

Deteccción de cloranfenicol en camarones (*Penaeus* sp.) mediante la prueba de ELISA

Víctor Alonso Urbina González *, Antonio Joel Ruiz Uribe *, Andrew Charles Snyderlaar Hardwicke *, Abundio González González *, Jesús Genaro Sánchez Martínez *, Gabriel Aguirre-Guzmán *

Resumen

Deteccción de cloranfenicol en camarones (*Penaeus* sp.) mediante la prueba de ELISA. Los antibióticos son usados como tratamiento en contra de las enfermedades bacterianas presentes en cultivos de camarón, siendo estos productos un riesgo para el medio ambiente y el hombre. Este trabajo evaluó la factibilidad de usar la hemolinfa como muestra base para la detección de cloranfenicol mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Camarones juveniles (*Penaeus* sp.) de 5 a 7.5 cm (3-4 g) nativos de la laguna La Pesca, Tamaulipas, México, fueron transportados y aclimatados a condiciones de laboratorio en agua marina con aereación, durante al menos dos días. Cien camarones fueron expuestos por 2 h a 35 mg l⁻¹ de cloranfenicol mediante baño de inmersión y transferidos hacia agua marina limpia. Muestras de músculo y hemolinfa fueron recolectadas en grupos compuestos de cinco camarones

Abstract

D e t e c t i o n o f chloramphenicol in shrimps (*Penaeus* sp.) by means of ELISA test. Antibiotics are used as treatment to bacteria diseases in shrimp culture; however, these products show an environmental effect and are deemed as a possible cause of human problems. This work evaluates the possibility to use haemolymph for chloramphenicol detection by Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Juvenile shrimp (*Penaeus* sp.) of 5-7.5 cm (3-4 g) from La Pesca Lagoon, Tamaulipas, Mexico, were transported and acclimated to laboratory conditions on aerated seawater, for at least two days. One hundred organisms were exposed for 2 h to 35 mg l⁻¹ of chloramphenicol by dip bath and then transferred to clean seawater. After exposure, batches of five shrimps were sampled at 1, 24, and 48 h of exposure (n= 8, 8, 4, respectively) for muscle and haemolymph collection. Control shrimp (five specimens) were treated as above except that

Résumé

D é t e c t i o n d e chloramphénicol dans des crevettes (*Penaeus* sp.) par test ELISA. Les antibiotiques, utilisés comme traitement des maladies bactériennes présentes dans les cultures de crevettes, représentent un danger pour l'environnement et pour l'homme. Ce travail évalue la faisabilité d'utiliser l'hémolymph comme échantillon de base pour la détection de chloramphénicol par essai immunoabsorbant lié à enzymes (ELISA). Des crevettes juvéniles (*Penaeus* sp.) de 5 à 7,5 cm (3-4 g) natives de la lagune de La Pesca, Tamaulipas, Mexique, ont été transportées et acclimatées aux conditions de laboratoire en eau marine aérée, pendant au moins deux jours. Cent crevettes ont été exposées durant 2 h à des concentrations de chloramphénicol de 35 mg l⁻¹ par bain d'immersion et transférées vers de l'eau marine propre. Des échantillons de muscle et d'hémolymph ont été prélevés de groupes de cinq crevettes

* Universidad Autónoma de Tamaulipas, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, km 5 carretera Victoria-Mante, Ciudad Victoria, Tamaulipas, 87000, México. Tel. (834) 312-5078, Fax (834) 312-9531.
Correo electrónicos: v_urbina01@hotmail.com, ajruiz@uat.edu.mx, asnydela@uat.edu.mx, aglez@uat.edu.mx, jgsanchez@uat.edu.mx, gabaguirre@uat.edu.mx

cada uno, después de 1, 24 y 48 h de exposición ($n= 8, 8$ y 4 , respectivamente). Cinco camarones sin exposición a cloranfenicol fueron usados como control. Los valores de cloranfenicol en el músculo fueron de 18.56 a 19.76 ppb y de 12.07 a 19.76 ppb en la hemolinfa. El ANDEVA como la *t* de Student mostraron un valor inferior ($p<0.05$) en el nivel de cloranfenicol en la hemolinfa recolectada a las 24 h de exposición, con respecto al músculo; esto pudo deberse a un efecto de dilución causado por una mayor recolecta de hemolinfa entre el seno venoso y cardiaco. Sin embargo, tanto la prueba de *t* de Student como el ANDEVA no mostraron una diferencia significativa ($p<0.05$) entre las muestras recolectadas a 1 y 48 h de exposición en ambos tejidos. Esto sugiere que la hemolinfa puede ser usada para la detección in vivo de cloranfenicol, siendo una alternativa de muestreo no terminal que permite la evaluación periódica de un mismo conjunto de organismos.

Palabras clave: Antibióticos, hemolinfa, músculo, Tamaulipas, toxicología.

La acuicultura usa productos químicos y antibióticos capaces de combatir a los diferentes agentes patógenos presentes en los sistemas acuícolas. Sin embargo, algunos de estos productos pueden llegar a generar resistencia bacteriana, bioacumulación, o tener efectos negativos en el ambiente y en el

antibiotic was not added. Chloramphenicol values in muscle ranged from 18.56 to 19.76 ppb, while in haemolymph they were of 12.07 to 19.76 ppb. ANOVA and Student's *t*-test show a lower value ($p<0.05$) in the chloramphenicol level on haemolymph at 24 h of exposition, with respect to the muscle tissue; which may be represent a dilution effect originate by a high collection of haemolymph between venous and cardiac sinus. However, no significant differences ($p<0.05$) were detected by ANOVA and Student's *t*-test at 1 and 48 h of exposition for both tissues. This suggests that haemolymph may be used in vivo toxicology studies and as an alternative non-terminal sample tool.

Key words: Antibiotic, haemolymph, muscle, Tamaulipas, toxicology.

hombre (Scott 1993, Vargas *et al.* 1996, Roch 1999, Kautsky *et al.* 2000, Shojaee & Lees 2000). El cloranfenicol es un antibiótico muy estable que fue aislado de la bacteria *Streptomyces venezuelae* (Jawetz 1996, Sumano & Ocampo 1997, Shojaee & Lees 2000, Treves 2000, Amornchai 2002), y puede causar en el hombre

chacuns, après 1, 24 et 48 h d'exposition ($n= 8, 8$ et 4 , respectivement). Cinq crevettes sans exposition au chloramphénicol ont été utilisées comme témoins. Les teneurs de chloramphénicol obtenues sont de 18,56 à 19,76 ppb dans le muscle, et de 12,07 à 19,76 ppb dans l'hémolymph. L'ANOVA comme le test *t* de Student montrent, après 24 h d'exposition, une valeur inférieure ($p<0.05$) du niveau de chloramphénicol dans l'hémolymph par rapport au muscle; ceci peut être dû à un défaut de dilution causé par une majeure collecte d'hémolymph en milieux veineux et cardiaques. Néanmoins, le test de Student comme l'ANOVA ne montrent pas une différence significative ($p<0.05$) entre les échantillons collectés après 1 et 48 h d'exposition dans les deux tissus. Ceci suggère que l'hémolymph peut être utilisée pour la détection in vivo de chloramphénicol, comme alternative non terminale d'échantillonnage qui permettrait l'évaluation périodique d'un même groupe d'organismes.

Mots clefs: Antibiotiques, hémolymph, muscle, Tamaulipas, toxicologie.

vómito, náusea, diarrea, daño hepático y problemas en la maduración eritrocitaria cuando es ingerido y detectado en sangre a dosis de 25 a 30 $\mu\text{g ml}^{-1}$ durante una o dos semanas (Jawetz 1996). Este producto ha sido utilizado indebidamente por algunos productores de camarón, motivo por el cual la Unión Europea llevó a cabo el cierre de sus fronteras al camarón proveniente de Vietnam y China, ya que se detectaron residuos de cloranfenicol en este organismo (Anónimo 2001, 2002a). Debido a esta situación, el gobierno mexicano restableció la norma NOM-EM-05-PESC-2002 (Anónimo 2002b) la cual señala los requisitos y medidas para prevenir y controlar el uso y aplicación de antibióticos en la camaronicultura, con el fin de evitar el uso del cloranfenicol por algunos productores poco escrupulosos.

Las pruebas disponibles actualmente en el mercado, para la detección de cloranfenicol, están basadas en el uso de músculo del organismo, siendo por tal motivo una prueba del tipo terminal que afecta a los camaronicultores cuando no desean estos sacrificar a sus organismos (reproductores). El objetivo del presente trabajo fue determinar si es factible utilizar la hemolinfa, en lugar del músculo, en una de estas pruebas de detección de cloranfenicol a fin de convertirla en una prueba del tipo no terminal; lo cual puede ser de gran interés para los camaronicultores y para estudios toxicológicos.

Se recolectaron camarones juveniles (*Penaeus* sp.), de 5 a 7.5 cm de longitud (3-4 g de peso), en la laguna de La Pesca, municipio de Soto La Marina, Tamaulipas, México y se transportaron en bolsas de polietileno, conteniendo agua de la laguna hasta el laboratorio de acuicultura de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, de la Universidad Autónoma de Tamaulipas (FMVZ-UAT). Los organismos fueron aclimatados durante dos días en un tanque cilíndrico con 3 m³ de agua marina, sin sustrato y con aireación continua; y se alimentaron con una dieta comercial (35% de proteína). El laboratorio de acuicultura de la FMVZ-UAT

posee un sistema cerrado de recirculación de 25 m³, la calidad del agua fue mantenida mediante filtros de arena y filtro biológico. El agua marina utilizada durante el experimento provenía del Laboratorio de postlarva de la unidad marina de La Pesca (Tamaulipas). Los parámetros fisicoquímicos a lo largo del experimento fueron: 5 a 7 mg l⁻¹ de oxígeno disuelto, 19 y 24°C y 35‰ de salinidad.

Cien camarones fueron expuestos por 2 h a 35 mg l⁻¹ de cloranfenicol (Laboratorio Grin S.A. de C.V., Ciudad de México) por medio de un baño de inmersión en un tanque con 120 l de agua marina con aireación y en ausencia de filtro biológico (Scott 1993). Antes de ser reinstalados en su tanque los organismos expuestos fueron pasados dos veces con agua marina, con el fin de eliminar el antibiótico adherido al exoesqueleto, antes de ser reinstalados nuevamente en su tanque. Para el grupo control se usaron cinco camarones los cuales fueron tratados de igual forma que los organismos expuestos pero sin adición de cloranfenicol.

La hemolinfa y el músculo de los organismos expuestos fueron recolectados a 1, 24, y 48 h de exposición al cloranfenicol. Los tiempos de recolecta se seleccionaron a fin de evitar que este producto pudiera retornar a los camarones debido al sistema cerrado de recirculación de agua marina usada para el bioensayo. En cada uno de los tiempos señalados, se extrajeron grupos de cinco camarones, siendo 8, 8, y 4 grupos los recolectados a 1, 24, y 48 h respectivamente (n= 8, 8 y 4). La hemolinfa fue obtenida del seno ventral o cardiaco (Roux *et al.* 2002) mediante punción con una aguja de 22x35 mm y 0.6 ml de solución Alsever modificada o MAS a 4°C, dicha solución consiste en una mezcla de citrato de sodio (27 mM), cloruro de sodio (336 mM), glucosa (115 mM) y EDTA (9 mM), a pH 7.0 (Rodríguez *et al.* 1995, Yepiz *et al.* 2000). Los organismos muestreados fueron sacrificados para obtener el músculo, siendo ambos tejidos (músculo y hemolinfa) conservados a -12°C hasta su posterior análisis. Las muestras de hemolinfa y músculo del control fueron

obtenidos de la forma antes descrita.

La extracción de cloranfenicol de las muestras se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo usado en la prueba de inmunoensayos (ELISA) de Veratox[®] (Neogen, Lansing, EUA). Con la ayuda de un Stomacher 80 (Lab. Blender of Seward, Inglaterra) se homogenizaron por 60 segundos 5 g de tejido muscular, con 20 ml de PBS pH 7.4, la cual consiste de NaCl (137 mM), KCl (2.7 mM), Na₂HPO₄ (10mM) y KH₂PO₄ (2 mM) (Sambrook & Russell 2001). El tejido homogenizado fue filtrado con papel Whatman No. 4 y centrifugado por cinco minutos a 220 g; el sobrenadante fue usado para la detección de cloranfenicol. Las muestras de hemolinfa se analizaron de manera directa, sin el filtrado y centrifugado descrito en el músculo.

Se utilizó el programa Rida[®] (Soft Win r-biopharm[®] AG, Alemania) para determinar la concentración de cloranfenicol en las muestras, estableciendo una curva de calibración, según la ley de Beer-Lambert. Para la interpretación de los resultados se evaluó el grado de concordancia entre músculo y hemolinfa mediante una prueba de Kappa, utilizando la escala de valoración de Landis & Koch (1977). El nivel de significancia (0.05) de cloranfenicol presente entre ambos tejidos y en cada uno de los tiempos de muestreo, se analizó mediante la prueba t de Student (Brower & Zar 1980). Además, se realizó un análisis de varianza de una vía (ANDEVA) y la prueba de intervalos múltiples de Duncan (Brower & Zar 1980), por medio del programa STATISTICA (1995), para comparar el nivel de significancia (0.05) presente en cada uno de los tejidos.

La Tabla 1 muestra el contenido de cloranfenicol en músculo y hemolinfa de camarón después de 1, 24 y 48 h de exposición; en músculo se encontraron concentraciones de 18.56 a 19.76 partes por billón (ppb) mientras que en hemolinfa los valores fueron de 12.07 a 19.76 ppb; en ninguno de los dos casos se encontró diferencia estadística ($p < 0.05$). En cuanto al grupo control los valores

presentados fueron de 0 ppb. Sin embargo, al evaluar los tejidos por separado solamente la hemolinfa recolectada a las 24 h mostró diferencia significativa ($p < 0.05$) por ambos métodos estadísticos. La diferencia observada en la hemolinfa pudo ser debida al sitio de toma de muestra (seno venoso o cardiaco). Alabi *et al.* (2000) como Muñoz *et al.* (2000) recomiendan tanto la punción cardiaca como la del seno ventral para la toma de muestras de hemolinfa. Sin embargo, este trabajo observó mayor cantidad de hemolinfa recolectada vía el seno venoso que el cardiaco, pudiendo esto generar una disminución aparente en el contenido de cloranfenicol en las muestras.

Tabla I. Contenido de cloranfenicol (ppb) en músculo y hemolinfa (media y desviación estándar).

	Tiempo (h)		
	1	24	48
Control	0	0	0
Músculo	18.57 ± 2.04	18.09 ± 1.91	19.77 ± 0
Hemolinfa	19.77 ± 0	12.08 ± 5.34 ^{a,i}	17.85 ± 3.85

^a Diferencia significativa respecto al control, ANDEVA, Duncan ($P < 0.05$).

ⁱ Diferencia significativa respecto al control, t de Student ($P < 0.05$).

El músculo es el tejido empleado para la prueba comercial de ELISA en la detección de cloranfenicol en camarón, sin considerarse a la hemolinfa o algún otro tejido como factible de ser muestreado. Los resultados obtenidos por la prueba de t de Student, independientemente del tiempo de muestreo señalan que no existe diferencia significativa entre los valores presentes entre el músculo y la hemolinfa. Esto aunado a la falta de diferencia significativa entre la prueba de t de Student y ANDEVA (Tabla 1) para las muestras recolectadas a la 1 y

48 h sugiere que tanto la hemolinfa como el músculo pueden ser usados para detectar cloranfenicol independientemente del tiempo de exposición.

La detección de algunos fármacos como la enrofloxacin a partir de muestras de hemolinfa de camarón se ha notificado en estudios mediante cromatografía líquida de alta resolución o HPLC (Toro 2001), con el inconveniente de que esta prueba es más prolongada y costosa que la prueba de ELISA. El presente estudio sugiere que la prueba de ELISA puede ser una buena herramienta para la detección de cloranfenicol en muestras de organismos acuáticos, ya que puede llevarse a cabo *in situ*, a bajo costo y con niveles muy confiables de detección. El músculo ha demostrado ser un tipo de muestra ideal, ya que este tejido puede congelarse y permite que la detección del fármaco se lleve a cabo tiempo después del procesamiento del camarón (Neuhaus *et al.* 2002, Pfenning *et al.* 2002). Sin embargo, este tejido tiene la desventaja de aumentar el tiempo de manipulación de la muestra, mientras que la hemolinfa puede ser usada directamente en la prueba de ELISA sin necesidad de homogenización y centrifugación.

Teniendo en cuenta que México es un importante productor e importador de camarón y que la legislación nacional vigente determina que el cloranfenicol no se debe usar en ninguna etapa de producción de este tipo de organismo, es importante establecer metodologías que ayuden en la detección de este producto. Esto a fin de evitar el uso de este producto por acuicultores poco escrupulosos que puedan provocar algo como lo sucedido a China y Vietnam con el cierre del mercado europeo a sus camarones (Anónimo 2001).

Es necesario profundizar en el presente estudio para obtener una mejor comprensión de la farmacocinética del cloranfenicol en el camarón y sus respectivos tejidos (músculo, hemolinfa, hepatopáncreas, hemocitos, etc.). Esto último favorecerá el uso de estos organismos para estudios toxicológicos (Toro 2001).

Agradecimientos

Se agradecen las facilidades y el apoyo proporcionados por los laboratorios de Inmunología, Farmacología y Acuicultura de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Tamaulipas. Asimismo, se agradece a dos árbitros anónimos por la revisión crítica del manuscrito previo. Se agradece a Aitor Aizpuru por la traducción al francés del resumen.

Referencias

- Alabi, A., J. Latchford & D. Jones. 2000. Demonstration of residual antibacterial activity in plasma of vaccinated *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 187(1-2): 15-34.
- Amornchai, S. 2002. Chloramphenicol concerns in shrimp culture. *Aquaculture Asia* 7(1): 51-52.
- Anónimo. 2001. Boletín relativo a determinadas medidas de protección con respecto a determinados productos de la pesca y de la acuicultura destinados al consumo humano y originario de China y Vietnam. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L251: 11-12.
- Anónimo. 2002a. Boletín relativo a la ampliación de las medidas de protección establecidas con respecto a los productos de la pesca y de la acuicultura importados de Vietnam. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L84: 75-76.
- Anónimo. 2002b. *Diario Oficial de la Federación*. Ciudad de México, 19 de julio, (15): 45 pp.
- Brower J.E. & J.H. Zar. 1980. *Field and laboratory methods for general Ecology*. Brown Company Publishers, Iowa, 17-23 pp.
- Jawetz, B. 1996. Cloranfenicol y tetraciclinas. Pp: 845-852, *In* Bertram, G.K. (ed), *Farmacología básica y clínica*. 6a ed. Manual Moderno, Ciudad de México.
- Kautsky, N., P. Rönnbäck, M. Tedengren & M. Troell. 2000. Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pound farming. *Aquaculture* 191(1-3): 145-161.
- Landis, J. & G. Koch. 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 33(1): 159-174.
- Muñoz, M., R. Cedeño, J. Rodríguez, W.P.W. Knaap, E. Mialhe & E. Bachère. 2000. Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 191(1-3): 89-107.
- Neuhaus, B., J. Hurlbut & W. Hammack. 2002. Analysis of chloramphenicol in shrimp. *US Food Drug*

- Admon. Lab. Inf. Bull. 18(9): 4290.
- Pfenning, A., S. Turnipseed, J. Roybal, C. Burns, M. Madson, J. Storey & R. Lee. 2002. Confirmation of multiple phenicol residues in shrimp by electrospray LC/MS. US Food Drug Admon. Lab. Inf. Bull. 18(5): 4284.
- Roch, P. 1999. Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates. *Aquaculture* 172(1-2): 125-145.
- Rodríguez, J., V. Boulo, E. Mialhe & E. Bachère. 1995. Characterization of shrimp haemocytes and plasma components by monoclonal antibodies. *Cell Science* 108(3): 1043-1050.
- Roux, M., A. Pain, K. Klimpel & A. Dhar. 2002. The lipopolysaccharide and -1,3-glucan binding protein gene is upregulated in white spot virus-infected shrimp (*Penaeus stylirostris*). *Virology* 76(14): 7140-7149.
- Sambrook J. & D.W. Russell. 2001. Molecular cloning. A laboratory manual. Pp: 750-752, 3a ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York.
- Scott, P. 1993. Therapy in aquaculture. Pp: 131-152, *In* Brown, L. (ed.), *Aquaculture for veterinarians: Fish husbandry and medicine*. Pergamon Press, Inglaterra.
- Shojaee, F. & P. Lees. 2000. Antibiotic treatment for animals: effect on bacterial population and dosage regimen optimization. *Antimicrobial Agents* 14(4): 307-313.
- Sumano, H. & L. Ocampo. 1997. Tetraciclinas, cloranfenicol, tianfenicol y florfenicol. *Farmacología Veterinaria*. Pp: 148-160, McGraw-Hill Interamericana, Ciudad de México.
- Toro, L. 2001. Distribución de los residuos de enrofloxacin en camarón blanco *Penaeus vannamei* alimentado con dietas medicadas a diferentes concentraciones. Tesis de maestría, Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas, San Pedro de Manglaralto, Ecuador.
- Treves-Brown, V. 2000. Applied fish pharmacology. Pp: 149-150, Kluwer Academic Publisher Group, Holanda.
- Vargas, F., I. Higuera, F. Jiménez, J. Hernández, T. Gollas & G. Yepiz. 1996. Posibilidades de inmunoestimulación del camarón a través del alimento. Pp: 433-439, *In* Memorias del tercer simposio internacional en nutrición acuícola, noviembre 11-13 de 1996, Monterrey. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey.
- Yepiz, G., F. Vargas & I. Higuera. 2000. Penaeid shrimp hemolymph lipoproteins. *Aquaculture* 191(1-3): 177-189.

Recibido: 10 de agosto de 2006.

Aceptado: 15 de septiembre de 2006.