

ENSAYO INTERLABORATORIO PARA LA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS ANIMALES PROCESADAS POR MICROSCOPIA

INTERLABORATORY STUDY FOR THE DETECTION OF PROCESSED ANIMAL PROTEINS BY MICROSCOPY

Sandra Cristina Bachur, Marcelo Oscar Bello,
Susana Beatriz Binotti y María Mercedes Bertotto

(Coordinación de Análisis de Productos Alimenticios de Origen Animal y Conexos, Dirección de Laboratorio Animal, Dirección General de Laboratorio y Control Técnico, Senasa) - Argentina

Resumen

El presente ensayo interlaboratorio fue organizado por la Dirección General de Laboratorios y Control Técnico perteneciente al Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (Senasa, Argentina) en colaboración con el Instituto Interamericano de Cooperación Agrícola (IICA). El objetivo fue evaluar el estado actual de los laboratorios de la región en lo que se refiere al control de piensos por microscopía, en el marco de los programas de prevención de Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EET) sobre la base de la metodología de referencia publicada en la legislación de la Unión Europea.

Participaron trece laboratorios, de los cuales once pertenecen a Servicios Oficiales de distintos países de la región y los restantes a entidades privadas. Cada participante recibió cuatro muestras conformadas por diferentes matrices de origen vegetal y mineral fortificadas con distintas materias primas de origen animal, como harinas de carne y hueso, y pescado.

Debido a la heterogeneidad de las muestras preparadas y previo al envío de estas, se realizó un estudio de homogeneidad para cada una de ellas. El 46 % de los laboratorios participantes obtuvo todos los resultados informados satisfactorios.

En el resumen total, fueron informados un 88 % de resultados satisfactorios para la identificación de fragmentos óseos terrestres y un 77 % para la identificación de fragmentos óseos de pescado.

Palabras clave: Interlaboratorio, PAP, Microscopía.

Abstract

This Inter laboratory Comparison was organized by the General Direction of Laboratories and Technical Control of the Agri-food Health and Quality National Service (DLA Senasa), in cooperation with Inter-American Institute for Cooperation on Agriculture (IICA). The aim of this report was to assess the current state of the regional laboratories in relation to the control of the compounds feeds by microscopy, in the context of the prevention of transmissible spongiform encephalopathy (EET), and taking into consideration the methodology of reference published in the European Union legislation.

Thirteen laboratories have participated, eleven of which belong to Official Services of different countries of the region and the rest to private entities. Each participant received four samples of different matrices of vegetal and mineral origins, fortified with different raw materials of animal origin, such as powder of meat, bone and fishmeal.

Taking into consideration the heterogeneity of the prepared samples, an homogeneity study was previously done for each of them. 46 per cent of the laboratories participating got the results satisfactorily. In the final conclusion, 88 % of the results were correct for the identification of terrestrial bone fragments and 77 % of them were correct in the identification of fish bone fragments.

Keywords: Interlaboratory Test, animal feeds, microscopy.

1. INTRODUCCIÓN

La Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB) es una enfermedad mortal que afecta el sistema nervioso central de los bovinos adultos. Es aceptado mundialmente que el agente causal es una proteína infecciosa o prión, altamente resistente a la acción de distintos agentes físicos y químicos.

Esta enfermedad reconocida por primera vez en Gran Bretaña, en 1986, y asociada luego a la nueva variante de Creutzfeldt-Jakob (vCJD) en humanos ha causado preocupación en muchos países, que han adoptado medidas sanitarias con el objeto de prevenir su ingreso o diseminación.

Diversos estudios científicos llegaron a la conclusión de que la infección del ganado bovino se produce por consumo de alimento que contiene harinas de carne y hueso (HCH) contaminadas, hallazgo que derivó en la prohibición de alimentar el ganado con proteínas animales.

En la actualidad, los programas de prevención y control se encuentran principalmente enfocados en prevenir el ingreso del agente tanto en la cadena de alimentación animal como humana. La metodología reconocida oficialmente por la Unión Europea para la identificación de componentes de origen animal prohibidos (PAP) en piensos es la técnica de microscopía (Reglamento EC N.º 152/2009 y sus modificatorias).

La prohibición de utilización de proteínas de origen animal varía de acuerdo con la legislación establecida en cada país. En el presente estudio, se evaluó la capacidad de los laboratorios para detectar proteínas terrestres o de pescado. Los resultados corresponden a un ensayo cualitativo: presencia/ausencia de componentes de origen animal.

El ejercicio de intercomparación, el tercero organizado por este organismo para países de Latinoamérica, permite mostrar el grado de avance de la región en la incorporación de esta técnica como herramienta para la prevención de la EEB.

2. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

2.1. Material utilizado

- Materias primas de origen vegetal: afrechillo de trigo, girasol molido, harina de soja y maíz, pisingallo molido y partido. Todas fueron suministradas, seleccionadas y molidas por el Departamento de Química y Micotoxinas de la Dirección de Laboratorio Vegetal del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria.

- Materias primas de origen mineral: conchilla (carbonato de calcio de origen marino) y sal fina comercial provenientes del stock de patrones del Departamento de Evaluación y Desarrollo de la Coordinación de Aprobación de Productos Alimenticios de Origen Animal y Conexos (APAC), dependiente de la Dirección de Laboratorio Animal del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria.
- Materias primas de origen animal: harina de carne y hueso 45/50 y harina de pescado del stock de patrones del Departamento de Evaluación y Desarrollo de la Coordinación de APAC, dependiente de la Dirección de Laboratorio Animal del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria.

2.2. Proceso de preparación de las muestras

En la Figura 1 se observa el diagrama de preparación y rotulado de las muestras.

Las materias primas utilizadas para preparar las distintas matrices fueron analizadas previamente por microscopía para verificar ausencia de contaminación con PAP. Las muestras finales (B, C y D) se prepararon mediante un proceso de dilución por agregados parciales de 50 g por vez de matriz sobre el total de la harina de pescado, o carne y hueso 45/50 en cada caso particular, con posterior mezclado y homogeneización manual.

A partir de las muestras finales A, B, C, D se generaron los grupos E, F, G, H, I conformados por 23 muestras individuales cada uno, rotuladas en todos los casos de forma aleatoria.

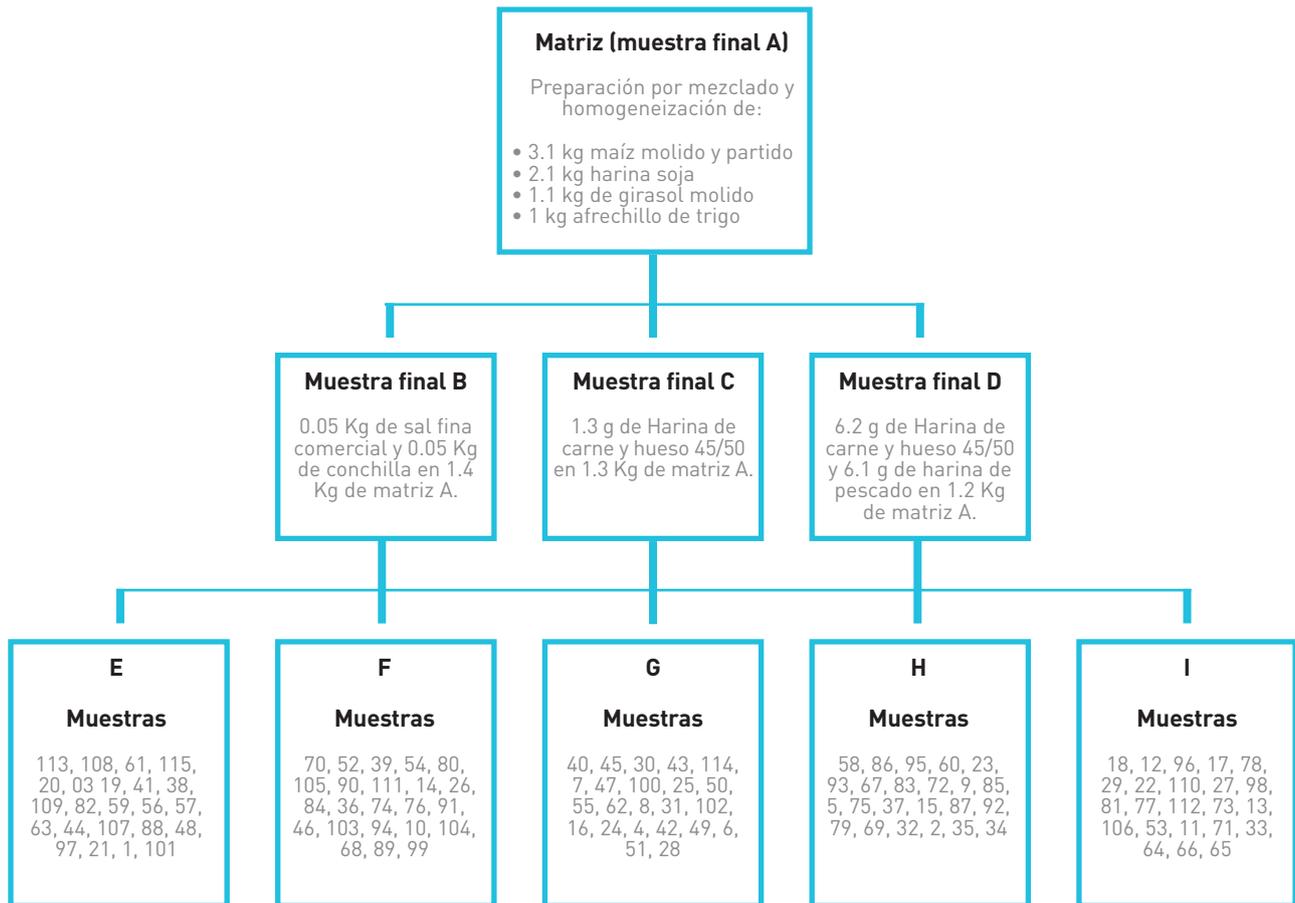


Figura 1: Diagrama de preparación y rotulado de las muestras.

2.3. Ensayo de homogeneidad

El estudio de homogeneidad fue realizado según el procedimiento basado en la Norma ISO 13528 (2005). Para tal fin, un total de 10 muestras elegidas aleatoriamente de las 23 muestras envasadas para cada grupo de muestras (E, F, G, H e I) fueron analizadas por microscopía en el Laboratorio del Departamento de Evaluación y Desarrollo de la Coordinación APAC del Senasa. Se obtuvieron los resultados detallados en la Tabla 1.

Tabla 1: Resultados de los análisis realizados para el estudio de homogeneidad

Grupo de muestras	Muestras analizadas	Partículas animales	
		Terrestres	Pescado
E	1-19-21-38-44-59 63-97-107-109	Ausencia	Ausencia
F	10-26-36-52-74 80-90-94-104-105	Ausencia	Ausencia
G	6-24-25-28-30 31-42-45-55-102	(1)	(1)
H	5-15-23-37-60 79-85-86-87-95	Presencia	Presencia
I	18-27-29-64-65 71-77-81-106-112	Ausencia	Ausencia

(1) El ensayo de homogeneidad no fue satisfactorio.
Las muestras de este grupo no se enviaron a los laboratorios.

2.4. Envío de las muestras

Un sobre con cuatro frascos unívocamente identificados fue enviado a los laboratorios participantes el 31 de julio de 2014. Cada uno contenía aproximadamente 50 g de muestra.

3. RESULTADOS

3.1. Análisis de resultados

La fecha límite para el envío de los resultados fue el 30 de septiembre de 2014. El plazo de entrega de resultados fue extendido hasta el 31 de octubre de 2014 debido a inconvenientes con el envío de las muestras a algunos de los laboratorios de países participantes. En la Tabla 2, se detallan los resultados cualitativos informados por cada participante con su correspondiente evaluación.

Es importante destacar que un resultado se considera satisfactorio cuando se informa correctamente la presencia/ausencia de fragmentos óseos de origen terrestre o pescado. El resto de los componentes de origen animal que puedan haber sido informados se evaluaron en el ítem de análisis de datos adicionales (ver 4.2).

Según se observa en la Tabla 2, el 46 % de los laboratorios participantes informaron todos los resultados satisfactorios (laboratorios 1, 2, 3, 4, 10 y 12). Los laboratorios 2 y 8 solo informaron resultados para presencia o ausencia de componentes de origen animal terrestre.

El análisis de los datos para el total de muestras analizadas por los laboratorios refleja un 88 % de resultados satisfactorios en la identificación de fragmentos óseos terrestres y un 77 % para fragmentos óseos de pescado.

En la muestra sin fortificar (grupos E, F e I) se observó un 87,5 % de resultados satisfactorios por ausencia de fragmentos óseos terrestres y de pescado.

En el caso de las muestras del grupo H (fortificadas con 0,5 % de harina de pescado y 0,5 % de harina de carne y hueso), se observó un 85 % de resultados satisfactorios para presencia de fragmentos óseos terrestres y un 55 % de resultados satisfactorios para presencia de fragmentos óseos de pescado.

Tabla 2: Resultados informados y evaluación de los laboratorios participantes

Laboratorio	Muestra	Grupo de muestras	Partículas animales terrestres		Partículas animales pescado	
			Resultado	Evaluación	Resultado	Evaluación
1	2	H	Presencia	Satisfactorio	Presencia	Satisfactorio
	70	F	Ausencia	Satisfactorio	Ausencia	Satisfactorio
	82	E	Ausencia	Satisfactorio	Ausencia	Satisfactorio
	98	I	Ausencia	Satisfactorio	Ausencia	Satisfactorio
2	58	H	Presencia	Satisfactorio	Sin resultados	-----
	73	I	Ausencia	Satisfactorio	Sin resultados	-----
	103	F	Ausencia	Satisfactorio	Sin resultados	-----
	113	E	Ausencia	Satisfactorio	Sin resultados	-----
3	3	E	Ausencia	Satisfactorio	Ausencia	Satisfactorio
	22	I	Ausencia	Satisfactorio	Ausencia	Satisfactorio
	69	H	Presencia	Satisfactorio	Presencia	Satisfactorio
	76	F	Ausencia	Satisfactorio	Ausencia	Satisfactorio

4	32	H	Presencia	Satisfactorio	Presencia	Satisfactorio
	48	E	Ausencia	Satisfactorio	Ausencia	Satisfactorio
	99	F	Ausencia	Satisfactorio	Ausencia	Satisfactorio
	110	I	Ausencia	Satisfactorio	Ausencia	Satisfactorio
5	46	F	Ausencia	Satisfactorio	Ausencia	Satisfactorio
	53	I	Ausencia	Satisfactorio	Ausencia	Satisfactorio
	92	H	Presencia	Satisfactorio	Ausencia	No Satisfactorio
	115	E	Ausencia	Satisfactorio	Ausencia	Satisfactorio
6	35	H	Ausencia	No Satisfactorio	Ausencia	No Satisfactorio
	41	E	Ausencia	Satisfactorio	Ausencia	Satisfactorio
	66	I	Ausencia	Satisfactorio	Ausencia	Satisfactorio
	91	F	Ausencia	Satisfactorio	Ausencia	Satisfactorio
7	11	I	Ausencia	Satisfactorio	Ausencia	Satisfactorio
	20	E	Ausencia	Satisfactorio	Ausencia	Satisfactorio
	54	F	Ausencia	Satisfactorio	Presencia	No Satisfactorio
	93	H	Presencia	Satisfactorio	Presencia	Satisfactorio
8	12	I	Ausencia	Satisfactorio	Sin resultados	-----
	57	E	Presencia	No Satisfactorio	Sin resultados	-----
	72	H	Presencia	Satisfactorio	Sin resultados	-----
	84	F	Ausencia	Satisfactorio	Sin resultados	-----
9	14	F	Ausencia	Satisfactorio	Presencia	No Satisfactorio
	34	H	Presencia	Satisfactorio	Ausencia	No Satisfactorio
	96	I	Ausencia	Satisfactorio	Ausencia	Satisfactorio
	108	E	Ausencia	Satisfactorio	Ausencia	Satisfactorio
10	17	I	Ausencia	Satisfactorio	Ausencia	Satisfactorio
	56	E	Ausencia	Satisfactorio	Ausencia	Satisfactorio
	75	H	Presencia	Satisfactorio	Presencia	Satisfactorio
	111	F	Ausencia	Satisfactorio	Ausencia	Satisfactorio
11	13	I	Presencia	No Satisfactorio	Presencia	No Satisfactorio
	61	E	Presencia	No Satisfactorio	Presencia	No Satisfactorio
	67	H	Ausencia	No Satisfactorio	Ausencia	No Satisfactorio
	68	F	Presencia	No Satisfactorio	Presencia	No Satisfactorio
12	78	I	Ausencia	Satisfactorio	Ausencia	Satisfactorio
	83	H	Presencia	Satisfactorio	Presencia	Satisfactorio
	88	E	Ausencia	Satisfactorio	Ausencia	Satisfactorio
	89	F	Ausencia	Satisfactorio	Ausencia	Satisfactorio
13	9	H	Presencia	Satisfactorio	Ausencia	No Satisfactorio
	33	I	Ausencia	Satisfactorio	Ausencia	Satisfactorio
	39	F	Ausencia	Satisfactorio	Ausencia	Satisfactorio
	101	E	Ausencia	Satisfactorio	Ausencia	Satisfactorio

3.2. Análisis de datos adicionales

En las Tablas 3 y 4 se detallan los datos adicionales aportados por los laboratorios.

El laboratorio 11 informó tres muestras con presencia de partículas animales terrestres y de pescado, sin ningún dato adicional que avale dicho resultado.

Los laboratorios 2, 3, 4 y 7 consideran partículas de origen animal la conchilla proveniente de la molienda de valvas de moluscos bivalvos y conchas de moluscos gasterópodos, que son utilizadas en algunos países como suplemento mineral en la elaboración de piensos.

Los laboratorios 4 y 9 informaron partículas de origen pesquero en muestras que no tenían harina de pescado en su composición.

El laboratorio 4 informó presencia de gelatina en una muestra que fue preparada sin componentes de origen animal.

Con relación al análisis de las metodologías utilizadas por los laboratorios participantes, pueden realizarse las siguientes observaciones:

- El cloroformo es utilizado como solvente de extracción por 10 de los laboratorios.
- Los laboratorios 1, 6 y 13 utilizan tetracloroetileno como solvente de extracción.
- Los laboratorios 2, 5 y 11 informan seguir los lineamientos del Reglamento EC 152/2009 sin modificaciones, sin embargo, declaran la utilización de cloroformo como solvente de extracción.

Tabla 3: Datos adicionales informados por los laboratorios participantes

Laboratorio	Muestra	Grupo de muestras	Peso de la muestra (g)	Peso del sedimento (g)	Fragmentos óseos terrestres	Fragmentos óseos de pescado	Otras partículas origen animal
1	2	H	5.00	0.246	Más de 20	5 a 20	-----
	70	F	5.00	0.404	Ninguno	Ninguno	-----
	82	E	5.00	0.001	Ninguno	Ninguno	-----
	98	I	5.00	0.001	Ninguno	Ninguno	-----
2	58	H	10.44	0.442	Más de 20	-----	-----
	73	I	10.12	0.416	Ninguno	-----	-----
	103	F	10.63	0.956	Ninguno	-----	conchilla
	113	E	10.46	0.341	Ninguno	-----	-----
3	3	E	5.01	0.044	Ninguno	Ninguno	-----
	22	I	5.51	0.059	Ninguno	Ninguno	-----
	69	H	5.52	0.075	5 a 20	Más de 20	escamas
	76	F	5.26	0.477	Ninguno	Ninguno	conchillas
4	32	H	5	0.0464	5 a 20	5 a 20	-----
	48	E	5	0.0403	Ninguno	Ninguno	escama
	99	F	5	0.4018	Ninguno	Ninguno	conchilla
	110	I	5	0.505	Ninguno	Ninguno	Gelatina
5	46	F	5.01	0.530	Ninguno	Ninguno	-----
	53	I	5.01	0.073	Ninguno	Ninguno	-----
	92	H	5.01	0.083	Más de 20	Ninguno	músculo
	115	E	5.02	0.060	Ninguno	Ninguno	-----
6	35	H	35.13	0.864	Ninguno	Ninguno	-----
	41	E	33.35	0.049	Ninguno	Ninguno	-----
	66	I	27.04	0.094	Ninguno	Ninguno	-----
	91	F	38.22	0.093	Ninguno	Ninguno	pelo

7	11	I	23.67	0.055	Ninguno	Ninguno	-----
	20	E	27.6	0.052	Ninguno	Ninguno	-----
	54	F	31.87	2.48	Ninguno	Más de 20	conchillas
	93	H	28.95	0.187	Más de 20	5 a 20	-----
8	12	I	5.002	0.049	Ninguno	-----	-----
	57	E	5.004	0.055	Menos de 5	-----	-----
	72	H	5.005	0.109	Más de 20	-----	-----
	84	F	5.001	0.437	Ninguno	-----	-----
9	14	F	5.00	0.402	Ninguno	5 a 20	-----
	34	H	5.00	0.074	Más de 20	Ninguno	-----
	96	I	5.00	0.081	Ninguno	Ninguno	dientes pescado
	108	E	5.00	0.065	Ninguno	Ninguno	-----
10	17	I	10	0.0248	Ninguno	Ninguno	-----
	56	E	10	0.0509	Ninguno	Ninguno	-----
	75	H	10	0.0983	Más de 20	Más de 20	Pelos y escamas
	111	F	10	0.639	Ninguno	Ninguno	-----
11	13	I	-----	-----	-----	-----	-----
	61	E	-----	-----	-----	-----	-----
	67	H	-----	-----	-----	-----	-----
	68	F	-----	-----	-----	-----	-----
12	78	I	5.05	0.007	Ninguno	Ninguno	-----
	83	H	5.04	0.018	Más de 20	5 a 20	escamas
	88	E	5.03	0.378	Ninguno	Ninguno	-----
	89	F	5.01	0.004	Ninguno	Ninguno	-----
13	9	H	10	0.044	Más de 20	Ninguno	-----
	33	I	10	0.004	Ninguno	Ninguno	-----
	39	F	10	0.713	Ninguno	Ninguno	-----
	101	E	10	0.002	Ninguno	Ninguno	-----

Tabla 4: Métodos de análisis informados por los laboratorios participantes

Laboratorio	Método	Acreditado según ISO 17025/2005		Solvente de extracción utilizado
1	EC Reglamento 152/2009	NO	NO	Tetracloroetileno
2	EC Reglamento 152/2009	SI	SI	Cloroformo
3	EC Reglamento 152/2009 con modificaciones	NO	NO	Cloroformo
4	EC Reglamento 152/2009 con modificaciones	SI	SI	Cloroformo
5	EC Reglamento 152/2009	SI	NO	Cloroformo
6	EC Reglamento 152/2009 con modificaciones	SI	SI	Tetracloroetileno
7	Propio	SI	SI	Cloroformo
8	Propio	SI	NO	Cloroformo
9	EC Reglamento 152/2009 con modificaciones	SI	SI	Cloroformo
10	EC Reglamento 152/2009 con modificaciones	SI	NO	Cloroformo
11	EC Reglamento 152/2009	NO	NO	Cloroformo
12	EC Reglamento 152/2009 con modificaciones	SI	SI	Cloroformo
13	EC Reglamento 152/2009 con modificaciones	NO	SI	Tetracloroetileno

4. CONCLUSIONES

La evaluación del presente ensayo, referido a la capacidad de los laboratorios en la detección de proteínas animales prohibidas, ha mostrado en general buenos resultados habida cuenta del alto número de países participantes y de los resultados obtenidos.

Este estudio tuvo dentro de sus propósitos evaluar el avance en la implementación de la técnica de microscopía para detección de PAP en la región y demostró que aproximadamente la mitad de los laboratorios informó todos los resultados en forma satisfactoria. Sin embargo, el 31 % de estos no tiene aún la técnica validada y el 46 % no tiene acreditado el ensayo.

La búsqueda de una mejora continua nos muestra la importancia de seguir con este tipo de intercomparaciones de manera regular en el tiempo.

BIBLIOGRAFÍA

Reglamento EC N.º 152/2009 del 27 de enero de 2009.

Identificación de componentes de origen animal por microscopía – método cualitativo, 2 – COA – ED – PCP N.º 040 v012, 01 de diciembre de 2013.

Norma ISO 13528:2005, Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons, 1º edición, 01 de septiembre de 2005.

Norma ISO 17043:2010, Conformity Assessment – General Requirements for Proficiency testing, 1.º edición, 01 de febrero de 2010.

Honduras: Laboratorio de Control de Calidad San José.

México: Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Ambiental, SENASICA, SAGARPA.

Paraguay: Departamento de Control de alimentos, Dirección General de Laboratorios, SENACSA.

Perú: Certificaciones del Perú SA.

Uruguay: División de Laboratorios Veterinarios “Miguel C. Rubino”, Sección Patología, MGAP.

Uruguay: Laboratorio de Alimentos de la División de Protección de alimentos Vegetales, MGAP.

AGRADECIMIENTOS

Al Departamento de Química y Micotoxinas de la Dirección de Laboratorio Vegetal, del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria por el suministro de los patrones de origen vegetal.

LABORATORIOS PARTICIPANTES

Argentina: Departamento Evaluación y Desarrollo, Coordinación APAC, DLA, DILAB, Senasa.

Argentina: Laboratório Biofarma SA.

Brasil: Laboratorio Nacional Agropecuario, LANAGRO, MG.

Chile: Laboratorio de Química Ambiental y Alimentaria, Departamento de Laboratorios, Servicio Agrícola y Ganadero, Ministerio Agricultura.

Costa Rica: Centro de Investigaciones en Nutrición animal, CINA.

Cuba: Laboratorio Nacional de Higiene de los Alimentos, Instituto Medicina Veterinaria.

Ecuador: Laboratorio de Ensayo de Productos de Uso Acuícola, LAB-EPA.