbuterol en retina al igual que en pelo e hígado permanece por mucho tiempo después de suspender la administración de esta sustancia, se han determinado concentraciones muy elevadas en estos tejidos, pero es realmente improbable que alguien consuma la cantidad necesaria de estos para lograr una dosis peligrosa. Sin

embargo, es evidente que el uso ilegal del clenbuterol está relacionado estrechamente con residuos que sobrepasaran en gran medida los límites máximos de residuos (LMR). (FAO 1996)

En México existe poco control y/o vigilancia por parte de las autoridades correspondientes, por lo tanto no se cuenta con un programa efectivo supervisado por veterinarios oficiales.

En humanos donde la ingesta de alimentos contaminados sea mayor a 40mcg/día, puede presentarse un cuadro de intoxicación, de una a seis horas posterior a su ingestión.

Actualmente el método más utilizado para la detección de clenbuterol es el de ELISA, ya que este método además de ser confiable, posee la característica de poder trabajar con un número elevado de muestras simultáneamente y obtener resultados en un corto espacio de tiempo.(CENAPA)

El clenbuterol puede concentrarse en diferentes tejidos, las muestras más representativas del problema son: orina, hígado, riñón y retina, siendo la retina del ojo una de las muestras que no requiere un laborioso proceso de extracción previo al análisis, y sin embargo puede retener el clenbuterol durante más de 5 de meses después de suspender el suministro del mismo. Además debido a la alta afinidad del fármaco con la melanina (compuesto celular responsable de la fijación del clenbuterol), este órgano puede alcanzar concentraciones de hasta 10 veces mayores a las halladas en hígado (SAGARPA 2000).

En Europa, Canadá, y EE UU a partir de 1988, se he considerado ilegal su uso. En México la NOM-061-ZOO-1999 prohibió su empleo en el mismo año, pero no obstante se siguen presentando casos de intoxicación en humanos.

En Jalisco se sabe de su uso clandestino como promotor de la producción de carne en ganado bovino de engorda y se han reportado mas de 200 casos de intoxicación en lo que va del año 2006, y esto a pesar de los de los esfuerzos desarrollados por las entidades gubernamentales involucradas (SAGARPA, SS, SEDER).

De aquí el objetivo de este trabajo de desarrollar un monitoreo en los rastros de la zona metropolitana de Guadalajara para obtener un panorama general de la presencia de este tipo de fármaco.

Material y métodos

El estudio se realizó en dos rastros de la zona metropolitana de Guadalajara. En un plazo de cuatro meses, desde junio hasta septiembre del 2006. En este periodo se analizaron 99 bovinos obteniendo un ojo de cada uno, los cuales se congelaron a -10°C durante 24 horas para conservación y lisis de la retina. Posteriormente se descongela la muestra (para destruir las células del tejido) y se corta con precaución de lado a lado del ojo para extraer la retina con la ayuda de un bisturí estéril.

Se emplea 0.5 ml del líquido y se diluye en una relación de 1:1 con agua destilada, posteriormente se centrifuga por 5 minutos a 2500 rpm y se emplea para su análisis 20 μ l. El procedimiento de la muestra se lleva a cabo bajo el método RIDASCREEN® Clenbuterol Fast.

La prueba se basa en la reacción antígeno-anticuerpo, los pozos de la placa son cubiertos con anticuerpos específicos al clenbuterol. El conjugado enzima clenbuterol, los estándares de clenbuterol y la muestra son adicionados a la placa, la enzima del conjugado y el clenbuterol compiten por los sitios de unión de los anticuerpos. Cualquier enzima conjugada no unida es eliminada con lavados. La enzima sustrato y el cromógeno son adicionados a los pozos y se incuban. El enlace de la enzima conjugado se convierte con el cromógeno de color transparente a azul, posteriormente hay un cambio de color azul al amarillo tras adicionar el reactivo stop. La medición es hecha fotométricamente a 450 nm. La absorción es inversamente proporcional a la concentración de clenbuterol en la muestra. La placa es leída con el lector de ELISA, y las absorbancias obtenidas, se analizan mediante el programa RIDASOFT WIN®. Para determinar una muestra positiva debe considerarse el valor de 3000 ppt con un rango analítico de la prueba de 0 a 8100 ppt. (Ridascreen 2002).

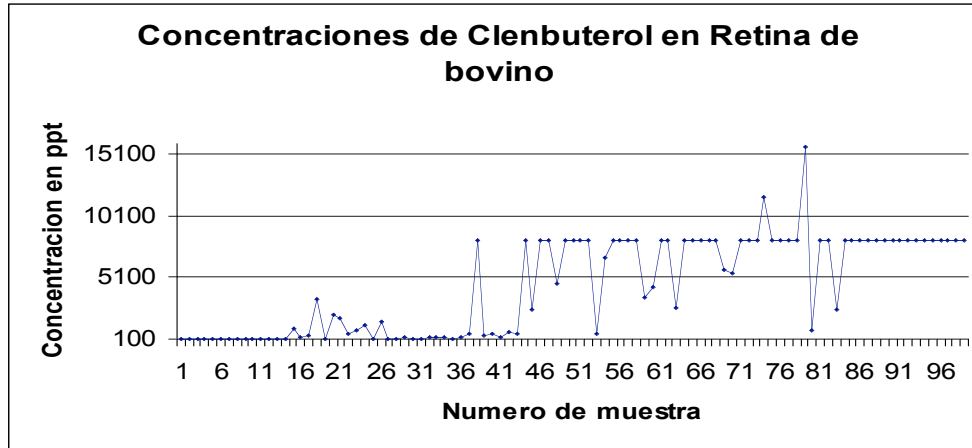
Resultados y discusión

De las 99 muestras que se analizaron un 53.5% resultaron positivas, con concentraciones mayores de 8100 ppt en 46 de ellas y en las 7 restantes las concentraciones oscilaron entre 3000 y 8100 ppt.

Las muestras negativas, varían sus concentraciones de entre 200 y 2540 ppt.

Los resultados se pueden observar en el cuadro y la grafica siguientes:

RESULTADO	No. DE MUESTRAS	%
Positivos	53	53.5
Negativos	46	46.5
TOTAL	99	100



Estos resultados confirman que se está haciendo uso ilegal y en abuso del clenbuterol para la engorda de ganado en los bovinos que se sacrifican para consumo humano en los rastros de la zona metropolitana de Guadalajara, ya que las entidades gubernamentales como la secretaria de Salud y SAGARPA consideran muestras positivas en este tipo de tejido a partir de 3,000 ppt. La FAO indica un límite máximo de residuos en músculo de 200 ppt y en hígado de 600 ppt debido a la posibilidad de abuso de este medicamento estos límites se recomiendan únicamente cuando están asociados como uso terapéutico aprobado (FAO 1996).

Al comparar los resultados con la concentración máxima de residuos, el LMR, recomendado por el grupo de expertos del comité mixto de la FAO/OMS, como punto de partida para el estudio de clenbuterol el cual es de 600 ppt. identificando que es superado por las concentraciones obtenidas en este estudio, que van de 3000 hasta mayores a 8100 ppt. de clenbuterol lo que convierte los productos de origen animal contaminados en potencialmente peligrosos si son consumidos por personas sensibles.

Debido a que el peso de la retina no es suficiente para pensar que su consumo represente un peligro real para la salud de los consumidores, es importante destacar que la acumulación en retina nos puede ser útil para brindar información sobre el uso de clenbuterol en animales enviados al rastro, con base en el criterio de cero tolerancia.

Al analizar los resultados obtenidos encontramos que las concentraciones son muy altas en la retina y aunque podemos suponer que los productores están siendo más precavidos en cuanto a las dosis suministradas y los periodos de retiro del clenbuterol previo al envío de sus animales al sacrificio, aun así no es suficiente como para lograr desechar los residuos por completo. También hay una notable tendencia al incremento en el uso del producto por parte de los engordadores de bovinos debido a las exigencias del mercado que demanda carne magra y al costo elevado del beta agonista autorizado en México para uso en la engorda de bovinos que es el Zipaterol, esto da mayor margen de utilidades a engordadores introductores y tablajeros; situación que hace más compleja la solución de este problema de salud pública.

La especificidad del método de ELISA Fast clenbuterol® fue determinado mediante el análisis de reactividad cruzada con las siguientes sustancias:

β - análogo	% de reacción cruzada
Clenbuterol	100 %
Brombuterol	150 %
Terbutalin	10 %
Salbutamol	10 %
Cimaterol	6 %
Mabuterol	86 %
Cartuterol	4 %
Isoproterenol	Menos de 0.1 %
Adenalin	Menos de 0.1 %
Noradrenalin	Menos de 0.1 %

Fuente: Ridascreen

Por lo tanto se puede considerar que este tipo de prueba tiene un mínimo margen de error considerando la especificidad antes mencionada.

Se han hecho estudios para identificar si existe reacción cruzada con 2 agonistas autorizados en México, Zilpaterol y Ractopamina que tienen el mismo efecto en los animales pero con baja residualidad, Sumano en el 2002 reporta que estas sustancias en hígado con un tiempo de retiro, denominado "cero" (que en realidad es 12 h), se ha informado que es igual o inferior a 0.013 ppm. Este valor es inferior al LMR, que es de 0.15 ppm.

Con base en el criterio de cero residuos, Elliot en el recomienda un tiempo de retiro de cuatro semanas cuando se utiliza una dosis convencional para mejorar el rendimiento en canal. Sin embargo, no hace referencia al tiempo requerido utilizando otras dosificaciones. La melanina es el componente ocular responsable de la fijación del clenbuterol,⁸⁹ lo cual se demostró en residuos oculares de ratas albinas y ratas testigo ya que ambas presentaron la misma cantidad de residuos de clenbuterol, mientras que las ratas con ojos pigmentados mostraron clara evidencia de acumulación.

Es importante recalcar que existen diferentes métodos para identificar residuos de esta sustancias en tejidos de animales como cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y cromatografía de gases, pero debido al alto costo de de los equipos y la necesidad de personal capacitado en relación al manejo de la muestra, encarece el diagnóstico de la presencia de clenbuterol en diferentes tejidos animales.

Conclusiones

Existe la presencia alta de residuos de clenbuterol en retina de bovino que se envían a los rastros municipales de la zona metropolitana de Guadalajara.

La prueba de ELISA es confiable e identifica concentraciones bajas y altas de clenbuterol en retina de bovino en un promedio de 3 horas.

Bibliografía

- NOM-EM-015-ZOO-2002, Especificaciones técnicas para el control del uso de los beta-agonistas en los animales. Diario Oficial de la Federación, viernes 01 de Marzo 2002.
- Ensayo Inmunoenzimatico para el análisis cuantitativo de Clenbuterol y otros β -agonistas. CENAPA, Nota Técnica 2002.
- Sumano L. H., y Cols; Farmacología veterinaria 2da. Ed. México, Mc graw Hill, Interamericana, 1997, Págs.: 396-459.
- RIDASCREEN® Clenbuterol Fast. 2002. R-Biopharm Alemania.
- Hector Sumano I., Luis Ocampo C. y Lilia Gutiérrez O.; Clenbuterol y otros β -agonistas, ¿Una opción para la producción pecuaria o un riesgo para la salud pública?. Vet mex, abr./jun. 2002, vol. 33, no.2. Issn 0301-5092.
- FAO/OMS, 2005. Norma Oficial de Residuos de medicamentos veterinarios en alimentos,
<http://www.codexalimentarius.net/mrls/servlet/VetDrugServlet?Substances=312&Items...>