

Presencia de residuos antibióticos en carnes comercializadas en el área transfronteriza España-Francia: un enfoque novedoso en los métodos de vigilancia

María Jesús Serrano^{1,*}, Janire Elorduy², Itsaso Zabaleta², Georges Istamboulie³, Elena González-Fandos⁴, Alain Bousquet-Melou⁵, Luis Mata⁶, Chloé Aymard³, Jessica Da Silva⁴, Marlène Lacroix⁵, Alba Martínez-Laorden⁴, Diego García-Gonzalo¹, Santiago Condón¹, Eunate Abilleira² y Rafael Pagán¹

¹ Instituto Agroalimentario de Aragón – Universidad de Zaragoza. Facultad de Veterinaria, 50013, Zaragoza, España

² Ministerio de Sanidad del Gobierno Vasco, Oficina de Salud Pública y Adicciones, Laboratorio de Salud Pública, 20013, Guipuzkoa, España

³ Universidad de Perpignan Via Domitia. Biocapteurs-Analyse-Environnement, 66860, Perpignan, Francia

⁴ Departamento de Tecnología de Alimentos, Centro de Investigación CIVA, Department of Food Technology, CIVA Research Center, University of La Rioja, 26006 Logroño, Spain

⁵ INTHERES, Toulouse University, INRA, ENVT, 31300 Toulouse, France

⁶ Department of R&D, ZEULAB S.L., 50197, Zaragoza, Spain

Resumen

Aunque los antimicrobianos son grandes aliados en producción animal, su uso masivo ha contribuido a la aparición de antibiorresistencias. Además, cuando los periodos de supresión no se respetan, sus residuos pueden llegar a la cadena alimentaria, provocando toxicidad directa, alergias y/o disbiosis en la microbiota intestinal de los consumidores.

Puesto que España y Francia son los mayores productores de carne en la UE y están entre los principales consumidores a nivel mundial, el objetivo de nuestro estudio fue investigar la presencia de antimicrobianos en carne comercializada en el área transfronteriza España-Francia. Se recogieron 5.357 muestras de carne de diferentes especies animales en España (Zaragoza, Bilbao y Logroño) y Francia (Toulouse y Perpignan), que se analizaron por un método de cribado (Explorer®+QuinoScan®, Zeulab S.L., Zaragoza, España), obteniendo 194 muestras positivas, que se analizaron por cromatografía UPLC-QTOF para su confirmación. Los análisis cromatográficos revelaron presencia de residuos en 30 muestras, aunque solo 5 de ellas (0,093 % de las muestras iniciales) fueron no-conformes de acuerdo a la legislación. Análisis posteriores sugirieron que esta divergencia entre el cribado y la confirmación se debe a la presencia de metabolitos biológicamente activos derivados de los antimicrobianos originales, no identificados

* Autor para correspondencia: mjserran@unizar.es

Cita del artículo: Serrano M.J., Elorduy J., Zabaleta I., Istamboulie G., González-Fandos E., Bousquet-Melou A., Mata L., Aymard C., Da Silva J., Lacroix M., Martínez-Laorden A., García-Gonzalo D., Condón S., Abilleira E., Pagán R. (en prensa). Presencia de residuos antibióticos en carnes comercializadas en el área transfronteriza España-Francia: un enfoque novedoso en los métodos de vigilancia. ITEA-Información Técnica Económica Agraria. Vol. xx: 1-18. <https://doi.org/10.12706/itea.2024.001>



por el método dirigido UPLC-QTOF, generando la inhibición del test Explorer®. Así, aunque las técnicas cromatográficas detectan el compuesto marcador indicado por la legislación y son los métodos de elección para control oficial de antibióticos en alimentos, sus metabolitos pueden escapar al monitoreo, lo que sugiere que los test biológicos son más adecuados para proteger la salud de los consumidores.

Palabras clave: Carne, antibióticos, control de residuos antimicrobianos, test biológico de cribado, cromatografía QTOF.

Antimicrobial residues assessment over commercialized meat samples from the cross-border area Spain-France: a new approach for effective monitoring

Abstract

Although antimicrobials are valuable allies in animal production, their extended use has led to the emergence of antimicrobial resistance. Moreover, when withdrawal periods in food-producing animals are not observed, antimicrobial residues can access the food chain, causing direct toxicity, allergies, and/or intestinal microbiota dysbiosis in consumers. Given that Spain and France are the largest meat producers in the EU and are among the top consumers, our study's aim was to investigate the presence of antimicrobials in commercialized meat purchased in the Spain-France cross-border area (POCTEFA region). 5,357 meat samples were collected from different animal species and a variety of different retailer types in Spain (Zaragoza, Bilbao, and Logroño) as well as in France (Toulouse and Perpignan). Meat samples were analysed by a screening method (Explorer®+QuinoScan®), yielding 194 positive samples, which were further evaluated by UPLC-QTOF (Ultra Performance Liquid Chromatography-Quadrupole Time of Flight) for confirmation. Chromatographic analyses found antimicrobial residues in 30 samples, although only 5 of them (0.093 % of initial samples) were non-compliant according to the current legislation. Further studies suggested that this mismatch between screening and confirmatory analyses might be due to the presence of biologically active metabolites derived from antimicrobials unidentified by the targeted UPLC-QTOF method, causing inhibition of the biological Explorer® test. Although chromatographic techniques detect the marker compounds determined by legislation and are the methods selected for official control of antimicrobials in food, metabolites might escape their monitoring. This thus suggests that biological tests are the most adequate ones in terms of ideal consumer health protection.

Keywords: Meat, antibiotics, metabolites, antimicrobial residues control, biological screening test, QTOF chromatography.

Introducción

La situación sanitaria actual, marcada por la pandemia, ha evidenciado la importancia de una buena salud global bajo el enfoque "One Health". En este contexto, los antibióticos se dibujan como herramientas muy útiles en la salvaguarda de la salud humana y animal. Mientras que en 2014 un 70 % de los antibióticos se destinaban a animales de producción (Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades; ECDC *et al.*, 2017), los últimos datos publicados para Europa (ECDC, 2021) muestran que esta situa-

ción se ha revertido, siendo más alto en medicina humana. Aun así, su uso en ganadería tiene repercusión en la salud pública (Brown *et al.*, 2017; Diana *et al.*, 2020).

Por un lado, la ingesta de carne contaminada con residuos de antibióticos puede tener graves consecuencias para los consumidores, generando toxicidad directa, reacciones alérgicas y/o disbiosis de la microbiota intestinal, por no mencionar el incremento de resistencias a antibióticos (AMR) que se pueden acumular en nuestra microbiota intestinal (Wang *et al.*, 2016). Por otro lado, la libera-

ción al medio ambiente de los residuos antimicrobianos utilizados en las granjas puede contribuir al incremento del ya grave problema de AMR (Hamscher et al., 2005; Sarma et al., 2006; Zhou et al., 2020), tanto que la OMS (Organización Mundial de la Salud) ya la considera como uno de los 10 mayores retos a los que se enfrenta la humanidad en las próximas décadas (OMS, 2021).

A pesar de que un buen control de los tratamientos antimicrobianos implementados a nivel de granja es suficiente para evitar su aparición en la carne, la administración también lleva a cabo controles exhaustivos. La unión del buen hacer de ganaderos y veterinarios, apoyada en recomendaciones para un uso racional emitidas por organismos como la Agencia Europea del Medicamento (EMA, 2020), en unión con una legislación conservadora, han conseguido rebajar la notificación de muestras no-conformes hasta un 0,14 % en 2019 en Europa (EFSA, 2021). Sin embargo, no existen datos sobre las muestras que contienen residuos de antibióticos por debajo de los LMR (Límites Máximos de Residuos; Reglamento (UE) n° 37/2010).

Puesto que la región POCTEFA comprende territorios transfronterizos de España y Francia, países con la producción cárnica europea más alta (EUROSTAT, 2020), y entre los mayores consumidores europeos (Kanerva, 2013) e incluso a nivel mundial (FAOSTAT, 2021), el objetivo de este trabajo es evaluar la incidencia de residuos antimicrobianos en carne comercializada en la zona, procedente de 5 de las ciudades POCTEFA más pobladas, procedente de 12 especies animales y diferente tipología de detallista, y tipificar las tendencias de su aparición mediante un análisis secuencial (mediante método de cribado y confirmatorio; Reglamento (UE) 2017/625) análogo al propuesto en control oficial.

Material y métodos

Recogida de muestras comerciales

La región POCTEFA comprende territorios de la frontera entre España y Francia. Desde enero de 2020 hasta febrero de 2021, se recogieron 5.357 muestras de carne comercial de 5 ciudades de esta zona: Zaragoza, Logroño, Bilbao, Perpignan y Toulouse, de distinta tipología de comercio (grandes superficies, supermercados, comercio de proximidad, halal y carnicerías rurales). La cantidad de muestras recogida por especie se determinó en base a datos de consumo (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, MAPA, 2019; Agreste, 2020), disponibilidad y diversidad de marcas comerciales, especialmente alta en carne de vacuno. El número de muestras por especie y ciudad se recoge en la Tabla 1.

Todas las muestras se analizaron de acuerdo a la normativa vigente (Reglamento de Ejecución (UE) 2021/808): se llevó a cabo un análisis de cribado (Explorer® + QuinoScan®) seguido de un análisis cromatográfico por UHPLC-QTOF (Ultra High Performance Liquid Chromatography – Quadrupole Time of Flight) de las muestras sospechosas (positivas a dos análisis de cribado consecutivos) de acuerdo a lo descrito por Serrano et al. (2022). El test Explorer® es un test de base biológica para el cribado de un amplio espectro de antibióticos, y QuinoScan® detecta específicamente quinolonas, familia para la cual no es sensible Explorer®. El programa GraphPad Prism® (San Diego, California, USA) se utilizó para la representación de resultados y los análisis estadísticos por ANOVA. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $P \leq 0,05$.

Tabla 1. Número y porcentaje de muestras de cada especie recogido en cada ciudad.
 Table 1. Number and percentage of samples of each species collected on each city.

	Zaragoza		Bilbao		Logroño		Toulouse		Perpignan		TOTAL	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
Vacuno	299	25,9	233	24,2	334	26,7	355	34,5	210	21,9	1.431	26,7
Pollo	300	26,0	307	31,9	258	20,6	319	31,0	146	15,2	1.330	24,8
Cerdo	219	19,0	202	21,0	219	17,5	171	16,6	129	13,4	940	17,5
Pavo	109	9,4	112	11,6	103	8,2	77	7,5	152	15,8	553	10,3
Cordero	145	12,6	50	5,2	127	10,2	42	4,1	115	12,0	479	8,9
Conejo	83	7,2	59	6,1	109	8,7	14	1,4	52	5,4	317	5,9
Pato					31	2,5	48	4,7	94	9,8	173	3,2
Caballo					19	1,5	1	0,1	60	6,3	80	1,5
Codorniz					37	3,0					37	0,7
Cabra					11	0,9					11	0,2
Pintada							2	0,2	2	0,2	4	0,1
Perdiz					2	0,2					2	0,04
TOTAL	299	25,9	233	24,2	334	26,7	355	34,5	210	21,9	1.431	26,7

No: Número de muestras totales recogidas; %: Porcentaje de muestras de cada especie.

Estudios adicionales para detectar las causas de la divergencia entre los resultados del cribado y la confirmación cromatográfica

Por su parte, la cromatografía detecta las moléculas buscadas en una muestra en base a su composición química. Es por ello que se plantearon diversas hipótesis que pudieran explicar la presencia de estas moléculas que inhiben el test biológico Explorer® pero que no son detectables por la cromatografía dirigida.

a) La presencia de antimicrobianos no incluidos en la lista de detección de la cromatografía dirigida, como es el caso de los aminoglucósidos. Sin embargo, ésta no debería ser la causa principal de las diferencias entre los resultados de Explorer® y QTOF, ya que la administración de amino-

glucósidos en animales de producción a nivel europeo es, por ejemplo, 4 veces menor a la de las penicilinas y 5 menor que la de las tetraciclinas (EMA, 2021).

- b) La presencia en carne de antimicrobianos alternativos de origen natural del tipo de los aceites esenciales, cuyo uso está actualmente en auge.
- c) La presencia en carne de metabolitos biológicamente activos procedentes de la degradación de los antimicrobianos originales, que pasan desapercibidos para la cromatografía dirigida.

Para comprobar el papel que jugaron las dos últimas hipótesis en el gap detectado entre los resultados del test biológico y la cromatografía, se llevaron a cabo los experimentos adicionales que se detallan a continuación.

Evaluación de la actividad de aceites esenciales como compuestos responsables de resultados falsos positivos del test biológico

En las últimas décadas, las autoridades sanitarias, veterinarios y productores han centrado sus esfuerzos en racionalizar el uso de los antibióticos a nivel de granja. Es por ello que actualmente se añaden a piensos algunos compuestos naturales con actividad antibiótica, entre los que destacan los aceites esenciales, ya que mejoran la salud general de los animales, el rendimiento e incluso la calidad de la carne (Omonijo et al., 2018). Los aceites esenciales tienen una actividad antibacteriana ampliamente reconocida y estudiada y pueden tener incluso efectos positivos sobre el perfil de ácidos grasos de la carne (Smeti et al., 2018). De hecho, algunos estudios han revelado que los aceites esenciales pueden acumularse en músculo (de Haro, 2015), y algunos autores han descrito cómo afectan a la capacidad de germinación y crecimiento de bacterias esporuladas, específicamente, de *Geobacillus stearothermophilus* (Voundi et al., 2015), microorganismo esporulado en que está basado el test Explorer®. Así, la bioacumulación a nivel muscular de los aceites esenciales añadidos a los piensos podría ser responsable de su inhibición y, por tanto, de las altas tasas de muestras positivas a Explorer® que no se confirmaron por QTOF.

Con el objeto de evaluar esta hipótesis, se determinaron inicialmente las concentraciones mínimas inhibitorias (MICs) de los aceites esenciales o de sus componentes, usualmente utilizados en alimentación animal y que eventualmente podrían acumularse en músculo y ser responsables así de la inhibición del test. Puesto que son prácticamente inmiscibles en agua, se aplicó el método desarrollado por Friedman et al. (2002) para su adición a muestras de carne libre de antibióticos.

Presencia en carne de metabolitos biológicamente activos derivados de los antibióticos originales

En el caso de que estos metabolitos existiesen en las muestras de carne, éstos deberían proceder, obviamente, de la degradación de los compuestos originales. A pesar de que estos metabolitos podrían mantener su actividad biológica y ser responsables de la inhibición del crecimiento microbiano, dando así lugar a la alta tasa de positivos detectada por Explorer®, su estructura química sería diferente a la del compuesto original, pasando así inadvertidos para las técnicas cromatográficas empleadas en control oficial, dirigidas a la detección de compuestos marcador definidos por la legislación (Reglamento (UE) n° 37/2010 para sustancias autorizadas y Reglamento (UE) 2019/1871 para las no autorizadas). Para comprobar esta hipótesis, se estudiaron 26 muestras de carne congeladas procedentes del banco de muestras construido por Serrano et al. (2020), con concentraciones conocidas de antibióticos (determinadas por QTOF en 2018), envasadas a vacío y mantenidas en congelación a -20 °C desde entonces hasta su re-análisis por Explorer® y QTOF en 2021. Brevemente, el banco se construyó con muestras pareadas de músculo, sangre y otros fluidos procedentes de 93 cerdos. De ellos, 15 fueron sacrificados sin recibir tratamiento, considerándose animales blanco de referencia y 78 fueron administrados vía intramuscular con diferentes antibióticos (amoxicilina, oxitetraciclina, sulfametoxipiridazina, oxitetraciclina y enrofloxacina). Estos cerdos se sacrificaron a lo largo del periodo de supresión y las muestras obtenidas se caracterizaron por cromatografía, determinando la concentración de antibiótico presente, lo que permitió estudiar tanto su evolución en las distintas matrices como estudiar comparativamente su presencia en los diversos fluidos.

Presencia de metabolitos de β -lactámicos biológicamente activos en muestras de carne naturalmente contaminadas con amoxicilina

BTScan® (Zeulab, Zaragoza, España) es un test actualmente comercializado, basado en inmunocromatografía de flujo lateral que detecta la presencia de β -lactámicos y tetraciclinas en leche. Este test está optimizado para leche, por lo que para evaluar la presencia potencial de metabolitos activos de β -lactámicos en muestras de carne, se comprobó la dilución más adecuada de suero de carne en leche, que resultó ser de 20/80 v/v.

Detección de metabolitos de sulfamidas basada en inhibición competitiva de su actividad biológica

Las sulfamidas son antimicrobianos con actividad bacteriostática relacionada con la inhibición de la síntesis del ADN. Concretamente, son moléculas análogas al ácido paraminobenzóico (pABA), necesario para la síntesis de ácido fólico en bacterias. Los folatos son cruciales para la síntesis del ADN y el ARN en mamíferos y bacterias, pero mientras que los mamíferos pueden obtenerlo mediante su ingesta a través de la dieta, las bacterias tienen que sintetizarlo. El mecanismo de acción de las sulfamidas reside en la competición con el pABA por su unión a la enzima dihidropteorato sintasa y la consiguiente inhibición de la síntesis de folatos (Escribano Moriana et al., 2002).

Resultados y discusión

Cribado

Resultados de Explorer®

Las Tabla 2 muestra los resultados de los análisis por Explorer® de las 5.357 muestras de carne comercial, clasificados por especies y

ciudades. Globalmente, un 3,5 % de las muestras recogidas resultaron positivas (185 muestras). Los mayores porcentajes se describieron en aves (pato, pavo y pollo), mientras que los menores se describieron en vacuno ($P \leq 0,05$). Aunque la positividad observada en cabra y pintada destacó por valores altos, y la de codorniz y perdiz, por lo contrario, no se consideraron en la comparativa ya que el tamaño muestral no fue representativo ($n \leq 50$).

Resultados de QuinoScan®

Los resultados se muestran en la Tabla 3, clasificados por especies y ciudades. En total, el 0,2 % de las muestras resultaron positivas a la presencia de quinolonas.

Resultados del cribado

Los resultados finales del cribado están representados en la Tabla 4, organizados por especies y ciudades, y son resultado de sumar los resultados de Explorer® y QuinoScan®. En total, 194 muestras fueron positivas al cribado (2 de ellas a los dos métodos de cribado), lo que corresponde a un 3,6 % de las muestras recogidas.

Análisis cromatográficos de confirmación

Tras el cribado, los 194 positivos se analizaron por UPLC-QTOF (de aquí en adelante, QTOF), por el Laboratorio de Salud Pública del Gobierno Vasco (Derio, España), autorizado para el análisis de antibióticos en el marco del control oficial. Se confirmó que 30 de ellas (Tabla 5) contenían residuos (15,2 %), con la siguiente distribución: tetraciclinas (40,6 %), sulfamidas (37,5 %), quinolonas (18,8 %) y lincomicina (3,1 %). Sin embargo, sólo el 0,093 % del total de las muestras recogidas fue no conforme, es decir, contuvo residuos antibióticos por encima de los niveles que marca el Reglamento (UE) n° 37/2010 (Límites Máximos de Residuos, LMR), valor incluso mejor que los últimos datos publicados por la

Tabla 2. Número y porcentaje de muestras de cada especie positivas a Explorer® recogidas en cada ciudad (comparadas con el número total de muestras de cada especie recogidas en cada ciudad).

Table 2. Number and percentage of samples of each species positive to Explorer® collected on each city (compared to the total number of samples of each species collected on each city).

	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
Lamb	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

No.: Número de muestras positivas a Explorer®; %: Porcentaje de muestras positivas a Explorer®.

Tabla 3. Número y porcentaje de muestras de cada especie positivas a QuinoScan® recogidas en cada ciudad (comparadas con el número total de muestras de cada especie recogidas en cada ciudad).

Table 3. Number and percentage of samples of each species positive to QuinoScan® collected on each city (compared to the total number of samples of each species collected on each city).

	Zaragoza		Bilbao		Logroño		Toulouse		Perpignan		TOTAL	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
Vacuno	0	0	0	0	0	0,6	1	0,3	1	0,5	2	0,3
Pollo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0
Cerdo	0	0	0	0	0	0,9	1	0,6	0	0	1	0,3
Pavo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0
Lamb	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	2	0,5	2	0,2	5	0,5	11	0,2

No.: Número de muestras positivas a QuinoScan®; %: Porcentaje de muestras positivas a QuinoScan®.

Tabla 4. Número y porcentaje de muestras de cada especie positivas al cribado recogidas en cada ciudad (comparadas con el número total de muestras de cada especie recogidas en cada ciudad).

Table 4. Number and percentage of samples of each species positive to the screening collected on each city (compared to the total number of samples of each species collected on each city).

	Zaragoza		Bilbao		Logroño		Toulouse		Perpignan		TOTAL	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
Vacuno	7	2,3	3	1,3	4	1,8	6	1,7	1	0,5	21	1,5
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	1,8	12	7,0	0	0,0	36	3,8
Pavo	7	6,4	5	4,5	6	5,8	12	15,6	5	3,3	35	6,3
Lamb	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	35	2,8	61	5,9	16	1,8	194	3,6

No: Número de muestras positivas al cribado; %: Porcentaje de muestras positivas al cribado.

*Se ha eliminado una muestra de conejo de Bilbao y otra de Perpignan porque daban resultado positivo a ambos test.

Agencia Europea de Seguridad Alimentaria, que declararon un 0,14 % de muestras no conformes para 2019 (EFSA, 2021). A pesar de que estos datos apuntan a que la condición de la carne del área transfronteriza España-Francia es mejor que la de Europa, otras 5 muestras contuvieron concentraciones próximas a los LMR (56-96 µg/Kg), y otras 20, concentraciones muy bajas, si bien no se identificaron residuos de antibióticos en las 164 restantes.

No obstante, existe un amplio gap entre el 3,6 % de positivos al cribado y el ~0,1 % de positivos a la cromatografía. Como ambos test, Explorer® y QuinoScan®, están validados y ajustados a los LMR, no pueden ser responsables de la desviación.

Estudios adicionales para detectar las causas de la divergencia entre los resultados del cribado y la confirmación cromatográfica

Los positivos al test Explorer®, el cual detectó el mayor porcentaje de positivos del cribado, son reflejo de la presencia de metabolitos activos biológicamente, ya que estos son responsables de la inhibición del crecimiento del microorganismo en que se basa el test.

Antimicrobianos alternativos: aceites esenciales

De entre todos los antimicrobianos testados, el carvacrol, el orégano y el cinemaldehído inhibieron el crecimiento de *G. stearother-*

Tabla 5. Residuos de antibiótico identificados por cromatografía QTOF entre las muestras positivas al cribado (30 muestras en total).

Table 5. Antibiotic residues identified by QTOF chromatography between the samples positive to the screening (30 samples in total).

		Ciudad	Especies	Antibiótico	Concentración (µg/kg)	
No conformes		Logroño	Cordero	Enrofloxacina	218,8	
				Ciprofloxacina	34,34	
		Toulouse	Cabra	Sulfadiazina	164,3	
				Doxiciclina	813	
				Cerdo	Sulfadimetoxina	110
Perpignan	Conejo	Sulfadimetoxina	187			
Conformes	Cercanas al LMR	Zaragoza	Cordero	Sulfadiazina	81,89	
		Bilbao	Cordero	Sulfadoxine	96,4	
				Oxytetracyclina	21,7	
				Sulfadiazina	56,2	
		Toulouse	Cerdo	Enrofloxacina	88	
	Perpignan	Conejo	Sulfadimetoxina	80		
	Negativas	Zaragoza	Pollo	Doxiciclina	<LD*	
				Doxiciclina	25,46	
				Doxiciclina	<LD*	
			Cerdo	Doxiciclina	<LD*	
			Cerdo	Doxiciclina	9,24	
			Cordero	Sulfadiazina	12,4	
			Cordero	Sulfadiazina	14,68	
			Pavo	Doxiciclina	<LD*	
				Enrofloxacina	10,42	
			Pavo	Doxiciclina	<LD*	
			Conejo	Sulfadimetoxina	22,7	
			Conejo	Enrofloxacina	6,84	
			Bilbao	Pollo	Lincomicina	3,4
				Pavo	Doxiciclina	7,05
Conejo				Enrofloxacina	39,5	
Logroño	Pollo	Doxiciclina	27,71			
	Cordero	Enrofloxacina	9,7			
	Pavo	Doxiciclina	6,6			
Toulouse	Pollo	Sulfadimetoxina	12,5			
	Pollo	Doxiciclina	31,5			
	Pavo	Sulfadimetoxina	<LD*			

*LD: Límite de detección de la técnica cromatográfica.

mophilus, dando resultados positivos a Explorer®, tal y como se muestra en la Tabla 6. No obstante, hay que señalar que, para lograr resultados positivos, fue necesario añadir concentraciones $\geq 200 \mu\text{L/L}$, lo cual aportaría un olor y sabor tan intenso que resultaría desagradable. Como las muestras de este estudio no poseían un aroma especial y las con-

centraciones normalmente detectadas son del orden de $\mu\text{L/mL}$ (de Haro, 2015), lo que significa 1.000 veces menores a la concentración inhibitoria descrita en este estudio, la inhibición de Explorer® por aceites esenciales se descartó como responsable de la elevada positividad de Explorer® (en comparación con los resultados de la cromatografía QTOF).

Tabla 6. Resultados de Explorer® obtenidos del análisis de suero de carne libre de antibióticos contaminado con diferentes concentraciones de algunos de los aceites esenciales más comúnmente usados y con mayor actividad antimicrobiana. Cada experimento se llevó a cabo por triplicado, y la última columna incluye el resultado del control blanco.

Table 6. Explorer® results obtained from the analyses of meat serum free of antibiotic stained with different concentrations of some of the most commonly used and higher antimicrobial activity essential oils. Each experiment was performed in triplicate, and the last column shows the result of a blank control.

	1000 $\mu\text{L/L}$	600 $\mu\text{L/L}$	400 $\mu\text{L/L}$	200 $\mu\text{L/L}$	100 $\mu\text{L/L}$	Blanco
Carvacrol 1	+	+	+	-	-	-
Carvacrol 2	+	+	+	+	-	-
Carvacrol 3	+	+	+	-	-	-
Orégano 1	+	+	-	-	-	-
Orégano 2	+	+	+	+	-	-
Orégano 3	+	+	+	-	-	-
Cinimaldehído 1	+	-	-	-	-	-
Cinimaldehído 2	+	+	-	-	-	-
Cinimaldehído 3	+	+	-	-	-	-

+: El símbolo + se corresponde con resultados positivos a Explorer®.

-: El símbolo - se corresponde con resultados negativos a Explorer®.

Presencia de metabolitos biológicamente activos procedentes de la degradación de los antibióticos originalmente presentes en músculo

Aunque diferencias en la sensibilidad entre el método de cribado y el método confirmatorio podrían explicar desviaciones en los resultados de las 25 muestras en las que, aun siendo conformes, se detectaron residuos de

antibióticos, debían existir otras razones que explicaran las desviaciones en el resto de las muestras de carne (159 muestras en total, 5 menos que las 164 restantes, ya que hubo 5 muestras en las que sí se detectó el compuesto antibiótico aunque a concentraciones bajas, menores al límite de detección de la técnica). Es por ello que se planteó la necesidad de profundizar en la posible presencia de residuos antibióticos en muestras conformes,

incluso moléculas con propiedades antimicrobianas no incluidas en la lista de compuestos diana de los análisis cromatográficos QTOF, como los metabolitos de los compuestos originales con los que se trataron los animales.

1. Análisis confirmatorios de residuos antibióticos en muestras aleatorias negativas al cribado.

De entre las muestras de carne comercial negativas a Explorer®, se tomaron 138 (2,7 %) de forma aleatoria y se analizaron por QTOF

para comprobar la presencia de trazas de antibióticos entre las muestras negativas y corroborar el buen funcionamiento de los test, ya validados. Tal y como muestra la Tabla 7, 17 de las 138 muestras (12,3 %) contenían residuos de antibióticos siempre por debajo de los LMRs (no se encontraron falsos negativos, es decir, todas ellas eran conformes, lo que corrobora el buen funcionamiento del método de cribado). De nuevo, la familia más detectada fueron las tetraciclinas (63,2 % de las muestras con residuos), seguida por

Tabla 7. Residuos de antibiótico identificados por cromatografía QTOF entre 138 muestras negativas al cribado.

Table 7. Antibiotic residues identified by QTOF chromatography between 138 samples negative to the screening.

Ciudad	Especie	Antimicrobiano	Concentración (µk/kg)	
Bilbao	Conejo	Enrofloxacina	<LD*	
		Oxitetraciclina	<LD*	
	Cerdo	Lincomicina	14	
		Pavo	Doxiciclina	<LD*
			Doxiciclina	21
	Cordero	Doxiciclina	13	
		Sulfadiazina	16,2	
Zaragoza	Conejo	Oxitetraciclina	20,9	
		Oxitetraciclina	11	
		Doxiciclina	33,5	
		Oxitetraciclina	9,8	
	Pollo	Norfloxacina	7,3	
	Cerdo	Doxiciclina	11,5	
		Flumequina	31,6	
		Dicloxacilina	10,9	
		Lincomicina	7,8	
	Pavo	Doxiciclina	8,27	
	Cordero	Doxiciclina	<LD*	

* LD. Límite de detección de la técnica cromatográfica.

las quinolonas (15,8 %), lincomicina (10,5 %) y sulfamidas y β -lactámicos (5,3 % para cada una de ellas).

La diferencia entre el porcentaje de muestras positivas al cribado que contenía residuos de antibióticos identificados por QTOF (15,5 %) y el porcentaje de muestras negativas al cribado que contenían estos residuos analizadas por el mismo método (12,3 %), fue del 3,2 %. Este valor es muy próximo al porcentaje de muestras positivas al cribado, excluyendo aquellas que fueron no-conformes (5 muestras) y aquellas conformes próximas al LMR (5 muestras), que resulta en un 2,4 % (184 de 5.357). Estas muestras adicionales, positivas a Explorer® y con trazas de antibióticos, podrían contener metabolitos biológicamente activos derivados del compuesto original. Así, tanto los antibióticos originales

como sus metabolitos, que pasarían inadvertidos para la cromatografía dirigida, serían responsables de la inhibición de Explorer®, dando lugar a muestras de carne comercial positivas al cribado que no son detectadas por cromatografía. No obstante, aunque estos resultados apoyan la hipótesis de la presencia de metabolitos biológicamente activos, fue necesario llevar a cabo experimentos adicionales para demostrar su presencia.

2. Presencia en carne de metabolitos biológicamente activos derivados de los antibióticos originales.

Los análisis cromatográficos detectaron degradación de los antibióticos ($P \leq 0,05$) en 14 muestras congeladas en magnitud diferente en función del compuesto (Figura 1). Mientras que la oxitetraciclina no mostró de-

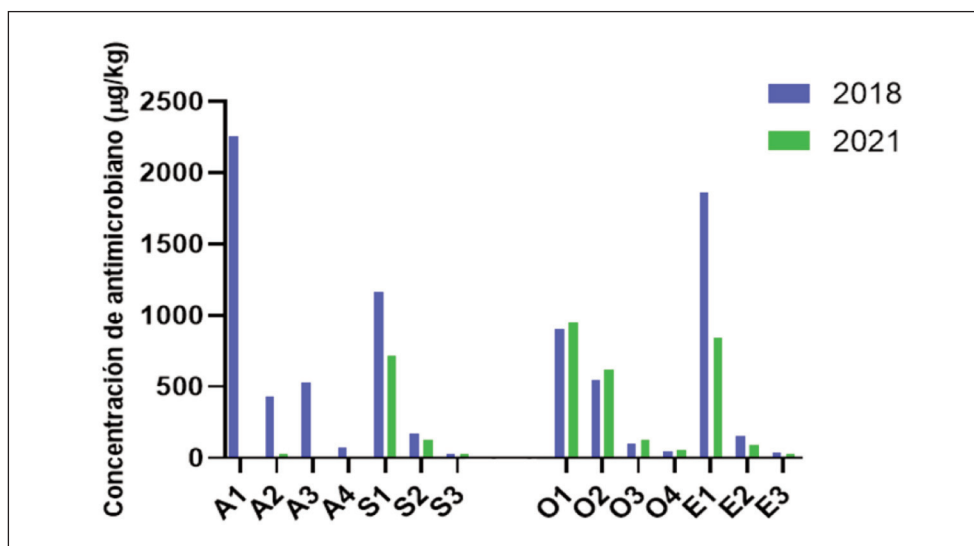


Figura 1. Concentraciones de antimicrobianas detectadas por cromatografía HPLC-FLD en 2018 (■) y QTOF en 2021 (■) en muestras de carne del banco de muestras contaminadas de forma natural con amoxicilina (A1, A2, A3, A4), sulfametoxipiridazina (S1, S2, S3), oxitetraciclina (O1, O2, O3, O4) y enrofloxacina (E1, E2, E3).

Figure 1. Antimicrobial concentrations detected by HPLC-FLD chromatography in 2018 (■) and QTOF in 2021 (■) in meat samples coming from the sample bank, naturally tainted with amoxicillin (A1, A2, A3, A4), sulfamethoxy-pyridazine (S1, S2, S3), oxytetracycline (O1, O2, O3, O4) and enrofloxacin (E1, E2, E3).

gradación, la amoxicilina se degradó de forma completa. La enrofloxacin (26-55 % de degradación) y la sulfametoxipiridazina (5-39 %) mostraron un comportamiento intermedio. La degradación de antibióticos tras el almacenamiento en congelación ya ha sido descrita previamente (Shaltout et al., 2019).

De acuerdo a los análisis cromatográficos, algunas de las muestras de amoxicilina y sulfametoxipiridazina (A1, A3, A4 y S3; Figura 1), experimentaron una degradación a niveles menores al LD de la técnica cromatográfica, pero seguían siendo positivas a Explorer®, lo que apuntaba a la presencia de actividad antibacteriana derivada de los compuestos de degradación de los antibióticos originales, que pasarían desapercibidos para la técnica cromatográfica empleada. Para confirmarlo, se llevaron a cabo los experimentos que se detallan a continuación.

2.1. Presencia de metabolitos de β -lactámicos biológicamente activos en muestras de carne naturalmente contaminadas con amoxicilina: detección basada en reconocimiento bioquímico estructural.

Para evaluar la presencia potencial de metabolitos activos de β -lactámicos en muestras de carne, se tomaron 4 muestras de carne procedentes del banco de muestras construido en 2018 por Serrano et al. (2020), caracterizadas por cromatografía HPLC-FLD en 2018, y se reanalizaron en 2021 con el test BTScan®. La Tabla 8 muestra cómo, a pesar de que el antibiótico se degradaba por completo tras 3 años de almacenamiento, seguían siendo capaces de inhibir el crecimiento del microorganismo diana del test Explorer®, no sólo en 2018, cuando se detectaban elevadas concentraciones, sino también en 2021, a concentraciones bajas incluso menores al LD del

Tabla 8. Análisis cromatográficos (HPLC-FLD) y resultados de Explorer® de 4 muestras de carne contaminadas con amoxicilina, obtenidos tras el análisis de estas muestras en 2018 y 2021, momento en el cual también se analizaron por BTScan®. Los valores numéricos están expresados en $\mu\text{g}/\text{kg}$, los resultados positivos con el símbolo +, y los resultados próximos al positivo, con el símbolo \pm .

Table 8. Chromatographic analyses (HPLC-FLD) and Explorer® results of 4 meat samples tainted with amoxicillin, obtained after the analysis of these samples in 2018 and 2021, when they were also analyzed by BTScan®. Numeric values are expressed in $\mu\text{g}/\text{kg}$, positive results with the symbol +, and those results close to positive, with the symbol \pm .

	HPLC-FLD		Explorer®		BTScan® 1/5*
	2018	2021	2018	2021	2021
A1	2254	<LD**	+	+	+
A2	429	29	+	+	+
A3	532	<LD**	+	+	\pm
A4	72	<LD**	+	+	\pm

* Puesto que la técnica está optimizada para el análisis de β -lactámicos en leche, para evitar el efecto matriz, se llevó a cabo una dilución 20/80 v/v de suero de carne en leche. Las muestras con resultados \pm se corresponden con muestras cuyos resultados encajan con la presencia de β -lactámicos, teniendo en cuenta el factor dilución 1/5.

* LD. Límite de detección de la técnica cromatográfica.

QTOF, mientras que el análisis en tándem de estas muestras con BTScan® demostró la presencia de metabolitos de β -lactámicos en todas las muestras analizadas. Es necesario mencionar que el LD del test bioquímico está en torno a 15 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, ligeramente por encima al LD del QTOF (datos no mostrados), apuntando así hacia un correcto reconocimiento no sólo de la molécula parental sino de sus derivados que mantienen propiedades biológicas (detectadas por Explorer®) y estructurales (detectadas por BTScan®).

Estos hallazgos revelan la presencia de metabolitos biológicamente activos de amoxicilina en muestras de músculo, procedentes de su degradación durante el almacenamiento en congelación, y que podrían ser responsables de resultados positivos en tests de cribado de base biológica como Explorer®, incluso pasando desapercibidos para técnicas cromatográficas empleadas rutinariamente en control oficial, ya que están dirigidas a la detección específica de compuestos diana indicados por la legislación.

2.2. Detección de metabolitos de sulfamidas basada en inhibición competitiva de su actividad biológica.

Para comprobar la presencia de metabolitos de sulfamidas, se tomaron 8 muestras de carne procedentes del banco de muestras (Serrano et al., 2020), contaminadas con sulfamidas a concentraciones menores al LMR, y se analizaron con Explorer® antes y después de la adición de 50 g/mL de pABA (FIL/IDF, 1991; Sanz et al., 2015). Hay que puntualizar que el test Explorer® ha sido validado para la detección de sulfamidas (Mata et al., 2014) y que los LDs son próximos a los LMRs establecidos por la legislación, oscilando entre 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$. La Figura 2a ilustra la positividad de las muestras antes de la adición de pABA (valores de Explorer® acoplado a e-Reader® por encima del *cut-off* o valor del método por encima del cual una muestra se considera positiva) y cómo el efecto inhibitorio des-

apareció tras la adición de pABA ($P \leq 0,05$), lo que es muestra de la competición de este compuesto con metabolitos biológicamente activos presentes en carne, presumiblemente procedentes de la degradación de la sulfamida original con la que se trataron a los animales que no se detectaron por la técnica cromatográfica dirigida.

Se demostró la presencia de metabolitos biológicamente activos de sulfamidas en muestras de músculo conservadas en congelación durante 3 años, procedentes de animales tratados con sulfamidas. Además, se re-analizaron 18 muestras de carne comercial recogidas en el presente estudio, positivas a Explorer® pero negativas de acuerdo a los análisis cromatográficos por QTOF, tras 4 y 8 meses mantenidas en congelación tras la compra. Después de 4 meses, únicamente 7 muestras siguieron siendo positivas al test biológico, mientras que solamente 4 siguieron siendo positivas tras 8 meses (S12-S14, Figura 2b). Con el objetivo de evidenciar la presencia de metabolitos en estas tres muestras, se añadió pABA, y se constató que su adición revertía el efecto inhibitorio ($P \leq 0,05$) en 3 de las 4 muestras (S13 y S14), hecho que apunta a la presencia de metabolitos biológicamente activos de sulfamidas. La fiabilidad del pABA para revertir la inhibición de las sulfamidas sobre el test Explorer® se comprobó con la muestra S15, una muestra de carne comercial que, caracterizada por QTOF, contenía 82 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de sulfadiazina en el momento de su recogida, y positiva a Explorer® incluso tras 8 meses de almacenamiento en congelación, ya que la Figura 2 muestra la pérdida de la capacidad inhibitoria de la sulfamida tras la adición de pABA. Este hecho refuerza la hipótesis de la presencia en carne de metabolitos biológicamente activos procedentes de la degradación de sulfamidas como responsables de la inhibición del test Explorer® y, por ende, potenciales causantes de positivos no detectados por cromatografía dirigida.

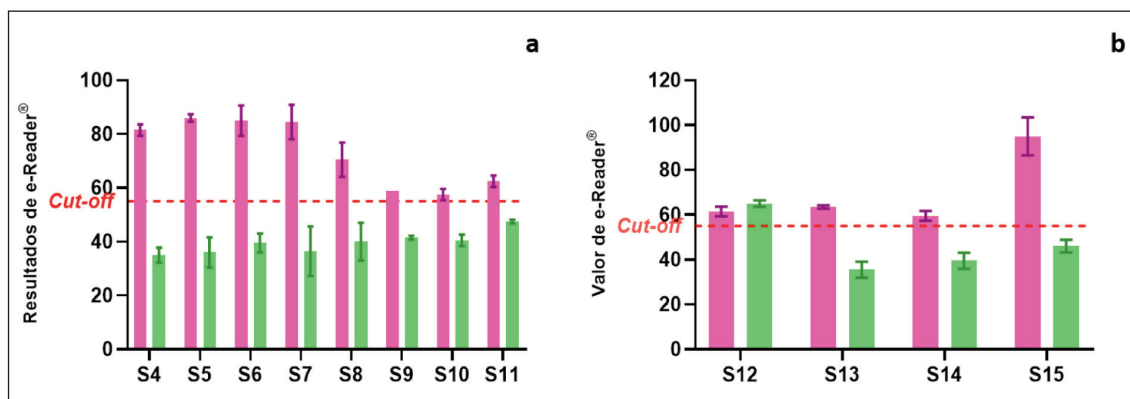


Figura 2. 2a. Resultados de Explorer® acoplado a e-Reader® tras el análisis de 8 muestras de carne de animales tratados con sulfametoxipiridazina procedentes del banco de muestras antes (■) y después (■) de la adición de pABA. La línea discontinua roja representa el *cut-off* del test Explorer® por encima del cual los resultados se consideran positivos. 2b. Resultados de Explorer® acoplado a e-Reader® tras el análisis de 4 muestras de carne comercial recogidas en este estudio antes (■) y después (■) de la adición de pABA. La línea discontinua roja representa el *cut-off* del test Explorer® por encima del cual los resultados se consideran positivos.

Figure 2. 2a. Explorer® coupled to e-Reader® results obtained after the analysis of 8 meat samples obtained from animals treated with sulfamethoxy pyridazine coming from the sample bank, before (■) and after (■) the addition of pABA. The red dotted line corresponds to the cut-off value of Explorer® test, over which results are considered positive. 2b. Explorer® coupled to e-Reader® results obtained after the analysis of 4 commercial meat samples collected in this study before (■) and after (■) the addition of pABA. The red dotted line corresponds to the cut-off value of Explorer® test, over which results are considered positive.

Estos hallazgos probaron la presencia en carne de metabolitos biológicamente activos procedentes de los antibióticos originales. Así pues, a pesar de que los análisis cromatográficos ofrecen la ventaja de la caracterización de las muestras en cuanto a la identificación y cuantificación del antibiótico presente en una muestra, su análisis no detecta la presencia de estos metabolitos debido a su carácter dirigido. Es por esto que los test biológicos de cribado ofrecen ciertos beneficios, puesto que son medida directa de la actividad biológica tanto de antibióticos como de sus metabolitos.

Conclusiones

El análisis secuencial (cribado + confirmación) de 5.357 muestras de carne comercializada

del área transfronteriza España-Francia mostró un 3,6 % de muestras positivas al cribado mientras que los análisis cromatográficos dirigidos (QTOF) mostraron no conformidad en el 0,093 %, datos similares a los publicados por la EFSA para 2019. Las familias más detectadas fueron tetraciclinas, sulfamidas, quinolonas, lincomicina y β -lactámicos. Para explicar las diferencias entre el 3,6 % de positivos al cribado y el 0,093 % de no conformes detectadas por cromatografía, se llevaron a cabo experimentos adicionales que demostraron que estas muestras de carne, aun siendo conformes, contienen metabolitos biológicamente activos procedentes de la degradación del compuesto original, que detecta el test biológico Explorer® pero no la cromatografía dirigida, empleada en este estudio y utilizada en control oficial. Por consiguiente,

la elección del test para control de residuos antibióticos dependerá del objetivo del análisis. Cuando los requerimientos legales son prioridad, serán los análisis cromatográficos dirigidos a la detección de los compuestos marcador (Reglamento (UE) n° 37/2010) los de elección. Sin embargo, los metabolitos derivados de éstos escapan a su vigilancia, por lo que, si se busca ofrecer protección extra a los consumidores, los test biológicos de cribado de tipo biológico serán los de elección.

Agradecimientos

El proyecto ha sido cofinanciado al 65 % por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) a través del Interreg V-A España, Francia, Andorra (POCTEFA 2014-2020). El objetivo de POCTEFA es reforzar la integración económica y social de la zona fronteriza España-Francia-Andorra. Su ayuda se concentra en el desarrollo de actividades económicas, sociales y medioambientales transfronterizas a través de estrategias conjuntas a favor del desarrollo territorial sostenible.

Referencias bibliográficas

- Agreste (2020). La consommation de viande en France en 2019. Agreste, la statistique, l'évaluation et la prospective agricole. Synthèses conjoncturelles 39. Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation. 9 pp.
- Brown K., Uwiera R.R., Kalmokoff M.L., Brooks S.P., Inglis G.D. (2017). Antimicrobial growth promoter use in livestock: a requirement to understand their modes of action to develop effective alternatives. *International Journal of Antimicrobial Agents* 49(1): 12-24. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.08.006>.
- De Haro M.P. (2015). Efecto de los aceites esenciales de plantas aromático-medicinales en la fase de transición de animales monogástricos. Tesis doctoral. Universidad de Murcia.
- Diana A., Santinello M., Penasa M., Scali F., Magni E., Alborali G.L., Bertocchi L., De Marchi M. (2020). Use of antimicrobials in beef cattle: an observational study in the north of Italy. *Preventive Veterinary Medicine* 81: 105032. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.105032>.
- ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), EFSA (European Food Safety Authority), EMA (European Medicines Agency) (2017). ECDC/EFSA/EMA Second Joint Report on the Integrated Analysis of the Consumption of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Bacteria from Humans and Food-Producing Animals. Joint Interagency Antimicrobial Consumption and Resistance. Analysis (JIACRA) Report. *EFSA Journal* 15: e04872. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4872>
- ECDC, EFSA, EMA (2021). Third joint inter agency report on integrated analysis of consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food producing animals in the EU/EEA: JIACRA III 2016 2018. *EFSA Journal* 19(6): e06712. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6712>
- EFSA (European Food Safety Authority) (2021). Report for 2019 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal products. *EFSA Supporting Publications* 18: 1997E. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2021.EN-1997>
- EMA (European Medicines Agency) (2020). Categorisation of antibiotics for use in animals for prudent and responsible use. Disponible en: https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/infographic-categorisation-antibiotics-use-animals-prudent-and-responsible-use_en.pdf (Consultado: el 27 de abril de 2021)
- EMA (2021). Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2019 and 2020. Trends from 2010 to 2020 – Eleventh ESVAC report, Publications Office of the European Union. 130 pp. <https://doi.org/10.2809/636389>
- Escribano Moriana J.C., Soto Cárdenas M.J., Tinoco Racero I. (2002). Sulfamidas. Cotrimoxazol. Quinolonas. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado* 8: 3887-3896. [https://doi.org/10.1016/S0304-5412\(02\)70720-8](https://doi.org/10.1016/S0304-5412(02)70720-8).

- EUROSTAT (2020). *Statistics Explained. Agricultural production – livestock and meat*. Disponible en: https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Agricultural_production_-_livestock_and_meat&oldid=427096#Meat_production (Consultado: 28 de octubre de 2021)
- FAO (2021). *Food and Agriculture Organization of the United Nations. Food Supply – Livestock and Fish Primary Equivalent*. Disponible en: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/CL> (Consultado: 29 de junio de 2021)
- FIL/IDF (International Dairy Federation) (1991). *Detection and confirmation of inhibitors in milk and milk products*. IDF Bulletin 258. Bruselas, Bélgica. 99 pp.
- Friedman M., Henika P.R., Mandrell R.E. (2002). Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *Journal of Food Protection* 65(10): 1545-1560. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-65.10.1545>.
- Hamscher G., Pawelzick H.T., Höper H., Nau H. (2005). Different behavior of tetracyclines and sulfonamides in sandy soils after repeated fertilization with liquid manure. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24(4): 861-868. <https://doi.org/10.1897/04-182R.1>.
- Kanerva M. (2013). *Meat consumption in Europe: Issues, trends and debates*. Artec-paper 187. Universität Bremen, Bremen, Alemania. 58 pp.
- MAPA (2019). *Informe del consume de alimentación en España 2019*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. 674 pp. Disponible en: https://www.mapa.gob.es/en/alimentacion/temas/consumo-tendencias/informe2019_v2_tcm38-540250.pdf (Consultado: 10 de octubre de 2021)
- Mata L., Sanz D., Razquin P. (2014). Validation of the Explorer® 2.0 test coupled to e-Reader® for the screening of antimicrobials in muscle from different animal species. *Food Additives & Contaminants: Part A* 31(9): 1496-1505. <https://doi.org/10.1080/19440049.2014.934303>.
- Omonijo F.A., Ni L., Gong J., Wang Q., Lahaye L., Yang C. (2018). Essential oils as alternatives to antibiotics in swine production. *Animal Nutrition* 4(2): 126-136. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.09.001>.
- OMS (Organización Mundial de la Salud) (2021). *Antimicrobial resistance*. Disponible en: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance> (Consultado: 20 de noviembre de 2021).
- Reglamento (UE) 2017/625 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 15 de marzo de 2017, relativo a los controles y otras actividades oficiales realizados para garantizar la aplicación de la legislación sobre alimentos y piensos, y de las normas sobre salud y bienestar de los animales, sanidad vegetal y productos fitosanitarios, y por el que se modifican los Reglamentos (CE) n° 999/2001, (CE) n° 396/2005, (CE) n° 1069/2009, (CE) n° 1107/2009, (UE) n° 1151/2012, (UE) n° 652/2014, (UE) 2016/429 y (UE) 2016/2031 del Parlamento Europeo y del Consejo, los Reglamentos (CE) n° 1/2005 y (CE) n° 1099/2009 del Consejo, y las Directivas 98/58/CE, 1999/74/CE, 2007/43/CE, 2008/119/CE y 2008/120/CE del Consejo, y por el que se derogan los Reglamentos (CE) n° 854/2004 y (CE) n° 882/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, las Directivas 89/608/CEE, 89/662/CEE, 90/425/CEE, 91/496/CEE, 96/23/CE, 96/93/CE y 97/78/CE del Consejo y la Decisión 92/438/CEE del Consejo (Reglamento sobre controles oficiales). *Diario Oficial de la Unión Europea*, núm. 95, de 7 de abril de 2017, pp. 1-142.
- Reglamento (UE) n° 37/2010 de la Comisión de 22 de diciembre de 2009 relativo a las sustancias farmacológicamente activas y su clasificación por lo que se refiere a los límites máximos de residuos en los productos alimenticios de origen animal. *Diario Oficial de la Unión Europea*, núm. 15, de 20 de enero de 2010, pp. 1-72.
- Reglamento (UE) 2019/1871 de la Comisión de 7 de noviembre de 2019 relativo a los valores de referencia para las sustancias farmacológicamente activas no autorizadas presentes en los alimentos de origen animal y por el que se deroga la Decisión 2005/34/CE. *Diario Oficial de la Unión Europea*, núm. 289, de 8 de noviembre de 2019, pp. 41-46.

- Reglamento de Ejecución (UE) 2021/808 de la Comisión, de 22 de marzo de 2021, relativo al funcionamiento de los métodos analíticos para los residuos de sustancias farmacológicamente activas utilizadas en animales productores de alimentos y a la interpretación de resultados, así como a los métodos que deben utilizarse para el muestreo, y por el que se derogan las Decisiones 2002/657/CE y 98/179/CE. Diario Oficial de la Unión Europea, núm. 180, de 21 de mayo de 2021, pp. 84-109.
- Sanz D., Razquin P., Condón S., Juan T., Herráiz B., Mata L. (2015) Incidence of antimicrobial residues in meat using a broad spectrum screening strategy. *European Journal of Nutrition and Food Safety* 5: 156-165. <https://doi.org/10.9734/EJNFS/2015/13795>.
- Sarmah A.K., Meyer M.T., Boxall A.B. (2006). A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere* 65(5): 725-759. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.03.026>.
- Serrano M.J., Mitjana O., Bonastre C., Laborda A., Falceto M.V., García-Gonzalo D., Abilleira E., Elorduy J., Bousquet-Melou A., Mata L., Cordón S., Pagán R. (2020). Is blood a good indicator for detecting antimicrobials in meat? Evidence for the development of in vivo surveillance methods. *Antibiotics* 9(4): 175. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9040175>.
- Serrano M.J., Elorduy J., Zabaleta I., Istamboulie G., González-Fandos E., Bousquet-Mélou A., Mata L., Aymard C., Martínez-Laorden A., Da Silva-Guedes J., Lacroix M., García-Gonzalo D., Condón S., Abilleira E., Pagán, R. (2022). Antimicrobial residue assessment in 5,357 commercialized meat samples from the Spain-France cross-border area: A new approach for effective monitoring. *Food Control* 138: 109033. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109033>.
- Shaltout F.A.E., Shatter M.A.E., Sayed N.F. (2019). Impacts of different types of cooking and freezing on antibiotic residues in chicken meat. *Journal of Food Science and Nutrition* 5: 045. <http://dx.doi.org/10.24966/FSN-1076/100045>.
- Smeti S., Hajji H., Mekki I., Mahouachi M., Atti, N. (2018). Effects of dose and administration form of rosemary essential oils on meat quality and fatty acid profile of lamb. *Small Ruminant Research* 158: 62-68. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2017.10.007>.
- Voundi S.O., Nyegue M., Lazar I., Raducanu D., Ndoye F.F., Stamate M., Etoa, F.X. (2015). Effect of essential oils on germination and growth of some pathogenic and spoilage spore-forming bacteria. *Foodborne Pathogens and Disease* 12(6): 551-559. <https://doi.org/10.1089/fpd.2014.1892>.
- Wang S., Zeng X., Yang Q., Qiao S. (2016). Antimicrobial peptides as potential alternatives to antibiotics in food animal industry. *International Journal of Molecular Sciences* 17(5): 603. <https://doi.org/10.3390/ijms17050603>.
- Zhou X., Wang J., Lu C., Liao Q., Gudda F.O., Ling W. (2020). Antibiotics in animal manure and manure-based fertilizers: Occurrence and ecological risk assessment. *Chemosphere* 255: 127006. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127006>.

(Aceptado para publicación el 16 de enero de 2024)