



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



ESTUDIO DE DEPLECIÓN DE ENROFLOXACINO EN HUEVOS DE
GALLINAS DE POSTURA

GABRIELA CONTRERAS GONZÁLEZ

Memoria para optar al Título Profesional
de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Clínicas

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : DRA. BETTY SAN MARTÍN
PROFESOR CONSEJERO: DRA. DANIELA IRAGÜEN
PROFESOR CONSEJERO: DR. SERGIO CORNEJO

SANTIAGO, CHILE
2008

ÍNDICE

Resumen	3
Summary	4
Introducción	5
Revisión Bibliográfica	7
Objetivos	29
Materiales y Método	30
Resultados	37
Discusión	50
Conclusiones	55
Bibliografía	56
Anexo 1	64

RESUMEN

Las fluoroquinolonas son antimicrobianos ampliamente usados en animales de producción para el tratamiento de enfermedades bacterianas. Sin embargo, su uso reviste un riesgo para los consumidores, ya que puede haber concentraciones residuales de estas drogas en los alimentos de origen animal, como son huevo, carne, leche miel y otros.

Para determinar el período de resguardo de enrofloxacino en huevos, se administró una formulación comercial de enrofloxacino 10% a gallinas ponedoras. El método analítico utilizado para la determinación de enrofloxacino y su metabolito ciprofloxacino en clara y yema fue previamente validado de acuerdo a las recomendaciones de la Decisión 2002/657/CE de la Comunidad Europea. Para la detección y cuantificación de las drogas en ambos compartimentos del huevo se utilizó cromatografía líquida con detección de fluorescencia. El límite de detección de la técnica fue de 1 $\eta\text{g/g}$ y la recuperación fue mayor al 80%.

El estudio de depleción fue realizado utilizando 12 gallinas ponedoras Leghorn las que fueron tratadas con una dosis de 10 mg/kg vía oral de enrofloxacino 10% por 5 días consecutivos. Las concentraciones de enrofloxacino y ciprofloxacino en ambos compartimentos del huevo fueron monitoreados durante los 5 días de tratamiento y por 10 días una vez que éste fue suspendido.

Durante el tratamiento, las concentraciones alcanzadas en clara se mantuvieron elevadas durante los 5 días de tratamiento. En la yema, las concentraciones aumentaron en forma gradual. Una vez que el tratamiento fue suspendido, el nivel de antimicrobianos en la clara disminuyó rápidamente desde el día 1 postratamiento, siendo éstas no detectadas al día 10 postratamiento (LOD=1 $\eta\text{g/g}$). En la yema, las concentraciones de antimicrobianos aumentaron hasta el primer día postratamiento, pero los niveles decayeron para no ser detectados al día 10 postratamiento.

Considerando las recomendaciones de la Comunidad Europea, se debe considerar un período de resguardo de 13 días para la formulación oral de enrofloxacino 10% cuando ésta sea administrada por la vía y dosis utilizada en este estudio. Además, debido a que ambos compartimentos demoraron lo mismo en depletar el antimicrobiano, cualquiera de ellos puede ser considerado el tejido marcador para el control de residuos.

SUMMARY

Fluoroquinolones are antimicrobial agents widely used in food producing animals for the treatment of bacterial diseases. However, there is a risk to human consumers as there may be residual concentrations of these drugs in foods of animal origin such as egg, meat, milk and honey, among others.

In order to assess the withdrawal time of enrofloxacin in eggs, an oral formulation of 10% enrofloxacin was administered to laying hens. The analytical method used for the determination of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in egg white and yolk was previously validated following the recommendations of the European Decision 2002/657/CE. Liquid chromatography with fluorescence detection was used in order to quantify drug concentrations in egg compartments. The chromatographic method reached a detection limit (LOD) of 1 ng/g and a recovery over 80%.

The depletion study was carried out by treating 12 Leghorn laying hens with a dose of 10 mg/kg bw of 10% enrofloxacin orally for 5 consecutively days. Enrofloxacin and ciprofloxacin concentrations in both egg compartments were monitored during treatment and also for ten days after the treatment was suspended.

Elevated concentrations were found in egg white since 24 hours after the treatment was started and remained in those levels during treatment. In yolk, drug concentrations increased gradually. After treatment was suspended, the antimicrobial levels in white decreased rapidly since the first day and they were not detected on day 10 after treatment (LOD=1 ng/ml). In yolk, drug concentrations increased until the first day after treatment, but were also not detected on day 10.

Considering the recommendations of the European Community, a withdrawal time of 13 days for the formulation of 10% enrofloxacin in eggs must be considered when administered in the dose and route of administration used in this study. In addition, white or yolk indistinctly can be considered as the target tissue for residue control as they depleted the studied antimicrobial at the same time.

INTRODUCCIÓN

La inocuidad alimentaria es actualmente una de las grandes preocupaciones a nivel mundial, siendo los contaminantes ambientales y los residuos farmacológicos considerados los de mayor riesgo.

En Chile, la producción de huevos hasta septiembre de 2008, ha aumentado un 2,65% en relación a la producción acumulada al mismo mes del año 2007, mientras que el consumo per cápita en el año 2006 fue de 162,7 huevos/háb/año (ASOHUEVO, 2008). Además, las condiciones sanitarias del sector y los tratados comerciales han generado las óptimas condiciones para que Chile se inserte en el mercado internacional, pudiendo exportar huevos a Estados Unidos de América, México y España, en la medida que se cumplan la normativa de inocuidad alimentaria dictada por cada uno de los países importadores.

El Servicio Agrícola y Ganadero, como organismo responsable de velar por la sanidad de la producción pecuaria en Chile, se encarga de la inspección y del control sanitario de los alimentos y productos farmacéuticos de uso veterinario, procurando la eliminación de trabas sanitarias que impongan los países o mercados externos para la comercialización de los productos de origen animal chilenos. Actúa como garante de las certificaciones zoosanitarias, bromatológicas y de calidad e inocuidad de los productos pecuarios de exportación.

Nuestro país cuenta con Programas de Monitoreo de Residuos de fármacos en músculo, hígado, riñón y grasa de animales de abasto, miel y leche. Esto ha permitido conocer los principales fármacos causantes de residuos en estos productos, pudiendo tomar las medidas preventivas que aseguren la entrega de productos inocuos; sin embargo, los huevos no son monitoreados aún cuando también existe el riesgo de que queden residuos cuando las gallinas son tratadas con algún fármaco.

Dentro de los fármacos que pueden generar residuos en los productos de origen animal, las fluoroquinolonas son de especial interés debido a las posibles consecuencias nocivas para la salud humana, como por ejemplo, reacciones alérgicas, selección de bacterias resistentes que pueden traspasarse a la población vía cadena alimentaria, alterando la microbiota intestinal y efectos adversos agudos y crónicos (fototoxicidad, dermatitis, condrotoxicidad en articulaciones inmaduras y neurotoxicidad).

Basándose en los efectos adversos que pueden generar estos fármacos, organismos intergubernamentales como el JEFCA (Comité mixto FAO/OMS de expertos en aditivos alimentarios) han establecido Límites Máximos Residuales (LMR) para diferentes fármacos. En el caso del enrofloxacino en huevos no se ha establecido un LMR (JEFCA, 2008).

Los países que realizan monitoreo de residuos en huevos, utilizan el concepto de Límite Mínimo de Funcionamiento Exigido (MRPL), lo cual obliga a contar con métodos analíticos de alta sensibilidad y especificidad. A nivel nacional, los Programas de Control de Residuos no incorporan el monitoreo de huevos de consumo, y los laboratorios nacionales no cuentan con métodos analíticos validados para la detección de residuos de fluoroquinolonas en este alimento.

Debido al riesgo potencial que representan las fluoroquinolonas en las aves de postura, se propuso estudiar el traspaso de enrofloxacino y su metabolito ciprofloxacino a los distintos componentes del huevo, yema y clara, y su depleción en cada uno de estos compartimentos. Con los resultados se puede definir un adecuado período de resguardo para una formulación de enrofloxacino.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Quinolonas y Fluoroquinolonas

Las quinolonas fueron descubiertas en 1962 por Lescher *et al.*, y a diferencia de los primeros antimicrobianos descubiertos el siglo pasado, no fueron aisladas desde organismos vivos, sino que sintetizadas desde un químico. El hallazgo fortuito de la actividad antibacteriana de derivados de la 1,8 naftiridina en el contexto del desarrollo de agentes antimaláricos, permitió la síntesis del ácido nalidíxico. De esta manera, estos investigadores ocupan un lugar trascendente en el descubrimiento y desarrollo de este tipo de quimioterápicos (Mella *et al.*, 2000; Andriole, 2005).

Desde su descubrimiento en la década de 1960, las quinolonas han sido de gran utilidad clínica y científica (Andersson y MacGoman, 2003), por lo que ha existido un gran interés por entender mejor la relación estructura-actividad de ellas, realizándose cambios estructurales en la molécula principal de ácido nalidíxico (núcleo 4-quinolona en la Figura 1). Uno de los cambios claves fue la incorporación de un átomo de flúor en la posición 6, originando las fluoroquinolonas (Figura 1), mejorando las características farmacocinéticas y el espectro de acción de estos antimicrobianos, disminuyendo además la toxicidad asociada a estos (Alós, 2003).

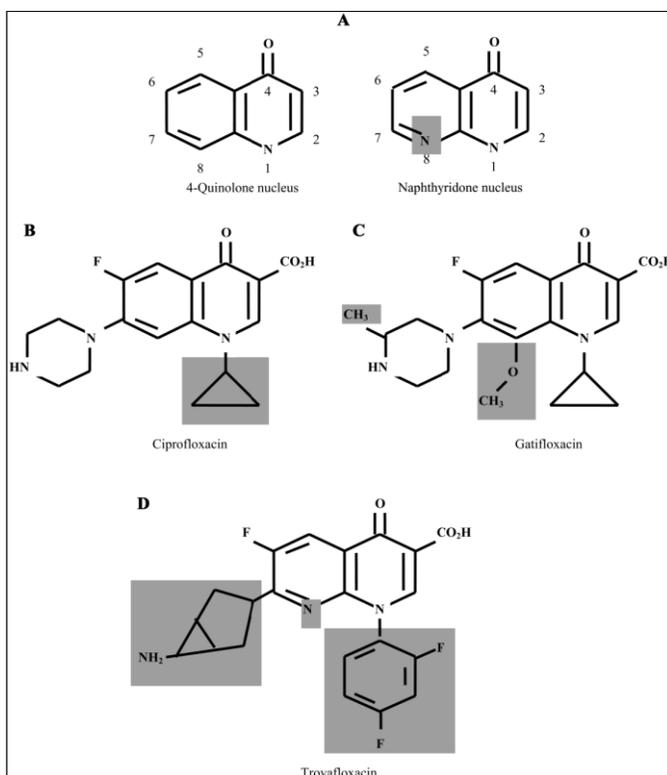


Figura 1. Estructura representantes quinolonas (Owens y Ambrose, 2005)

Estos cambios, además permitieron la clasificación de las quinolonas en generaciones (Cuadro 1). La primera generación fue un excelente antagonista de bacterias gramnegativas y aerobias; sin embargo, presentaban baja actividad frente a bacterias grampositivas o anaerobias. En 1980, se adiciona un átomo de flúor en la posición C-6 y una molécula de diamin piperazin cíclico en la posición C-7, dando origen al norfloxacin, primera fluoroquinolona y primer integrante de la segunda generación, que adicionalmente presenta actividad frente a bacterias aerobias grampositivas y aumenta la actividad frente a bacterias gramnegativas. Tanto enrofloxacin como su metabolito ciprofloxacin forman también parte de la segunda generación de fluoroquinolonas (García *et al.*, 2005), la cual se caracteriza fundamentalmente por la presencia ya constante de flúor en la posición 6 y de piperazina o metil piperazina en la posición 7 del antibacteriano (Mella *et al.*, 2000). En la tercera generación aumenta aún más la actividad frente a bacterias grampositivas, particularmente neumococo, y también presenta buena actividad contra anaerobios. La cuarta generación tiene una potente actividad antagonista frente anaerobios y aumenta su

actividad contra neumococos (Andriole, 2005). En el Cuadro 1 se muestra una clasificación de las quinolonas según el mismo autor.

Cuadro 1. Clasificación de las quinolonas (Fuente: Andriole, 2005).

Generación	Representantes
Primera	Ácido nalidíxico, ácido oxolínico, cinoxacino, ácido piromídico, ácido pipemídico y flumequina.
Segunda	Norfloxacinó, enrofloxacinó, ciprofloxacino, ofloxacino, levofloxacino, enoxacino, fleroxacino, lomefloxacino, pefloxacino y rufloxacino.
Tercera	Grepafloxacino, gatifloxacino, esparfloxacino, temafloxacino, tosufloxacino y pazufloxacino.
Cuarta	Trovafloxacino, clinafloxacino, sitafloxacino, moxifloxacino y gemifloxacino.

Características farmacocinéticas y farmacodinámicas de las fluoroquinolonas

La farmacocinética se refiere a la disposición de un fármaco en el organismo y se centra en parámetros tales como la absorción, unión a proteínas, distribución y eliminación. Por otro lado, ya que el objetivo final de una terapia antimicrobiana es disminuir la morbilidad y la mortalidad asociada a infección, la maximización de estos resultados requiere de la comprensión de las complejas interacciones entre la droga administrada y el patógeno infectante (Wispelwey, 2005).

Las fluoroquinolonas se caracterizan por una buena absorción cuando la administración es oral, siendo su biodisponibilidad mayor al 50% (incluso algunos logran el 100%), alcanzando niveles en suero similares a la administración intravenosa. Norfloxacino se absorbe un 50 %, pero ciprofloxacino alcanza el 70 % y ofloxacino, lomefloxacino, fleroxacino y pefloxacino llegan a tener una absorción casi completa entre 97 y 100 %. Las máximas concentraciones plasmáticas se logran una a dos horas post administración (Cué *et al.*, 2005). La absorción generalmente es rápida y escasamente afectada por los alimentos; sin embargo, puede disminuir en presencia de cationes

bivalentes, incluyendo Al^{++} , Mg^{++} , Ca^{++} y Fe^{++} , que frecuentemente se encuentran en antiácidos y otros medicamentos, como también en productos lácteos (Vacarezza, 2000).

La unión a proteínas plasmáticas es baja (entre un 20-40%) y se une principalmente a albúmina. La vida media plasmática de los distintos representantes de este grupo de antimicrobianos varía entre 1,5 a 17 horas, siendo mayor en las generaciones más nuevas. El volumen de distribución es alto, excediendo los 1,5 L/Kg, por lo que alcanza altas concentraciones intracelulares (Alós, 2003; Andersson y MacGoman, 2003).

La distribución en tejidos es buena, con excelentes niveles en tejido intersticial, células fagocíticas y concentraciones urinarias que exceden las concentraciones mínimas inhibitorias para muchos patógenos. La concentración en próstata, bilis, pulmón, neutrófilos y macrófagos es superior a la sérica, mientras que en líquido cefalorraquídeo alcanza la mitad (Andriole, 2005).

Las quinolonas son metabolizadas por el hígado con eliminación urinaria y fecal de los metabolitos. La eliminación renal ocurre por filtración glomerular y secreción tubular y existe transporte activo de las quinolonas en el intestino (Rodríguez *et al.*, 2000).

La ruta principal de eliminación varía ampliamente entre fluoroquinolonas. Ofloxacino y su isómero, levofloxacino, lomefloxacino, rufloxacino y gatifloxacino tienen predominantemente excreción renal y mínima metabolización (menor a un 10%). En contraste, el ácido nalidíxico, pefloxacino, esparfloxacino y grepafloxacino sufren metabolización hepática mayor a un 35% (Turnidge, 1999).

La farmacodinamia apunta a los cambios bioquímicos y fisiológicos que provoca la droga en el tejido o célula blanco en relación a la concentración alcanzada y dosis. La actividad de las quinolonas es concentración dependiente, lo cual significa que actúa cuando las concentraciones están por sobre la concentración mínima inhibitoria, presentando además un efecto postantibiótico prolongado (Andersson y MacGoman, 2003). En los antibióticos cuya actividad depende de la concentración, se considera como

parámetro importante para predecir la respuesta antimicrobiana y el éxito clínico, el cociente de la concentración máxima en suero ($C_{\text{máx}}$) y la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM). Este cociente $C_{\text{máx}}/CIM$ debe ser superior a 10 para obtenerse la máxima eficacia clínica y la menor selección de resistencia. Otro parámetro farmacodinámico usado, es el cociente del área bajo la curva de la concentración sérica-tiempo y la CIM (AUC/CIM), que debe ser mayor de 125, aunque para neumococos se han propuesto valores superiores a 30 (Cué *et al.*, 2005).

Aplicaciones Terapéuticas de las fluoroquinolonas

Las fluoroquinolonas son ampliamente utilizadas hoy en día en medicina humana y animal debido a su espectro y a sus propiedades fisicoquímicas (Orden y De la Fuente, 2001). Se usan para el tratamiento de una gran variedad de infecciones, tanto en el medio hospitalario como en el ámbito extrahospitalario (Alós, 2003).

El desarrollo de estos antimicrobianos ha permitido su uso desde infecciones del tracto urinario y respiratorio hasta un diverso grupo de infecciones sistémicas. Están indicadas para el tratamiento de prostatitis, infecciones gastrointestinales, infecciones de piel y tejidos blandos, enfermedades de transmisión sexual, osteomielitis crónica, infecciones del tracto respiratorio e infecciones sistémicas producidas por cepas bacterianas sensibles (Vacarezza, 2000; Alós, 2003; Andersson y MacGoman, 2003).

En el ámbito productivo nacional, las fluoroquinolonas están autorizadas para su uso en pollos broiler y pavos en crecimiento, en el control de mortalidad temprana, colibacilosis y otras infecciones bacterianas. En Chile, existen 16 formulaciones de enrofloxacino para el uso en aves (SAG, 2008a) y, al no existir a nivel nacional un control sobre el uso extraetiqueta, es decir, sin considerar las instrucciones establecidas en el prospecto oficialmente autorizado por las entidades responsables del registro de medicamentos, estas pueden ser usadas como terapia o como medidas preventivas en aves de postura, con el consecuente riesgo que se presenten residuos de estos fármacos en los huevos destinados a consumo humano.

Mecanismo de acción y Resistencia Bacteriana

Las quinolonas son antimicrobianos bactericidas que actúan inhibiendo la síntesis del ADN bacteriano al unirse a enzimas topoisomerasas que participan en esta etapa (Emmerson y Jones, 2003). En el caso de las bacterias gramnegativas, se unen principalmente a la topoisomerasa II o DNA-girasa y, en las grampositivas a la topoisomerasa IV, siendo intrínsecamente más susceptible la topoisomerasa II (Andriole, 1999).

Las topoisomerasas se encuentran en todos los organismos vivos; pero las quinolonas sólo afectan a las topoisomerasa II y IV de las bacterias y no a las células eucariotas humanas, debido a que las topoisomerasas están formadas por sólo 2 subunidades en lugar de las 4 que poseen las células bacterianas. En el caso de la topoisomerasa II, estas subunidades son la GyrA y GyrB; y para la topoisomerasa IV son la ParC y la ParE (Cué *et al.*, 2005).

Las dos enzimas trabajan juntas en la replicación, transcripción, recombinación y reparación del ADN. La función más importante de la ADN-girasa es mantener un nivel de enrollamiento del ADN que facilite el movimiento hacia los complejos que se forman en la replicación y la transcripción. También libera enrollamientos negativos en un proceso dependiente de ATP. La topoisomerasa IV separa las hebras de ADN tras cada replicación. También tiene una actividad relajante sobre la cadena de ADN (Alós, 2003).

Las quinolonas atrapan la DNA-girasa o la topoisomerasa IV en un complejo enzima-ADN-droga (Holtzapple *et al.*, 1997). Esta unión provoca un cambio conformacional en el complejo girasa-ADN responsable de la inhibición de la enzima. Dado que la girasa del ADN mantiene los cromosomas en un estado de superespiral, y que repara pequeñas roturas de filamento único de ADN que ocurren durante el proceso de multiplicación del ADN, su inhibición ofrece una posible explicación a la actividad antibacteriana de estos agentes. El bloqueo de dichas enzimas ofrece una explicación para la inhibición de la multiplicación bacteriana, pero no lo suficiente para explicar el efecto

bactericida que poseen estos antimicrobianos (Andriole, 1989; Alós, 2003; Morejón y Salup, 2003).

La resistencia bacteriana a quinolonas ha sido un problema desde que el ácido nalidíxico fue introducido a la medicina clínica. Durante un tiempo, la mayor potencia de las fluoroquinolonas en comparación con las quinolonas más antiguas, permitió la complacencia en cuanto a su uso, lo que sumado al resultado exitoso de tratamientos, aumentó más aún su uso, con el consecuente aumento de la tasa de resistencia bacteriana (Jackson *et al.*, 1998; Schneider y Donoghue, 2003).

Actualmente se conocen tres mecanismos de resistencia: mutaciones que alteran el blanco de la droga, mutaciones que reducen la acumulación de droga y plasmidios que protegen la célula del efecto letal de las quinolonas, siendo el primero el mecanismo de resistencia más importante (Bearden y Danziger, 2001). Las mutaciones generalmente se dan en la subunidad GyrA de la topoisomerasa II en las bacterias gramnegativas y en la ParC de la topoisomerasa IV en las grampositivas. Estas mutaciones se dan en una región concreta denominada QRDR (región determinante de la resistencia a quinolonas), lo cual altera la afinidad de la quinolona por la enzima (Taléns-Visconti *et al.*, 2002).

En bacterias gramnegativas se han descrito resistencias por alteraciones en las porinas ubicadas en la membrana externa. Recientemente se ha constatado que la sobreexpresión de bombas de expulsión activa, puede llevar a resistencia a quinolonas tanto en bacterias grampositivas como en gramnegativas (Alós, 2003; Jacoby, 2005).

Resistencia transferible mediada por plásmidos sólo se ha confirmado en un número pequeño de cepas de *Klebsiella pneumoniae*. El plásmido lleva un gen que codifica una proteína denominada Qnr que protege a la ADN-girasa de la acción de las quinolonas. Varios mecanismos de resistencia pueden coexistir en la misma cepa (De la fuente *et al.*, 2007).

El desarrollo de resistencia a estos antimicrobianos ha originado una fuerte controversia sobre el uso de fluoroquinolonas en animales, ya que podría contribuir a la adquisición de resistencia en bacterias transmitidas vía cadena alimentaria. Por otro lado, aunque generalmente las fluoroquinolonas usadas para el tratamiento de infecciones en animales domésticos son diferentes a las fluoroquinolonas disponibles para uso clínico humano, la resistencia bacteriana a una fluoroquinolona reconoce a todas las fluoroquinolonas. Dado que las fluoroquinolonas son las drogas de elección para muchas infecciones refractarias y/o zoonóticas en humanos, la profesión médica está intentando minimizar el desarrollo de la resistencia a estos antimicrobianos. (Orden y De la Fuente, 2001; Cué *et al.*, 2005).

En producción avícola, a nivel internacional, se ha descrito el desarrollo de resistencia en bacterias transmisibles al hombre, tales como *Salmonella spp.* (Eaves *et al.*, 2004; Esaki *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2006), *Campylobacter spp.* (Griggs *et al.*, 2005; Humphrey *et al.*, 2005) y *Escherichia coli* (Lee *et al.*, 2005; Khan *et al.*, 2005). Chile no está ajeno a este problema, ya que se ha observado resistencia frente a estos fármacos en cepas de *Salmonella spp.* aisladas de pollos broiler, aves de postura y huevos (San Martín *et al.*, 2005). Esto, se ha asociado con una disminución de la eficacia de estos fármacos en el tratamiento de enfermedades zoonóticas bacterianas, en los cuales estos fármacos son de primera línea de elección (Turnidge, 2004; Norstrom y *et al.*, 2006).

En 1997, la Food and Drug Administration de los Estados Unidos de América (FDA) prohibió el uso extraetiqueta de fluoroquinolonas debido a la gran preocupación por el desarrollo de resistencia bacteriana (FDA, 2001; Chu *et al.*, 2002). Posteriormente, el 12 de Septiembre de 2005, anunció la prohibición del uso de enrofloxacino en aves de corral (pollos y pavos), avalada por el evidente incremento de la resistencia en cepas de *Campylobacter spp.*, lo cual se relacionó con el extensivo uso de este agente antimicrobiano en las granjas de aves (FDA, 2005a).

Residuos de antimicrobianos en los alimentos de origen animal y su implicancia en salud pública

La utilización de fármacos en animales de abasto para la prevención y tratamiento de diferentes enfermedades, es una práctica habitual autorizada pero cada vez más controlada, tanto por parte de los médicos veterinarios como por las autoridades sanitarias (Pérez, 2004).

El uso racional de fármacos en animales de abasto, es beneficioso desde el punto de vista económico como sanitario, al proporcionar productos alimenticios de origen animal a un precio asequible y en condiciones higiénicas adecuadas. Sin embargo, el uso poco juicioso o ilegal de estos fármacos puede dar lugar a efectos adversos, como el establecimiento de poblaciones bacterianas resistentes a los antibióticos, presencia de residuos en los alimentos que podrían causar reacciones alérgicas, perturbación de la microbiota intestinal o la aparición de toxicidad aguda o crónica en los consumidos humanos (Errecalde, 2004; Hassouan *et al.*, 2007).

Los efectos adversos más frecuentes relacionados con el uso de fluoroquinolonas son los trastornos gastrointestinales como náuseas, vómitos, dolores abdominales y diarreas. También se han descrito fototoxicidad, erupciones cutáneas, prurito, urticaria y eritema en piel; alteraciones del sistema nervioso central acompañadas de excitación, temblores y ataxias. Además, se ha reportado un potencial cardiotoxico, principalmente de esparfloxacino y grepafloxacino, con un aumento del intervalo QT no recomendándose en pacientes que tienen prolongación de este intervalo, como por ejemplo en pacientes arrítmicos. La condrotoxicidad causada por quinolonas, se ha observado en animales inmaduros y afecta el cartílago articular y/o la placa de crecimiento epifisial, dependiendo de la etapa de desarrollo. La patogénesis de la condrotoxicidad se puede explicar probablemente por las propiedades quelantes sobre el magnesio. Como animales jóvenes son especialmente sensibles, su uso en pediatría está restringido a indicaciones cuidadosamente seleccionadas (Stahlmann y Lode, 1999; Martínez *et al.*, 2006).

Límites Máximos Residuales (LMR) y Límites Mínimos de Funcionamiento Exigido (MRPL)

Basándose en los efectos adversos, organizaciones nacionales e intergubernamentales han establecido los Límites Máximos Residuales (LMR). La Comisión del Codex *Alimentarius* (1995), define los LMR para los medicamentos veterinarios como, la concentración máxima de residuos resultantes del uso de un medicamento, expresada en mg/kg o µg/kg sobre la base de peso fresco, que se permite legalmente o se reconoce como admisible dentro de un alimento o en la superficie del mismo.

A nivel mundial, existen organizaciones encargadas de establecer normas en cuanto al control de residuos, vigilar su cumplimiento y sancionar infracciones. En el caso de los Estados Unidos de América, la FDA a través del Centro para Medicina Veterinaria (CVM), se encarga de regular los estudios que las compañías farmacéuticas deben presentar para la aprobación de un fármaco destinado a animales de abasto. Esta normativa contempla los niveles máximos de residuos y los tiempos de espera. Por otro lado, el Servicio de Inspección de Seguridad Alimentaria (FSIS), adscrito al departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) tiene el control anual nacional de la incidencia de residuos. En consecuencia, la FDA se encarga de investigar los casos ilegales descubiertos por la FSIS (Arboix y Martín-Jiménez, 2002; Donoghue, 2003).

En el caso de la Unión Europea, la EMEA (Agencia Europea de Medicamentos) es la encargada de la protección y la promoción de la salud pública y animal, mediante la evaluación y supervisión de medicamentos de uso humano y veterinario. Se encarga de autorizar la comercialización de medicamento de uso humano y animal (Europa, 2008).

Tanto el enrofloxacino como el sarafloxacino han sido aprobados por la Unión Europea para el tratamiento de infecciones bacterianas en aves de corral (pavos y pollos broiler), estableciendo los Niveles Máximos de Residuos (LMRs) para estas drogas en diferentes tejidos comestibles de origen animal (músculo, piel, grasa, hígado y riñón). Sin

embargo, su uso en gallinas ponedoras no ha sido autorizado, razón por la cual a la fecha, no se ha determinado un LMR en huevos destinados a consumo humano (Lolo *et al.*, 2005; Molero *et al.*, 2006; Herranz *et al.*, 2007).

Los LMRs establecidos por la Unión Europea para las distintas quinolonas utilizadas en aves de corral son de 100 µg/kg para ácido oxolínico y enrofloxacino más su metabolito, 400 µg/kg para flumequina y 200 µg/kg para danofloxacino (Europa, 1990). Japón es aún más estricto, definiendo para la suma de enrofloxacino y ciprofloxacino, un LMR de 10 µg/kg (Japón, 2005).

El cuadro 2 presenta los LMRs de enrofloxacino y ciprofloxacino en Europa en productos obtenidos a partir de aves.

Cuadro 2. LMR para Enrofloxacino y Ciprofloxacino en Aves de Corral. (CMVP, 2002).

Matriz	LMR (µg/kg)	
Músculo	100	No usar en animales productores de huevos destinados a consumo humano.
Piel + grasa	100	
Hígado	200	
Riñones	300	

El CVM del FDA de Estados Unidos de América, actualmente no tiene descrito tolerancias para las quinolonas. Para el caso particular de enrofloxacino, hasta abril de 2005, definían una tolerancia de 0,3 mg/kg en músculos de pollos y pavos, sin embargo, por la rápida aparición de resistencia, a partir de septiembre del 2005 se prohibió el uso de este fármaco en estas especies (FDA, 2005a).

Chile, en el año 1999, estableció los LMRs de Medicamentos Veterinarios en alimentos destinados al consumo humano; entre ellos se encuentran las fluoroquinolonas para aves de consumo. Es así que en músculo de pollo para danofloxacino se fijó un LMR de 200 µg/kg, para la suma de enrofloxacino y ciprofloxacino de 100 µg/kg, para

sarafloxacino de 10 µg/kg y para flumequina de 500 µg/kg (Chile. Ministerio de Salud, 1999).

Si bien es cierto, actualmente existen diferencias en los LMR (o niveles de tolerancia) establecidos por los diferentes países, la tendencia mundial es armonizar sobre estos criterios. Al respecto, la Organización Mundial de Comercio (OMC, 1998), en el Acuerdo sobre la aplicación de las medidas sanitarias y fitosanitarias, anima a sus países miembros a revisar y armonizar en el mayor grado posible las reglamentaciones sanitarias, basándose en directrices o recomendaciones internacionales. De hecho, éstas son objeto de revisiones rigurosas y permanentes a nivel internacional con el fin de proteger a los ciudadanos y que éstas no repercutan en el comercio internacional de alimentos.

En el año 2002, la Unión Europea estableció un nuevo concepto, el Límite Mínimo de Funcionamiento Exigido (MRPL), definido como contenido mínimo de un analito en una muestra que puede ser detectado y confirmado. Éste se aplica a aquellos fármacos a los que no se ha establecido un LMR o que están prohibidos o no autorizados para su uso en animales de producción. El MRPL depende de la sensibilidad del método analítico y tecnología utilizada. Además, indicó que los laboratorios de control oficial deben utilizar sistemas de aseguramiento de calidad y métodos validados de acuerdo con procedimientos y criterios de funcionamiento comunes para así asegurar la trazabilidad con arreglo a normas comunes o normas consensuadas (Europa, 2002).

El MRPL plantea un gran desafío tecnológico ya que, para el caso de la detección de residuos de quinolonas y fluoroquinolonas mediante tecnologías convencionales como la Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (HPLC) con detector de fluorescencia, las concentraciones mínimas detectables van de 1 a 10 µg/kg. Si se utilizan nuevas tecnologías de reciente incorporación a nivel mundial, como es la Cromatografía Líquida Masa/Masa (LC-MS/MS), los niveles de detección pueden disminuir a 0,1-0,2 µg/kg, como ha sido recientemente señalado por algunos investigadores (Hermo *et al.*, 2006). Esto nos hace suponer que, en países donde exista prohibición de uso o no tengan registrados estos

fármacos, en los Programas de Inocuidad Alimentaria relacionados con el control de residuos alimentos de origen animal, incorporarán estas nuevas tecnologías.

Control de residuos de fármacos en Chile

En el ámbito nacional, es importante señalar que en estos últimos años ha existido un gran esfuerzo por parte de los organismos gubernamentales, privados y universidades, orientados a la entrega de un producto de origen animal inocuo y seguro para la población. Se suma a esto, que el sector pecuario exportador, ha debido experimentar cambios significativos en su quehacer habitual, producto de un conjunto de transformaciones en relación directa con los procesos de globalización económica, lo cual los lleva a poner en práctica normas concordantes con los objetivos fundamentales de la OMC. Es así, que el Servicio Agrícola Ganadero (SAG) del Ministerio de Agricultura, está encargado del Registro de Medicamentos Veterinarios y de certificar los productos de exportación. Por su parte, el Ministerio de Salud vela por la inocuidad de los alimentos que van a la población nacional a través del Reglamento Sanitario de los Alimentos (San Martín, 2001).

Con respecto al control de residuos en nuestro país, el SAG (2008b) proporciona la siguiente información:

- Nuestro país cuenta con una excelente situación zoonosológica, pudiendo competir con productos de mercados externos y acceder a nuevos mercados internacionales. Para esto, es necesario que los sistemas productivos utilicen los fármacos de manera prudente y eficiente cuidando el entorno y la salud de la población.

- Con el objeto de dar cumplimiento a las exigencias de los mercados de destino y, además, contar con una información esquemática de carácter anual sobre la presencia de residuos en poblaciones animales, se ha definido y diseñado la operatoria del Programa de Control de Residuos (PCR) en Productos Pecuarios. Cada plan permite evaluar las tendencias de los residuos e identificar los sectores de la industria pecuaria en donde se detecten problemas de residuos y en donde sea necesario realizar medidas correctivas.

- El Programa se inició en 1987 en carnes de la especie ovina. En el año 1998 se implementó en carnes de aves, cerdo, liebres y miel. Posteriormente, durante el año 2000 se estableció en carnes de pavos; a mediados del año 2002 se incluyeron en el programa las carnes de bovinos, y durante el 2005 los productos lácteos.

- Debe tenerse presente, que en el caso de los productos de exportación, se debe además controlar los residuos que son solicitados por los países de destino, que no necesariamente están incluidos en el plan nacional de control de residuos.

- En la actualidad se cuenta con un red de 4 Laboratorios de determinación de Residuos acreditados por el SAG, los cuatro ubicados en la Región Metropolitana. La supervisión de esta Red es a través del Sistema de Acreditación de Terceros que estableció el Servicio durante el año 2004, en el cual se establece una norma general que deben cumplir todas las entidades acreditadas y para el caso de los laboratorios de ensayos un reglamento específico. Este establece los requisitos necesarios para la realización de análisis/ensayos como apoyo para la ejecución de actividades en el marco de programas oficiales del Servicio, para cada área de análisis debe además cumplir con el instructivo técnico correspondiente. Todo tercero acreditado será supervisado por el SAG, para lo cual las acciones de seguimiento serán periódicas y programadas, sin perjuicio de las facultades de fiscalización del Servicio.

- La Acreditación ISO 17025, otorgada en Chile por el Instituto Nacional de Normalización (INN) es uno de los requisitos que exige el instructivo técnico de diagnóstico de residuos. Este sistema de Acreditación comenzó a regir a partir del 02/06/2005 fecha en la cual fue aprobado mediante resolución exenta del Director Nacional del SAG N° 2488 / 2005.

El SAG no incorpora en los programas nacionales de control de residuos farmacológicos el monitoreo de huevos y además los laboratorios nacionales no cuentan con métodos analíticos validados para la detección de residuos de distintos fármacos en este alimento.

Períodos de carencia de los fármacos utilizados en animales de producción y procedimientos para su determinación

Para proteger la salud del consumidor, uno de los principios básicos es garantizar que los alimentos de origen animal no contengan residuos farmacológicos como resultado del tratamiento en los animales. Por ello, se ha fijado para cada sustancia con acción farmacológica períodos de resguardo (carencia o retirada). Estos períodos corresponden al tiempo que transcurre desde la última aplicación del fármaco hasta que éste o sus metabolitos alcancen el LMR o MRPL fijados. Dependen de la cinética, vías de administración, formas farmacéuticas (excipientes), dosis y posología en cada especie. El uso extraetiquetado de un fármaco habitualmente requiere modificar el período de resguardo, por ejemplo, si se administra una terapia con dosis mayores a las indicadas, el período de resguardo debería ser extendido (San Martín, 1995; Arboix y Martín-Jiménez, 2002; Pérez, 2004).

Para determinar los períodos de carencia se deben realizar estudios de depleción, en los cuales a un grupo de animales de una determinada especie productiva, se les administra una fórmula farmacéutica comercial de un medicamento. Para el caso de las aves de postura, estos estudios se deben realizar en huevos, ya que dependiendo de las características fisicoquímicas del fármaco podrían alcanzar los ovarios, folículos en crecimiento y oviducto y de esta forma difundir a la yema o a la clara, como es el caso de las fluoroquinolonas. Se realizan mediante el monitoreo de las concentraciones de droga en huevo, desde la última aplicación del medicamento a las gallinas ponedoras, hasta el momento en que las concentraciones en huevo alcancen el MRPL o el LMR (Lolo *et al.*, 2005).

Las reglamentaciones internacionales señalan que los estudios de depleción se deben realizar en grupos de aves a las cuales se les administra el fármaco, utilizando una formulación comercial y el régimen terapéutico recomendado. El número de animales por tiempo de muestreo varía según el organismo regulador. La FDA recomienda el uso de 5 animales por tiempo de muestreo, tomando como mínimo 20 animales por estudio (FDA,

2005b). Por otro lado, el Comité para Medicamentos Veterinarios (CVMP) recomienda entre 3 a 10 animales por tiempo de muestreo (CVMP, 1997)

Los animales son sacrificados en intervalos de tiempo previamente definidos en base a las características farmacocinéticas de la droga. La toma de muestras es exhaustiva, considerando todos aquellos tejidos y productos que serán comercializados para consumo humano, los cuales son analizados para la detección y cuantificación del analito en estudio. Para definir los períodos de carencia, se considera el comportamiento farmacocinético del medicamento, considerando exclusivamente la fase de eliminación del fármaco. Para esto, se realizan curvas de concentraciones en función del tiempo de muestreo, utilizando la fase de eliminación terminal, considerando que en esta etapa, la depleción de residuos desde los diferentes tejidos sigue un modelo monocompartimental descrita por una cinética de eliminación de primer orden (CVMP, 1997)

El método estadístico recomendado por el CVMP para el análisis de la fase de eliminación terminal es el Análisis de Regresión Lineal, considerando un nivel de confianza mínimo de un 95%. Se define el período de carencia, en el momento en que las concentraciones obtenidas a partir del análisis de las muestras se encuentran bajo el LMR (o niveles de tolerancia). Un aspecto importante de mencionar, es la variabilidad que presenta el comportamiento del fármaco en los diferentes individuos. Al respecto y dado que en la determinación de los períodos de carencia se trabaja con un número reducido aunque suficiente de animales, pueden presentarse desviaciones importantes en relación al comportamiento poblacional. El CVMP (1997) recomienda aplicar un margen de seguridad entre un 10 a un 30% por sobre el período establecido para compensar la variabilidad biológica entre individuos.

Métodos analíticos para la detección de residuos fluoroquinolonas

Los principales métodos analíticos para la determinación de residuos de medicamentos en alimentos de origen animal son los cromatográficos (cromatografía líquida con detección ultravioleta, fluorescencia o espectrometría de masas y cromatografía

de gases). Estas técnicas se caracterizan por ser específicas, selectivas y sensibles, permitiendo determinar pequeñas concentraciones de los fármacos en la matriz o muestra que se analizan (Pérez, 2004).

Generalmente, los métodos analíticos descritos en la literatura muestran un amplio rango de procedimientos de extracción y limpieza, dependiendo del tipo de quinolona y tejido analizado. En el caso particular de los huevos, ésta es una matriz difícil de analizar ya que los lípidos y proteínas deben ser removidos antes del análisis. El tratamiento de las muestras incluye un paso de extracción con solventes polares o mezclas hidro-orgánicas en medio ácido o básico, seguido de varios procedimientos de extracción líquido-líquido o sólido-líquido (Ramos *et al.*, 2003; Shim *et al.*, 2003).

En la detección de fluoroquinolonas en huevos el método analítico de mayor uso es el HPLC con detección de fluorescencia. En los últimos años, la LC-MS/MS ha permitido mejorar los límites de detección de estos fármacos. Al respecto, al utilizar HPLC con detector de fluorescencia, las concentraciones mínimas detectables se encuentran en un rango de 1 a 10 µg/kg (Chu *et al.*, 2002); en cambio la LC-MS/MS logra mejores niveles de detección (Lolo *et al.*, 2005).

Johnston *et al.* (2002) diseñaron un método multiresidual confirmatorio utilizando LC-MS/MS para 8 quinolonas y fluoroquinolonas en tejidos de trucha, gambas y abalones, obteniendo un límite de cuantificación de 5 µg/kg, excepto para ciprofloxacino el cual fue de 10 µg/kg. Hatano (2004), desarrolló un método similar para la determinación simultánea de 7 quinolonas en músculo de bovino, cerdo, pollo, leche, camarones y anguilas, obteniendo límites de detección de 1-2 µg/kg. Recientemente, Hermo *et al.* (2006), utilizando la misma tecnología, desarrollaron un método multiresidual para 8 quinolonas, logrando límites de detección entre 0,2 y 0,3 µg/kg.

También es importante señalar, que independiente del método analítico seleccionado, el *Codex Alimentarius* (1995) señala que los laboratorios analíticos deben previamente validar sus métodos, aún cuando estos sean oficiales, de referencia o hayan

sido previamente descritos, con la finalidad de demostrar la confiabilidad de sus resultados. Señala además que los métodos analíticos deben detectar, cuantificar e identificar todos los residuos de medicamentos veterinarios en concentraciones inferiores a los LMR, con el fin de garantizar el cumplimiento de los requisitos relativos a la inocuidad alimentaria.

Al respecto, la Directiva de las Comunidades Europeas sobre el Funcionamiento de los Métodos Analíticos y la Interpretación de los Resultados (Europa, 2002), señala que “dado los avances realizados en la química analítica, ha quedado obsoleto el concepto de métodos de rutina y de métodos de referencia, reemplazándose esto por un planteamiento que establece criterios de funcionamiento y procedimientos de validación de los métodos”.

El procedimiento de validación de un método analítico debe incorporarse en todas las investigaciones cuyos resultados dependan de la química analítica ya que permiten al laboratorio demostrar que el método seleccionado y desarrollado para una sustancia específica, en una muestra específica, produce resultados comparables. Esto se logra a través de una serie de pruebas estadísticas que permiten demostrar la confiabilidad de los resultados. Los parámetros a definir en una validación son la especificidad, sensibilidad, límite de detección, límite de cuantificación, recuperación, precisión, repetitividad y robustez tal como lo señala además en los Procedimientos Analíticos y Validación de Métodos descrita en la Guidance for Industry N°63 del FDA de Estados Unidos de América (FDA, 1999).

Distribución de los antimicrobianos en huevos

El huevo está formado básicamente por tres componentes: la yema, que es el equivalente al óvulo microscópico de los mamíferos; la albúmina, o clara, que es secretada por el aparato reproductor; y el cascarón, que proporciona la protección y los minerales al embrión en desarrollo. El tamaño, composición del huevo y la velocidad a las que se producen, reciben las influencias de numerosos factores genéticos, ambientales y fisiológicos. Los constituyentes del huevo se elaboran en dos fases sucesivas. En el ovario se deposita el vitelo durante los 10 a 12 días que preceden a la ovulación. Una vez ovulado

y durante su paso por el oviducto, se depositan los otros constituyentes del huevo; esta fase dura 24 a 26 horas (Proudman, 2002).

Morfológica y funcionalmente, el oviducto puede dividirse en seis regiones: Infundibulum, Magnum, Istmo, Istmo rojo o Glándula Tubular de la Cáscara, Glándula de la Cáscara propiamente tal y Vagina (ver figura 2). Todos los segmentos excepto la vagina, están involucrados en el proceso de formación del huevo (Fernández y Arias, 2000).

La yema se compone predominantemente de lipoproteínas formadas en el hígado, las cuales son transportadas al ovario vía sanguínea. Estas lipoproteínas son depositadas en los folículos ováricos en forma de capas concéntricas. Este proceso tarda alrededor de 10 días en completarse. No se sabe con exactitud si la yema se deposita hasta el momento de la ovulación o si transcurre un día entre la última deposición de material y la ovulación (Donoghe y Myers, 2000; Kan y Petz, 2000).

Inmediatamente después de la ovulación, la yema pasa al Infundibulum, región más proximal al ovario, sitio donde ocurre la fecundación antes del depósito de la albúmina. En este segmento la yema pasa sólo algunos minutos (15-20 min). En el Magnum el huevo permanece 3-4 horas. Aquí se sintetiza la totalidad de las proteínas de la albúmina o clara.

La formación de la clara ocurre en general en 3 fases, estas son: síntesis y almacenamiento de albúmina previo a la ovulación, secreción de proteínas almacenadas y síntesis y secreción de nuevas proteínas durante el paso del óvulo (yema) bajando por el sistema reproductivo y, adición de agua. La mayoría de la albúmina es sintetizada y almacenada en el mágnium previo a la ovulación. Después de la ovulación, estas proteínas almacenadas son secretadas alrededor del óvulo (Donoghue y Hairston, 2000).

La liberación de la albúmina es probablemente afectada por la estimulación mecánica del huevo en descenso. En el Istmo el huevo permanece 1-2 horas y aquí ocurre el depósito de las membranas de la cáscara. En el Istmo rojo o Glándula Tubular de la Cáscara ocurre el depósito de las mamilas lugar donde se iniciará la mineralización de la cáscara. Al

abandonar el Istmo rojo el huevo alcanza la Glándula de la Cáscara donde permanecerá aproximadamente 20 horas. En esta región ocurren dos fenómenos: hidratación de las proteínas de la clara lo que hace que el huevo tome estrecho contacto con la pared de esta región y mineralización de la cáscara que se produce por la precipitación de calcio en asociación con una trama orgánica. Durante las dos últimas horas de formación de la cáscara, se detiene la mineralización y se inicia el depósito de cutícula. Luego del depósito de ésta, la glándula de la cáscara se contrae y expulsa el huevo hacia la vagina (Fernández y Arias, 2000).

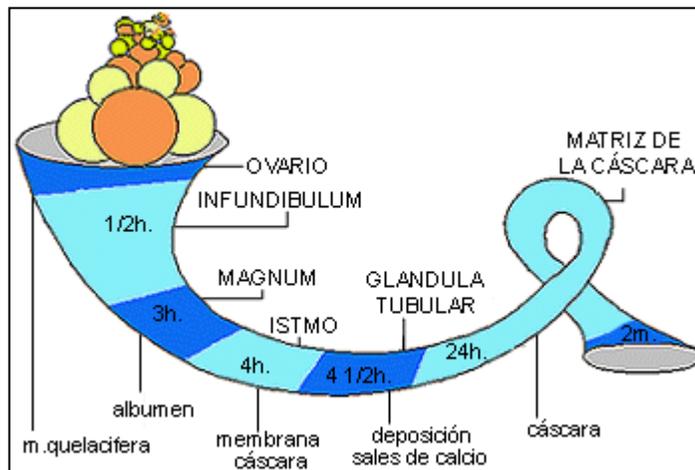


Figura 2. Formación del huevo. (Instituto de Estudio del Huevo, 2008).

Los medicamentos veterinarios usados en gallinas ponedoras son aplicados en forma masiva a través del agua o el alimento. Algunas de estas drogas están diseñadas para un efecto sistémico, por lo que deben absorberse en intestino para llegar a plasma y distribuirse en el organismo para ejercer su acción. Otras drogas, como los coccidiostatos ejercen su acción en forma local en el tubo gastrointestinal, sin embargo, parte de ellas son absorbidas. Esta absorción se debe a las propiedades lipofílicas de los fármacos que les permiten interactuar y traspasar membranas. Cuando estos compuestos alcanzan la sangre, estos son distribuidos por todo el organismo, incluyendo en gallinas ponedoras los ovarios con folículos en crecimiento y el oviducto, donde la clara es formada y secretada (Kan, 2003).

Kan y Petz (2000) describieron la siguiente distribución de los fármacos dentro del huevo:

1. Los residuos de fármacos pueden primero aparecer en la clara. Los residuos de droga en la clara son un reflejo de los niveles plasmáticos, y por lo tanto mostrarán niveles constantes mientras existan en plasma. El tiempo necesario para que la clara alcance niveles constantes varía entre 2 a 3 días.
2. Los residuos en yema reflejan exposiciones de al menos 10 días, por lo tanto, dependiendo del momento de exposición en las yemas en crecimiento, los niveles en este tejido pueden aumentar, ser constantes o disminuir. Los residuos de droga en yema generalmente requieren exposiciones de 8 a 10 días para alcanzar niveles constantes.
3. Una sola exposición a la droga podría ser suficiente para detectar droga en clara o yema, dependiendo de las características de la droga y de la sensibilidad analítica del método utilizado.
4. La desaparición de la droga desde la clara o yema depende fuertemente de los niveles plasmáticos. Las drogas que son rápidamente eliminadas del cuerpo demoran 2 a 3 días postratamiento en desaparecer de la clara. La desaparición de droga desde la yema puede demorar 10 días.
5. Si los niveles de exposición son demasiado altos y el límite de detección de método analítico muy bajo, los residuos depositados en yemas en etapa de crecimiento intermedio, también serán detectables.

Anhalt (1977) y Hafez (1991) consideraron la yema como el principal compartimento del huevo a ser tomado en cuenta cuando se consideran residuos de droga. Esto, contrasta con las observaciones realizada por Blom (1975), quien reportó niveles de residuos de sulfonamidas mucho más altos en clara que en yema.

Gorla *et al.* (1997), estudiando la distribución de enrofloxacino en el huevo, señaló que existen diferencias en las concentraciones residuales entre la clara y la yema. Al respecto a la fecha actual, aún no se ha logrado un consenso, debido a que por una parte, se ha determinado que la droga permanece por más tiempo en la yema debiendo ser ésta el tejido marcador de residuos (Donoghe y Myers, 2000) y por otro lado, Lolo *et al.*, (2005),

al estudiar el traspaso de la droga al huevo determinó que el enrofloxacino se transfiere en mayor concentración a la clara.

Es por esto que este estudio pretende determinar la magnitud de traspaso de enrofloxacino y ciprofloxacino a los compartimentos del huevo, con el fin de definir el tejido marcador, el que puede ser monitoreado en Programas de Control de Residuos en caso que se incorporen los huevos en dicha actividad.

OBJETIVOS

Objetivo General

Definir el período de carencia de una formulación comercial de enrofloxacino en huevos destinados al consumo humano obtenidos de gallinas de postura.

Objetivos Específicos

1.- Implementar y validar un método analítico para la detección de residuos de enrofloxacino y ciprofloxacino en huevos de aves de postura, de acuerdo a las normativas internacionales.

2.- Identificar el tejido marcador de enrofloxacino y ciprofloxacino en los componentes de huevos.

3.- Definir el período de resguardo en huevos de una formulación comercial de enrofloxacino administrado en gallinas ponedoras.

MATERIALES Y MÉTODO

Objetivo 1: Implementación y validación de las metodologías analíticas para la detección de enrofloxacin y su metabolito ciprofloxacino

Se siguieron las recomendaciones de la Directiva 96/23/CE de la Comunidad Europea (Europa, 2002).

Matriz de trabajo.

Se utilizaron 200 huevos sin antimicrobianos (blanco) recolectados de gallinas Leghorn sin tratamiento. Estas gallinas fueron criadas desde las 16 semanas de edad en el galpón experimental del Departamento de Fomento de la Producción Animal de la Facultad de Cs. Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile y alimentadas con una dieta libre de antimicrobiano según los requerimientos de la especie. Con esto, nos aseguramos la total ausencia de residuos antimicrobianos que pudieran interferir en nuestro experimento.

Reactivos y estándares.

Enrofloxacin (USP Referente Standard, Rockville, MD) y ciprofloxacino (Dr. Ehrenstorfer GmbH[®], Augsburg, Germany) de pureza certificada. Acetonitrilo (Fisher Scientific, New Jersey, USA) y ácido acético, etanol absoluto, hexano, ácido cítrico, acetato de amonio, trietilamina (Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

Preparación de las muestras y procedimiento analítico.

En base a las diferencias fisicoquímicas de los compartimentos del huevo, estos se analizaron por separado. Las muestras correspondieron a 1 gr. de clara y 1 gr. de yema de cada huevo.

Cada muestra fue fortificada con el estándar correspondiente en las siguientes concentraciones de enrofloxacin y ciprofloxacino: 1, 2, 4 y 8 $\eta\text{g/g}$. Se utilizó soluciones madres de 1 mg/ml, a partir de las cuales se prepararon soluciones de trabajo para enriquecer las muestras blanco y alcanzar las concentraciones ya mencionadas.

Una vez fortificadas las muestras, éstas fueron tratadas utilizando un protocolo basado en el método de Zeng *et al.* (2005). A cada muestra de clara se le adicionó 4 ml de una solución de ácido acético/etanol absoluto, en una proporción 1:99 y fueron agitadas durante 5 minutos.

Por otro lado, a cada muestra de yema se le adicionó 500 µl de acetonitrilo y se agitaron por 5 minutos. Luego se adicionó 4 ml de la solución de extracción de ácido acético/etanol absoluto. Las muestras de clara y yema fueron agitadas durante 30 minutos a 200 rpm; y centrifugadas durante 20 minutos a 3220 g. El sobrenadante fue traspasado a un tubo de vidrio y secado bajo flujo de nitrógeno. El sedimento fue disuelto en 500 µl de acetonitrilo, agitado durante un minuto y sonicado por 2 minutos. Luego se agregó 2 ml de hexano, se agitó y sonicó. En las yemas la extracción con hexano fue repetida una vez más.

Posteriormente, la fase inferior fue secada bajo flujo de nitrógeno y el residuo fue disuelto con 500 µl de fase móvil. Finalmente, las muestras fueron traspasadas a un tubo eppendorf y centrifugadas a 8000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante fue filtrado y traspasado a un vial de HPLC para su posterior lectura cromatográfica.

Fase Móvil.

Acetonitrilo/solución acuosa (ácido cítrico 50 mM, acetato de amonio 100 mM ajustado con trietilamina pH 4) en una proporción de 9:91 v/v.

Sistema Cromatográfico y Condiciones Cromatográficas.

El sistema cromatográfico fue Cromatografía Líquida con Detector de Fluorescencia (HPLC, Waters 2475) y una columna Symmetry C18 5µm, 4.6x250 mm., Waters. Las condiciones cromatográficas utilizadas fueron las descritas por Zeng *et al.* (2005): flujo de la fase móvil 2.2 ml/minuto; temperatura de la columna 50° C; longitud de onda excitación/emisión: 278/465 nm.

Parámetros de validación.

Siguiendo las recomendaciones de la Directiva 96/23/CE de la Comunidad Europea (Europa, 2002), los parámetros a definir fueron: tiempo de retención del analito, especificidad, recuperación, precisión, repetibilidad, límite de decisión ($CC\alpha$), capacidad de detección ($CC\beta$) y robustez.

1. Tiempo de retención del analito:

Se analizaron 6 drogas puras de enrofloxacino y ciprofloxacino respectivamente, sacando un promedio del tiempo de elución del analito.

2. Especificidad:

Se define como la capacidad de un método de distinguir entre el analito que se está midiendo y otras sustancias. Se determinó analizando 20 muestras blanco para verificar posibles interferencias en la región de interés en la que cabe esperar la elución del analito.

3. Recuperación:

Como no se dispone de material de referencia certificado, este factor se determinó mediante experimentos con matriz en blanco fortificadas. Se fortificaron 18 muestras blanco con 1, 1,5 y 2 veces el MRPL y se calculó la concentración de cada muestra. El porcentaje de recuperación se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de recuperación} = \frac{100 \times \text{concentración muestra}}{\text{Nivel de fortificación}}$$

Los resultados obtenidos serán aceptados cuando se encuentren dentro de los intervalos presentados en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Intervalos de recuperación aceptados según fracción de masa. (Europa 2002).

Fracción de Masa ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Intervalo (%)
≤ 1	- 50 a + 20
> 1 a 10	- 30 a + 10
≥ 10	- 20 a + 10

4. Precisión:

Se analizaron 6 curvas de 1, 2 y 4 $\eta\text{g}/\text{g}$ y luego se calculó el promedio, desviación estándar (D.S) y coeficiente de variación (C.V) entre mismas concentraciones. Los valores serán aceptados si los coeficientes de variación se encuentran dentro de los valores presentados en el cuadro 4.

Cuadro 4. Coeficiente de variación aceptado según fracción de masa. (Europa 2002).

Fracción de Masa ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	CV (%)
≥ 10 a 100	20
> 100 a 1000	15
≥ 1000	10

Para aquellas fracciones de masa inferiores a 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, los CV deberán ser lo más bajo posible.

5. Curvas de calibración:

La linealidad del método se mostró a través de 3 curvas de calibración de 1, 2, 3, 4, 8 y 16 $\eta\text{g}/\text{g}$, cuyo Coeficiente de Correlación (R) es cercano a uno (linealidad de la curva).

6. Repetibilidad:

Se determinó de la misma manera que la precisión, es decir, mediante 6 curvas de 3 puntos cada una. Los resultados fueron aceptados cuando el coeficiente de variación de las curvas era la mitad o igual al coeficiente de variación de la precisión.

7. Límite de decisión o detección ($CC\alpha$):

Corresponde a la probabilidad de error α (falso positivo) que una muestra no es conforme o positiva. Para calcularlo analizamos 5 curvas de 1, 2, 4 y 8 $\eta\text{g/g}$, incluyendo una muestra blanco (concentración cero) para cada curva. El límite de decisión es igual a la concentración correspondiente a la ordenada en el origen más 2,33 veces la desviación estándar de la ordenada en origen.

8. Capacidad de detección ($CC\beta$):

Concentración mínima en que se puede detectar muestras contaminadas con una certeza estadística de $1 - \beta$. Se calculó analizando 20 muestras blanco enriquecidas en la concentración del límite de decisión. La capacidad de detección ($\beta = 5\%$) es igual al límite de decisión más 1,64 veces la desviación estándar del coeficiente de variación obtenido entre cada muestra.

9. Robustez:

Corresponde a la susceptibilidad de un método analítico a los cambios de las condiciones experimentales. Se identificaron 3 factores (tiempo de agitado en shaker, tiempo centrifugación, temperatura secado) que pudieran influir en los resultados, se variaron ligeramente y mediante el Método de Youden (diseño factorial fraccional) se diseñaron 8 cartas de trabajo que incluían las modificaciones alternadamente, lo que permitió detectar las interacciones entre dichos factores:

- Carta A: agitar 25 minutos; centrifugar 15 minutos; secado 50°C
- Carta B: agitar 30 minutos; centrifugar 15 minutos; secado 50°C
- Carta C: agitar 25 minutos; centrifugar 20 minutos; secado 50°C
- Carta D: agitar 30 minutos; centrifugar 20 minutos; secado 50°C
- Carta E: agitar 25 minutos; centrifugar 15 minutos; secado 78°C
- Carta F: agitar 30 minutos; centrifugar 15 minutos; secado 78°C
- Carta G: agitar 25 minutos; centrifugar 20 minutos; secado 78°C
- Carta H: agitar 30 minutos; centrifugar 20 minutos; secado 78°C

Objetivo 2: Identificar el tejido marcador de enrofloxacino y ciprofloxacino

Objetivo 3: Definir el período de resguardo de una formulación comercial de enrofloxacino en huevos de gallinas ponedoras

Animales de Experimentación.

Se utilizaron 15 pollitas Leghorn de 16 semanas de edad; éstas fueron criadas en el galpón experimental del Departamento de Fomento de la Producción Animal de la Facultad de Cs. Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, que cuenta con dispositivos para el manejo de la temperatura ambiental, ventilación e iluminación natural y artificial.

Se alojaron en jaulas convencionales con comederos lineales de canoa y bebederos automáticos de niple para el consumo de alimento y agua *ad libitum*. Estas aves fueron alimentadas con dietas libres de antimicrobianos que cubren los requerimientos nutricionales según lo señalado por el National Research Council (NRC, 1994) y línea genética respectiva. Las condiciones de manejo de las aves, se efectuaron de acuerdo a los preceptos del bienestar animal, sancionadas por el Comité de Ética de la Facultad de Cs. Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile (ANEXO 1). Las gallinas fueron asignadas aleatoriamente a dos grupos:

- Grupo A: grupo tratamiento formado por 12 gallinas, con lo cual se aseguró la obtención mínima de 10 huevos diarios en su peak de postura.
- Grupo B: grupo sin tratamiento (control) formado por 3 gallinas.

Al grupo A se le administró una dosis de 10 mg/kg p.v. de enrofloxacino al 10% por 5 días consecutivos, utilizando una sonda gástrica; al grupo B se le administró agua.

Recolección de los Huevos.

Para evaluar la transferencia de enrofloxacino y ciprofloxacino a los distintos compartimentos del huevo, éstos fueron recolectados desde el día 0 (inicio tratamiento) y se analizaron 6 muestras de clara y yema por día.

Para la evaluación de los períodos de carencia e identificación del tejido marcador, los huevos fueron recolectados durante 30 días post-tratamiento, siendo analizadas 8 muestras de clara y yema por cada día. Los huevos fueron rotulados señalando día, hora y grupo de recolección y fueron mantenidos refrigerados (entre 4°C y 8°C) hasta el análisis en el laboratorio.

Evaluación del Período de Resguardo

Para determinar el período de resguardo de enrofloxacino en huevos, se determinó las concentraciones de este antimicrobiano y su metabolito en función del tiempo. Para esto, se realizaron curvas en escala semilogarítmica para la concentración de enrofloxacino en huevos versus tiempo. Se realizó un análisis de regresión lineal en la fase final de eliminación considerando un nivel de confianza del 95%. A partir de esta gráfica se definió el momento (días) en el cual las concentraciones alcanzan el $CC\alpha$. Tomando en cuenta las desviaciones individuales en relación al comportamiento poblacional, consideramos un margen de seguridad de un 30% en días (Arboix y Martín-Jiménez, 2002; CVMP, 1997).

El período de resguardo se determinó cuando todas las observaciones estaban bajo el $CC\alpha$. Adicionalmente, se agregó el 30% de margen de seguridad. En caso que el período de resguardo coincida con una fracción de 1 día (por ejemplo 11,3 días) se debe considerar el período incluyendo un día completo (12 días) (Arboix y Martín-Jiménez, 2002).

RESULTADOS

Implementación y validación de un método analítico para la detección de residuos de enrofloxacino y ciprofloxacino en huevos de aves de postura, de acuerdo a las normativas internacionales.

Los resultados obtenidos de la validación del método analítico utilizado para la detección de residuos de enrofloxacino y ciprofloxacino se exponen a continuación:

1. Tiempo de retención de los analitos:

El promedio del tiempo de retención para ciprofloxacino fue a los 13,8 minutos. En el caso de enrofloxacino el promedio fue a los 24,1 minutos.

2. Especificidad:

En 20 muestras blancos de yema y clara no se observaron interferencias en los tiempos de retención de enrofloxacino y su metabolito ciprofloxacino.

3. Recuperación:

Los datos de recuperación obtenidos para ciprofloxacino y enrofloxacino en clara y yema se presentan en los cuadros 5, 6, 7 y 8:

Cuadro 5. Porcentaje de Recuperación de ciprofloxacino en clara analizada por HPLC fluorescencia.

Concentración (η g/g)	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6	Rangos (%)
1	95	80	117	99	98	81	80-117
2	104	115	87	100	101	114	87-115
4	99	97	102	100	100	98	97-102

Cuadro 6. Porcentaje de Recuperación de enrofloxacino en clara analizada por HPLC fluorescencia.

Concentración (ng/g)	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6	Rangos (%)
1	108	85	99	92	108	109	85-109
2	94	111	101	107	96	95	94-111
4	101	98	100	99	101	101	98-101

Cuadro 7. Porcentaje de Recuperación de ciprofloxacino en yema analizada por HPLC fluorescencia.

Concentración (ng/g)	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6	Rangos (%)
1	91	100	113	121	121	107	91-121
2	107	100	90	84	84	93	84-107
4	99	100	102	103	103	101	99-103

Cuadro 8. Porcentaje de Recuperación de enrofloxacino en yema analizada por HPLC fluorescencia.

Concentración (ng/g)	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6	Rangos (%)
1	91	106	96	92	102	80	80-106
2	107	95	103	106	99	115	95-115
4	99	101	100	99	100	98	98-101

Los rangos de recuperación estuvieron dentro de lo establecido para un rango de ≤ 1 ng/g y 1 a 10 ng/g, de acuerdo a lo recomendado por la Decisión 657 de año 2002 (Europa, 2002).

4. Precisión (Reproducibilidad intralaboratorio):

El método demostró ser preciso ya que el CV (%) fue menor al 20%. Los resultados obtenidos se muestran en los cuadros 9, 10, 11 y 12.

Cuadro 9. Precisión o reproducibilidad intralaboratorio de ciprofloxacino en clara analizada por HPLC fluorescencia.

Concentración (ng/g)	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6	X	D.S	C.V
1	1,0	0,8	1,2	1,2	1,0	1,0	1,03	0,16	15,44
2	2,0	2,3	1,6	1,7	2,0	2,0	1,95	0,24	12,21
4	4,0	3,9	4,1	4,1	4,0	4,0	4,02	0,08	1,98

Cuadro 10. Precisión o reproducibilidad intralaboratorio de enrofloxacin en clara analizada por HPLC fluorescencia.

Concentración (ng/g)	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6	X	D.S	C.V
1	1,2	0,9	1,2	1,0	1,0	1,2	1,07	0,16	14,52
2	1,7	2,2	1,7	2,0	2,1	1,8	1,90	0,23	12,25
4	4,1	3,9	4,1	4,0	4,0	4,1	4,03	0,08	1,92

Cuadro 11. Precisión o reproducibilidad intralaboratorio en ciprofloxacino en yema analizada por HPLC fluorescencia.

Concentración (ng/g)	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6	X	D.S	C.V
1	0,9	1,0	1,1	1,2	1,1	1,0	1,05	0,11	10,33
2	2,1	2,0	1,8	1,7	1,9	2,0	1,93	0,16	8,42
4	4,0	4,0	4,1	4,1	4,0	4,0	4,02	0,05	1,35

Cuadro 12. Precisión o reproducibilidad intralaboratorio en enrofloxacino en yema analizada por HPLC fluorescencia.

Concentración (ng/g)	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6	X	D.S	C.V
1	0,9	1,1	1,0	1,2	1,1	1,0	1,05	0,11	10,31
2	2,1	1,9	2,1	1,7	1,8	2,0	1,93	0,16	8,41
4	4,0	4,0	4,0	4,1	4,1	4,0	4,02	0,05	1,34

5. Repetibilidad:

La repetibilidad en el CV de cada concentración medida, está en rango de valores correspondientes a la mitad o igual al CV de la Precisión. Los datos obtenidos se muestran a continuación en los cuadros 13, 14, 15 y 16.

Cuadro 13. Repetibilidad de ciprofloxacino en clara analizada por HPLC fluorescencia.

Concentración (ng/g)	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6	X	D.S	C.V
1	1,0	0,8	1,2	1,0	1,0	0,8	0,95	0,14	14,44
2	2,1	2,3	1,7	2,0	2,0	2,3	2,07	0,21	9,95
4	4,0	3,9	4,1	4,0	4,0	3,9	3,98	0,07	1,73

Cuadro 14. Repetibilidad de enrofloxacino en clara analizada por HPLC fluorescencia.

Concentración (ng/g)	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6	X	D.S	C.V
1	1,1	0,9	1,0	1,0	1,2	1,2	1,04	0,13	12,81
2	1,9	2,2	2,0	2,1	1,8	1,7	1,94	0,20	10,33
4	4,0	3,9	4,0	4,0	4,1	4,1	4,02	0,07	1,66

Cuadro 15. Repetibilidad de ciprofloxacino en yema analizada por HPLC fluorescencia.

Concentración (ng/g)	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6	X	D.S	C.V
1	0,9	1,0	1,1	1,2	1,0	1,0	1,04	0,11	10,62
2	2,1	2,0	1,8	1,7	2,0	2,0	1,95	0,16	8,47
4	4,0	4,0	4,1	4,1	4,0	4,0	4,02	0,05	1,37

Cuadro 16. Repetibilidad de enrofloxacin en yema analizada por HPLC fluorescencia.

Concentración (ng/g)	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6	X	D.S	C.V
1	0,9	1,1	1,0	0,9	1,0	0,8	0,95	0,09	9,68
2	2,1	1,9	2,1	2,1	2,0	2,3	2,08	0,14	6,60
4	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	3,9	3,97	0,05	1,15

6. Curvas de Calibración:

Los Cuadros 17 y 18 presentan las curvas de calibración, las que demuestran la linealidad del método.

Cuadro 17. Curvas de calibración de ciprofloxacino y enrofloxacin en clara obtenidas a partir del análisis cromatográfico (HPLC fluorescencia) de muestras fortificadas a distintas concentraciones.

Concentración (ng/g)	Ciprofloxacino			Enrofloxacin		
	Áreas curvas			Áreas curvas		
	1	2	3	1	2	3
1	155,336	90,116	73,193	2628,352	332,726	499,564
2	517,085	152,446	182,074	2117,715	889,249	714,732
4	797,247	409,541	395,912	3702,266	1965,321	1090,294
8	1478,801	823,405	796,558	4521,314	3294,977	2217,829
16	3266,335	1644,325	1688,923	9693,079	6708,511	3521,32
Intercepto	-4,475	-25,477	-38,04	420,14	59,588	337,8
Pendiente	201,199	104,74	107,32	578,54	415,9	204,99
R	0,9971	0,9995	0,9998	0,9790	0,9983	0,9941

Cuadro 18. Curvas de calibración de ciprofloxacino y enrofloxacino en yema a partir del análisis cromatográfico (HPLC fluorescencia) de muestras fortificadas a distintas concentraciones.

Concentración ($\eta\text{g/g}$)	Ciprofloxacino			Enrofloxacino		
	Áreas curvas			Áreas curvas		
	1	2	3	1	2	3
1	118,952	146,598	89,098	648,196	635,855	227,302
2	282,786	299,307	121,478	1129,141	1040,818	343,544
4	528,148	601,448	283,624	1846,906	2061,014	903,845
8	1159,906	1135,444	813,167	3681,664	3288,555	2160,146
16	2370,177	2113,517	1751,864	7242,528	6458,237	3975,981
Intercepto	-39,147	50,359	97,924	183,54	321,98	71,151
Pendiente	150,18	130,47	114,48	439,7	383,05	256,99
R	0,9997	0,9910	0,9971	0,9997	0,9986	0,9975

7. Limite de Decisión $CC\alpha$ y Capacidad de detección $CC\beta$:

Los datos de $CC\alpha$ y $CC\beta$ para ciprofloxacino y enrofloxacino en clara y yema analizadas por HPLC fluorescencia se presentan en el Cuadro 19.

Cuadro 19. $CC\alpha$ y $CC\beta$ para enrofloxacino y ciprofloxacino en clara y yema analizadas por HPLC fluorescencia.

Droga		$CC\alpha$ ($\eta\text{g/g}$)	$CC\beta$ ($\eta\text{g/g}$)
Ciprofloxacino	Clara	0,47	1,24
	Yema	0,82	1,20
Enrofloxacino	Clara	0,91	1,33
	Yema	0,80	1,20

De acuerdo a los valores obtenidos para el $CC\alpha$ en clara y yema para ciprofloxacino y enrofloxacino, se informa 1 $\eta\text{g/g}$ para ambas matrices, valor límite a partir del cual se puede concluir con una probabilidad de error α (1%) que una muestra no es conforme. En el caso del $CC\beta$, se informa como 2 $\eta\text{g/g}$, tanto en clara y yema para ambos antimicrobianos,

contenido mínimo de la sustancia que puede ser detectado, identificado o cuantificado con una posibilidad de error β (5%).

9. Robustez

El método analítico seleccionado fue robusto ya que las D.S. calculadas para clara y yema luego de introducir modificaciones en el método, fueron menores que la D.S de la precisión. Las D.S para enrofloxacino y ciprofloxacino en clara fueron 0,034 $\eta\text{g/g}$ y 0,015 $\eta\text{g/g}$ y yema 0,013 $\eta\text{g/g}$ y 0,068 $\eta\text{g/g}$, respectivamente, los que son menores a la D.S calculada en la precisión (0,16 $\eta\text{g/g}$ en clara y 0,11 $\eta\text{g/g}$ en yema).

Los factores que más afectaron la robustez fueron el secado a 78°C y agitar las muestras durante 30 minutos.

2. Evaluación de la magnitud del traspaso de enrofloxacin y ciprofloxacino en la clara y la yema de huevos obtenidos desde gallinas durante 5 días de tratamiento.

Las concentraciones obtenidas de ciprofloxacino y enrofloxacin en clara y yema por cada día de tratamiento se presentan en el cuadro 20.

Cuadro 20. Concentraciones de ciprofloxacino y enrofloxacin en clara y yema.

Día	Clara		Yema	
	Concentración (ng/g)		Concentración (ng/g)	
	Ciprofloxacino	Enrofloxacin	Ciprofloxacino	Enrofloxacin
1	200,3	1963,1	6,2	347,3
	111,7	1473,5	6,1	231,4
	137,8	2205,7	7,0	523,8
	113,5	1908,0	8,6	303,8
	124,0	2136,5	10,2	317,8
	109,8	1562,7	6,9	177,3
2	136,1	2577,0	8,1	604,5
	145,6	2422,5	25,6	896,1
	134,0	2717,0	18,7	722,2
	116,4	1872,0	14,8	497,6
	123,5	1884,8	12,0	659,3
	108,0	1637,1	14,4	421,8
3	107,5	1406,1	45,3	726,7
	137,4	2466,7	34,7	875,6
	113,5	1533,4	21,7	619,5
	136,3	2065,0	32,5	695,8
	127,3	1972,2	29,1	635,7
	115,7	1566,5	11,5	632,4
4	127,6	1764,7	113,4	529,0
	115,8	1796,8	64,0	1093,5
	117,2	1627,4	40,7	701,2
	109,3	1399,4	84,9	662,7
	115,1	1544,7	31,5	723,1
	121,4	1784,4	39,9	834,0
5	114,2	1962,8	78,0	454,8
	113,8	1988,6	165,8	564,9
	126,0	1771,8	118,2	1347,3
	124,6	2136,9	89,8	1034,1
	115,2	1556,1	99,2	1189,9
	112,7	1714,4	121,7	1209,5

La Figura 3 grafica las concentraciones promedio de ciprofloxacino y enrofloxacin en clara y yema en cada día de tratamiento, expresadas en Logaritmo Natural (LN)

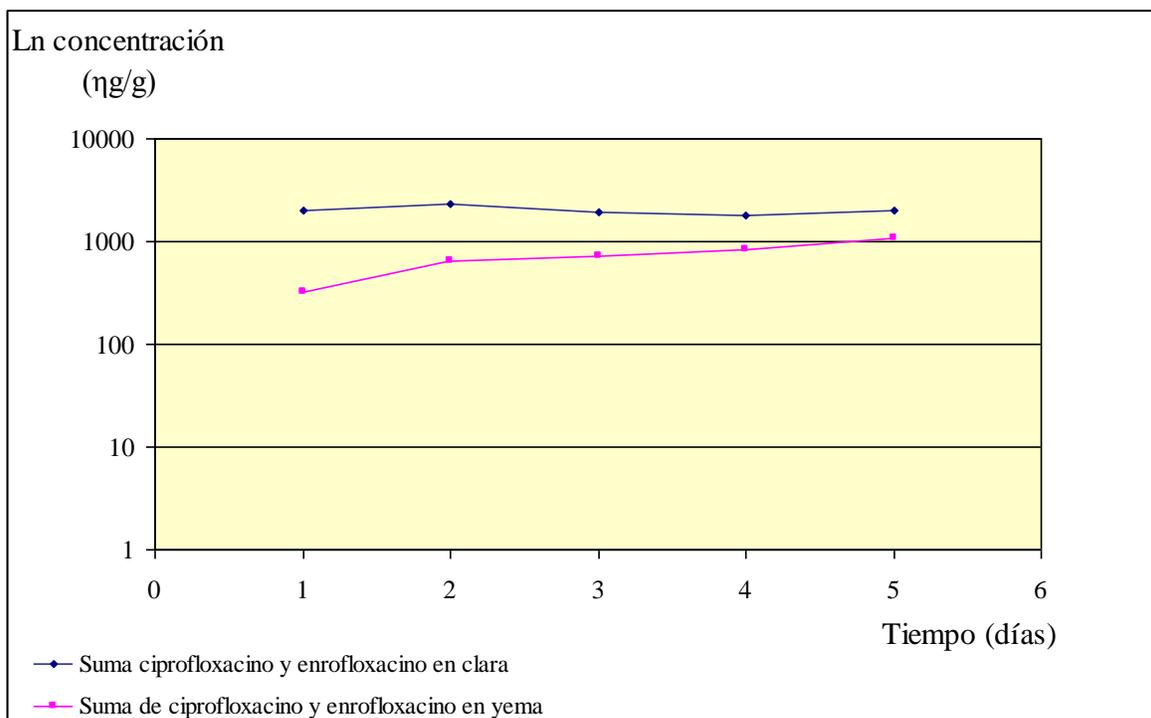


Figura 3. Promedio de las concentraciones de ciprofloxacino y enrofloxacin en clara y yema obtenidas durante el tratamiento. Los datos se presentan en escala semilogarítmica.

3. Evaluación de la cinética de depleción de enrofloxacino y ciprofloxacino en huevos originados durante la fase inicial del ciclo de postura, considerando el límite de detección de los métodos analíticos.

Los resultados de la cinética de depleción de enrofloxacino y ciprofloxacino en clara y yema se presentan en el cuadro 21.

Cuadro 21. Concentraciones de ciprofloxacino y enrofloxacino en clara y yemas analizadas por HPLC fluorescencia durante días postratamiento.

Día postratamiento	Clara		Yema	
	Concentración (ng/g)		Concentración (ng/g)	
	Ciprofloxacino	Enrofloxacino	Ciprofloxacino	Enrofloxacino
1	66,3	787,5	119,239	1798,4
	56,8	310,8	158,255	1304,4
	52,4	290,6	137,852	1227,6
	55,7	276,4	265,066	2074,0
	54,6	261,5	230,296	1695,3
	62,0	489,4	165,823	944,1
	25,1	200,8	98,7894	845,8
	297,1	111,6	146,823	751,0
2	270,479	87,484	125,064	1800,785
	208,618	28,847	294,084	1487,790
	722,628	115,381	249,329	1465,042
	251,747	126,546	279,003	1579,382
	303,208	113,144	213,415	1098,610
	236,946	101,402	177,431	657,409
	155,176	66,122	148,408	539,109
	333,701	143,147	165,169	449,189
3	5,422	56,120	170,445	638,122
	5,733	69,526	168,530	704,796
	7,561	51,961	276,221	1122,593
	14,856	60,876	225,333	672,211
	11,885	54,210	254,117	1080,477
	13,080	51,512	172,768	316,706
	11,885	71,366	178,123	352,942
	11,885	55,499	172,454	493,947

Día postratamiento	Clara		Yema	
	Concentración (ng/g)		Concentración (ng/g)	
	Ciprofloxacino	Enrofloxacino	Ciprofloxacino	Enrofloxacino
4	ND	20,392	124,0	427,334
	ND	24,823	103,7	403,503
	ND	11,702	267,5	5,698
	ND	40,142	40,1	117,059
	ND	29,290	129,8	425,257
	ND	29,323	174,9	540,669
	ND	17,183	60,1	175,352
	ND	32,902	114,2	515,275
5	ND	7,181	43,9	97,691
	ND	6,405	117,7	263,449
	ND	8,930	171,7	468,158
	ND	3,795	121,4	220,929
	ND	9,934	81,8	166,850
	ND	11,180	60,8	144,926
	ND	8,813	111,6	264,821
	ND	6,850	80,3	295,199
6	ND	2,253	16,8	14,870
	ND	2,795	132,7	209,873
	ND	1,655	60,1	149,061
	ND	5,898	59,9	80,809
	ND	1,591	21,3	41,448
	ND	2,516	28,8	23,095
	ND	1,725	15,1	19,222
	ND	1,0	8,3	7,6
7	ND	1,1	3,1	3,3
	ND	ND	3,4	3,7
	ND	1,0	2,8	2,8
	ND	1,5	6,1	5,0
	ND	ND	2,7	3,9
	ND	1,3	3,1	3,8
	ND	1,0	8,0	11,6
	ND	ND	ND	3,0
8	ND	ND	ND	1,0
	ND	ND	ND	ND
	ND	1,1	ND	1,2
	ND	1,2	ND	1,0
	ND	ND	ND	ND
	ND	ND	ND	1,3
	ND	ND	2,1	1,8

Día postratamiento	Clara		Yema	
	Concentración (ng/g)		Concentración (ng/g)	
	Ciprofloxacino	Enrofloxacino	Ciprofloxacino	Enrofloxacino
9	ND	ND	ND	ND
	ND	ND	ND	ND
	ND	ND	ND	1,0
	ND	ND	ND	ND
	ND	1,4	ND	ND
	ND	ND	ND	ND
	ND	ND	ND	ND
10	ND	ND	ND	ND
	ND	ND	ND	ND
	ND	ND	ND	ND
	ND	ND	ND	ND
	ND	ND	ND	ND
	ND	ND	ND	ND
	ND	ND	ND	ND

ND: observaciones < 1 ng/g.

Los días 6, 9 y 10 tienen menos observaciones por falta de matriz de trabajo.

La Figura 4 presenta las concentraciones promedios de ciprofloxacino y enrofloxacino obtenidas durante los días postratamiento, expresadas en LN.

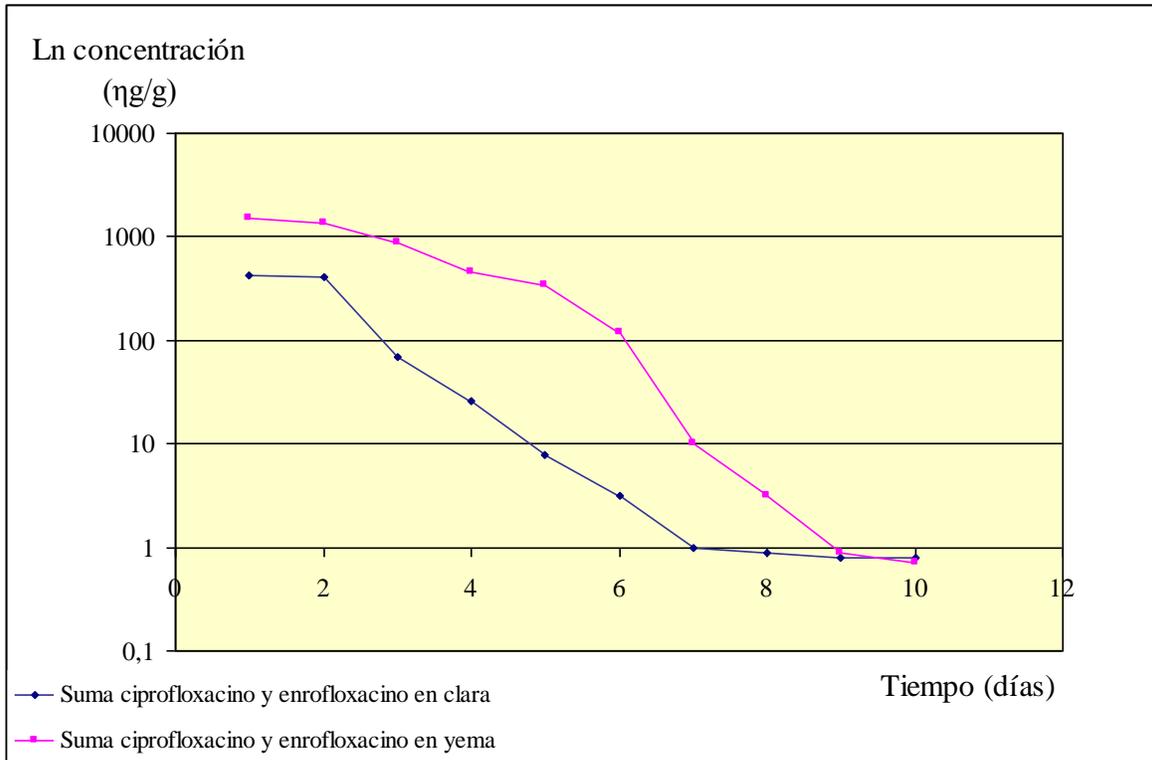


Figura 4. Depleción de ciprofloxacino y enrofloxacino de clara y yema después de 5 días de tratamiento. Los datos se presentan en escala semilogarítmica.

Dado que a partir del día 10 postratamiento todas las observaciones se encuentran bajo el $CC\alpha$, y sumando el 30% de margen de seguridad, el período de resguardo calculado en este estudio para una formulación de enrofloxacino al 10%, es de 13 días.

DISCUSIÓN

Las fluoroquinolonas son antimicrobianos ampliamente usados en medicina veterinaria para el tratamiento de enfermedades en animales de producción.

En Chile, el registro de fármacos tiene autorizado el uso de fluoroquinolonas en pollos broiler y pavos en crecimiento, pero no en aves de postura en producción. Por otro lado, nuestro país no cuenta con un control sobre el uso extraetiqueta, por lo que no podemos asegurar el no uso de estos fármacos en aves de postura y por lo tanto la ausencia de residuos de antimicrobianos en huevos destinados a consumo de la población.

Actualmente, Chile cuenta con Programas de Control de Residuos de Fármacos en una variedad de alimentos de origen animal, como leche, miel, músculo e hígado; sin embargo, dentro de estos programas los huevos no están incluidos. Según lo anterior, surge la necesidad de establecer un punto de partida respecto a la urgencia de aplicar medidas de prevención y control, y así evitar la presencia de residuos antimicrobianos en este alimento.

En los programas de control de residuos y estudios de depleción, la selección y validación de un método analítico es de especial preocupación y por esta razón antes de realizar el estudio se desarrolló y validó un método analítico que cumpla con las recomendaciones internacionales.

Este estudio utilizó un protocolo de extracción basado en el método de Zeng *et al.* (2005), siendo ajustado a las condiciones analíticas del Laboratorio de Farmacología Veterinaria FAVET de la Universidad de Chile y validado según las normas de la Comunidad Europea, Decisión 657 del año 2002, para lo cual determinamos los parámetros de tiempo de retención del analito, especificidad, recuperación, repetibilidad, precisión, curvas de calibración, límite de decisión $CC\alpha$, capacidad de detección $CC\beta$ y robustez.

El tiempo de retención obtenido en nuestro estudio (13,8 minutos para el ciprofloxacino y 24,1 minutos para el enrofloxacino) difiere de los resultados obtenidos por

Zeng *et al.* (2005), quienes desarrollaron un método de determinación simultánea para nueve fluoroquinolonas en clara y yema, utilizando cromatografía líquida con detector de fluorescencia. En dicho trabajo, el tiempo de retención del ciprofloxacino fue a los 8,975 minutos y el de enrofloxacinó fue a los 16,985. Esto se puede atribuir a diferencias de los equipos cromatográficos y condiciones Cromatográficas (presiones, programas de temperatura o columnas analíticas utilizadas, principalmente en cuanto a su diámetro como a su largo).

En cuanto a la especificidad, al analizar las veinte muestras blanco, se pudo corroborar que el método de extracción aplicado no presentó interferencias en el tiempo de elución del enrofloxacinó ni tampoco en el de su metabolito ciprofloxacino, por lo cual el método es lo suficientemente específico como para distinguir entre ambos analitos y otras sustancias presentes en la matriz.

Los valores de recuperación fueron mayores a un 80%, coincidiendo con el estudio realizado por Chu *et al.* (2002), quienes desarrollaron un método de determinación de fluoroquinolonas en clara y yema mediante cromatografía líquida con detección fluorométrica. La repetibilidad del método se considera aceptada ya que el coeficiente de variación es igual o menor al obtenido en la precisión, tal como lo plantea la decisión 657 del año 2002 en el Diario Oficial de las Comunidades Europeas.

Las tres curvas de calibración seleccionadas para clara y yema tienen un $R > 0,95$ demostrando la linealidad del método analítico, lo que hace confiable la cuantificación de los resultados obtenidos. Así también, el método demostró ser robusto, ya que todas las desviaciones estándar obtenidas fueron menores a la desviación estándar de la precisión. Es importante notar que, los factores de secado y agitado fueron los que más afectaron los resultados, por lo cual son factores que se deben trabajar con cuidado y evitar modificaciones.

Los valores de $CC\alpha$ y $CC\beta$ obtenidos para ciprofloxacino y enrofloxacinó en los distintos compartimentos del huevo (Cuadro 19) permiten señalar que tanto la capacidad de

detección como el límite de decisión se acercan bastante a los obtenidos por otros autores. Schneider y Donohue (2003), desarrollaron un método de determinación multiresidual de fluoroquinolonas en huevos, usando LC-MS/MS y las sensibilidades logradas fueron similares a las alcanzadas por el método validado en este estudio. Herranz *et al.* (2007), desarrollaron un método para la determinación de fluoroquinolonas en huevos, usando una extracción líquida presurizada, sin embargo, los resultados para CC α y CC β obtenidos por estos autores estuvieron muy por encima de los obtenidos en este trabajo. Esto indica que la sensibilidad del HPLC fluorescencia puede llegar a ser tan buena como la de la LC-MS/MS; no obstante, utilizar esta última técnica otorga la ventaja que confirma la molécula detectada mediante la identificación de iones de transición (Herranz *et al.*, 2007).

Todos los parámetros de validación cumplen con las sugerencias de validación de la Decisión 657 del año 2002 de la Comunidad Europea, por lo cual, el método se considera apto para la detección de residuos de ciprofloxacino y enrofloxacino en huevos. Es así que esta metodología podría ser utilizada en los futuros programas de control de residuos de estos antimicrobianos en huevos en Chile.

También podemos señalar que el enrofloxacino como su metabolito ciprofloxacino se distribuyen en clara y yema, pero en diferentes magnitudes, similar a lo descrito por Gorla *et al.* (1997). Estos investigadores estudiaron la transferencia de enrofloxacino y ciprofloxacino en clara y yema, obtenidas a partir de huevos de gallinas tratadas con enrofloxacino al 5% durante 5 días, encontrando concentraciones de antimicrobiano superiores en clara.

A una conclusión similar llegaron Kan y Petz (2000), quienes describieron un comportamiento muy similar al obtenido en nuestro estudio, donde las concentraciones alcanzadas en la clara durante el tratamiento, son siempre más altas que las alcanzadas en la yema y se mantienen dentro de rangos constantes. Esto, se puede atribuir a que el principal componente de la clara es la albúmina, una proteína presente en la sangre y a la cual las fluoroquinolonas se unen entre un 20% - 40%, por lo que las concentraciones del antimicrobiano en la sangre se reflejan en la clara.

La formación de las proteínas de clara toma alrededor de 1 a 2 días, por lo tanto, el máximo de antimicrobiano se espera 2 a 3 días de iniciado el tratamiento. En este experimento, el nivel máximo de antimicrobiano en la clara se obtuvo el segundo día de tratamiento, similar a lo obtenido por Lolo *et al.* (2005), quienes usaron una formulación de enrofloxacino al 5% a una dosis oral de 12 mg/kg durante 5 días, obteniendo niveles máximos al tercer día de tratamiento.

Por otro lado, la yema mantuvo durante el tratamiento, concentraciones menores que la clara y, a medida que progresaba el tratamiento, estas concentraciones aumentaron gradualmente desde 324 $\eta\text{g/g}$ el primer día hasta 1079 $\eta\text{g/g}$ el quinto día. De acuerdo con Lolo *et al.* (2005) esto es esperable, ya que las lipoproteínas de la yema se forman en el hígado, por lo cual los niveles máximos se esperan a los 8 a 10 días después de administrada la primera dosis.

En ambas matrices, los niveles de enrofloxacino fueron en general más altos que los alcanzados por el ciprofloxacino, lo cual es esperable ya que este último corresponde a un metabolito del enrofloxacino.

En los días posteriores al tratamiento, en la clara los niveles de antimicrobiano decaen fuertemente el primer día postratamiento, disminuyendo rápidamente durante los días siguientes. Esta brusca disminución de droga en clara demuestra que los niveles de antimicrobiano en este compartimiento son un reflejo de los niveles presentes en la sangre.

En contraste a lo sucedido en la clara, en la yema los niveles de droga en el primer día postratamiento fueron superiores a los del último día de tratamiento, disminuyendo gradualmente durante los siguientes días, alcanzando niveles inferiores a 1 $\eta\text{g/g}$ a partir del día 10 postratamiento. Esto coincide con lo descrito por Lolo *et al.* (2005), el cual encontró niveles mayores de antimicrobiano en los primeros días postratamiento y después estos niveles fueron gradualmente disminuyendo.

No se detectó ciprofloxacino en clara a partir del cuarto día postratamiento, mientras que las de enrofloxacino fueron detectables hasta el día 9 postratamiento. En la yema en cambio, los niveles de ciprofloxacino fueron detectables hasta el día 8 y el enrofloxacino hasta el día 9 postratamiento. En el trabajo desarrollado por Lolo *et al.* (2005), los niveles de ciprofloxacino en clara se mantuvieron detectables hasta el quinto día postratamiento, mientras que en yema lo fueron hasta el décimo día, es decir, los resultados de este estudio son bastante similares a los obtenidos por estos investigadores. Este comportamiento se puede atribuir a que el ciprofloxacino se origina a nivel hepático, en un proceso de biotransformación del enrofloxacino, y los componentes de la yema también se forman en el hígado, por lo cual, es esperable encontrar concentraciones de este metabolito en yema varios días después de terminado el tratamiento.

De acuerdo a los resultados de este trabajo, la yema y la clara se pueden considerar tejidos marcadores, ya que las concentraciones de antimicrobiano dejan de ser detectables en ambas al día 10 postratamiento. Esto se contrapone a lo descrito por Donoghue y Myers (2000), quienes consideraron a la yema como el principal compartimento marcador de residuos. Por otro lado, Blom (1975) reportó concentraciones de residuos de sulfonamidas más altas en clara que en yema. Debido a estas diferencias, se considera necesario realizar nuevas investigaciones que aclaren las discrepancias que existen con respecto a cual es el compartimento más indicado como marcador de residuos.

El período de resguardo definido (13 días) está por debajo de lo reportado por Lolo *et al.* (2005), quienes encontraron residuos hasta el día 15 postratamiento. Esto lo podemos atribuir a que estos investigadores realizaron la detección de residuos antimicrobianos mediante LC-MS/MS, técnica con mayor sensibilidad que la usada en este estudio.

Es evidente la necesidad de seguir con investigaciones enfocadas a la detección de residuos antimicrobianos en huevos, utilizando métodos analíticos de última generación con mejores niveles de detección, los que además puedan ser aplicados en estudios de depleción, con el objetivo de determinar con mayor exactitud los períodos de resguardo de diferentes formulaciones farmacéuticas.

CONCLUSIONES

1-. El método validado para la detección de enrofloxacino y su metabolito ciprofloxacino en huevos, cumple con los criterios de validación establecidos por Directiva 2002/657 de la Comunidad Europea.

2-. Los huevos que provienen de gallinas ponedoras tratadas con una formulación de enrofloxacino al 10% no deben enviarse a consumo humano hasta pasados 13 días de finalizado el tratamiento.

3-. Se puede utilizar yema o clara como tejido marcador para la detección de residuos de enrofloxacino; sin embargo, debido a la discrepancia que existe en la literatura disponible en relación a cual de los dos compartimentos debe ser considerado como tejido marcador, es recomendable realizar nuevas investigaciones con respecto a este tema.

BIBLIOGRAFÍA

- **ALÓS, J.** 2003. Quinolonas. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 21: 261-268.
- **ANDERSON, M. ; MACGOMAN, A.** 2003. Development of the quinolones. *J Antimicrob Chemother.* 51: 1-11.
- **ANDRIOLE, V.** 1989. Mecanismo de acción. **In:** Las Quinolonas, Andriole, V. Academic Press, INC. California, Estados Unidos. pp 3.
- **ANDRIOLE, V.** 1999. The future of the quinolones. *Drugs.* 58: 1-5.
- **ANDRIOLE, V.** 2005. The Quinolones: Past, Present, and Future. *Clin Infect Dis.* 41: 113-119.
- **ANHALT, G.** 1977. Physiologie der Eientstehung und Einlagerung antibakterieller Wirkstoffe. *Arch. Gefluegelk.* 41: 232-237 (citado por Kan y Petz. 2000. Residues of veterinary drugs in eggs and their distribution between yolk and white. *J Agric Food Chem.* 48: 6397-6403.
- **ARBOIX, M.; MARTÍN-JIMÉNEZ, T.** 2002. Aspectos terapéuticos y de salud pública de los residuos farmacológicos. **In:** Botana, L.; Landoni, M.; Martín-Jiménez, T. (Eds.). *Farmacología y Terapéutica Veterinaria.* McGraw-Hill-Interamericana de España. Madrid, España. pp. 681-689.
- **ASOHUEVO-CHILE A. G.** 2008. Asociación Gremial de Productores de Huevos de Chile. Estadísticas generales. [en línea]. <<http://www.asohuevo.cl>> [consulta 08-09-2008].
- **BEARDEN, D.; DANZIGER, L.** 2001. Mechanism of action of and resistance to quinolones. (Abstract). *Pharmacotherapy.* 21: 224-232.
- **BLOM, L.** 1975. Plasma Half-Lives and the Excretion into Egg-White and -yolk of Three Sulphonamides and Pyrimethamine after Medication of Laying Hens. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 37: 79-93 (citado por Kan y Petz. 2000. Residues of veterinary drugs in eggs and their distribution between yolk and white. *J Agric Food Chem.* 48: 6397-6403.
- **CHILE. MINISTERIO DE SALUD.** 1999. Resolución exenta N°1462/1999. Fija límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en alimentos destinados a consumo humano. Publicada en el D. Oficial de 01.03.02. 29 p.
- **CHU, P.; WANG, R.; CHU, H.** 2002. Liquid chromatographic determination of fluoroquinolones in egg albumen and egg yolk of laying hens using fluorometric detection. *J Agric Food Chem.* 50: 4452-4455.

- **COMISIÓN DEL CODEX ALIMENTARIUS.** 1995. Programa conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias sobre Residuos de Medicamentos Veterinarios en los alimentos. Sección 4: 80-82.
- **CUÉ, M.; MOREJÓN, M.; SALUP, R.** 2005. Actualidades de las Quinolonas. Rev Cubana Farm. 39: 1-15.
- **CVMP. COMMITTEE FOR VETERINARY MEDICINAL PRODUCTS.** 1997. EMEA/CVMP/036/95 **FINAL.** Note for guidance: Approach towards harmonization of withdrawal periods. The European Agency for the evaluation of Medicinal Products (EMA). 37 p.
- **CVMP. COMMITTEE FOR VETERINARY MEDICINAL PRODUCTS.** 2002. EMEA/MRL/820/02 **FINAL.** Enrofloxacin (Extension to all food producing species). The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA). 2 p.
- **DE LA FUENTE, M.; DAUROS, P.; BELLO, H.; DOMÍNGUEZ, M.; MELLA, S.; SEPÚLVEDA, M.; ZEMELMAN, R.; GONZÁLEZ, G.** 2007. Mutaciones en genes *gyrA* y *gyrB* en cepas de bacilos gramnegativos aisladas en hospitales chilenos y su relación con la resistencia a fluoroquinolonas. Rev Méd Chile. 135: 1103-1110.
- **DONOGHUE, D.** 2003. Antibiotic residues in poultry tissues and eggs: human health concerns?. Poult Sci. 82: 618-621.
- **DONOGHUE, D.; HAIRSTON, H.** 2000. Food safety implication: certain antibiotics may rapidly contaminate egg albumen during the process of its formation. Br Poult Sci. 41: 174-177.
- **DONOGHUE, D.; MYERS, K.** 2000. Imaging residue transfer into egg yolks. J Agric Food Chem. 48: 6428-6430.
- **EAVES, D.; RANDALL, L.; GRAY, D.; BUCKLEY, A.; WOODWARD, M.; WHITE, A.; PIDDOCK, L.** 2004. Prevalence of Mutations within the Quinolone Resistance-Determining Region of *gyrA*, *gyrB*, *parC*, and *parE* and Association with Antibiotic Resistance in Quinolone-Resistant *Salmonella enterica*. Antimicrob Agents Chemoth. 48: 4012-4015.
- **EMERSON, A.; JONES, A.** 2003. The quinolones: decades of development and use. J Antimicrob Chemoth. 51: 13-20.
- **ERRECALDE, J.** 2004. Uso de antimicrobianos destinados a consumo. Incidencia del desarrollo de resistencia en la salud pública. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma. 67 p.
- **ESAKI, H.; MORIOKA, A.; ISHIHARA, K.; KOJIMA, A.; SHIROKI, A.; TAMURA, Y.; TAKAHASHI, T.** 2004. Antimicrobial susceptibility of *Salmonella* isolated from cattle, swine and poultry (2001–2002): report from the Japanese

Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Program. J Antimicrob Chemoth. 53: 266-270.

- **EUROPA.** 1990. Reglamento (CEE) N° 2377/90 del Consejo, de 26 de junio de 1990, por el que se establece un procedimiento comunitario de fijación de los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal. 113 p.
- **EUROPA.** 2002. Decisión 2002/657/CE, de 12 de agosto de 2002 por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados. Diario Oficial de las Comunidades Europeas. 36 p.
- **EUROPA.** 2008. European Medicines Agency. EMEA. About EMEA - Structure. [en línea]. <<http://www.emea.europa.eu/htms/aboutus/emeaoverview.htm>> [consulta: 10-03-2008].
- **FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION.** 1999. la Guidance for Industry N°63. Validation of analytical procedures: definition and terminology. 8 p.
- **FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION.** 2001. The Human Health Impact of Fluoroquinolone Resistant Campylobacter Attributed to the Consumption of Chicken. 113 p.
- **FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION.** 2005a. Docket N°2000N-1571. **FINAL DECISION OF THE COMMISSIONER.** Withdrawal of approval of the new animal drug application for enrofloxacin in poultry. 126 p.
- **FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION.** 2005b. Guideline for establishing a withdrawal period. [en línea]. <<http://www.fda.gov/cvm/Guidance/1732.htm>> [consulta 09-09-2008].
- **FERNÁNDEZ, M.; ARIAS, J.** 2000. La cáscara del huevo: Un modelo de biomineralización. Monografías de Medicina Veterinaria. [en línea]. <http://www.monografiasveterinaria.uchile.cl/CDA/mon_vet_completa/0,1421,SCID%253D18364%2526ISID%253D452,00.html> [consulta: 01-03-2008].
- **GARCÍA, I.; SARABIA, L.; ORTIZ, M.; ALDAMA, J.** 2005. Usefulness of D-optimal designs and multicriteria optimization in laborious analytical procedures Application to the extraction of quinolones from eggs. J of Chromatogr A. 1085: 190-198.
- **GORLA, N.; CHIOSTRI, E.; UGNIA, L.; WEYERS, A.; GIACOMELLI, N.; DAVICINO, R.; OVANDO, H.** 1997. HPLC residues of enrofloxacin and ciprofloxacin in eggs of laying hens. Int J Antimicrob Agents. 8: 253-256.
- **GRIGGS, D.; JOHNSON, M.; FROST, J.; HUMPHREY, T.; JØRGENSEN, F.; PIDDOCK, L.** 2005. Incidence and Mechanism of Ciprofloxacin Resistance in

Campylobacter spp. Isolated from Commercial Poultry Flocks in the United Kingdom before, during, and after Fluoroquinolone Treatment. *Antimicrob Agents Chemoth.* 49: 699-707.

- **HAFEZ, H.** 1991. Factors influencing Drug Residues in Poultry Products: A review. *Arch. Gefluegelk.* 55: 193-195 (citado por Kan y Petz. 2000. Residues of veterinary drugs in eggs and their distribution between yolk and white. *J Agric Food Chem.* 48: 6397-6403.
- **HASSOUAN, M.; BALLESTEROS, O.; TAOUFIKI, J.; VÍLCHEZ J.; CABRERA-AGUILERA, M.; NAVALÓN, A.** 2007. Multiresidue determination of quinolone antibacterials in eggs of laying hens by liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 852: 625-630.
- **HATANO, K.** 2004. Simultaneous determination of quinolones in foods by LC/MS/MS. (Abstract). *Shokuhin Eiseigaku Zasshi.* 45: 239-244.
- **HERMO, M.; BARRÓN, D.; BARBOSA, J.** 2006. Development of analytical methods for multiresidue determination of quinolones in pig muscle samples by liquid chromatography with ultraviolet detection, liquid chromatography–mass spectrometry and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 1104: 132-139.
- **HERRANZ, S.; MORENO-BONDI, M.; MARAZUELA, M.** 2007. Development of a new sample pretreatment procedure based on pressurized liquid extraction for the determination of fluoroquinolone residues in table eggs. *J Chromatogr A.* 1140: 63-70.
- **HOLTZAPPLE, C.; BUCKLEY, S.; STANKER, L.** 1997. Development of antibodies against the fluoroquinolone sarafloxacin and molecular modeling studies of cross-reactive compounds. *Food Agric Immunol.* 9: 13-26.
- **HUMPHREY, T.; JØRGENSEN, F.; FROST, J.; WADDA, H.; DOMINGUE, G.; ELVISS, N.; GRIGGS, D.; PIDDOCK, L.** 2005. Prevalence and Subtypes of Ciprofloxacin-Resistant *Campylobacter* spp. in Commercial Poultry Flocks before, during, and after Treatment with Fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother.* 49: 690-698.
- **INSTITUTO DE ESTUDIO DEL HUEVO.** 2008. Seguridad Alimentaria en Huevos y Ovoproductos. [en línea].
<<http://www.institutohuevo.com/scripts/libroleccioneshuevo.asp>> [consulta 02-03-2008].
- **JACOBY, G.** 2005. Mechanisms of Resistance to Quinolones. *Clin Infect Dis.* 41: 120-126.
- **JACKSON, L.; MACHADO, L.; HAMILTON, M.** 1998. Quinolonas y terapia antimicrobiana. *Acta Médica Córdoba.* 8: 58-65.

- **JAPÓN.** 2005. Ministry of Health and Welfare. Notification No. 499. Specifications and Standards for Food, Food Additives. 126 p.
- **JEFCA.** 2008. Comité mixto FAO/OMS de expertos en aditivos alimentarios. [en línea]. < http://www.fao.org/ag/agn/agns/jecfa_index_es.asp > [consulta: 09-09-2008].
- **JOHNSTON, L.; MACKAY, L.; CROFT, M.** 2002. Determination of quinolones and fluoroquinolones in fish tissue and seafood by high-performance liquid chromatography with electrospray ionisation tandem mass spectrometric detection. *J Chromatogr A.* 982: 97-109.
- **KAN, C.; PETZ, M.** 2000. Residues of veterinary drugs in eggs and their distribution between yolk and white. *J Agric Food Chem.* 48: 6397-6403.
- **KAN, C.** 2003. Residues of veterinary drugs in eggs and their distribution between yolk and white. Alemania. Universidad Wuppertal. 80 p.
- **KHAN, A.; NAWAZ, M.; WEST, S.; KHAN, S.; LINT, J.** 2005. Isolation and Molecular Characterization of Fluoroquinolone-Resistant *Escherichia coli* from Poultry Litter. *Poult Sci.* 84: 61-66.
- **LEE, Y.; CHO, J.; KIM, K.; TAK, R.; KIM, A.; KIM, J.; IM, S.; KIM, B.** 2005. Fluoroquinolone Resistance and gyrA and parC Mutations of *Escherichia coli* Isolated from Chicken. *J Microbiol.* 43: 391-397.
- **LESHER, G.; FROELICH, E.; GRUETT, D.; BAILEY, J.; BRUNDAGE, R.** 1962. 1,8-Naphthyridine derivatives: a new class of chemotherapeutic agents. *J Med Pharm Chem.* 91: 1063-1065 (citado por Andriole, V. 2005. The Quinolones: Past, Present, and Future. *Clin Infect Dis.* 41: 113-119).
- **LOLO, M.; PEDREIRA, S.; FENTE, C.; VAÄZQUEZ, B.; FRANCO, C.; CEPEDA, A.** 2005. Study of Enrofloxacin Depletion in the Eggs of Laying Hens Using Diphasic Dialysis Extraction/Purification and Determinative HPLC-MS Analysis. *J Agric Food Chem.* 53: 2849-2852.
- **MARTINEZ, M.; MCDERMOTT, P.; WALKER, R.** 2006. Pharmacology of the fluoroquinolones: A perspective for the use in domestic animals. *Vet J.* 172: 10-28.
- **MELLA, S.; ACUÑA, G.; MUÑOZ, M.; PEREZ, C.; LABARCA, J.; GONZALEZ, G.; BELLO, H.; DOMINGUEZ, M.; ZEMELMAN, R.** 2000. Quinolonas: Aspectos generales sobre su estructura y clasificación. *Rev Chil Infect.* 17: 53-66
- **MOLERO, G.; PÉREZ, M.; SÁNCHEZ, A.; MAVÁREZ, M.; ASCANIO, E.; OVIEDO, M.** 2006. Residuos de enrofloxacin en tejido hepático y muscular de pollos beneficiados en el municipio San Francisco del estado Zulia, Venezuela. *Revista Científica, FCV-LUZ.* 16: 629-633.

- **MOREJÓN, M.; SALUP, R.** 2003. Actualización en quinolonas. [en línea]. [<http://biomed.uninet.edu/2003/n3/morejon2.html>](http://biomed.uninet.edu/2003/n3/morejon2.html) [consulta 18-08-2008].
- **NORSTRÖM, M.; HOFSHAGEN, M.; STAVNES, T.; SCHAU, J.; LASSEN, J.; KRUSE, H.** 2006. Antimicrobial resistance in *Campylobacter jejuni* from humans and broilers in Norway. *Epidemiol Infect.* 134: 127-130.
- **NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL.** 1994. Nutrient requirements of poultry. 9th Rev. National Academy Press. Washington D.C.
- **OMC. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE COMERCIO.** 1998. Acuerdo sobre la aplicación de las medidas sanitarias y fitosanitarias. 16 p.
- **ORDEN, J.; DE LA FUENTE, R.** 2001. Repercusiones en la Salud Pública de la Resistencia a Quinolonas en Bacterias de Origen Animal. *Rev Esp Salud Pública.* 75: 313-320.
- **OWENS, R.; AMBROSE, P.** 2005. Antimicrobial safety: focus on fluoroquinolones. *Clin Infect Dis.* 40: 144–157.
- **PÉREZ, B.** 2004. La detección de residuos farmacológicos en los alimentos. [en línea]. [<http://www.consumaseguridad.com/web/es/investigacion/2004/07/20/13468.php>](http://www.consumaseguridad.com/web/es/investigacion/2004/07/20/13468.php) [consulta 09-09-2008].
- **PROUDMAN, J.** 2002. Reproducción de las aves de corral: macho y hembra. **In:** Hafez, E.; Hafez, B. (Eds.). Reproducción e inseminación artificial en animales. Séptima edición. McGraw-Hill Interamericana. Kiawah Island, South Carolina, USA. pp. 243-265.
- **RAMOS, M.; ARANDA, A.; GARCÍA, E.; REUVERS, T.; HOOGHUIS, H.** 2003. Simple and sensitive determination of five quinolones in food by liquid chromatography with fluorescent detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 789: 373-381.
- **RODRÍGUEZ, E.; MORFÍN, R.; ESPARZA, S.; CASTRO, P.** 2000. Programa de actualización continua para infectología. [en línea]. [<http://www.drscope.com/pac/infecto-1/c3/index.htm>](http://www.drscope.com/pac/infecto-1/c3/index.htm) [consulta 15-02-2008].
- **SAG. SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO.** 2008a. Medicamentos de uso veterinario autorizados.[en línea]. [<http://laima.sag.cl/AppSag/public/medicamentos/medicamentos_BL.jsp>](http://laima.sag.cl/AppSag/public/medicamentos/medicamentos_BL.jsp) [consulta 18-08-2008].
- **SAG, SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO.** 2008b. Programa de Control de Residuos en Productos Pecuarios Año 2008. [en línea]. [<http://www.sag.gob.cl/pls/portal/docs/page/pg_sag_biblioteca/bibl_exportaciones/biblio_exp_pec/biblio_exp_pec_manuales/programa_control_residuos.pdf>](http://www.sag.gob.cl/pls/portal/docs/page/pg_sag_biblioteca/bibl_exportaciones/biblio_exp_pec/biblio_exp_pec_manuales/programa_control_residuos.pdf) [consulta 18-08-2008].

- **SAN MARTÍN, B.** 1995. Residuos de antibióticos y sulfas en leche. Tecnovet. [en línea].
<http://www.tecnovet.uchile.cl/CDA/tecnovet_articulo/0,1409,SCID%253D10134%2526ISID%253D429,00.html> [consulta 25-02-2008].
- **SAN MARTÍN, B.** 2001. Residuos químicos en los alimentos de origen animal: un análisis global de la situación mundial y nacional. [en línea].
<http://www.tecnovet.uchile.cl/CDA/tecnovet_articulo/0,1409,SCID%253D9590%2526ISID%253D467,00.html> [consulta 15-07-2007].
- **SAN MARTÍN, B.; LAPIERRE, L.; TORO, C.; BRAVO, B.; CORNEJO, J.; HORMAZABAL, J.; BORIE, C.** 2005. Isolation and molecular characterization of quinolone resistant *Salmonella* spp. from poultry farms. *Vet Microbiol.* 110: 239-244.
- **SCHNEIDER, M. DONOGHUE, D.** 2003. Multiresidue determination of fluoroquinolone antibiotics in eggs using liquid chromatography-fluorescence-mass spectrometry. *Anal Chim Acta.* 483: 39-49.
- **SHIM, J., LEE, M.; KIM, M.; LEE, C.; KIM, I.** 2003. Simultaneous measurement of fluoroquinolones in eggs by a combination of supercritical fluid extraction and high pressure liquid chromatography. *Biosci biotechnol biochem.* 67: 1342-1348.
- **STAHLMANN, R.; LODE, H.** 1999. Toxicity of quinolonas. *Drugs.* 2: 37-42.
- **TALÉNS-VISCONTI, R.; GARRIGUES, T.; CANTÓN, E.** 2002. Mecanismos de resistencia bacteriana a las quinolonas. [en línea].
<http://www.seq.es/seq/html/revista_seq/0102/rev1/rev1.html>. [consulta 20-02-2008].
- **TURNIDGE, J.** 1999. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of fluoroquinolones. *Drugs.* 58: 29-36.
- **TURNIDGE, J.** 2004. Antibiotic use in animals-prejudices, perceptions and realities. *J Antimicrob Chemoth.* 53:26-27.
- **VACAREZZA, M.** 2000. Quinolonas. [en línea].
<<http://www.infecto.edu.uy/terapeutica/atbfa/quino/quinolonas.htm>> [consulta 10-02-2008].
- **WISPELWEY, B.** 2005. Clinical Implications of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Fluoroquinolones. *Clin Infect Dis.* 41: 127-135.
- **ZENG, Z.; DONG, A.; YANG, G.; CHEN, Z.; HUANG, X.** 2005. Simultaneous determination of nine fluoroquinolones in egg white and egg yolk by liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 821: 202-209.

- **ZHAO, S.; MCDERMOTT, PF.; FRIEDMAN, S.; ABBOTT, J.; AYERS, S.; GLENN, A.; HALL-ROBINSON, E.; HUBERT, S.; HARBOTTLE, H.; WALKER, R.; CHILLER, T.; WHITE, D.** 2006. Antimicrobial resistance and genetic relatedness among Salmonella from retail foods of animal origin: NARMS retail meat surveillance. Foodborne Pathog Dis. 3: 106-117.

ANEXO 1



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

CERTIFICADO

Con relación a los procedimientos propuestos para el uso de animales experimentales en el Proyecto titulado **“DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS Y ESTUDIOS DE DEPLECIÓN DE FLUOROQUINOLONAS EN HUEVOS DE CONSUMO: PRIMER ESTUDIO NACIONAL CONSIDERANDO LAS NORMATIVAS INTERNACIONALES DE INOCUIDAD ALIMENTARIA VIGENTE”**, cuyo Investigador Responsable es la Profesora BETTY SAN MARTIN N., el Comité de Bioética Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile certifica que este satisface lo estipulado en la guía de principios directrices internacionales para el uso de animales en investigaciones Biomédicas, elaborada por el Consejo para las Organizaciones Internacionales de las Ciencias Biomédicas, adecuada y adoptada por este Comité.


DR. JULIO LARENAS HERRERA
Decano (S)
Presidente
Comité de Bioética Animal



Santiago, Julio 7 de 2006

Santa Rosa 11735, La Pintana. Santiago, CHILE - Teléfono (56-2) 978 5501 - Fax (56-2) 541 6840