



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**EVALUACIÓN DE LA DISEMINACIÓN AMBIENTAL DE SULFACLOROPIRIDAZINA
MEDIANTE DEYECCIONES DE POLLOS BROILER TRATADOS
TERAPÉUTICAMENTE**

ROCÍO ESPERANZA CADENA FLÁNDEZ

Proyecto de Memoria para optar
al Título Profesional de Médico
Veterinario

PROFESOR GUÍA: ALDO MADDALENO TOLEDO

Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias

Financiamiento: Proyecto FONDECYT 1220520

SANTIAGO, CHILE

2023



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**EVALUACIÓN DE LA DISEMINACIÓN AMBIENTAL DE SULFACLOROPIRIDAZINA
MEDIANTE DEYECCIONES DE POLLOS BROILER TRATADOS
TERAPÉUTICAMENTE**

ROCÍO ESPERANZA CADENA FLÁNDEZ

Proyecto de Memoria para optar
al Título Profesional de Médico
Veterinario

NOTA FINAL:

FIRMA

PROFESOR GUÍA: ALDO MADDALENO TOLEDO

.....

PROFESOR CORRECTOR: JAVIERA CORNEJO KELLY

.....

PROFESOR CORRECTOR: PILAR OVIEDO HANNIG

.....

SANTIAGO, CHILE

2023

ÍNDICE DE CAPÍTULOS

INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
1. Uso de antimicrobianos en producción animal	3
2. Efectos negativos relacionados al uso de AMs.....	3
3. Normativas regulatorias del uso de antimicrobianos	4
4. Sulfonamidas	5
5. Diseminación de antimicrobianos al ambiente.....	5
6. Detección de residuos de antimicrobianos	6
OBJETIVOS	7
Objetivo general.....	7
Objetivos específicos	7
MATERIALES Y MÉTODOS	8
1. Animales experimentales	8
2. Formulaciones farmacéuticas y administración	8
3. Diseño experimental.....	8
4. Soluciones y reactivos.....	9
5. Obtención de las muestras.....	10
6. Tratamiento de muestras	10
7. Análisis instrumental	11
8. Verificación y confirmación del método analítico	11
9. Análisis estadístico.....	12
RESULTADOS	13
Verificación y confirmación del método analítico.....	13
Tiempo de Retención y Especificidad	13
Límite de Detección (LOD) y Límite de Cuantificación (LOQ).....	13
Linealidad	13
1. Determinación de las concentraciones residuales de SCP.....	14
Grupo A (grupo tratado).....	14
Grupo B.1 (grupo contiguo).....	16
Grupo B.2 (grupo a 30 cm)	18

2. Magnitud de contaminación de residuos de SCP	20
DISCUSIÓN	22
CONCLUSIÓN	24
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
ANEXOS	30

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla Nro. 1: Concentraciones de SCP en heces de pollos Broiler pertenecientes al grupo A (grupo tratado) medidas el $\mu\text{g/Kg}$, distribuidas por días de muestreo.	14
Tabla Nro. 2: Concentraciones de SCP en heces de pollos Broiler pertenecientes al grupo B.1 (grupo contiguo) medidas el $\mu\text{g/Kg}$, distribuidas por días de muestreo.	17
Tabla Nro. 3: Concentraciones de SCP en heces de pollos Broiler pertenecientes al grupo B.2 (grupo a 30 cm) medidas el $\mu\text{g/Kg}$, distribuidas por días de muestreo.	18

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura Nro. 1: Distribución de la unidad experimental.....	9
Figura Nro. 2: Cromatogramas	13
Figura Nro. 3: Linealidad	14
Figura Nro. 4: Gráficos descriptivos de las concentraciones del grupo A (grupo tratado).	16
Figura Nro. 5: Gráficos descriptivos de las concentraciones del grupo B.1 (grupo contiguo).....	18
Figura Nro. 6: Gráficos descriptivos de las concentraciones del grupo B.2 (grupo a 30 cm).	20
Figura Nro. 7: Diagrama de Tukey.....	21

RESUMEN

El incremento en la intensidad productiva de la industria avícola ha llevado a un aumento de enfermedades infecciosas y, por consecuencia, a un mayor uso de antimicrobianos (AMs) como agentes metafilácticos y terapéuticos. El extenso uso de estos fármacos ha causado un gran impacto en la salud pública, animal y ambiental a nivel mundial, debido a que son liberados hacia el ambiente, en gran medida, mediante residuos en heces de animales tratados con ellos, llegando así a suelos, flujos de agua, aire y biota. El polvo en las producciones animales contiene partículas de deyecciones, entre otros materiales orgánicos, las cuales contienen residuos de AM, este, se mantiene en suspensión y es diseminado por el ambiente mediante corrientes de aire o movimiento de individuos. La sulfacloropiridazina (SCP) es un AM de la familia de las sulfonamidas, la cual es ampliamente utilizada en la industria avícola y es excretada mediante las deyecciones de pollos Broiler tratados con ella, pudiendo así contaminar el ambiente productivo, entendiéndose este como “todo estiércol, cama, alojamiento u otros animales presentes”.

Para evaluar la diseminación de residuos desde grupos de animales tratados oralmente con SCP hacia grupos centinelas, se dispuso de 3 grupos experimentales (A, B.1 y B.2) y 1 grupo control (C) de 10 pollos Broiler cada uno, criados bajo condiciones controladas. Al grupo A se le trató con una formulación comercial de SCP sódica al 10%, durante 5 días, mientras que los otros dos grupos no fueron tratados y se encontraban en un corral contiguo (B.1) y en uno a 30 cm (B.2) del grupo en tratamiento. Finalizando en tratamiento, se tomaron muestras de deyecciones de todos los grupos, por estimulación cloacal, los días 3, 6, 9, 12, 15 y 18 y cuantificaron las concentraciones de residuos de SCP en ellas, mediante HPLC-MS/MS.

En el grupo A se encontraron concentraciones residuales de SCP hasta el día 15 post tratamiento, las cuales fluctuaron entre 18,62 y 718,17 $\mu\text{g}/\text{kg}$, en promedio. Por su parte, en el grupo B.1 y grupo B.2 se detectaron residuos de SCP en concentraciones bajo el Límite de cuantificación (LOQ), las cuales perduraron hasta el día 12 post tratamiento y el día 3 post tratamiento, respectivamente. Se realizó un ANOVA de un factor de las concentraciones obtenidas de los 3 grupos, obteniendo un p-valor menor a 0,05, por lo que se determinó que existe diferencia entre los grupos de estudio. Posteriormente, se realizó un ANOVA de un factor de las concentraciones obtenidas en los grupos B.1 y B.2, obteniendo un p-valor mayor a 0,05, estableciendo que no hay diferencia significativa en la diseminación a las diferentes distancias aplicadas.

Finalmente, se concluye que existe diseminación de SCP hacia el ambiente productivo desde las deyecciones de un grupo de pollos Broiler tratados con ella, y que no hay diferencia significativa en la diseminación de SCP bajo los 30 cm de distancia del grupo en tratamiento.

Palabras claves: residuos antimicrobianos, sulfacloropiridazina, deyecciones, diseminación, industria avícola, HPLC-MS/MS.

ABSTRACT

The increase in the productive intensity of the poultry industry has led to an increase in infectious diseases and, consequently, to a greater use of antimicrobials (AMs) as metaphylactic and therapeutic agents. The extensive use of these drugs has caused a great impact on public, animal and environmental health worldwide due to their release into the environment, to a large extent, through residues in the feces of the animals treated with them, reaching soils, water flows, air and biota. Dust in animal production contains particles of feces, among other organic materials, which contain AM residues, which remain in suspension and are disseminated through the environment by air currents or individual's movement. Sulfachloropyridazine (SCP) is an AM of the sulfonamide family, which is widely used in the poultry industry, and it is excreted through the droppings of broiler chickens treated with it, thus contaminating the productive environment, which is understood as "all manure, bedding, housing or other animals present".

To evaluate the spread of residues from groups of animals orally treated with SCP to sentinel groups, 3 experimental groups were available (A, B.1 and B.2) and 1 control group (C) of 10 Broiler chickens each, bred under controlled conditions. Group A was treated with a commercial formulation of 10% sodium SCP for 5 days, while the other two groups were not treated and were in an adjacent pen (B.1) and in a pen 30 cm away (B.2) from the treated group. Subsequently, samples of excreta were taken from all groups by cloacal stimulation on days 3, 6, 9, 12, 15 and 18 after the end of the treatment, and the concentrations of SCP residues in them were quantified by HPLC-MS/MS.

In group A, residual SCP concentrations were found up to day 15 post-treatment, which ranged from 18.62 to 718.17 µg/kg on average. On the other hand, in group B.1 and group B.2 SCP residues were detected in concentrations below the Limit of Quantification (LOQ), which lasted until day 12 post-treatment and day 3 post-treatment, respectively. A one-factor ANOVA was performed on the concentrations obtained from the 3 groups, obtaining a p-value below 0.05, so it was determined that there exists a difference between the study groups. Subsequently, a one-factor ANOVA was performed on the concentrations obtained in groups B.1 and B.2, obtaining a p-value greater than 0.05, establishing that there is no significant difference in the dissemination at the different distances applied.

Finally, it is concluded that there is dissemination of SCP into the productive environment from the droppings of a group of broilers treated with it, and that there is no significant difference in the dissemination of SCP under 30 cm distance from the treatment group.

Key words: antimicrobial residues, sulfachloropyridazine, droppings, dissemination, poultry industry, HPLC-MS/MS.

INTRODUCCIÓN

El incremento en la intensidad productiva de la industria avícola ha llevado a un aumento de enfermedades infecciosas que afectan a distintas especies de aves, debido al tipo de sistema productivo en el que se encuentran, el cual incluye condiciones de hacinamiento espacial, poca ventilación en corrales, exposición a estrés metabólico, entre otras (Hofmann *et al.*, 2020). Por este motivo, ha habido un aumento constante en las cantidades de antimicrobianos (AMs) utilizados en la industria como agentes terapéuticos y metafilácticos, los que, principalmente, se administran a través del alimento y agua, con el fin de asegurar un consumo constante del principio activo y así alcanzar su concentración plasmática efectiva (Deck *et al.*, 2012).

Dentro de los AMs más ampliamente utilizados en la industria avícola, se encuentra la sulfacloropiridazina (SCP). Esta molécula es un antimicrobiano de la familia de las sulfonamidas, y al administrarse junto a trimetoprim, logra mayor eficacia terapéutica, potenciando su efecto. Estas moléculas, se utilizan para tratar diversas enfermedades de origen bacteriano en la industria avícola, como la enfermedad crónica respiratoria complicada, salpingitis, colibacilosis, entre otras (Deck *et al.*, 2012).

El excesivo uso de este tipo de fármacos, tanto en medicina humana como en medicina veterinaria, ha causado un gran impacto en la salud pública, animal y ambiental a nivel mundial, debido a que son liberados hacia el ambiente producto de su baja biodisponibilidad oral, por mal manejo de desechos farmacéuticos asociados a la producción o por residuos en deyecciones de animales tratados con ellos, llegando así a suelos, flujos de aguas, aire y biota, lo que posteriormente podría contaminar aguas de consumo, zonas de cultivo y productos agrícolas (Agirrezabala *et al.*, 2016). La SCP es eliminada hacia el ambiente a través de deyecciones de pollos Broiler tratados con ella y debido a su baja persistencia en suelos, y a su carácter hidrofílico, pasa a aguas superficiales manteniéndose ahí por un mayor periodo de tiempo (Berendsen *et al.*, 2018). Estas deyecciones contaminadas con residuos de AMs, al utilizarse como abono en huertos y praderas o al usar aguas contaminadas con residuos para su riego, pueden bioacumularse en plantas y vegetales provocando alteraciones en su crecimiento y desarrollo, a su vez al utilizar estos vegetales como alimento para animales, se pueden bioacumular en músculo y otras matrices de origen animal, donde finalmente pueden llegar a humanos, pudiendo ocasionar reacciones adversas al principio activo (RAM),

efectos tóxicos variados y resistencia bacteriana a los antimicrobianos (García, 2013; Minden *et al.*, 2017; Stahl *et al.*, 2016).

Por lo demás, ciertas moléculas de AMs presentes en deyecciones de pollos tratados farmacológicamente, han contaminado el ambiente cercano (suelos, alimento y agua) llegando a ser consumidas por otros individuos no tratados farmacológicamente, encontrándose residuos de estas moléculas en las heces de estos últimos (Pokrant *et al.*, 2021^a). Esto se debe a que partículas de deyecciones de animales, las cuales contienen residuos de fármacos, están presentes en el polvo de las producciones avícolas, el cual permanece en suspensión y se puede diseminar mediante corrientes de aire, llegando así a superficies y alimentos, ocasionando que exista un consumo involuntario y subterapéutico de estas moléculas tanto en humanos como en animales (Lorenzoni y Hofstetter, 2020). Es así, como es preciso estudiar si estos residuos de SCP presentes en deyecciones, podrían a su vez contaminar a otros individuos mediante las condiciones ambientales asociadas a la producción avícola, determinando si la distancia es un factor crítico para el traspaso de residuos desde poblaciones tratadas farmacológicamente, hacia poblaciones centinelas.

Este estudio busca determinar si, luego de un tratamiento oral con SCP a pollos Broiler, existe contaminación desde sus residuos mediante las deyecciones presente en el polvo, hacia individuos no tratados o centinelas, ubicados en corrales contiguos y distanciados del corral de individuos experimentales tratados. **El análisis para determinar la presencia y cuantificación de SCP, se realizó mediante HPLC-MS/MS, método analítico instrumental de carácter sensible, selectivo y robusto para la determinación de residuos en diferentes matrices de origen animal** (Pokrant *et al.*, 2021^a), evaluando además si la distancia es un factor estadísticamente significativo para la detección de estos residuos en grupos de individuos centinelas.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. Uso de antimicrobianos en producción animal

La eficiencia en la implementación de la terapia antimicrobiana en la industria animal ha crecido rápidamente en el tiempo gracias al desarrollo tecnológico y científico, y a la necesidad de buscar nuevas herramientas terapéuticas efectivas para el tratamiento de diversas enfermedades animales, lo que ha permitido descubrir y/o sintetizar nuevas familias de estas moléculas las cuales son más efectivas y potentes, y nuevas formas de administrarlas (Fuentes, 2020).

En el ámbito de la medicina veterinaria y producción animal, existe un amplio uso de este tipo de fármacos con el fin de resguardar el bienestar animal y la eficiencia productiva mediante el control y prevención de enfermedades, lo que de igual manera, fomenta las buenas prácticas en producción animal (González, 2021). Hoy en día los AMs se administran en variados tipos de producciones animales, ya sea de carne o subproductos y en diferentes presentaciones comerciales (Van Boeckel *et al.*, 2015).

En los últimos años, la industria avícola ha potenciado su crecimiento a nivel mundial, debido a su bajo costo de producción, al aumento de los ingresos en países de menores recursos, y al aumento global de la demanda de proteínas de mejor calidad (OECD-FAO, 2021). A nivel nacional, representa una de las principales industrias agropecuarias del sector productivo animal y ha tenido un gran crecimiento en las últimas dos décadas, donde la producción ha crecido en un 119% a una tasa promedio anual del 4%, llegando a alcanzar una tasa de crecimiento en la faena y productos de consumo de un 8,7% en el tercer trimestre del año 2021, con respecto al mismo periodo del año 2020 (Giacomozzi, 2015; INE, 2021).

El aumento en los niveles productivos de la industria avícola se relaciona en sus inicios al uso de concentraciones terapéuticas y subterapéuticas de diferentes AMs, como promotores de crecimiento (Fuentes, 2020). Lo anterior, condujo al uso excesivo de estos fármacos, provocando problemas de salud pública, ambiental y animal, siendo uno de los más importantes la resistencia bacteriana a estas moléculas (Van Boeckel *et al.*, 2015).

2. Efectos negativos relacionados al uso de AMs

El uso de AMs genera presión de selección sobre las bacterias provocando que adquieran mecanismos de resistencia mediante mutación o adquisición de plasmidios, disminuyendo así su sensibilidad frente a estos AMs, ocasionando problemas en distintos ámbitos

productivos y de salud pública (Fuentes, 2020). En el año 2019, murieron alrededor de 5 millones de personas debido a infecciones bacterianas que no se pudieron tratar, producto de bacterias multirresistentes (Murray *et al.*, 2022). A su vez, estas bacterias pueden causar que para el año 2050, 28 millones de personas pasen a estado de pobreza debido a la imposibilidad y falta de recursos para tratar ciertas enfermedades infecciosas (Banco Mundial, 2016).

Además de la selección de bacterias resistentes, se encuentra su efecto sobre plantas y vegetales, donde pequeños residuos de AMs se pueden bioacumular en estos organismos, alterando su tasa fotosintética y su tiempo de crecimiento. Por otro lado, estos residuos pueden causar reacciones de hipersensibilidad, toxicidad, disrupción en el microbiota intestinal y/o resistencia bacteriana tanto en humanos como en animales (Minden, 2017). En el caso de las sulfonamidas, al llegar a masas de agua, pueden provocar mutagenicidad en animales acuáticos y fitotoxicidad en algas (García, 2013). Es por esto, que diferentes países han prohibido el uso de estas moléculas como promotores del crecimiento y han implementado normativas para su control (OPS, 2021).

3. Normativas regulatorias del uso de antimicrobianos

A nivel mundial se han aplicado normativas regulatorias nacionales y/o internacionales respecto a la utilización de AMs en la industria animal, acudiendo a diferentes herramientas para controlar el correcto uso de estas sustancias, como establecer un Límite Máximo Residual (LMR) y un periodo de carencia, los cuales son parámetros específicos para cada medicamento y especie animal respectivamente, asegurando que al momento de la faena este alimento sea inocuo para el consumidor (*Codex Alimentarius*, 2017). Cabe destacar que estos límites no se establecen para los subproductos provenientes de las producciones animales, tales como las deyecciones y las camas de pollos Broiler, las cuales contienen residuos de AMs y se utilizan como abono en producciones agrícola, lo que puede contaminar productos de origen vegetal destinados a consumo (Pokrant, *et al.*, 2021^b; Yévenes *et al.*, 2021).

En Chile se creó el Programa de Uso Responsable y Prudente de los AMs en la Producción Primaria Nacional, para así fomentar su correcto uso (SAG, 2022). Actualmente, según la Resolución exenta N°:6801/2017, está prohibido el uso de AMs como promotores del crecimiento animal, por lo que el uso de estos fármacos debe ser exclusivamente de manera terapéutica, metafiláctica o profiláctica, y deben ser

administrados por un médico veterinario, profesional que tiene el conocimiento necesario acerca de las funciones y restricciones de estos medicamentos (SAG, 2017).

4. Sulfonamidas

Las sulfonamidas son una familia de antimicrobianos ampliamente utilizada por diversos países (García, 2013). Estas moléculas actúan como antagonistas del ácido para-aminobenzóico (PABA), el cual participa en la síntesis del ácido fólico, necesario para la formación de ácidos nucleicos y consecuentemente la división y crecimiento del ADN bacteriano (Deck *et al.*, 2012).

Las sulfonamidas administradas por vía oral o parenteral son absorbidas rápidamente y tienen una amplia distribución debido a su unión a proteínas plasmáticas, alcanzando concentraciones séricas máximas (C_{max}) 1 a 3 horas post administración, luego se metabolizan en el hígado y son excretadas por vía renal, sin cambios en la molécula original y como conjugados de ácido acético (Deck *et al.*, 2012; Fuentes, 2020). El uso terapéutico común de estos fármacos es para tratar infecciones del sistema reproductor, de vías urinarias y vías respiratorias, entre otros (Deck *et al.*, 2012).

Un AM importante para la medicina veterinaria, en el grupo de las sulfonamidas, es la sulfacloropiridazina (SCP). La combinación de este AM con trimetoprim, tiene una mayor distribución y biodisponibilidad que otras sulfonamidas, potenciando su acción frente a enfermedades comunes presentes en los sistemas avícolas, como la aerosaculitis, coriza infeccioso e infecciones por *Staphylococcus sp.*, entre otras (Deck *et al.*, 2012).

5. Diseminación de antimicrobianos al ambiente

Las deyecciones provenientes de animales desde producciones pecuarias, (las cuales pueden contener residuos de distintas familias de AMs, incluyendo las sulfonamidas), al momento de su movilización ya sea por los mismos animales o por procedimientos de producción asociados, pueden vehiculizarse a través del polvo junto a otras partículas, entre ellas, cemento, material aislante, alimento, plumas y camas (Zhao *et al.*, 2010; Lorenzoni y Hofstetter, 2020). Estas partículas presentes en el polvo permanecen en suspensión, pudiendo dispersarse en el ambiente productivo debido a corrientes de aire y movimiento de individuos, llegando a superficies, paredes, comida y agua, donde pueden ser consumidas por trabajadores, personas en lugares aledaños u otros animales del plantel (Stahl *et al.*, 2016). Un estudio realizado por Pokrant *et al.* (2021^b) se determinó que, efectivamente, existe diseminación ambiental de moléculas de AMs, como las

oxitetraciclinas, desde deyecciones de pollos tratados hacia pollos que estaban en corrales contiguos y aledaños al corral del grupo tratado (individuos centinelas). Por otro lado, se han realizado diversos estudios donde se ha encontrado moléculas de SCP en heces o deyecciones de animales, es así como en un estudio realizado por Yévenes *et al.* (2018), donde se estudió la excreción de distintos AMs en el ambiente, provenientes de deyecciones de pollos Broiler, se determinó que la molécula de SCP es excretada mediante las deyecciones de aves tratadas, persistiendo en ellas y en el medio ambiente.

6. Detección de residuos de antimicrobianos

Existen variados métodos para cuantificar residuos de fármacos, de los cuales, un método confirmatorio es la Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento acoplado a un espectrómetro de masas en tándem (HPLC-MS/MS), donde el detector, el analito y la matriz de la muestra van a determinar la selectividad y sensibilidad del método. Esta técnica permite separar fragmentos iónicos por su relación masa/carga, lo que la ha convertido en un método sensible, selectivo y robusto para la detección y cuantificación de diversos AMs, tanto en heces como en otras matrices (Talero-Pérez *et al.*, 2014).

Considerando todos los antecedentes previamente expuestos es pertinente realizar un estudio sobre la diseminación medio ambiental que puede tener la SCP desde las deyecciones de pollos Broiler tratados farmacológicamente, con el fin de evaluar la posible contaminación en individuos centinelas ubicados a diferentes distancias, en el sistema productivo.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la diseminación ambiental de sulfacloropiridazina (SCP) desde deyecciones de pollos Broiler tratados oralmente hacia aves no tratadas (grupos centinelas).

Objetivos específicos

1. Determinar las **concentraciones residuales de SCP** en deyecciones de pollos Broiler tratados oralmente y en deyecciones de grupos centinelas.
2. Establecer **la magnitud de contaminación de residuos de SCP** desde un grupo de pollos Broiler tratados oralmente hacia dos grupos centinelas no tratados, ubicados a distintas distancias del grupo en tratamiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

La fortificación, extracción y análisis de las muestras se realizaron en el Laboratorio de Farmacología Veterinaria (FARMAVET) de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, que trabaja bajo la normativa ISO/IEC 17025:2017.

1. Animales experimentales

Se utilizaron 40 pollos Broiler machos de la línea genética Ross 308 (Ross®, Aviagen Inc., Huntsville, AL, E.E.U.U.), los que fueron adquiridos el día de su eclosión desde la empresa Agrosuper S.A. Estos animales fueron criados bajo condiciones controladas, con una temperatura ($25 \pm 5^\circ\text{C}$), humedad relativa (50-60%), con libre acceso al alimento y agua purificada, los que fueron analizados previamente para descartar la presencia de AMs, proporcionándoles las condiciones óptimas según los requerimientos descritos en el manual "*Ross Broiler Handbook*" (Ross, 2018).

Los animales permanecieron hasta una edad de 42 días en una unidad experimental, la cual contaba con cuatro corrales de madera, de 1m^2 cada uno, con una superficie de suelo liso de plástico y 10 cm de viruta de madera, previamente analizada para descartar la presencia de residuos de AMs, la cual fue utilizada como material aislante del frío y la humedad.

El proceso de manejo, mantención y sacrificio de los animales se hizo bajo las condiciones de bienestar animal aprobadas por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Chile, de acuerdo con lo establecido por AVMA: *Guidelines for the Euthanasia of Animals* 2020 (AVMA, 2020) y la Directiva 2010/63/EU. Según certificado N°22551-VET-UCH (CE, 2010) (Anexo 1).

2. Formulaciones farmacéuticas y administración

Durante 5 días, cada 24 horas, se administraron 30 mg/kg de Coliprim® (N° de registro oficial veterinario: 113), una formulación comercial de sulfacloropiridazina sódica al 10% en solución oral, que se encuentra presente en el Registro de Medicamentos de Uso Veterinario del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) para su administración en pollos Broiler (SAG, 2022).

3. Diseño experimental

Se trabajó con cuatro grupos (identificados como A, B.1, B.2 y C) de 10 pollos Broiler cada uno distribuidos aleatoriamente. Se trató individualmente al grupo A con 30 mg/Kg

de Coliprim® cada 24 hrs por 5 días, mediante sonda orogástrica, para asegurar la ingesta de la dosis completa. El grupo B.1 se encontraba en un corral contiguo al del grupo A y el grupo B.2 en cambio, se ubicó en un corral aledaño, a 30 cm del grupo A. Los grupos B.1 y B.2 no fueron tratados con SCP, y se utilizaron como grupos centinela del experimento. Finalmente, el grupo C fue el grupo control y se encontraba en un corral fuera del área de los de animales de estudio, para evitar contaminación con sulfacloropiridazina (Figura Nro. 1).

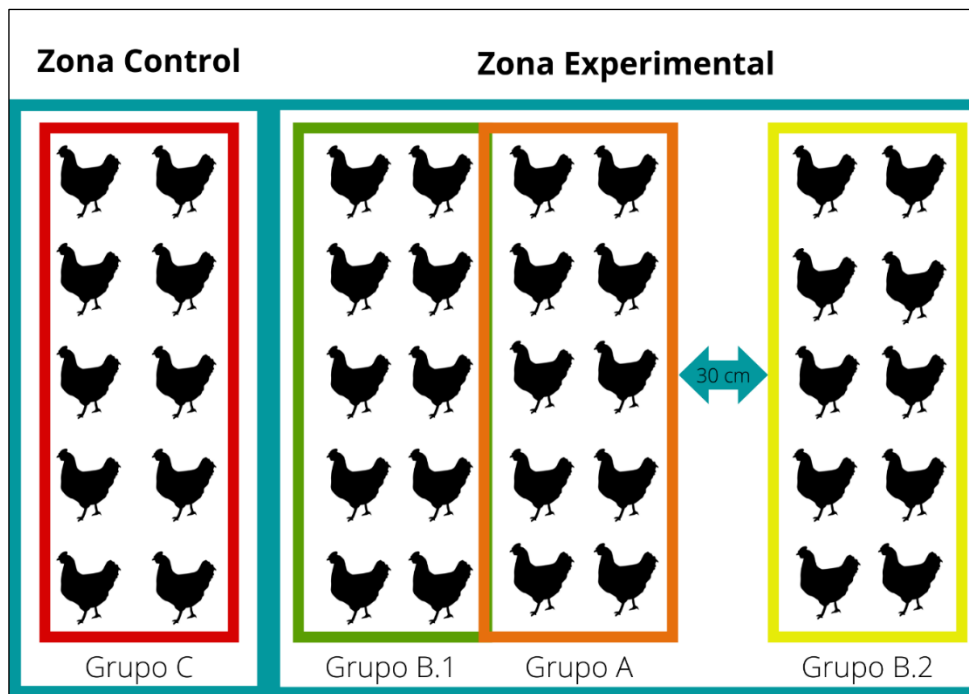


Figura Nro. 1: Distribución de la unidad experimental. Grupo A es el grupo tratado, grupo B.1 se encuentra en un corral contiguo al grupo A, grupo B.2 se encuentra a 30 cm del grupo A y grupo C es el grupo control, ubicado en la zona control.

4. Soluciones y reactivos

Para la extracción de SCP desde la matriz de heces se utilizó: agua grado HPLC (Millipore® o similar), solución buffer fosfato pH $4,0 \pm 0,1$ (EDTA/McIlvaine), Metanol grado HPCL (MERCK® o similar) y Acetonitrilo (MERCK® o similar).

Para realizar la solución tampón EDTA/McIlvaine se mezclaron 500 mL de la solución de ácido cítrico 0,1 M con 280 ml de fosfato disódico 0,2 M en un matraz de aforo clase A de 2 litros. Luego se añadieron 74,4 g de Na₂EDTA y 1 litro de agua HPLC, posteriormente se llevó a sonicar hasta que el Na₂EDTA estuviese disuelto. Finalmente, se ajustó a pH $4,0 \pm 0,1$ con solución de ácido cítrico 0,1 M o con tampón de fosfato 0,2 M.

Se utilizaron las siguientes fases móviles para la lectura instrumental de los analitos. Para la fase móvil A se debieron mezclar 750 mL de agua HPLC con 1000 µL de ácido fórmico puro y finalmente enrazar con agua en matraz aforado clase A. En cambio, para la fase móvil B, se debieron mezclar 375 mL de metanol con 500 µL de ácido fórmico puro, para finalmente enrazar con agua HPLC en matraz aforado clase A.

Como estándar interno se utilizó sulfametazina-fenil-13C6 hemihidratada (SMZ 13C6) obtenida de Sigma Aldrich®, de pureza certificada. Como solución stock se utilizó sulfacloropiridazina (CAS: 80-32-0) de pureza certificada. Ambos estándares, manufacturados por Dr. Ehrenstorfer™, fueron utilizados para la fortificación de muestras, controles y curvas de calibración asociados al análisis instrumental.

5. Obtención de las muestras

Se recolectaron 10 muestras diarias de deyecciones desde los individuos experimentales de cada grupo descrito mediante estimulación cloacal desde cada uno de los corrales; estas fueron homogeneizadas en tubos de polipropileno para posteriormente ser analizadas en triplicado. Las muestras fueron recolectadas los días 3, 6, 9, 12, 15 y 18 una vez terminado el tratamiento oral con SCP administrado al grupo A. Las muestras fueron rotuladas y almacenadas a -20°C hasta su procesamiento y posterior análisis cromatográfico. Para el trabajo con animales experimentales y el trabajo de laboratorio se consideraron las medidas de bioseguridad sugeridas en el Manual de Normas de Bioseguridad de CONICYT, versión 2018 (CONICYT, 2018) y del Comité de Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile (Anexo 2).

6. Tratamiento de muestras

Para la determinación de SCP desde deyecciones de pollos Broiler tratados, se pesó 1 ± 0.01 gramos de deyección en un tubo Falcon® de 50 mL y se agregó E.I. a todas las muestras para luego ser homogenizadas en vórtex antes de su extracción. Se les añadieron 8 mL de buffer McIlvaine-EDTA y después 2 mL de acetonitrilo. Luego de agitar por 10 min, sonicar por 5 min y centrifugar la muestra por 10 min a 6,722 g, se filtró el sobrenadante mediante tubos de microfibra de vidrio dispuestos en embudos y se transfirieron nuevamente a tubos Falcon®. Se agregaron 13 mL de buffer McIlvaine-EDTA para diluir las muestras, se agitaron 2 min en vortex y se centrifugaron por 5 min a 6,722 g. Las muestras se cargaron sobre las columnas de extracción en fase sólida (SPE) previamente acondicionadas con 5 mL de metanol y 5 mL de agua HPLC. Luego estas columnas se lavaron con 5 mL de agua grado HPLC y se secaron aplicando vacío. La

elución se hizo con 10 mL de metanol hacia tubos de vidrio y se evaporó bajo flujo de nitrógeno. Se reconstruyeron las muestras con 200 µL de metanol y 300 µL de agua, posterior a eso se agitaron 5 min en vortex, se sonicaron por 5 min y luego se centrifugaron 5 min a 2,539 g. Se transfirió la fase superior a un microtubo Eppendorf® y se centrifugaron 10 min a 8,299 g. Por último, las muestras se transfirieron a un vial mediante una jeringa usando filtros Millipore®, para así ser analizado por cromatografía líquida.

7. Análisis instrumental

Para la cuantificación de residuos de SCP se utilizó un cromatógrafo líquido (Agilent serie 1290), con una columna cromatográfica Sunfire™ C18 de 3,5 µm y 150 x 2,1 mm. Este cromatógrafo se encontraba acoplado a un espectrómetro de masa de triple cuadrupolo, modelo API 5500 (AB Sciex®, Darmstadt, Germany). El análisis instrumental se realizó con el software Analyst® versión 1.6.2.2 (Sciex®, Framingham, MA, USA).

8. Verificación y confirmación del método analítico

Para la verificación y confirmación del método analítico se utilizó un método validado para la matriz y el analito en cuestión (Pokrant *et al.*, 2021^a), esta verificación se realizó según las recomendaciones de la Decisión de la Comisión 2002/657/CE, de la “*Food and Drug Administration*” (CE, 2002).

Los parámetros para la confirmación del método analítico fueron:

- 1) Tiempo de retención (TR): Para esto se inyectaron 6 muestras de estándar de SCP analizando la variabilidad de sus TR, donde se aceptó un Coeficiente de variación (CV%) menor a 5% entre las muestras.
- 2) Especificidad: Se tomaron 20 muestras “blanco” obtenidas de diferentes orígenes, para determinar su TR y evaluar si existen interferentes en este.
- 3) Límite de detección (LOD): Se tomaron 20 muestras fortificadas al nivel del LOD seleccionado, donde la relación señal/ruido debía ser al menos 3:1 aceptando el parámetro si el CV% es menor al 25%.
- 4) Límite de cuantificación (LOQ): Se tomaron 20 muestras fortificadas al LOD y se estimó la desviación estándar de estas. Al LOD seleccionado, se le sumó 1,64 veces la desviación estándar obtenida. Se aceptó el parámetro si el LC cumplía con una relación señal ruido mínima de 10:1.

- 5) Linealidad: Se realizaron 3 curvas de calibración con 5 puntos de fortificación equidistante cada una, donde el punto más bajo fue el LOD. Se aceptó si el coeficiente de determinación R^2 era $\geq 0,95$ y con un CV% de sus pendientes menor al 25%.

9. Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico descriptivo de las cuantificaciones obtenidas de cada grupo. Las concentraciones obtenidas se llevaron a una escala semilogarítmica, en un gráfico de concentración versus tiempo y se realizó un análisis de regresión lineal de los 3 grupos experimentales, con el fin de estudiar la depleción del antimicrobiano en las deyecciones de los distintos grupos.

Para determinar si existía diferencia en los grupos evaluados según la distancia aplicada y según los días de muestreo, se realizó un análisis de varianza (ANOVA 1 factor) de las concentraciones obtenidas en el análisis de regresión. Finalmente, se realizó un diagrama de Tukey para visualizar las posibles diferencias entre las medias obtenidas de cada grupo.

RESULTADOS

Verificación y confirmación del método analítico

Tiempo de Retención y Especificidad

Los tiempos de retención de sulfacloropiridazina se mantuvieron constantes en los análisis, logrando tiempos cercanos a los 12 minutos para cada inyección. Se realizaron 6 repeticiones de drogas puras y 20 repeticiones de muestras blancos, donde no se encontraron interferentes en los tiempos de retención para el analito (Figura Nro. 2).

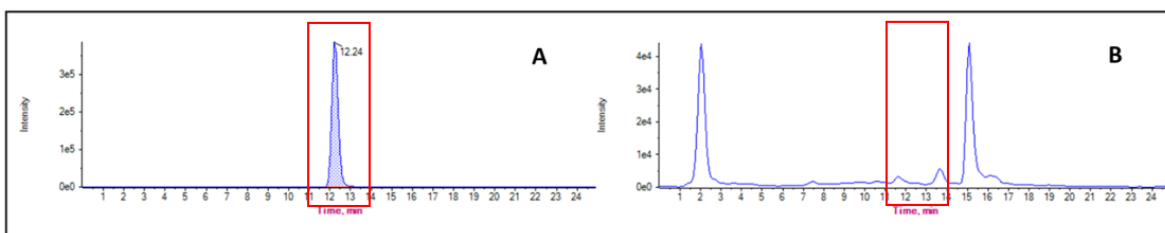


Figura Nro. 2: Cromatogramas de droga pura, representativo de 6 inyecciones (A), comparado con muestra blanco (B). Se observa que en los tiempos de retención de la droga no existen interferentes en las muestras.

Límite de Detección (LOD) y Límite de Cuantificación (LOQ)

Se determinó un LOD de 1 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ considerando que la relación señal/ruido fue mayor a 3:1 en esta concentración y el CV% fue de 0,0% siendo este menor al 25%. Para el cálculo del LOQ, al LOD se le sumó 1,64 veces la desviación estándar de la concentración de las muestras, dando un resultado de 4 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, siendo este mayor a la señal/ruido mínimo requerida de 10:1.

Linealidad

Las 3 curvas de 5 puntos realizadas presentaron un coeficiente de determinación mayor a 0,95. Los valores para las tres curvas fueron 0,985, 0,972 y 0,986 (Figura Nro. 3). El CV% de las pendientes de las curvas fue 11,36%, menor al 25%.

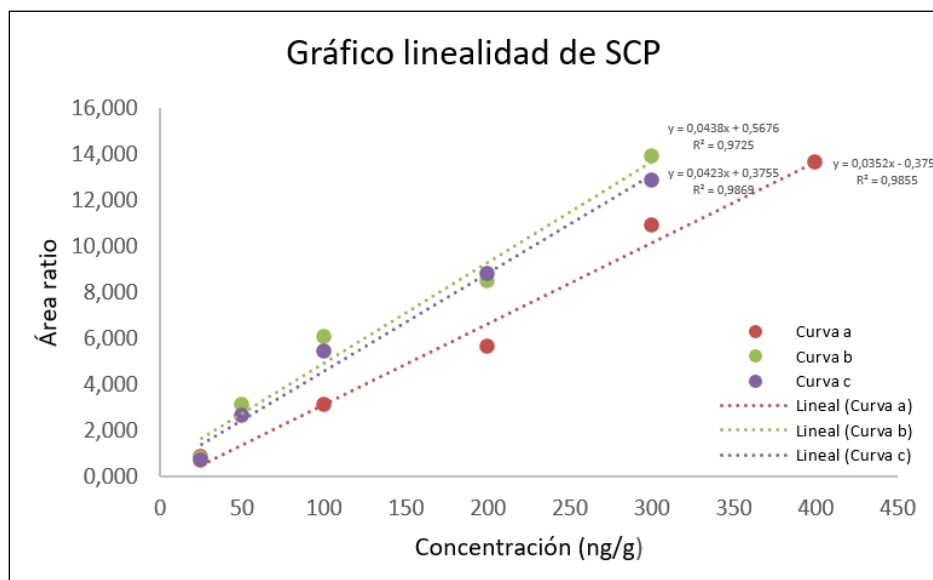


Figura Nro. 3: Linealidad. 3 curvas (a, b y c) de 5 puntos, sus coeficientes de determinación son mayores a 0,95.

1. Determinación de las concentraciones residuales de SCP

Para cada día de muestreo se calculó el promedio y desviación estándar de las muestras analizadas.

Grupo A (grupo tratado)

En el primer muestreo, es decir 3 días post tratamiento, se encontraron concentraciones de alrededor de 300 $\mu\text{g/Kg}$, lo que se encuentra sobre el LOQ (4 $\mu\text{g/Kg}$), luego al segundo muestreo estas concentraciones disminuyeron a 74 $\mu\text{g/Kg}$. El tercer muestreo hubo un aumento significativo de las concentraciones, incluso por sobre las concentraciones del muestreo N°1, encontrándose un promedio de 718 $\mu\text{g/Kg}$, posteriormente las concentraciones disminuyeron en el muestreo 4, encontrándose bajo el LOQ (4 $\mu\text{g/Kg}$), pero aumentaron nuevamente en el muestreo N°5 a una concentración 26 $\mu\text{g/Kg}$. Finalmente, en el sexto muestreo estas concentraciones se encontraron bajo el límite de detección por lo que se establecieron como N/D (no detectable) (Tabla Nro.1). En la Figura Nro. 4 se observan los gráficos descriptivos de las concentraciones del grupo A.

Tabla Nro. 1: Concentraciones de SCP en heces de pollos Broiler pertenecientes al grupo A (grupo tratado) medidas en $\mu\text{g/Kg}$, distribuidas por días de muestreo. N/D: No Detectable; N/A: No Aplica.

	Día 3 post tratamiento	Día 6 post tratamiento	Día 9 post tratamiento	Día 12 post tratamiento	Día 15 post tratamiento	Día 18 post tratamiento
Muestra 1	293,65	77,12	549,18	19,33	26,17	N/D
Muestra 2	298,85	76,37	734,88	18,40	27,52	N/D
Muestra 3	314,45	70,06	870,45	18,13	25,83	N/D
Promedio conc.	302,316	74,518	718,171	18,623	26,507	N/A
Desv. Estándar	10,82	3,87	161,28	0,63	0,89	N/A
CV%	3,58	5,20	22,46	3,38	3,37	N/A

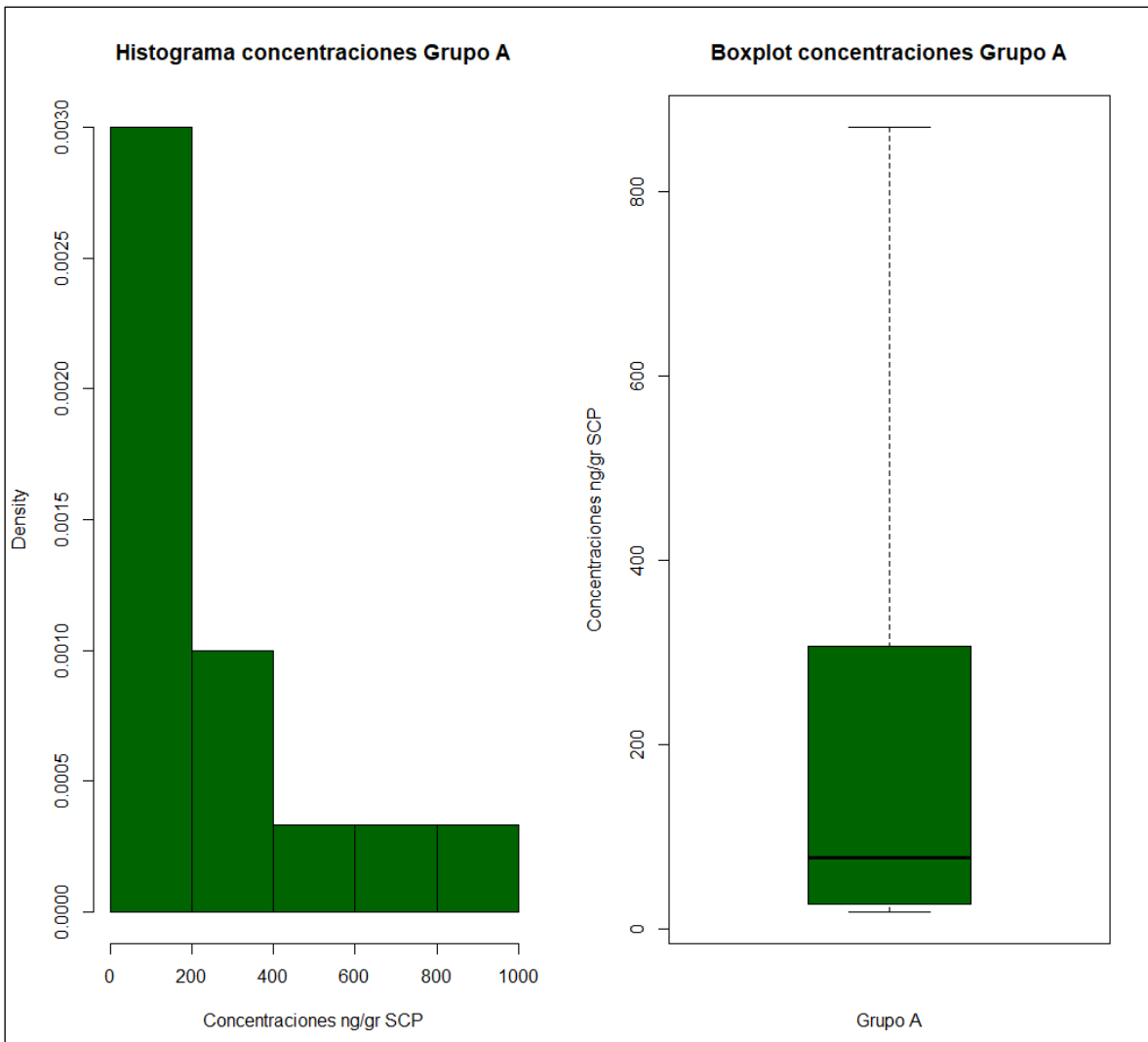


Figura Nro. 4: Gráficos descriptivos de las concentraciones del grupo A (grupo tratado). Histograma (izq.) y Boxplot (derecha).

Grupo B.1 (grupo contiguo)

En el caso del grupo B.1, las concentraciones comenzaron bajo el LOQ (4 µg/Kg) en 1,474 µg/Kg al primer día de muestreo, manteniéndose a 1,59 µg/Kg al muestreo N°2. Posteriormente, al día 9 post tratamiento, muestreo N°3, no se alcanzó a detectar 1 µg/Kg en promedio, pero al cuarto muestreo estas concentraciones aumentaron a 2,0 µg/Kg. Finalmente, en el muestreo 5 y 6 las concentraciones se encontraron bajo el LOD, determinándose que las muestras eran N/D (Tabla Nro. 2). En la Figura Nro. 5 se observan los gráficos descriptivos de las concentraciones del grupo B.1.

Tabla Nro. 2: Concentraciones de SCP en heces de pollos Broiler pertenecientes al grupo B.1 (grupo contiguo) medidas en µg/Kg, distribuidas por días de muestreo. N/D: No Detectable; N/A: No Aplica.

	Día 3 post tratamiento	Día 6 post tratamiento	Día 9 post tratamiento	Día 12 post tratamiento	Día 15 post tratamiento	Día 18 post tratamiento
Muestra 1	1,72	N/D	N/D	1,87	N/D	N/D
Muestra 2	1,35	3,21	N/D	1,87	N/D	N/D
Muestra 3	1,35	N/D	N/D	2,27	N/D	N/D
Promedio conc.	1,474	1,598	N/A	2,005	N/A	N/A
Desv. Estándar	0,21	1,41	N/A	0,23	N/A	N/A
CV%	14,55	88,01	N/A	11,52	N/A	N/A

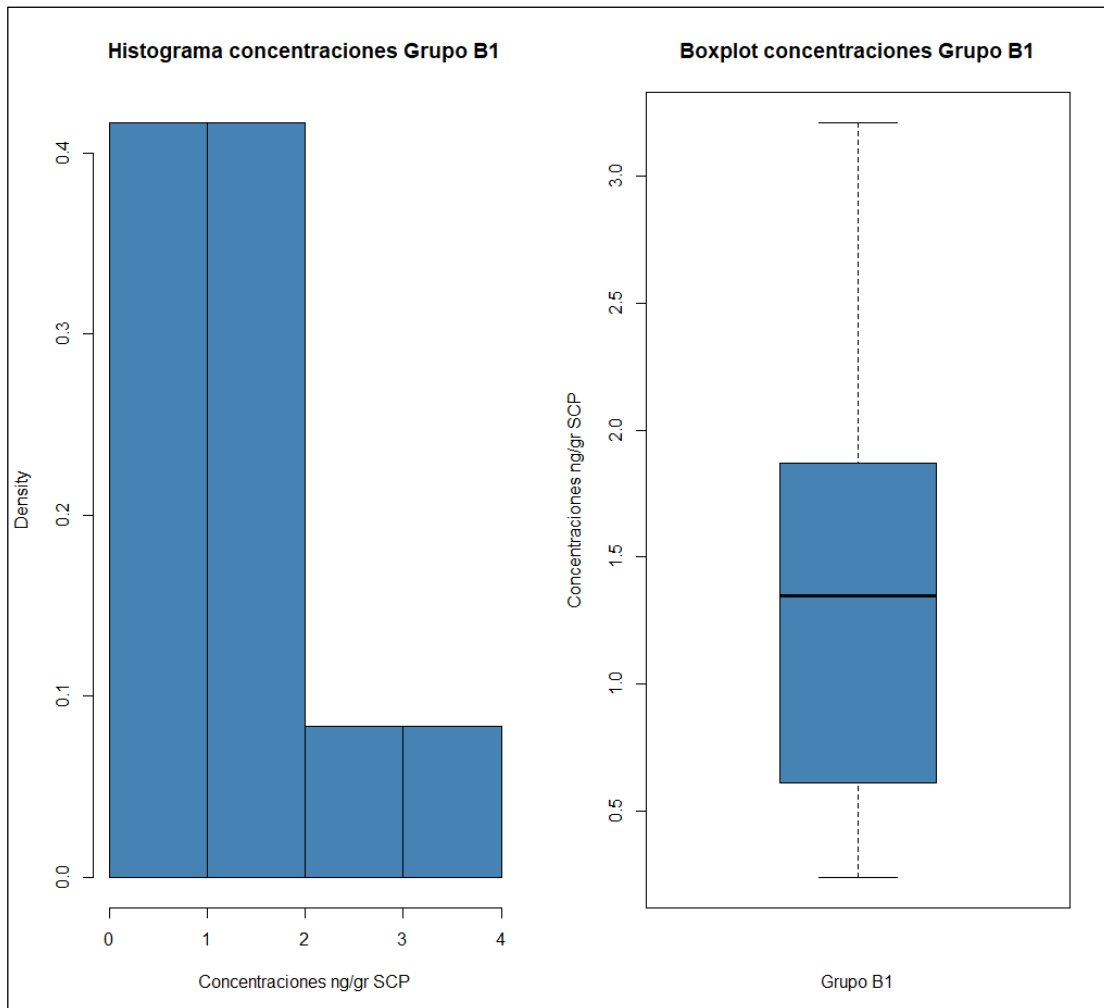


Figura Nro. 5: Gráficos descriptivos de las concentraciones del grupo B.1 (grupo contiguo). Histograma (izq.) y Boxplot (derecha).

Grupo B.2 (grupo a 30 cm)

Las concentraciones en el grupo B.2 al primer día de muestreo estuvieron sobre el LOD siendo 2,46 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ en promedio, luego disminuyeron hasta encontrarse bajo el LOD, por lo que se determinaron como “No Detectables” (N/D), lo que se mantuvo durante el resto de los muestreos (Tabla Nro. 3). En la Figura Nro. 6 se observan los gráficos descriptivos de las concentraciones del grupo B.2.

Tabla Nro. 3: Concentraciones de SCP en heces de pollos Broiler pertenecientes al grupo B.2 (grupo a 30 cm) medidas en $\mu\text{g}/\text{Kg}$, distribuidas por días de muestreo. N/D: No Detectable; N/A: No Aplica.

Día 3 post Día 6 post Día 9 post Día 12 post Día 15 post Día 18 post

	tratamiento	tratamiento	tratamiento	tratamiento	tratamiento	tratamiento
Muestra 1	2,46	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
Muestra 2	1,72	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
Muestra 3	3,21	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
Promedio conc.	2,464	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Desv. Estándar	0,74	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
CV%	30,14	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

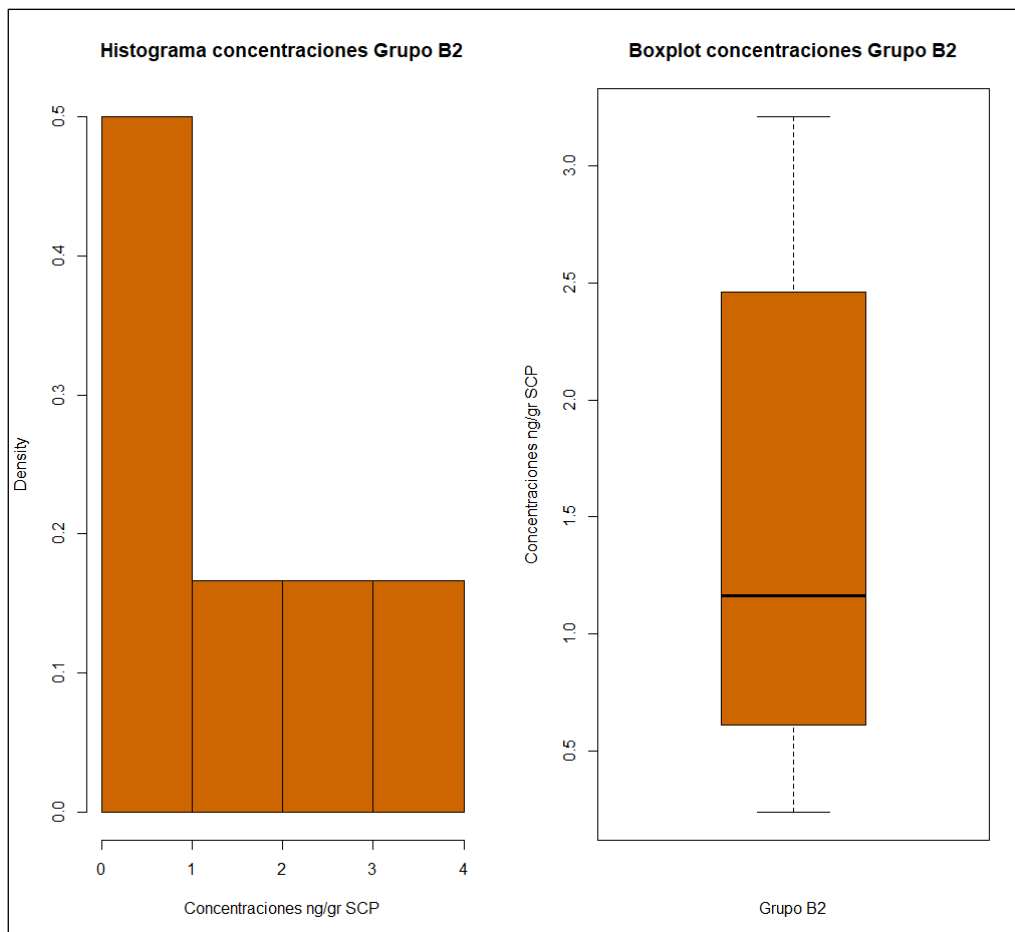


Figura Nro. 6: Gráficos descriptivos de las concentraciones del grupo B.2 (grupo a 30 cm). Histograma (izq.) y Boxplot (derecha).

2. Magnitud de contaminación de residuos de SCP

Se realizó la prueba de Shapiro-Wilk para evaluar si las muestras distribuían de forma normal, donde se estableció un valor de significancia de 0,05. En el grupo A, la prueba dio un p-valor de $0,0001573 < 0,05$; en el grupo B.1, la prueba dio un p-valor de $0,01429 < 0,05$ y en el grupo B.2, la prueba dio un p-valor de $0,000005729 < 0,05$. Por lo que, ninguna de las concentraciones de los grupos experimentales distribuye de forma normal.

Luego se realizó un análisis de varianza (ANOVA 1 factor) de las concentraciones obtenidas en los 3 grupos experimentales. Donde se estimó si hubo diferencia entre los grupos en cuestión. En este análisis el p-valor fue de 0,000514, por lo que al ser menor al valor de significancia (0,05), se rechaza la hipótesis nula (H_0), estableciendo que las medias de las concentraciones entre los grupos no son iguales. Posteriormente, para tener una mejor visualización de la situación, se realizó un análisis de varianza (ANOVA 1 factor) entre los grupos centinela (B.1 y B.2), donde el p-valor fue de 0,207 siendo este mayor al valor de significancia, por lo que en este caso se acepta la H_0 , estableciendo que no hay diferencia entre las medias de estos 2 grupos.

Para visualizar las diferencias entre las cinéticas de los datos obtenidos, se realizó un Diagrama de Tukey, en el cual se aprecia que existe una diferencia negativa entre los grupos 2-1 y los grupos 3-1, pero que el intervalo 3-2 pasa por el punto 0, indicando que no hay diferencia estadística entre ellos (Figura Nro. 7).

*grupo 1 corresponde al grupo A; grupo 2 corresponde al grupo B.1; grupo 3 corresponde a grupo B.2.

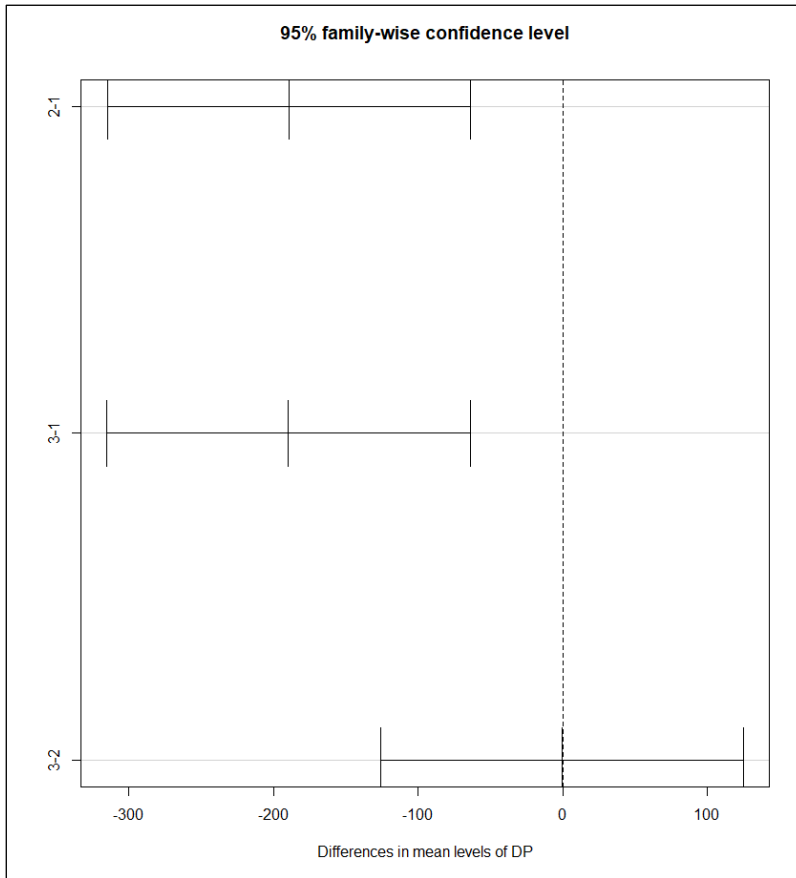


Figura Nro. 7: Diagrama de Tukey de las concentraciones de los grupos. Intervalo de confianza 2-1 corresponde al intervalo entre grupos B.1-A, intervalo 3-1 corresponde al intervalo entre grupos B.2-A, e intervalo 3-2 corresponde al intervalo entre grupos B.2-B.1.

DISCUSIÓN

Las concentraciones residuales de SCP detectadas y cuantificadas en deyecciones de pollos Broiler en los 3 grupos experimentales de este estudio, presentaron una cinética de depleción de sus concentraciones, desde el término del tratamiento, siendo esta errática en al menos un muestreo en los grupos A y B1, con concentraciones mayores a las indicadas por el modelo cinético calculado. En el grupo A, se encontró que el 3er día de muestreo existieron concentraciones mayores al promedio del 1er día, no siendo compatible con el modelo cinético teórico presentado en la ecuación de la recta de la depleción calculada.

Esta fluctuación en las concentraciones se podría explicar debido a distintos factores presentes en este estudio, donde el ambiente y el comportamiento normal de las aves cumplen un rol principal, debido a que estos animales realizan baños de polvo y aletean, lo que provoca levantamiento de materia orgánica presente en los corrales, diseminándose por el ambiente productivo, el cual abarca animales, camas y estiércol, lo que puede provocar un ingreso o en el caso del grupo en tratamiento, un reingreso del medicamento a los animales (Bos *et al.*, 2003). A su vez, puede existir una recirculación o reabsorción del medicamento administrado, lo que provocaría una reaparición de los residuos en sus deyecciones a concentraciones erráticas o fuera de la cinética de depleción general (de Assis *et al.*, 2016).

En el caso de los grupos B.1 y B.2, los cuales no fueron tratados con SCP, de igual manera hubo detección del residuo en las deyecciones de estos animales, lo que podría estar asociado a distintos factores. La excreción de la molécula de SCP a partir de los pollos tratados, es lenta y puede variar entre el 45 al 96%, lo que permite su constante eliminación desde el individuo hacia el ambiente, aportando más residuos del principio activo al lugar de crianza de los animales. Por otro lado, las sulfonamidas tienen un tiempo de degradación del 90% del AM en suelos de hasta 38 días, por lo que tienen una gran persistencia en el medio ambiente productivo, siendo esta la potencial vía de diseminación de este AM a estos grupos centinelas de pollos, los cuales se encontraban en la misma zona experimental, asociándolo además a las conductas propias de la especie (Peng *et al.*, 2016; Sumano y Gutiérrez, 2010; Berendsen *et al.*, 2018)

Esta excreción de AM a partir de tratamientos ha llevado a realizar diversos estudios (Hu *et al.*, 2008; Hou *et al.*, 2015; Karci y Akmehmet, 2009) en los que se han tomado muestras de estiércol de planteles avícolas y se han detectado concentraciones de AM de

distintas familias, incluyendo la SCP. En todos estos estudios se asume que estos residuos de AM provienen de tratamientos farmacológicos previos en los planteles, lo que es concordante con el presente estudio, ya que la molécula es excretada a partir de los individuos tratados, permaneciendo en el ambiente y diseminándose en este por movimiento de individuos, aleteos, baños de polvo y/o corrientes de aire (Conde-Cid *et al.*, 2018).

Se encontraron residuos de SCP en heces hasta el día 15 post tratamiento en el grupo A. En un estudio anterior (Pokrant *et al.*, 2021^a), en el cual se administraron individualmente 5 AMs (oxitetraciclina, enrofloxacino, florfenicol, tilosina y sulfacloropiridazina) se determinaron concentraciones de SCP sobre el LOQ hasta 30 días post tratamiento, utilizando la misma dosis y vía de administración del presente estudio. Estas diferencias en los tiempos de depleción de la molécula en deyecciones se podrían explicar por contaminación entre los grupos, habiendo interacciones de la SCP con los otros AMs, lo que podría alterar su farmacocinética. La interacción entre AMs puede afectar diferentes parámetros farmacocinéticos de la molécula como la absorción de ellos, su biodisponibilidad, su metabolización, distribución y en su excreción. Esto es debido a que puede cambiar la microbiota del sistema o el pH gastrointestinal, cambiando tanto su absorción como su biodisponibilidad, lo que finalmente afecta la excreción de ellos (Pino *et al.*, 2018). Además, la condición individual de a quienes se les administran estos medicamentos puede influir en su farmacocinética y farmacodinámica como, por ejemplo, la deshidratación por presencia de diarrea, la cantidad de tejido adiposo que contiene el animal, la cantidad de proteínas para la unión de ciertos medicamentos, la diferencia de alimentación o la alteración del sistema enzimático para metabolizarlos. Todo esto puede influir en que la molécula haya tenido un mayor tiempo de depleción en deyecciones, que en el presente estudio (Pino *et al.*, 2018).

Para el análisis de varianza (ANOVA) calculado, se obtuvo un p-valor de 0,000514, con un valor de significancia de 0,05, por lo que se determinó que los grupos experimentales no son iguales. Al realizar un segundo análisis, esta vez tomando solo los grupos B.1 y B.2, se obtuvo un p-valor de 0,207, con el mismo valor de significancia, el fin de este segundo análisis era determinar si existía diferencia en la diseminación a las distintas distancias. Por lo que, finalmente se estimó que el grupo A es el único con una diferencia significativa de las concentraciones de SCP y respecto a la diseminación, no hay diferencias estadísticas bajo los 30 cm de distancia del grupo en tratamiento.

CONCLUSIÓN

Se detectaron concentraciones de SCP en las deyecciones de los 3 grupos experimentales, donde los valores para el grupo A tuvieron un máximo de 870 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y perduraron hasta aproximadamente el día 15 post tratamiento, mientras que los del grupo B.1 y B.2 oscilaron entre 1 y los 3 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, perdurando hasta el cuarto y el primer día de muestreo, respectivamente.

Las concentraciones obtenidas en este estudio demostraron que, existe diseminación ambiental de SCP desde las deyecciones de un grupo de pollos Broiler tratados con ella, hacia grupos de pollos centinelas, los cuales no habían sido tratado y se encontraban a distintas distancias del grupo en tratamiento.

El estudio estadístico realizado indicó que hay diferencias entre las concentraciones de los 3 grupos experimentales, pero que no hay diferencia significativa entre las distancias aplicadas, es decir, que la diseminación de SCP ocurre de igual manera en animales que se encuentran en corrales contiguos como los que se encuentran a 30 cm del grupo en tratamiento.

Se concluye que la sulfacoloropiridazina se puede diseminar por el ambiente productivo, entendiéndose este como “todo estiércol, cama, alojamiento u otros animales presentes” (Bos *et al.*, 2003), pudiendo ser ingerido por animales en el mismo plantel y posteriormente ser excretado por esto, aportando al ciclo del antimicrobiano en el ambiente.

Es recomendable realizar futuros estudios con respecto a la distancia que puede alcanzar la diseminación de la SCP en el ambiente y así determinar una distancia en la que se asegura que no se detectaran residuos del AM en cuestión. A su vez, se deberían desarrollar medidas de contención y prevención relacionadas a la diseminación de residuos de AMs y mantener una vigilancia activa de ellos dentro de los planteles avícolas, aportando así a mantener la inocuidad de los productos derivados de la industria.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- **AVMA. AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION.** 2020. *AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2020 Edition.* AVMA. Illinois, Estados Unidos. 121p.
- **AGIRREZABALA, J.; AIZPURUA, I.; ALBIZURI, M.; ALFONSO, I.; ARMENDÁRIZ, M.; ASENSIO, A.; BARRONDO, S.; CALLÉN, M.; DOMINGO, S.; ELOLA, M.; ETXEBERRIA, A.; FERNÁNDEZ, J.; GIMÉNEZ, A.; GÓMEZ, N.; IBARRA, E.; IGLESIAS, J.; IRIBAR, J.; JAIO, N.; LEKUE, I.; LÓPEZ, M.; MARTÍNEZ, J.; MENDIZABAL, A.; MOZO, C.; OLLOQUIEGI, E.; RUIZ DE VELASCO, E.; SAINZ DE ROZAS, R.; VALVERDE, E.** 2016. *Farmacontaminación. Impacto ambiental de los medicamentos.* INFAC 24 (10).
- **BANCO MUNDIAL.** 2016. Para 2050, las infecciones resistentes a los medicamentos podrían causar daños económicos similares a los de la crisis financiera de 2018. [en línea] <<https://www.bancomundial.org/es/news/press-release/2016/09/18/by-2050-drug-resistant-infections-could-cause-global-economic-damage-on-par-with-2008-financial-crisis>> [consulta: 26-04-2022].
- **BERENDSEN, B.; LAHR, J.; NIBBELING, C.; JANSEN, L.; BONGERS, I.; WIPFLER, E.; VAN DE SCHANS, M.** 2018. *The persistence of a broad range of antibiotics during calve, pig and broiler manure storage.* *Chemosphere*, 204, 267-276.
- **BOS, B.; GROOT KOERKAMP, P.; GROENESTEIN, K.** 2003. *A novel design approach for livestock housing based on recursive control—With examples to reduce environmental pollution.* *Livest. Prod. Sci.* 84(2): 157-170.
- **CE, COMISIÓN EUROPEA.** 2002. Comisión 2002/657/CE Diario oficial de la Unión Europea. 221:8-36.
- **CE, COMISIÓN EUROPEA.** 2010. Directiva 2010/63/UE. Diario oficial de la Unión Europea. L 276: 33-79.
- **CODEX ALIMENTARIUS.** 2017. CAC/MRL 2–2017. [en línea] <<https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/maximum-residue-limits/es/>> [consulta: 28-07-2022].
- **CONDE-CID, M.; ÁLVAREZ-ESMORÍS, C.; PARADELO-NÚÑEZ, R.; NÓVOA-MUÑOZ, JC.; ARIAS-ESTÉVEZ, M.; ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ, E.; FERNÁNDEZ-SANJURJO, MJ.; NÚÑEZ-DELGADO, A.** 2018. *Occurrence of tetracyclines and sulfonamides in manures,*

agricultural soils and crops from different areas in Galicia (NW Spain). *J. Clean. Prod.* 18(10-11):953-1124.

-CONICYT. COMISIÓN NACIONAL DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA. 2018. Manual de normas de bioseguridad y riesgos asociados. Fondecyt- CONICYT. Versión 2018. Santiago, Chile. 209 p.

-DE ASSIS, D.; DA SILVA, G.; PEREIRA, I.; DOS SANTOS, A.; QUINTAO, A.; CAMARGOS, L.; CHAVES, T.; DE VASCONCELOS, S. 2016. *Evaluation of the presence and levels of enrofloxacin, ciprofloxacin, sulfaquinoxaline and oxytetracycline in Broiler chickens after drug administration*. *PLoS ONE* 11(11): e0166402.

-DECK, D.; WINSTON, L. 2012. *Sulfonamides, Trimethoprim, & Quinolones*. In: Katzung, B; Masters, S; Trevor, A. 12th ed. McGraw Hill. San Francisco, USA. 831 p.

-FUENTES, V. 2020. Antibióticos. In: Farmacología Veterinaria 2020. Universidad de Guadalajara. Guadalajara, México. pp. 49-214.

-GARCIA, M.J. 2013. Estudio de la presencia y comportamiento de las sulfonamidas en el medio ambiente. Tesis Químico Analítico. Barcelona, España. Universidad de Barcelona. 389 p.

-GIACOMOZZI, J. 2015. Actualización el mercado avícola. Oficina de estudios y políticas agrarias, ODEPA. <<https://www.odepa.gob.cl/wp-content/uploads/2015/04/Aves2015.pdf>> [consulta: 26-04-2022].

-GONZÁLEZ, P. 2021. Regulación del uso de antibióticos en la industria agropecuaria. In: Biblioteca del Congreso Nacional de Chile. [en línea] <https://obtienearchivo.bcn.cl/obtienearchivo?id=repositorio/10221/32143/1/Regulacion_antibioticos_en_carnes.pdf> [consulta: 26-04-2022].

-HOFMANN, T.; SCHMUCKER, S.; BESSEI, W.; GRASHORN, M.; STEFANSKI, V. 2020. *Impact of housing environment on the system in chickens: A review*. *Animals*, 10(7): 1138.

-HOU, J.; WAN, W.; MAO, D.; WANG, C.; MU, Q.; QIN, S.; LOU, Y. 2015. *Occurrence and distribution of sulfonamides, tetracyclines, quinolones, macrolides, and nitrofurans in livestock manure and amended soils of Northern China*. *Environ Sci Pollut Res.* 22:4545–4554.

- HU, X.; LOU, Y.; ZHOU, Q.; XU, L.** 2008. *Determination of Thirteen Antibiotics Residues in Manure by Solid Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography*. *Chin J Anal Chem*. 36(9):1162–1166.
- INE. INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA.** 2021. Producción de Broilers registró un aumento interanual de 4,0% en el trimestre julio-septiembre de 2021. [en línea] <[https://www.paho.org/es/noticias/17-11-2021-avanza-concientizacion-sobre-uso-adecuado-antimicrobianos-industria](https://www.ine.cl/prensa/detalle-prensa/2021/11/03/producci%C3%B3n-de-broilers-registr%C3%B3-un-aumento-interanual-de-4-0-en-el-trimestre-julio-septiembre-de-2021#:~:text=En%20el%20trimestre%20julio%2Dseptiembre%20de%202021%2C%20un%20total%20de,mismo%20per%C3%ADodo%20del%20a%C3%B1o%20anterior.> [consulta: 01-07-2022].</p>
<p>-KARCI, A.; AKMEHMET, I. 2009. Investigation of the tetracycline, sulfonamide, and fluoroquinolone antimicrobial compounds in animal manure and agricultural soils in Turkey. <i>Sci. Total Environ</i>. 407: 4652–4664.</p>
<p>-LORENZONI, G.; HOFSTETTER, D. 2020. El Polvo en la Avicultura. Pennsylvania, USA. <i>College of Agricultural Sciences, The Pennsylvania State University</i>.</p>
<p>-MINDEN, V.; DELOY, A.; VOLKERT, A.; LEONHARDT, S.; PUFAL, G. 2017. <i>Antibiotics impact plant traits, even at small concentrations</i>. <i>AoB PLANTS</i>, 9(2).</p>
<p>-MURRAY, C; IKUTA, K; SHARARA, F; SWETSCHINSKI, L; ROBLES AGUILAR, G; GRAY, A.; HAN, C.; BISIGNANO, C.; RAO, P.; WOOL, E.; JOHNSON, S.; BROWNE, A.; CHIPETA, M.; FELL, F.; HACKETT, S.; HAINES-WOODHOUSE, G.; KASHEF HAMADANI, B.; KUMARAN, E.; MCMANIGAL, B; ... NAGHAVI, M. 2022. <i>Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis</i>. <i>The Lancet</i>, 399 (10325): 629-655.</p>
<p>-OECD-FAO. 2021. <i>OECD-FAO Agricultural Outlook 2021-2030</i>. <i>OECD Publishing</i>. París, Francia. 337 p.</p>
<p>-OPS. ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. 2021. Avanza la concientización sobre uso adecuado de antimicrobianos en la industria agropecuaria. [En línea] < [consulta: 30-01-2023].
- PENG, P.; WANG, Y.; LIU, L.; ZOU, Y.; LIAO, X.; LIANG, J.; WU, Y.** 2016. *The excretion and environmental effects of amoxicillin, ciprofloxacin, and doxycycline residues in layer chicken manure*. *Poult. Sci. J.* 95(5):1033-1041.

- PINO, D.; MADRIGAL, J.; AMARILES, P.** 2018. Relevancia clínica de interacciones de antibióticos relacionadas con cambios en la absorción: revisión estructurada. *CES Med.* 32(3): 235–249.
- POKRANT, E; TRINCADO, L; YÉVENES, K; TERRAZA, G.; MADDALENO, A.; MARTÍN, B.; ZAVALA, S.; HIDALGO, H.; LAPIERRE, L.; CORNEJO, J.** 2021^a. *Determination of five antimicrobial families in droppings of therapeutically treated broiler chicken by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Poult. Sci. J.* 100(9): 101313.
- POKRANT, E.; YÉVENES, K.; TRINCADO, L.; TERRAZA, G.; GALARCE, N.; MADDALENO, A.; MARTÍN, B. S.; LAPIERRE, L.; CORNEJO, J.** 2021^b. *Evaluation of Antibiotic Dissemination into the Environment and Untreated Animals, by Analysis of Oxytetracycline in Poultry Droppings and Litter. Animals.* 11(3): 853.
- ROSS.** 2018. *Ross Broiler Management Handbook.* [En línea] <http://en.aviagen.com/assets/Tech_Center/Ross_Broiler/Ross-BroilerHandbook2018-EN.pdf > [consulta: 14-06-2020].
- SAG. SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO.** 2017. Resolución exenta N°:6801/2017. Establece requisitos para el registro, comercialización y uso de antimicrobianos. 22 noviembre 2017.
- SAG. SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO.** 2022. Resolución N°:1.129/2022, Crea el programa de uso responsable y prudente de antimicrobianos en la producción primaria. 4 marzo 2022.
- SAG. SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO.** 2022. Sistema de medicamentos veterinarios. [en línea] <https://medicamentos.sag.gob.cl/ConsultaUsrPublico/BusquedaMedicamentos_1.asp> [consulta: 15-07-2022].
- STAHL, J.; ZESSEL, K.; SCHULZ, J.; FINKE, J.; MULLER-GOYMANN, C.; KIETZMANN, M.** 2016. *The effect of miscellaneous oral dosage forms on the environmental pollution of sulfonamides in pig holdings. BMC Vet. Res.* 12(1): 68.
- SUMANO, H.; GUTIÉRREZ, L.** 2010. *Farmacología Clínica en Aves Comerciales.* 4ta ed. Interamericana Mc-Graw-Hill. DF, México. 713 p.

-TALERO-PÉREZ, Y.; MEDINA, O.; ROZO-NÚÑEZ, W. 2013. Técnicas analíticas contemporáneas para la identificación de residuos de sulfonamidas, quinolonas y cloranfenicol. *Univ. Sci.* 19(1): 11-28.

-VAN BOECKEL, T.; BROWER, C.; GILBERT, M.; GRENFELL, B.; LEVIN, S.; ROBINSON, T.; TEILLANT, A.; LAXMINARAYAN, R. 2015. *Global trends in antimicrobial use in food animals. Proc. Acad. Nat. Sci.* 112(18): 5649-5654.

-YÉVENES, K.; POKRANT, E.; TRINCADO, L.; LAPIERRE, L.; GALARCE, N.; MARTÍN, B. S.; MADDALENO, A.; HIDALGO, H.; CORNEJO, J. 2021. *Detection of Antimicrobial Residues in Poultry Litter: Monitoring a Risk through a Selective and Sensitive HPLC-MS/MS Method. Animals.* 11(5): 1399.

-ZHAO, L.; DONG, Y. H.; WANG, H. 2010. *Residues of veterinary antibiotics in manures from feedlot livestock in eight provinces of China. Sci Total Environ.* 408(5):1069-1075.

ANEXOS

Anexo N°1: Certificado del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Chile.



Santiago, 22 de abril de 2022
Certificado N°: 22551 – VET – UCH

CERTIFICADO

El Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Chile, certifica que en el Protocolo **5-2022** del Proyecto de Investigación titulado **“Diseminación de residuos de antimicrobianos hacia el entorno de animales productores de alimentos y sus riesgos asociados: Un estudio comprensivo de un peligro emergente en un sistema productivo intensivo”**, de la investigadora **Dra. Javiera Cornejo**, Profesora Asociada, Departamento de Medicina Preventiva Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, no se plantean acciones en sus procedimientos que contravengan las normas bioéticas de manejo y cuidado de animales. Así mismo, la metodología experimental planteada satisface lo estipulado en el Programa Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Chile.

La investigadora se ha comprometido a la ejecución de este proyecto dentro de las especificaciones señaladas en el protocolo revisado y autorizado por el CICUA, a mantener los procedimientos experimentales planteados y a no realizar ninguna modificación sin previa aprobación por parte de este Comité.

Se otorga la presente certificación para el uso de **160 pollos broiler**, genética Ross 308, provenientes de **Agrícola Chorombo S.A. y Agrosuper**, desde el **2 de mayo del 2022 hasta el 30 de abril del 2024**, tiempo estimado de ejecución del estudio, el cual será financiado por el proyecto **FONDECYT Regular N° 1220520**.

El CICUA de la Universidad de Chile, forma parte de la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo, y está constituido por 53 miembros: 5 médicos veterinarios, 39 académicos (12 de ellos médicos veterinarios), y 9 miembros no asociados a la academia o investigación, y que cuentan con experiencia en bioética relacionada a mantención y uso de animales. El certificado que emite el Comité procede de la aprobación del “Protocolo de Manejo y Cuidado de Animales” después de un estudio acucioso y de la acogida de los investigadores de las observaciones exigidas por el Comité.

Claudia Delgado Acevedo
Directora Ejecutiva
CICUA – VID
Universidad de Chile



Dr. Emilio Herrera Videla
Presidente
CICUA - VID
Universidad de Chile

Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA)
Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo (VID) – Universidad de Chile
<http://www.uchile.cl/portal/investigacion/152120/comite-institucional-de-cuidado-y-uso-de-animales-cicua>
email: coordinador.cicua@uchile.cl

Anexo N°2: Certificado de Bioseguridad.



CERTIFICADO N° 177


Santiago, 05 de abril de 2022.-

El Comité de Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile ha revisado el proyecto Fondecyt Regular N°1220520. **"Diseminación de residuos de antimicrobianos hacia el entorno de animales productores de alimentos y sus riesgos asociados: Un estudio comprensivo de un peligro emergente en un sistema productivo intensivo"**, cuya investigadora responsable es la Dra. Javiera Cornejo Kelly, académica del Departamento de Medicina Preventiva Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

La evaluación del citado proyecto permite acreditar que las normas de bioseguridad que se encuentran descritas en el documento, son las adecuadas según las especificaciones contenidas en el "Manual de Normas Bioseguridad y Riesgos Asociados Fondecyt – CONICYT, versión 2018 y en el "Manual de Bioseguridad en el Laboratorio, de la Organización Mundial de la Salud (versión 2005)", que previenen los riesgos para las personas, los animales y el medioambiente.

Se otorga el presente documento a solicitud de la interesada, para los fines que estime conveniente.

Atentamente



Dr. José Pizarro Lucero
Coordinador
Comité de Bioseguridad
FAVET – Universidad de Chile