



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



VALIDACIÓN DEL “FAST” COMO MÉTODO DE
“SCREENING” MICROBIOLÓGICO PARA LA PESQUISA
DE RESIDUOS DE ANTIMICROBIANOS EN PRODUCTOS
DE ORIGEN ANIMAL

DANIELA ALEJANDRA AGUILAR ESCUDERO

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina Preventiva
Animal.

PROFESOR GUÍA: CONSUELO BORIE POLANCO

SANTIAGO, CHILE
2006



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



VALIDACIÓN DEL “FAST” COMO MÉTODO DE
“SCREENING” MICROBIOLÓGICO PARA LA PESQUISA
DE RESIDUOS DE ANTIMICROBIANOS EN PRODUCTOS
DE ORIGEN ANIMAL

DANIELA ALEJANDRA AGUILAR ESCUDERO

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina Preventiva
Animal.

NOTA FINAL:.....

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : CONSUELO BORIE
PROFESOR CONSEJERO: BETTY SAN MARTIN
PROFESOR CONSEJERO : DANIELA IRAGUEN

**SANTIAGO, CHILE
2006**

INDICE

- Resumen	1
- Summary	3
- Introducción	5
- Revisión Bibliográfica:	
- Efectos adversos de residuos de antimicrobianos sobre la salud humana.....	10
- Regulación sobre residuos químicos en alimentos de origen animal.....	14
- Situación nacional.....	17
- Programas internacionales de control de residuos.....	18
- Métodos de análisis para el control de residuos.....	19
- Métodos microbiológicos.....	22
- Validación de metodologías analíticas.....	28
- Objetivos	30
- Material y Métodos:	
- Implementación de la técnica microbiológica “Fast Antimicrobial Screen Test” (“FAST”).....	31
- Validación del método.....	35
- Resultados	41
- Discusión	52
- Conclusiones	60
- Bibliografía	61
- Anexos	70

RESUMEN

El uso de antimicrobianos en animales de producción trae consigo el riesgo de presencia de residuos que superen los límites máximos permitidos de estos medicamentos en alimentos de origen animal. Esto ha llevado a desarrollar programas de control para lo cual es necesario contar con métodos de detección de estas sustancias, entre los cuales están los métodos de “screening”.

El objetivo del presente estudio fue validar la prueba de “screening” microbiológico “Fast Antimicrobial Screen Test” (“FAST”) para la detección de 16 antibióticos frecuentemente usados en la producción animal en Chile. Para esto, se siguieron las pautas recomendadas por la Unión Europea (U.E) publicadas en el Diario Oficial de las Comunidades Europeas (2002).

La implementación de la técnica, se basó en las recomendaciones del fabricante (Medtox®). En esta experiencia se determinó que la zona inhibitoria alrededor del sensidisco control N5 estuvo, en la mayoría de los casos, dentro de un rango de 25 a 30 mm, valor un poco más elevado que aquel descrito para la técnica (20 a 26 mm). Por otro lado, si bien en este estudio se observó que pueden obtenerse resultados tan pronto como a las seis horas de iniciada la incubación, para la validación del método la lectura de las placas se fijó a las 24 horas, tiempo al cual se visualizaron inequívocamente los halos de inhibición.

La especificidad del método se determinó analizando los solventes y diluyentes utilizados en el estudio y tejido renal libre de antimicrobianos, observándose que ninguno de ellos produjo interferencia con los resultados.

Para medir la capacidad de detección del método se fijó el límite de determinación para los 16 antibióticos como drogas puras con los siguientes resultados: amoxicilina (25 µg/kg o ppb), ampicilina (25 µg/kg), ceftiofur (3000 µg/kg), cloxacilina (25 µg/kg), enrofloxacino (100 µg/kg), eritromicina (100 µg/kg), estreptomicina (500 µg/kg), florfenicol (300 µg/kg), flumequina (1000 µg/kg), gentamicina (375 µg/kg), neomicina (2500 µg/kg), oxitetraciclina (300 µg/kg), penicilina (25 µg/kg) y tilosina

(200 µg/kg). Para ácido oxolínico y lincomicina no pudo ser determinado. Además, se obtuvo el límite de determinación para enrofloxacino y oxitetraciclina presentes en matrices renales de aves tratadas con dosis terapéuticas, obteniéndose valores de 1467 y 247µg/kg, respectivamente.

El análisis de robustez indicó que el método no es lo suficientemente robusto frente a los 4 factores seleccionados, los cuales fueron operador, pH del medio, concentración de esporas y temperatura de incubación.

En conclusión, a pesar de la baja robustez del método, éste resultó tener una especificidad y sensibilidad adecuadas siendo capaz de detectar, en conformidad a los niveles de exigencia, un amplio espectro de antimicrobianos como drogas puras. Sin embargo, si se desea emplear este método en Chile, es importante que se continúen los estudios basados en la matriz renal, para definir con mayor precisión la sensibilidad de la técnica.

Palabras clave: antimicrobiano, residuo, “screening” microbiológico, validación.

SUMMARY

The use of antimicrobials in food-producing animals brings along the risk of presence of residues that surpass the maximum limits allowed for these medicines in products of animal origin. This has led to develop control programs for which it is necessary to count with methods of detection of these substances, such as the screening methods.

The objective of the present study was to validate the bacterial inhibition test Fast Antimicrobial Screen Test ("FAST") for the detection of 16 antibiotics frequently used in the animal production in Chile. For this, the study followed the guidelines recommended by European Union published in the Official Newspaper of the European Communities (2002).

The implementation of the technique, was based on the recommendations of the manufacturer (Medtox®). In this experience the diameter of the inhibition zone surrounding the N5 disc was, in most of the cases, within the range of 25-30 mm, value a little more elevated than that described for the technique (20-26 mm). On the other hand, it observed that the reading of the plates can become as early as to the 6 hours from the time that the plates are initially placed in the incubator; nevertheless, for the validation of the method, the reading of the plates was at the 24 hours, time to which the zones of inhibition visualized unequivocally.

The specificity of the method was determined analyzing the solvents and diluents used in the study and free kidney tissue of antimicrobial, being observed that none of them produced interference with the results.

The capacity of detection of the method was obtained by means of the limit of determination for 16 antibiotics in pure form with the following results: amoxicillin (25 µg/kg or ppb), ampicillin (25 µg/kg), ceftiofur (3000 µg/kg), cloxacillin (25 µg/kg), enrofloxacin (100 µg/kg), erythromycin (100 µg/kg), streptomycin (500 µg/kg), florfenicol (300 µg/kg), flumequine (1000 µg/kg), gentamicin (375 µg/kg), neomycin (2500 µg/kg), oxytetracycline (300 µg/kg), penicillin (25 µg/kg) and tylosin (200

µg/kg). For lincomycin and oxolinic acid could not be determined. Furthermore, the limit of determination for enrofloxacin and oxytetracyclin in poultry kidney tissues was obtained medicated with therapeutical doses, obtaining values of 1467 and 247µg/kg, respectively.

The robustness analysis indicated that the method is not sufficiently robust *versus* the 4 selected factors, which were operator, pH of the medium, concentration of spores and temperature of incubation.

As a conclusion, in spite of the low robustness of the method, this one resulted to have a specificity and sensitivity suitable for the detection, according to the exigency levels, of a wide spectrum of antimicrobial in pure form. Nevertheless, to use this method in Chile, it is important to continue the studies based on the kidney tissue, in order to better clarify the sensitivity of the technique.

Key words: antimicrobial, residue, microbiological screening, validation.

INTRODUCCIÓN

En medicina veterinaria, el uso de antimicrobianos en animales de producción es una práctica habitual ya que constituye la principal herramienta terapéutica en el control y, en algunos casos, en la erradicación de enfermedades infecciosas de origen bacteriano en los diferentes sistemas de crianza intensivo. Sin embargo, la gran mayoría de estos productos son susceptibles de dejar residuos en los alimentos procedentes de los animales que han sido tratados y de esta forma llegar a la población generando diversos efectos adversos. Entre ellos se pueden mencionar la selección de cepas bacterianas resistentes, reacciones de hipersensibilidad o toxicidad, alteraciones de la microflora intestinal, además de pérdidas económicas en la industria alimentaria.

Al respecto, diferentes organizaciones internacionales, con el fin de asegurar la entrega de un producto inocuo, libre de residuos de antimicrobianos a la población humana, han sugerido normas sobre el uso racional de estas drogas en los diferentes sistemas de crianza intensiva de animales.

En el caso particular de Chile, el tema de la inocuidad alimentaria es un asunto de salud pública y de comercio exterior. La creciente inserción en los mercados internacionales lleva a la necesidad de adecuarse a los nuevos criterios de armonización de las exigencias internacionales, tomándose las medidas necesarias de control, monitoreo y fiscalización. De esta forma, se asegurará que todo producto de origen animal llegue en condiciones de inocuidad tanto al consumo interno como externo favoreciendo, por ende, el libre comercio con otros países.

El Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), como organismo responsable de velar por la sanidad de la producción pecuaria, se encarga de la calidad e inocuidad de los productos pecuarios de exportación. Para ello ha definido y diseñado el Programa de Residuos en Productos Pecuarios de Exportación que entre sus objetivos está el de asegurar que los productos de origen animal destinados a consumo humano no contengan sustancias químicas, entre ellas antimicrobianos, más allá de lo permitido. Para cumplir este objetivo, es condición indispensable disponer de métodos de detección de dichas sustancias. Ésto lleva implícito el desarrollo de técnicas analíticas

que cuenten con los estándares de calidad y de validación exigidos por nuestros principales compradores.

En la actualidad se dispone de múltiples métodos de análisis para detectar la presencia de residuos de antimicrobianos en los productos de origen animal. En forma general, estas técnicas se pueden clasificar en dos grupos: métodos de “screening” o de criba y métodos confirmatorios. Los primeros son de carácter exploratorio indicando presencia o ausencia de una o varias drogas en una muestra; entre ellos se encuentran los ensayos de unión inmunológica o enzimática y las pruebas microbiológicas. Por otro lado, los métodos confirmatorios permiten identificar y cuantificar la droga presente en la muestra para lo cual se utilizan generalmente técnicas cromatográficas. Los métodos de “screening” microbiológicos presentan ventajas en comparación con métodos químicos, al ser técnicas de bajo costo, rápidas, de fácil implementación e interpretación.

En el presente estudio se implementó la técnica microbiológica “Fast Antimicrobial Screen Test” (“FAST”) debido a que presenta ventajas frente al Método de las Cuatro Placas, actualmente vigente en los programas nacionales. Entre sus ventajas destacan la capacidad de detectar un mayor espectro de antimicrobianos en forma simultánea y mejorar la capacidad de responder a las exigencias de los mercados internacionales, ya que permite obtener resultados a partir de las 6 horas de realizado.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La globalización del comercio internacional ha permitido a Chile establecer una serie de acuerdos y tratados comerciales que representan nuevas posibilidades para el país en términos económicos y de desarrollo. Así, se han suscrito acuerdos que vinculan a Chile con Canadá, Centro América, Corea del Sur, Unión Europea (U.E), Estados Unidos de Norteamérica (EE.UU) y México, entre otros (ODEPA, 2005a).

Muchos son los beneficios que se generan a partir de estos acuerdos. Es así como cifras de PROCHILE indican que las exportaciones chilenas durante el primer semestre de 2005 registraron un incremento de 26,7%, llegando a US\$18.524 millones, ésto es un aumento de US\$3.901,7 millones respecto del mismo período del año 2004 (PROCHILE, 2005).

En particular, la situación de las exportaciones de carnes chilenas a diferentes mercados internacionales es bastante alentadora, mostrando cifras de crecimiento. A modo de ejemplo, hasta el mes de octubre de 2005, las exportaciones de carnes y subproductos crecieron un 40% en volumen y 44% en valor. La carne que más se exportó fue la de cerdos, con un 46% del total, seguida por la carne de aves, con un 33%. Más atrás se ubicó la de bovinos, con 10% del total; otras carnes y subproductos significaron un 8% y por último, se ubicó la carne de ovinos, con una participación de 3% (ODEPA, 2005b).

Estas cifras demuestran que Chile está posicionando sus productos pecuarios en los grandes mercados mundiales cada vez con mayor fuerza, obligando a los sistemas productivos a adecuarse a las exigencias del comercio internacional. Sólo así, se podrán mantener los mercados ya alcanzados y acceder a nuevos mercados para los productos pecuarios.

Un hecho de gran relevancia en el desarrollo de las exportaciones chilenas, es la condición zoonosanitaria nacional. Hasta el año 2005, la Organización Mundial de Sanidad Animal, anteriormente denominada Oficina Internacional de Epizootias (OIE), agrupaba las enfermedades de declaración obligatoria en dos listas (A y B) (OIE, 2006). La lista A reunía a las quince patologías animales universalmente consideradas como las

más dañinas y alarmantes estando Chile libre de todas ellas. Actualmente, la OIE aprobó la creación de una sola lista de la cual Chile está libre de las enfermedades más importantes pertenecientes a ésta, incluyendo la encefalopatía espongiforme bovina (EEB), la fiebre aftosa desde 1981 y recientemente, la peste porcina clásica, la influenza aviar y la enfermedad de Newcastle. Esta ventajosa situación zoonosanitaria, que ha sido reconocida por muchos países y mercados, constituye el aval para que Chile, paulatinamente en los últimos años, se haya convertido en un país exportador de carnes (SAG, 2006a).

Dependiendo de su situación zoonosanitaria, los países importadores establecen requisitos para los productos de origen animal según el nivel de protección que requieren. Las restricciones de tipo sanitario consisten en exigencias nacionales e internacionales traducidas en un conjunto de protocolos que deben ser aplicados a lo largo de la cadena de producción y de comercialización, desde el nivel predial hasta la etapa final de comercio y consumo. En el caso de la producción y comercio de carnes, las regulaciones sanitarias más importantes apuntan principalmente a un conjunto de enfermedades animales que eventualmente pueden transmitirse al hombre (zoonosis) como son el caso de brucelosis, tuberculosis y EEB, así como aquellas que se pueden transmitir a otros animales como son fiebre aftosa y EEB en rumiantes, peste porcina clásica en cerdos y enfermedad de Newcastle e influenza aviar en aves (Correa y Naranjo, 2005).

Sin embargo, las restricciones de tipo sanitario actualmente no son los únicos requisitos para el comercio internacional, sino que se han agregado aquellas relacionadas con la utilización de insumos químicos en los sistemas productivos capaces de generar residuos en la leche y sus derivados, carne, vísceras, miel y huevos. Se entiende por residuo de medicamento toda sustancia farmacológicamente activa que permanezca en los productos alimenticios obtenidos a partir de animales a los que se les hubiere administrado dicho medicamento. Booth y McDonald (1988) definen residuo medicamentoso o químico, como aquella sustancia que, como consecuencia del empleo de medicamentos o sustancias químicas en el control y tratamiento de enfermedades o de su inclusión como aditivo para promover el crecimiento, puede depositarse o almacenarse en células, tejidos u órganos animales ya sea como tales o sus metabolitos.

En las últimas décadas la intensificación de los sistemas productivos ha dejado a los animales cada vez más expuestos a sufrir enfermedades de diversa índole. Para controlar esta situación, la demanda de diferentes herramientas terapéuticas como antimicrobianos, antiparasitarios y pesticidas ha sido cada vez mayor, llevando a que la preocupación por la presencia de residuos resultantes del uso de estos compuestos sea actualmente uno de los aspectos importantes a considerar para asegurar la inocuidad de los alimentos. En este sentido, no cabe duda de que la existencia de sistemas de control de residuos en los alimentos es condición esencial para proteger la salud y seguridad de los consumidores.

Actualmente, entre los residuos químicos que se deben controlar en todo Plan de Control se encuentran hormonas, antiparasitarios, pesticidas, antimicrobianos y metales pesados, entre otros (Orellana y Maureira, 2002).

Dentro de estos residuos, los antimicrobianos son de gran trascendencia debido a su frecuente empleo en los sistemas productivos de alimentos de origen animal. A este respecto, se sabe que de todos los antimicrobianos generados a nivel mundial durante los últimos 50 años, aproximadamente un 50% se ha utilizado en los ámbitos de agricultura y veterinaria (Teuber, 2001). Este masivo empleo se explica por varias razones. Desde el punto de vista de la sanidad animal, el uso terapéutico de antimicrobianos sigue siendo una herramienta irremplazable para combatir distintas infecciones bacterianas participando en la prevención, tratamiento e incluso erradicación de enfermedades. Por otro lado, estas sustancias también se han utilizado como agentes promotores del crecimiento, actividad conocida desde los años cincuenta que consiste en administrar por vía oral a los animales de producción pequeñas cantidades de antimicrobianos con el fin de aumentar su eficiencia de crecimiento (Aarestrup, 2000). Todos los beneficios relativos a su uso han llevado muchas veces a que sean utilizados de forma fraudulenta, indiscriminada y abusiva.

La regulación de la venta de estos fármacos es una medida importante para evitar el abuso de ellos. En Chile, existe esta regulación desde septiembre del año 1999 para antibióticos utilizados en medicina humana; desde entonces, los antibióticos no pueden ser vendidos sin receta de un profesional competente (Bavestrello *et al.*, 2002). Sin embargo, en medicina veterinaria no existe restricción en la adquisición y uso de

estos fármacos, pudiendo adquirirse y emplearse en muchos casos sin la supervisión de un médico veterinario. Esta falta de regulación contribuye al riesgo de presencia de residuos en los alimentos de origen animal pudiendo llegar a la población humana y provocar una serie de efectos adversos.

I. Efectos adversos de residuos de antimicrobianos sobre la salud humana.

Los antimicrobianos que son consumidos directamente por los seres humanos como consecuencia de una terapia, pueden producir efectos colaterales, los que generalmente pueden ser evitados cumpliendo las prescripciones relativas a las dosis y la duración del tratamiento recomendadas por los médicos. Sin embargo, cuando se ingieren como residuos en los alimentos no es posible cuantificar o vigilar la cantidad ingerida, la cual generalmente se asume como pequeña o muy baja pero no siempre inocua, pudiendo llevar a problemas directos para la salud humana. Algunos de estos efectos se describen a continuación:

Reacciones de hipersensibilidad.

Alergia es el término genérico que se utiliza para englobar reacciones inmunológicas ligadas a hipersensibilidad individual. En este ámbito, todos los antimicrobianos tienen el potencial de causar reacciones alérgicas, sin embargo, los antibióticos beta-lactámicos han sido los más estudiados y constituyen en medicina humana la alergia medicamentosa más frecuente, representando alrededor del 30% de éstas (Guzmán *et al.*, 2004). En medicina veterinaria la situación no es diferente; gracias a su buen espectro antibacteriano y baja toxicidad son fármacos ampliamente utilizados (Zurich y San Martín, 1994).

De los pocos casos reportados de alergias en personas que han consumido alimentos contaminados con residuos de antimicrobianos, la mayoría corresponde a reacciones a la penicilina (Sundlof, 1989). Existen trabajos sobre la asociación entre reacciones alérgicas y el consumo de alimentos con residuos de antimicrobianos. Así, por ejemplo, en un estudio realizado en pacientes con urticaria permanente, al menos en un 8% de ellos se asoció la signología a la presencia de residuos de penicilina en leche (Ormerod *et al.*, 1987).

Datos experimentales indican que concentraciones residuales de 5 a 10 unidades internacionales (UI) en alimentos son capaces de producir reacciones alérgicas en individuos previamente sensibilizados (Sundlof, 1989).

El contacto de una concentración mínima de antibiótico con células de un individuo sensible activa la reacción, la cual puede determinar diversas manifestaciones clínicas tales como prurito, erupciones cutáneas o mucosas, edemas localizados u otras, casi siempre visibles en el tegumento. El fenómeno anafiláctico severo es, afortunadamente, poco común (Guzmán *et al.*, 2004).

Efectos tóxicos específicos.

El consumo de productos animales que contienen residuos de antimicrobianos puede producir los mismos efectos perjudiciales que si se administrara de forma directa una dosis equivalente (Díez y Calderón, 1997). De acuerdo a esto, es posible que el consumo de antimicrobianos, a través de alimentos contaminados, pueda alcanzar niveles que determinen una toxicidad de tipo crónico, lo cual es un motivo más que suficiente para controlar la presencia de éstos en los alimentos (Magariños, 2000).

Según Zurich y San Martín (1994), la ingestión continua de leche con residuos de tetraciclina puede generar toxicidad, sobre todo cuando los preparados de larga acción son utilizados en vacas lecheras sin respetar períodos de resguardo. Fundamentalmente en lactantes y niños, las tetraciclinas pueden interferir en el normal desarrollo óseo y dentario debido a sus propiedades quelantes de calcio (Kapusnik-Uner *et al.*, 2003).

Por otro lado, todos los aminoglicósidos tienen la potencialidad de producir nefrotoxicidad y ototoxicidad. Sin embargo, por la baja biodisponibilidad oral de estas drogas, los efectos adversos causados por exposición a sus residuos en los alimentos son poco probables (Gehring *et al.*, 2005).

Con respecto al cloranfenicol, el principal efecto adverso documentado es la anemia aplásica, reacción idiosincrásica que consiste en una depresión total de la formación de elementos sanguíneos. Esta respuesta no depende de la dosis y muchas veces es de curso fatal (Page, 1991). Por estas razones el uso de este antibiótico debe ser

en aquellos animales que no vayan a consumo humano, justificándose la medida adoptada por el “Food and Drug Administration” de EE.UU (FDA) que señaló tolerancia cero para el cloranfenicol, es decir, no se permite concentración alguna en fluidos y tejidos de animales destinados al consumo humano (Zurich y San Martín, 1994). Iguales medidas se han tomado en otros países como Canadá y parte de la Comunidad Europea donde se prohíbe el uso de cloranfenicol en terapia de animales de abasto para evitar que la población consuma esta droga a través de leche, carne o huevos.

Chile, mediante la resolución número 3599 del 29 de noviembre de 1996, publicada en el Diario Oficial 10-Diciembre-1996, prohibió el uso de cloranfenicol, o cualquiera de sus sales, en animales cuyos productos y subproductos sean destinados a la alimentación humana. Esta Resolución permitió que los productos que contenían cloranfenicol continuaran utilizándose en especies animales no destinadas al consumo humano, lo cual representaba un riesgo permanente de uso indebido en las especies de consumo. Por lo tanto, para asegurar total ausencia de residuos de esta droga en alimentos de origen animal, se resolvió prohibir el uso de fármacos que contengan cloranfenicol o cualquiera de sus sales, en animales no destinados al consumo humano (SAG, 2006b).

Alteraciones de la microflora intestinal.

La microflora del tracto gastrointestinal humano es un ecosistema balanceado, con más de 400 especies bacterianas y sobre 10^{11} células bacterianas por gramo de contenido (Cerniglia y Kotarski, 2005), que actúa como una barrera contra el sobrecrecimiento e invasión del tracto gastrointestinal por patógenos bacterianos (Tollefson y Miller, 2000). Además, juega un importante rol en la digestión de componentes dietarios y metabolismo de drogas y nutrientes que luego serán absorbidos (Chadwick *et al.*, 1992).

La población microbiana del tracto gastrointestinal es relativamente estable. La exposición intestinal a los agentes antimicrobianos ingeridos puede cambiar la ecología de la microflora, permitiendo la invasión de microorganismos exógenos o bien, la exacerbación de cierta flora endógena. A este respecto, la mayor complicación asociada a agentes antimicrobianos es la infección intestinal por *Clostridium difficile*, conocida

como colitis pseudo-membranosa, que consiste en una alteración de la flora intestinal generalmente por el uso de antibióticos provocando un sobrecrecimiento de esta bacteria que por medio de sus toxinas daña la mucosa intestinal llevando a una diarrea leve a severa con riesgo vital (Cammerer *et al.*, 1976).

Selección de cepas bacterianas resistentes.

Según describe la Organización Mundial de la Salud (OMS) la resistencia bacteriana es un fenómeno biológico natural de tal modo, puede esperarse que de cada nuevo agente antimicrobiano siempre se detecten cepas resistentes (OMS, 2005). Este hecho se evidenció hace ya medio siglo, cuando apenas pocos años después de que saliera al mercado la penicilina, los científicos comenzaron a observar la aparición de una cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a este antibiótico (OMS, 2000). El fenómeno de resistencia se extendió a otros antimicrobianos como sulfas, tetraciclinas, cloranfenicol y aminoglucósidos. Desgraciadamente, esta respuesta biológica es algo que persiste y que en la actualidad ha llevado a observar la aparición de organismos como *Mycobacterium tuberculosis*, *Enterococcus faecium*, *Acinetobacter* spp y *Pseudomonas* spp resistentes a todos los antimicrobianos disponibles en el arsenal terapéutico (Acuña, 2003). En la Tabla 1 se presentan, esquemáticamente los años de descubrimiento de los agentes antimicrobianos más importantes y los años en que las resistencias a los mismos fueron comunicadas (FAO, 2004).

TABLA 1. Año de descubrimiento de algunos agentes antimicrobianos y año de comunicación de la existencia de cepas resistentes a los mismos.

Droga	Descubrimiento	Uso clínico	Resistencia clínica
Penicilina	1928	1943	1954
Estreptomicina	1944	1947	1956
Tetraciclina	1946	1942	1956
Eritromicina	1952	1955	1956
Vancomicina	1956	1972	1994
Gentamicina	1963	1967	1968
Fluoroquinolonas	1978	1982	1985

Por lo tanto, se evidencia que a pesar de ser un proceso de selección natural, la rapidez con que aparece la resistencia depende de la presión selectiva que el antimicrobiano ejerza sobre la población bacteriana, inhibiendo el crecimiento de microorganismos susceptibles y seleccionando cepas que han adquirido resistencia (García, 2003).

De esta forma, residuos de antibióticos en alimentos de origen animal pueden seleccionar cepas resistentes, fundamentalmente en la flora intestinal del hombre (Corpet, 1992; San Martín y Cañón, 2000). En efecto, un estudio realizado por Corpet (1987), reveló que al administrarle pequeñas dosis de penicilina o clortetraciclina (0,5 mg/ml de agua) a ratones inoculados con flora fecal humana, la concentración fecal de *Escherichia coli* resistente aumentó. Algunos años después, Corpet (1993) realizó otro estudio en el cual se les administró una dosis muy pequeña de oxitetraciclina (2 mg/día por 7 días) a 6 individuos, concluyendo que la proporción de enterobacterias fecales resistentes aumentó significativamente.

Todos los efectos adversos relacionados con los residuos antimicrobianos, han orientado a la necesidad de regular sobre el empleo de estos fármacos y sustancias químicas en general en los sistemas productivos de animales, con el propósito de garantizar la entrega de un producto inocuo a la población.

II. Regulación sobre residuos químicos en alimentos de origen animal.

Con el fin de asegurar la entrega de un producto libre de residuos de sustancias no bióticas (antibióticos, antiparasitarios, entre otros) a la población humana, diferentes organizaciones internacionales como el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) a través del *Codex Alimentarius*, la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) y la Organización Internacional de Normalización (ISO), han sugerido normas sobre el uso racional de estas sustancias en los diferentes sistemas de crianza intensiva de animales.

Las primeras iniciativas para resguardar la inocuidad de los alimentos con respecto a residuos químicos datan del año 1955 y dicen relación con la evaluación de

los aditivos alimentarios. Con este fin se propuso la creación del JECFA que actualmente incorpora además de los aditivos, la evaluación de contaminantes, sustancias tóxicas y los residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos (JECFA, 2001)

En el caso particular de los residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos, el JECFA (2001) estableció las siguientes funciones:

- Elaborar principios (procedimientos) para evaluar su inocuidad.
- Establecer la ingesta diaria admisible (IDA) y recomendar Límites Máximos de Residuos (MRL); éstos últimos corresponden a la concentración máxima de residuos (expresada en miligramos por kilo o en microgramos por kilo del producto fresco), resultante del uso de un medicamento veterinario y que se recomienda se permita legalmente o se reconozca como admisible dentro de un alimento o en la superficie del mismo (FAO, 1997). Sus valores se establecen en base a la IDA que corresponde al consumo máximo de droga y metabolitos que una persona puede ingerir al día sin que se produzcan efectos adversos. La finalidad de estos MRL es asegurar que cuando el medicamento se utiliza adecuadamente, la ingestión de residuos del medicamento presente en los alimentos probablemente no superará la IDA correspondiente.
- Determinar los criterios para establecer los métodos adecuados de análisis a fin de detectar y/o cuantificar los residuos en los alimentos.

Basado en lo anterior la Comisión del *Codex*, establecida por la FAO y la OMS en la década de 1960, recomienda los niveles de residuos de medicamentos veterinarios que se consideran inocuos cuando se los utiliza bajo supervisión y conforme a las buenas prácticas veterinarias. Su labor se ha inspirado en el principio, actualmente aceptado de manera universal, de que las personas tienen derecho a esperar que los alimentos que comen sean inocuos, de buena calidad y aptos para el consumo (FAO, 2005). Para ello, la comisión se encarga de elaborar el *Codex Alimentarius* que es una colección de normas alimentarias internacionalmente aceptadas, que van desde la higiene y calidad nutricional de los alimentos hasta métodos para su análisis y muestreo.

El objeto de estas normas es proteger la salud del consumidor y asegurar la aplicación de prácticas equitativas en el comercio de alimentos (FAO/OMS, 1995).

Bajo este concepto, como una forma de asegurar la armonización en las exigencias que hacen los países para comercializar sus productos, y que estas exigencias no se transformen en barreras paraarancelarias que compliquen el comercio internacional, en el año 1996 se crea el Comité Internacional de Armonización Veterinaria (VICH), en el cual participan especialistas del área pecuaria de diferentes organizaciones y países como Japón y EE.UU, entre otros. El objetivo es armonizar no solamente los valores de MRL e IDA, sino también los métodos analíticos de detección de residuos de sustancias químicas y antimicrobianos en productos de origen animal.

En forma paralela, la U.E y países como EE.UU poseen sus propios sistemas de regulación de medicamentos, contribuyendo adecuadamente a las regulaciones establecidas para el comercio internacional a través de normativas sobre el uso de antimicrobianos y control de los MRL permitidos en los alimentos de origen animal. Estos MRL pueden variar entre los distintos países pero siempre dentro de los márgenes recomendados por la FAO y la OMS a través de la Comisión del *Codex Alimentarius*.

La U.E, en 1995 creó la “European Medicines Agency” (EMA) con el fin de proteger y promover la salud pública y animal a través de la evaluación y supervisión de medicamentos para uso veterinario y humano, facilitando el libre paso de productos medicinales a través de los estados miembros. Entre las principales labores del comité de medicamentos veterinarios está la de establecer los Límites Máximos Residuales para antibióticos en diferentes matrices de diversas especies animales (EMA, 1997). En el mismo contexto, EE.UU posee un sistema global de control de residuos, que incorpora procedimientos rigurosos de aprobación, muestreo, ensayos y control del cumplimiento de los reglamentos. En relación con los residuos, el FDA, a través de su “Center for Veterinary Medicine” (CVM) realiza los estudios previos a la aprobación de un medicamento, exigiendo a la industria farmacéutica que la información en la etiqueta sea completa con el fin de asegurar que las concentraciones en los alimentos de origen animal estén dentro de los niveles de tolerancia establecidos para la droga (FDA, 2005). A su vez, a través del “Food Safety and Inspection Service” (FSIS) del “United States Department of Agriculture” (USDA) se creó un programa nacional de residuos (NRP)

para prevenir niveles violativos de drogas y productos químicos en los alimentos de origen animal destinados a la población humana (Dey *et al.*, 2003).

Todos estos hechos, indican que en gran parte del mundo, un número creciente de consumidores y gobiernos están adquiriendo conciencia de lo relacionado con la calidad y la inocuidad de los alimentos y se están percatando de la necesidad de adoptar una actitud selectiva respecto de los alimentos que se consumen.

III. Situación nacional.

En el ámbito nacional, es importante señalar que en los últimos años ha existido un gran esfuerzo por parte de los organismos gubernamentales, privados y universitarios, orientado a la entrega de un producto de origen animal inocuo y seguro para la población.

Se suma a ésto, el hecho de que el sector pecuario exportador ha debido experimentar cambios significativos producto de un conjunto de transformaciones en relación directa con los procesos de globalización económica, lo cual lo lleva a poner en práctica normas concordantes a los requisitos exigidos por nuestros principales compradores.

Así, el SAG es la entidad pública responsable de certificar que los productos pecuarios de exportación tengan los estándares de calidad e inocuidad que soliciten los países importadores (Orellana y Maureira, 2002), para lo cual ha definido y diseñado el Programa de Residuos en Productos Pecuarios de Exportación con el objeto de dar cumplimiento a las exigencias de exportación y además, contar con información esquemática anual relativa a la presencia de residuos en poblaciones animales destinadas a la exportación. Este conocimiento permitirá evaluar las tendencias de los residuos e identificar los sectores de la industria pecuaria donde se detecten problemas y se requiera la aplicación de medidas correctivas. Este Programa se inició en 1987 en carnes de la especie ovina; en los años siguientes se implementó en carnes de aves (pollos y pavos), cerdos, bovinos, liebres y miel. A partir del año 2005 se incorporaron los lácteos (SAG, 2006c).

Este sistema complementa otros programas realizados en el área de inocuidad de alimentos, como el Sistema de Aseguramiento de Calidad (SAC) y Planteles Bajo Certificación Oficial (PABCO) (SAG, 2006c).

Por otro lado, el Ministerio de Salud es el encargado de velar por la inocuidad de los alimentos que van a la población nacional a través del Reglamento Sanitario de los Alimentos. Bajo este contexto, el Ministerio de Salud el 25 de Agosto de 1999 (decreto Exento número 1462), fijó los Límites Máximos de Residuos de medicamentos veterinarios en alimentos destinados a consumo humano. Para ello revisó y utilizó como referencia las recomendaciones del Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias, Comisión del *Codex Alimentarius* y en su defecto las concentraciones establecidas por la FDA o por la U.E. Consideró además, el acuerdo de las Medidas Sanitarias y Fitosanitarias de la Organización Mundial del Comercio (OMC), organización a la cual Chile está adscrito (Ministerio de Salud, 1999).

IV. Programas internacionales de control de residuos.

De acuerdo al *Codex Alimentarius* (FAO/OMS, 1995), las especificaciones de un programa de control de residuos están determinadas por la importancia de los diversos riesgos para la salud que podrían afectar a los consumidores de productos alimenticios de origen animal.

Además señala que, un país que cuente con tal programa podrá participar con mayor confianza en la comunidad de naciones que comercian con alimentos. Ello se debe a que un programa eficaz de control de residuos puede servir también de base para certificar la inocuidad de los productos alimenticios exportados por el país, así como garantizar la inocuidad de los productos importados por dicho país.

Para establecer un programa eficaz se deben adoptar varias medidas, entre ellas:

- Establecer el organismo regulador encargado de ejecutar los programas de inspección y análisis de laboratorio.
- Elaborar un programa integrado de inspección.

- Compilar un registro de los medicamentos veterinarios y/o sustancias químicas puras utilizadas en el país.
- Elaborar reglamentos relativos a la distribución de medicamentos veterinarios.
- Elaborar procedimientos para determinar la inocuidad y eficacia de los medicamentos veterinarios y los residuos resultantes del uso de dichos medicamentos en los alimentos.
- Establecer procedimientos para la obtención de muestras de productos alimenticios de origen animal.
- Seleccionar los métodos de análisis que habrán de utilizarse.
- Ejecutar un programa de garantía de calidad, con objeto de garantizar resultados de la mejor calidad posible.
- Elaborar programas educacionales para los productores y los médicos veterinarios en los que se de instrucciones sobre el correcto uso de los medicamentos y se fomente el uso de medidas que apunten a reducir la presencia de residuos en animales destinados a consumo humano.

Dentro de todas estas medidas, la selección de los métodos de análisis que garanticen la inocuidad de los alimentos es un punto fundamental. Se dispone de varios tipos de métodos para realizar análisis que respondan a las necesidades de los programas de control de residuos. Las decisiones con respecto al empleo de un determinado método de análisis dependerán de los objetivos que fije el programa regulador y de las características analíticas funcionales de los métodos (FAO/OMS, 1995).

V. Métodos de análisis para el control residuos.

Con el fin de garantizar el cumplimiento de los requisitos relativos a la inocuidad de los alimentos, señalados por los organismos internacionales, los laboratorios analíticos deben contar con métodos optimizados que funcionen como un sistema en que entran muestras y salen resultados (San Martín, 2000). Lo ideal sería disponer de métodos de análisis que fueran eficaces y prácticos para detectar,

cuantificar e identificar todos los residuos de medicamentos veterinarios que pudieran estar presentes en los alimentos en conformidad con los MRL (FAO/OMS, 1995).

El *Codex Alimentarius* (FAO/OMS, 1995) clasifica los métodos analíticos en tres grupos según sus características funcionales:

- Métodos Analíticos Tipo I: Se les conoce como métodos de referencia, ya que ofrecen el mayor grado de fiabilidad en lo que respecta a la cuantificación e identificación de la estructura del analito (droga). El inconveniente de estos métodos se relaciona con los costos analíticos, ya que la muestra requiere ser sometida a un tratamiento previo y el rendimiento por hora de trabajo es muy bajo. Dentro de estas técnicas se puede nombrar a la cromatografía, combinada con un procedimiento de espectrometría de masa, un detector de arreglo de diodos, o un detector de fluorescencia.
- Métodos Analíticos Tipo II: En general determinan la concentración del analito, pero no permiten identificar con total certeza su estructura. La mayoría de los métodos habitualmente empleados pertenecen a este grupo. Dentro de estos métodos se puede nombrar a la cromatografía en capa fina y cromatografía líquida con detector UV.
- Métodos Analíticos Tipo III: Son aquellos que proporcionan una información menos definitiva, pero de gran utilidad. Permiten determinar la presencia o ausencia de un compuesto o clase de compuestos. Por estos motivos se les denominan también métodos de selección o de “screening”, los que son útiles en los programas de control de residuos debido a su gran capacidad muestral (aplicación a gran escala), fácil implementación y ser relativamente económicos. Por otro lado, sus principales desventajas dicen relación con la sensibilidad y especificidad las cuales son bajas si se comparan con las del grupo I y II. De esta manera, con estos métodos por sí solos no se pueden adoptar medidas regulatorias, por lo que los resultados positivos deben confirmarse con métodos más sofisticados pertenecientes al grupo I o II.

De esta forma, cada tipo de método tiene sus propias características y ninguna prueba incluye todas las necesidades analíticas requeridas. Por lo tanto, es necesaria la utilización de un sistema integrado que emplee tanto ensayos de “screening” (métodos tipo III) como confirmatorios para asegurar que los alimentos con residuos sobre los niveles violativos no lleguen a la población (Mitchell *et al.*, 1998).

Dentro de los métodos de “screening” se encuentran los ensayos de unión inmunológica o enzimática y las pruebas microbiológicas. Los métodos inmunoenzimáticos se basan en la unión específica de un antimicrobiano o grupo antimicrobiano (antígeno) a un anticuerpo específico que se haya inmovilizado en una fase sólida (Cullor, 1992). Esta unión produce directa o indirectamente una reacción cuyo producto es visible y puede ser medido.

La mayoría de estos ensayos involucran un principio competitivo, en el cual el antimicrobiano contenido en la muestra compete por el receptor con un antimicrobiano estándar ligado a una enzima. Luego de un período breve de incubación, la enzima marcadora cataliza una reacción de color o de fluorescencia, cuya intensidad, proporcional a la presencia del antimicrobiano, es comparada con un control. Debido al principio de competencia, una baja intensidad usualmente se interpreta como un resultado positivo, mientras que una intensidad igual o superior al control se asocia con una mayor presencia del residuo marcado y, por lo tanto, constituye una muestra negativa (Cullor, 1993).

Estos ensayos, son más específicos y más rápidos que los microbiológicos, pero, son a menudo excluidos de un análisis de rutina debido a que requieren un alto nivel de experiencia y habilidad; además son de alto costo y necesitan una preparación previa de las muestras (Mellgren *et al.*, 1996).

Por otro lado, las técnicas de “screening” microbiológico son ampliamente usadas para detectar residuos de antimicrobianos en distintas matrices tales como leche, músculo, hígado, riñón, sangre, orina, e incluso en plasma (Korsrud *et al.*, 1998). Existe una gran diversidad de estas pruebas y su gran popularidad se debe principalmente a que son rápidas, fáciles de realizar y relativamente económicas ya que requiere de material de uso frecuente en laboratorio prescindiendo de equipos especializados.

VI. Métodos microbiológicos.

En términos generales, estas técnicas se basan en el fenómeno de inhibición del crecimiento de ciertos microorganismos cuando se hallan ante la presencia de una o varias sustancias inhibidoras contenidas en la muestra objeto de análisis (Martin, 2005).

El principio de estas técnicas se fundamenta en la capacidad de difusión del antimicrobiano presente en una muestra hacia un medio de cultivo que contiene un determinado microorganismo sensible inhibiendo el desarrollo de éste (Gesche, 1986; FSIS, 1994). El fenómeno inhibitorio, puede ser evidenciado por círculos o halos, generados por la inhibición del desarrollo bacteriano, medidos alrededor de cilindros de acero, discos de papel de pequeño diámetro o tómulas que contienen la muestra, o bien, basarse en cambios de coloración del medio debido a metabolitos originados por el desarrollo de los microorganismos (métodos colorimétricos) (Cullor, 1992). Las muestras de tejido se colocan sobre la superficie o en una pequeña perforación de un agar nutritivo depositado en placas petri que contiene las cepas bacterianas sensibles. La lectura se realiza previa incubación de las placas por un tiempo y a una temperatura variables según la cepa microbiana y el medio de cultivo que se emplee (Nouws *et al.*, 1979). También el pH del medio de cultivo en que se analizan las muestras juega un rol importante, por cuanto se ha demostrado que influye sustancialmente en la difusión y acción del antimicrobiano. Los valores de pH más utilizados son 6,0 y 8,0, ampliando de este modo el espectro de detección de los antibacterianos. Niveles más ácidos o más alcalinos, interfieren en el desarrollo de la bacteria sensible, motivo por el cual debe tenerse especial cuidado en la selección del pH del medio de cultivo (Gesche *et al.*, 2001).

Ante la presencia de una muestra positiva, es decir, presencia de inhibición, este tipo de pruebas no especifica de que analito se trata ni tampoco la concentración en que se encuentra, sino que sólo indica u orienta a la presencia de inhibidores, los que luego deberán determinarse y cuantificarse por otras técnicas más sofisticadas pertenecientes a los métodos tipo I o II.

La importancia de estas técnicas de “screening” radica en cumplir un rol primario en el análisis de rutina, ya que por sus características de fácil implementación

y bajos costos, permiten analizar un elevado número de muestras en busca de posibles resultados positivos, estando diseñadas específicamente para evitar los resultados falsos negativos (Diario Oficial de las Comunidades Europeas, 2002). El porcentaje de respuestas falsas negativas debe ser bastante bajo, mientras que en el caso de las respuestas falsas positivas podría aceptarse una flexibilidad ligeramente mayor (Korsrud *et al.*, 1998); es decir, en estas pruebas la sensibilidad es más importante que la especificidad. Esto se explica debido a que, como se mencionó anteriormente, en los métodos de “screening” los resultados positivos deben ser sometidos a confirmación y, por lo tanto, la consecuencia de un falso positivo implica someter innecesariamente una muestra a pruebas de laboratorio confirmatorias, mientras que la consecuencia de un falso negativo es que un animal con residuos pueda salir hacia el comercio y llegar a la población perjudicando su salud (Dey *et al.*, 2005a).

Dentro de los métodos microbiológicos más utilizados está la técnica del *Bacillus subtilis* BGA o prueba de las tres placas que es la prueba oficial de Alemania (Korsrud *et al.*, 1998). Consiste en colocar muestras de tejido muscular y renal (cortes de 2 mm de grosor) sobre un medio de cultivo a tres pH distintos (6,0; 7,2; 8,0) con el fin de detectar la mayoría de los agentes antimicrobianos incluyendo las sulfas (Korsrud *et al.*, 1998). La incubación es por 18-24 horas a 30°C. Este método presenta una buena detección para residuos de antibióticos beta-lactámicos, tetraciclinas y aminoglicósidos; relativamente buena para macrólidos y sulfonamidas y mala para residuos de cloranfenicol (Nouws, 1981).

Otro método microbiológico que utiliza el *Bacillus subtilis* BGA es la técnica de una placa, usada frecuentemente en Bélgica para monitorear la presencia de residuos de antimicrobianos en tejido renal (Cornet *et al.*, 2005). Utiliza un medio de cultivo a pH 7,0 al cual se le agrega trimetoprim para aumentar el espectro hacia sulfas (Koenen-Dierick *et al.*, 1995).

Otra prueba de uso frecuente es la “New Dutch Kidney Test”, técnica oficial de Holanda desde 1988, que utiliza como cepa sensible *Bacillus subtilis* y como muestra fluido de pelvis renal. Es un “test” de una placa con medio a pH 7,0 suplementado con dextrosa y trimetoprim, e incubada por 13-18 horas a 37° C. La técnica consiste en realizar una incisión al riñón e insertar 4 discos de papel durante 30 minutos para luego

sacarlos y ponerlos sobre la superficie de la placa. Esta prueba detecta residuos de betalactámicos, tetraciclinas, macrólidos y sulfonamidas (Korsrud *et al.*, 1998).

Otro método microbiológico que se utiliza con frecuencia es la prueba oficial de la U.E o método de las Cuatro Placas. Esta prueba es usada rutinariamente en Dinamarca, España, Inglaterra, Suiza, Francia, Italia, Grecia (Korsrud *et al.*, 1998) y Chile. Las muestras se obtienen desde tejido muscular y se sitúan sobre la superficie de cuatro placas que contienen *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Kocuria rhizophila* (*Micrococcus luteus*) ATCC 9341 y *Bacillus cereus* ATCC 11778 inoculados en medios de cultivo a diferentes pH (Ministerio de Sanidad y Consumo, 1989). El procesamiento de las muestras se inicia con un proceso de extracción de la droga desde la matriz, es decir, primero debe separarse el principio activo desde los componentes biológicos del tejido mediante procesos físico-químicos que permiten liberarlo de proteínas y otras moléculas que retienen la droga impidiendo su detección. Una vez extraída, las muestras se depositan sobre las placas sembradas con la cepas sensibles e incuban a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 18 a 24 horas (Ministerio de Sanidad y Consumo, 1989). Según Korsrud *et al.*, (1998), este método es más caro y laborioso que las pruebas microbiológicas mencionadas anteriormente.

Existen otras pruebas que utilizan como matriz orina y plasma como son el “Live Animal Swab Test” (“LAST”) que examina orina de animales vivos y el “Brilliant Black Reduction Test” (BBRT) que utiliza plasma (Korsrud *et al.*, 1998).

En EE.UU, el FSIS ha desarrollado tres métodos de “screening” microbiológico para la detección de residuos de antibióticos, fundamentalmente en tejido renal de animales faenados (Korsrud *et al.*, 1998). Ellos son “The Swab Test on Premises” (“STOP”), “Calf Antibiotic and Sulfa Test” (“CAST”) y, recientemente, el “Fast Antimicrobial Screen Test” (“FAST”) (Dey *et al.*, 1998). Estas pruebas fueron desarrolladas con el fin de disminuir el tiempo de retención de las carcasas antes de salir al comercio, el cual fluctuaba entre 5 a 6 días (Dey *et al.*, 2003).

En 1979 se desarrolló el “STOP”, un método simple, económico y confiable que fue implementado en matadero con el fin obtener resultados luego de 18 a 24 horas de realizado (Dey *et al.*, 2005b).

En 1980, un incremento en los porcentajes de niveles violativos de sulfas y residuos de antibióticos en carcasas de terneros determinó el desarrollo del segundo método conocido como “CAST”, el cual fue introducido a mataderos en 1985 sólo para este tipo de canales. También sus resultados pueden obtenerse a partir de las 18 a 24 horas de realizado (Dey *et al.*, 2005b).

Finalmente, durante el año 1994 se implementó el “FAST” con el fin de mejorar la capacidad del Programa de Detección de Residuos de Antimicrobianos (Dey *et al.*, 1998). Este método, similar al “CAST”, también se utiliza en mataderos ya que sus resultados pueden ser obtenidos tan rápidos como a las 6 horas (Dey *et al.*, 2003; Dey *et al.*, 2005a).

Estudios de sensibilidad *in vitro* entre “CAST” y “FAST”, han determinado que el límite menor de detección (LLD), es decir, la menor concentración de droga que es capaz de detectar el método, en el caso particular de sulfametazina, sulfatiazol y sulfadimetoxina es menor en el “FAST” que en el “CAST” (0,5, 0,5 y 0,125 mg/kg versus 2,0; 1,0 y 0,25 mg/kg, respectivamente) (Dey *et al.*, 2003; Dey *et al.*, 2005a). Es decir, el “FAST” puede detectar concentraciones más bajas de residuos de estas sulfas que el “CAST”. Esto es importante de considerar, ya que este último fue desarrollado especialmente para detectar este tipo de drogas en carcasas de terneros (Dey *et al.*, 2005a). Por otro lado, la sensibilidad (LLD) *in vitro* del “FAST” es significativamente mejor que la del “STOP”, tanto para algunos antibióticos como para las sulfas. Ejemplo de aquello, son los valores obtenidos del “STOP” para neomicina y gentamicina que corresponden a 0,025 y 0,125 mg/kg respectivamente, mientras que para el “FAST” son 0,0125 y 0,0063 mg/kg, respectivamente (Dey *et al.*, 2003; Dey *et al.*, 2005a).

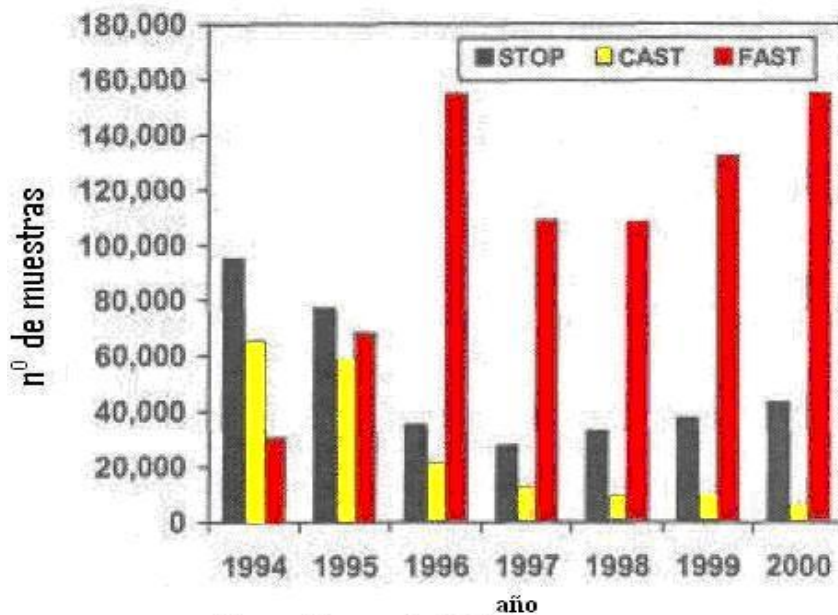
Además de estudios *in vitro*, se han analizado muestras de mataderos con las tres metodologías, revelando que, si bien, los niveles de sensibilidad del “FAST”, al compararlos con los del “STOP”, son significativamente mejores (97,5% versus 79,6%), las diferencias con el “CAST” (95,6%) no son significativas. Pese a lo anterior, la técnica “FAST” destaca por el menor tiempo requerido para obtener los resultados (Dey *et al.*, 2005a), lo cual representa la ventaja de generar resultados durante una jornada de trabajo y, por lo tanto, las carcasas libres de residuos pueden ser liberadas hacia el comercio mucho antes que con las otras pruebas. Sin duda alguna, esto aumenta

considerablemente la eficiencia de cualquier sistema de monitoreo por la posibilidad de analizar un alto número de muestras en forma simultánea y además, reducir los costos de los productores al mantener carcasas retenidas en congelación por menos tiempo.

Una ventaja adicional del “FAST” sobre el “STOP” y “CAST” es que la positividad de una muestra se determina no sólo por el halo inhibitorio, sino también por el viraje de color de la placa después de la incubación. (Dey *et al.*, 2005a), lo cual facilita considerablemente la lectura.

Informes del año 1994 hasta el año 2000 indican que, debido a su mejor sensibilidad y menor tiempo analítico, el uso del “FAST” aumentó en EE.UU, mientras que el “STOP” y “CAST” fueron disminuyendo (Dey *et al.*, 2003; Dey *et al.*, 2005a) como se muestra en el Gráfico 1.

Gráfico 1. Uso anual del STOP, CAST y FAST en EE.UU. desde el año 1994 hasta el año 2000.



Fuente: Dey *et al.*, 2005 a

El procedimiento para realizar el “FAST” es similar al del “CAST” y “STOP”. En todos ellos las muestras se obtienen de tejido renal (Dey *et al.*, 2003). La elección de la matriz renal se basa en el principio que al administrar una droga a un animal ésta se encontrará en mayor concentración en aquellos tejidos donde se metaboliza (hígado) y

depura (riñón) la droga, considerándose ambos como los principales tejidos “acumuladores” (“target tissues”). Para la mayoría de los antimicrobianos, el órgano de excreción es el riñón y por ende, es factible que se encuentren en él, aún cuando ya hayan desaparecido de la musculatura (Nouws, 1981). La concentración de residuos varía mucho de un tejido a otro, siendo mayor en los tejidos de reserva, como es la grasa corporal y en los tejidos “acumuladores” (hígado y riñón) principalmente dependiendo de la vía metabolizadora y depuradora. Por lo anterior, fármacos que son excretados por vía renal, se encontrarán en este tejido en concentraciones más altas que en otros tejidos comestibles (Payne *et al.*, 2004).

Sobre esta base, se podría pensar que el “FAST” tendría una mayor eficiencia que el método microbiológico actualmente usado en Chile y en la U.E, ya que éste último utiliza como muestra músculo, tejido donde la droga no está en su más alta concentración.

Otra ventaja que tendría el “FAST” sobre el Método de las Cuatro Placas es su rápida y simple ejecución, ya que ésta sólo implica la inserción de una tórula en el tejido renal por un corto tiempo (30 minutos), mientras que el método actualmente usado en Chile requiere la extracción de la droga desde el tejido, lo que abarca una serie de procesos previos que complican y entretienen el análisis de las muestras. Por otro lado, el “FAST” detectaría un mayor espectro de antimicrobianos simultáneamente. Es así, como según la literatura sería capaz de detectar: clortetraciclina, eritromicina, gentamicina, neomicina, oxitetraciclina, penicilina, estreptomicina, tetraciclina, tilosina, sulfametazina, sulfatiazol y sulfadimetoxina (Dey *et al.*, 2003; Dey *et al.*, 2005b), mientras que el Método de las Cuatro Placas está diseñado para detectar sólo 4 familias de antibióticos que son tetraciclinas, beta-lactámicos, macrólidos y aminoglicósidos (Ministerio de Sanidad y Consumo, 1989). En cuanto al tiempo requerido para obtener los resultados, el “FAST” tendría una nueva ventaja, ya que éstos pueden obtenerse transcurridas 6 horas de incubación, a diferencia de lo que ocurre con el método europeo que requiere de 18 a 24 horas.

Por todas las ventajas que representa el “FAST” sobre el Método de las Cuatro Placas, sería interesante poder implementar esta técnica en el país y eventualmente reemplazar al vigente. Sin embargo, cualquier método analítico antes de ser utilizado

debe ser validado, es decir, debe comprobarse que el método es científicamente correcto en las condiciones en que va a ser aplicado. Por lo tanto, aunque el método “FAST” está validado en EE.UU, para poder implementarlo en Chile no bastan los datos generados por los laboratorios del FSIS de EE.UU sino que este proceso debe realizarse a nivel del laboratorio donde se realizarán los análisis y así determinar la real utilidad que el método proporcionaría a los programas de control de residuos que funcionan en el país. Esta validación, es importante además, por el hecho de que si las futuras exigencias de EE.UU para exportar productos cárneos a su país incluyen la utilización de este método microbiológico particular, Chile estaría preparado y capacitado para cumplirlas.

VII. Validación de metodologías analíticas.

Hoy en día, los laboratorios deben demostrar que sus métodos analíticos proporcionan resultados confiables y adecuados para la finalidad o propósito perseguido, ya que muchas de las decisiones que se toman están basadas en la información que estos resultados proporcionan. Este propósito se cumple mediante estudios de validación (Maroto, 2002).

Existen numerosas definiciones de validación, sin embargo, de manera simple se puede decir que validación es el proceso por medio del cual se comprueba si el método es lo suficientemente confiable y si los resultados previstos se obtienen dentro de las condiciones prefijadas (Castillo y González, 1996).

La validación de un método analítico permite un conocimiento de las características de funcionamiento del método en cuestión y por otra parte, proporciona un alto grado de confianza y seguridad en el mismo y en los resultados obtenidos al aplicarlo. Es así, como la norma europea señala que es necesario garantizar la calidad y comparabilidad de los resultados analíticos de los laboratorios autorizados para el control de residuos. Para ello, deben utilizarse métodos validados de acuerdo con procedimientos y criterios de funcionamiento comunes (Diario Oficial de las Comunidades Europeas, 2002).

El estudio de validación de un método resulta ser el factor más importante para obtener datos analíticos que permitan definir las características funcionales de éste (FAO/OMS, 1995). La validación de los métodos analíticos se fundamenta en la determinación de diversos parámetros, que se aplican de acuerdo con la categoría a la que pertenezcan (Castillo y González, 1996), es así como para los métodos cualitativos de “screening”, categoría donde se enmarca el “FAST”, deben determinarse para su validación los siguientes parámetros (Diario Oficial de las Comunidades Europeas, 2002):

- Capacidad de detección: concentración mínima de una sustancia que puede ser detectada, identificada o cuantificada en una muestra.
- Especificidad: capacidad del método para distinguir entre el analito que se está midiendo y otras sustancias afines.
- Robustez: susceptibilidad de un método analítico a los cambios de las condiciones experimentales. Es decir, es la medida de su capacidad de permanecer inafectado frente a pequeñas variaciones deliberadas en el método.

Por lo anteriormente expuesto, el presente trabajo tiene como objetivo validar el “FAST” como método analítico de “screening” para la detección de las drogas de mayor uso a nivel nacional, entre ellas, quinolonas, fluoroquinolonas, cefalosporinas y beta-lactámicos y así, contribuir al Programa Nacional de Control de Residuos en Productos Pecuarios de Exportación que realiza actualmente el SAG.

OBJETIVO GENERAL

Validar la prueba de “screening” microbiológico “FAST” para los antibióticos más usados en los animales de producción en Chile.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I.** Implementar la técnica microbiológica “FAST”.
- II.** Determinar la especificidad de la técnica microbiológica “FAST”.
- III.** Determinar la capacidad de detección del “FAST” para 16 antibióticos como drogas puras y para 2 drogas en la matriz renal.
- IV.** Analizar la robustez del método “FAST”.

MATERIAL Y MÉTODOS

I. Implementación de la técnica microbiológica “Fast Antimicrobial Screen Test” (“FAST”):

Para su implementación, se siguieron las recomendaciones del fabricante (Medtox®) aprobadas por el FSIS, USDA de Estados Unidos de Norteamérica (FSIS, 1994).

1.- Medio de cultivo:

- 38 gramos de agar Mueller- Hinton II (Difco®)
 - 7 gramos de dextrosa (Difco®)
 - 0.028 gramos de púrpura de Bromocresol (Merck®)
 - 1000 ml de agua destilada
- ajustado a pH 6,8 y autoclavado a 121°C por 15 minutos.

Se prepararon placas petri desechables de 90 x 15 mm, colocando 9 ml del medio en cada una. Una vez solidificado el medio de cultivo, las placas se mantuvieron refrigeradas por no más de 7 días.

2.- Microorganismo:

Esporas de *Bacillus megaterium* ATCC 9885 en concentración de 1×10^6 ufc/ml (Medtox®).

3.- Siembra de la placa con las esporas:

Con un lápiz se marcó un extremo de la base de la placa (punto de origen) y se procedió a sembrar las esporas mediante la técnica descrita por el fabricante (Figura 1).

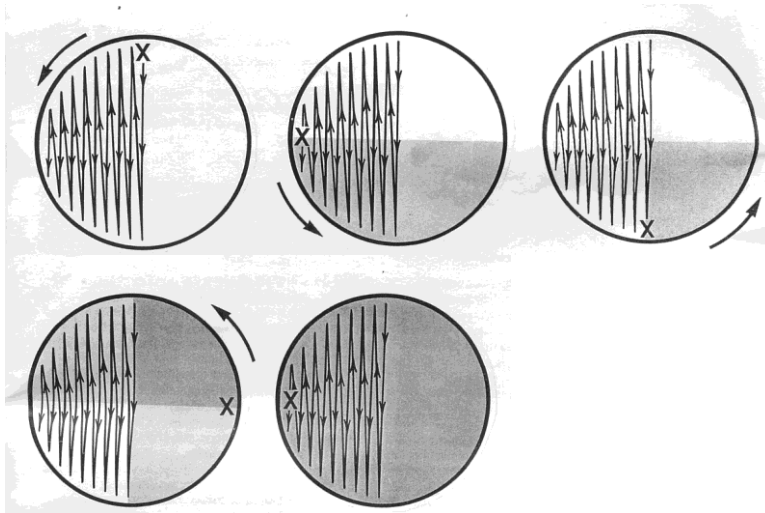


FIGURA 1. Técnica de siembra del *Bacillus megaterium* ATCC 9885 en la placa “FAST”.

Fuente: MEDTOX DIAGNOSTICS INC. Performing the Fast Antimicrobial Screen Test. A Self- Instructional Guide

4.- Ubicación del disco control de neomicina (Arlab®):

Con una pinza, se tomó un sensidisco de 5 μg de neomicina (N5) y se colocó sobre el agar debajo de la marca, tal como se muestra en la Figura 2.

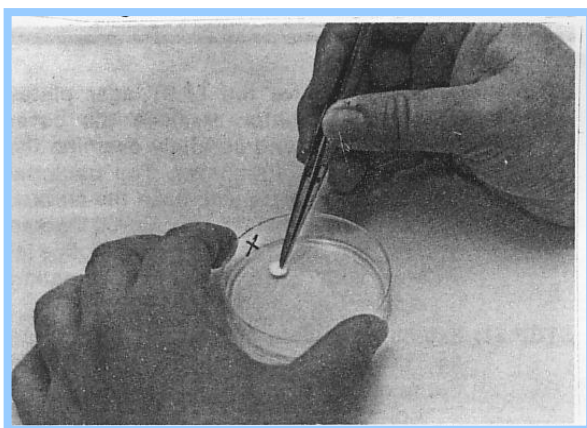


FIGURA 2. Ubicación del sensidisco N5 sobre el agar.

Fuente: MEDTOX DIAGNOSTICS INC. Performing the Fast Antimicrobial Screen Test. A Self- Instructional Guide

5.- Método “FAST”:

Antes de proceder a realizar el método “FAST”, se realizó la verificación de la calidad del lote de placas producido. Una placa del lote preparado a partir de un medio de cultivo, se sembró con esporas de *Bacillus megaterium* ATCC 9885 (Medtox®) y se le colocó un sensidisco control N5, incubándola en estufa (Mettmert®) a $44^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Luego, se midió con vernier de precisión (Caliper®) la zona o halo de inhibición alrededor del disco N5, el cual debió tener un diámetro entre 20-26 mm y observarse de color amarillo claro. Los casos en que existió inadecuado desarrollo bacteriano (color púrpura/morado), o bien se observó contaminación, se procedió a eliminar todo el lote de placas.

a.- **Obtención de la muestra con la tórula:** Las muestras de riñón que se analizaron estaban contenidas en bolsas plásticas dobles, en lo posible frescas y no congeladas. Se tomó una tórula estéril y se introdujo en la muestra moviéndola dentro del tejido para macerarlo y embeber el algodón con el fluido tisular; luego, la tórula inserta se dejó reposar por un tiempo de 30 minutos dentro del tejido para asegurar una máxima saturación del algodón.

b.- **Ubicación de la tórula en la placa:** Se retiró la tórula desde el tejido tomándola por el mango con las manos y manteniendo la cabeza de algodón hacia abajo. Se rompió el mango lo más corto posible para luego depositar la tórula sobre la superficie del agar, cuidando que el mango quedara en dirección hacia el sensidisco N5 y la cabeza de algodón hacia el centro (Figura 3). Se marcó con lápiz permanente, por el fondo de la placa, el número de muestra que correspondía. Por cada placa, como máximo, se colocaron dos tórulas y todas contenían un sensidisco control.

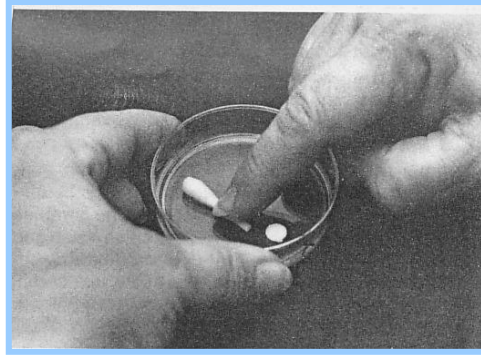


FIGURA 3. Ubicación de la tórula en la placa.

Fuente: MEDTOX DIAGNOSTICS INC.
Performing the Fast Antimicrobial Screen
Test. A Self- Instructional Guide

c.- **Incubación de las placas:** Se realizó a $44^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ por 24 horas.

d.- **Interpretación del “test”:** Se retiraron las placas de la estufa y cuidadosamente se removieron las tórulas de la superficie (golpeando el fondo de la placa). Antes de evaluar la muestra se verificó el tamaño y color del halo inhibitorio alrededor del sensidisco N5; valores fuera de rango (20-26 mm) exigieron repetir el análisis completo. Se calificó como una muestra positiva, aquella que presentara un halo inhibitorio y color amarillo claro alrededor de las tórulas independiente del tamaño de halo (Figura 4).

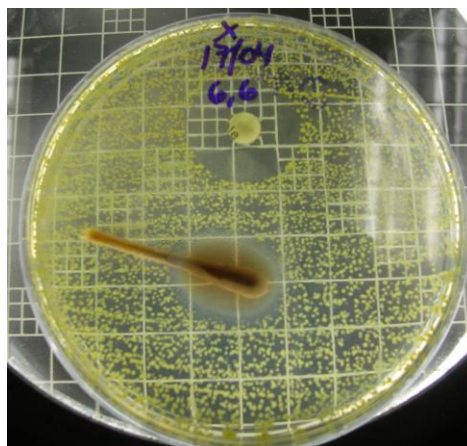


FIGURA 4. Muestra positiva a “FAST”.

II. Validación del método:

La validación de la técnica “FAST” se realizó mediante las metodologías propuestas por la U.E. (Diario Oficial de las Comunidades Europeas, 2002) para métodos de criba no cuantitativos ni confirmatorios. Se determinaron los siguientes parámetros: especificidad, capacidad de detección y robustez de la técnica.

a.- Especificidad de la técnica:

La especificidad se define como la capacidad del método para distinguir entre el analito que se está midiendo y otras sustancias afines. En el método “FAST”, las sustancias que deben ser detectadas son antimicrobianos, por ello se eligieron potenciales interferentes que pudieran haber alterado los resultados.

De esta forma, se realizó la prueba a todos los solventes y diluyentes utilizados para la preparación de drogas puras con el fin de determinar si éstos, por sí solos, generaban o no halo de inhibición. Las sustancias probadas fueron: agua destilada, NaOH 0.03 M, “buffer” fosfato pH 8.0, 0.1 mol/L, NaCl 0.9% y etanol 96% (Anexo 1).

Se utilizó una placa “FAST” con 5 sensidiscos de papel blancos (Arlab®) de 10 mm de diámetro y 1.2 mm de grosor distribuidos equidistantemente sobre la superficie del agar. A cada sensidisco se le agregó 150 µl del solvente o diluyente a evaluar. Luego, la placa se llevó a incubar a $44^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ por 24 horas, para finalmente leer los resultados (presencia o ausencia de halo de inhibición). Para cada solvente o diluyente se repitió la prueba 10 veces.

Otro posible interferente considerado fue el tejido renal. Para ello, se trabajó con riñones “blanco” (sin antimicrobianos según análisis cromatográfico) de cerdos, bovinos y aves a los que se les realizó la técnica “FAST” descrita en el ítem I. Las muestras de cerdos y bovinos fueron adquiridas en supermercados, mientras que las de aves provinieron de gallinas adultas mantenidas durante 30 días con alimento sin antimicrobianos. Los riñones se analizaron tanto al estado fresco como congelado ya que se reconoce un aumento de falsos positivos en las muestras que han sido congeladas/descongeladas (Payne *et al.*, 2004). De cada especie animal se analizaron 10 riñones.

b.- Capacidad de detección:

La capacidad de detección o límite de determinación corresponde a la concentración mínima de antimicrobiano que es capaz de producir un halo de inhibición visible mediante la técnica "FAST". Este parámetro se determinó para drogas puras y para matrices renales provenientes de animales tratados con antibióticos.

b.1.- Límite de determinación con drogas puras:

Se analizaron los siguientes antimicrobianos como droga pura (Sigma®): ácido oxolínico, amoxicilina, ampicilina, ceftiofur, cloxacilina, enrofloxacino, eritromicina, estreptomicina, florfenicol, flumequina, gentamicina, lincomicina, neomicina, oxitetraciclina, penicilina y tilosina.

De cada uno, se prepararon 3 diluciones con solventes y diluyentes (Anexo 1) que correspondieron a las siguientes concentraciones:

- 1.- valor del MRL (1 x Límite Máximo Residual).
- 2.- la mitad del valor del MRL (0.5 x Límite Máximo Residual).
- 3.- el doble del valor del MRL (2 x Límite Máximo Residual).

Para cada droga se seleccionó el valor de MRL más exigente a nivel internacional (Anexo 2). Las drogas se prepararon el mismo día del ensayo.

Se colocó 150 µl de cada una de las tres diluciones de cada droga en sensidiscos blancos (Arlab®), de 10 mm de diámetro y 1.2 mm de grosor, ubicados previamente sobre el medio de cultivo. Las placas se incubaron a $44^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Luego, se midieron los milímetros del halo inhibitorio determinando la menor concentración de cada droga que fue capaz de producir dicho halo. Se repitió 6 veces cada una de las diluciones calculando promedio, desviación estándar y coeficiente de variación.

b.2.- Límite de determinación en matriz renal:

Se utilizaron riñones de gallinas comerciales adultas en los que se analizaron 2 antibióticos: enrofloxacino y oxitetraciclina.

Para obtener tejido renal con residuos de antimicrobianos en concentración conocida, se trabajó con 2 grupos (A y B) de 16 y 15 animales respectivamente. Las

gallinas se mantuvieron con agua y alimento no medicado *ad libitum* durante 4 semanas en la sala de animales de experimentación de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. Transcurrido este tiempo, se les administró una dosis terapéutica de enrofloxacino de 10 mg/kg/24 horas por 3 días (Enromic® 5 %) vía intramuscular al grupo A y una dosis única de 0.25 ml/kg de oxitetraciclina (Oxilen®) vía intramuscular al grupo B.

Posteriormente, 1 ave de cada grupo se sacrificó por dislocación cervical al tiempo cero como control negativo y luego dos aves de cada grupo fueron sacrificadas a los tiempos que se muestran en el Esquema 1. De cada ave ambos riñones fueron extraídos y analizados mediante “FAST”. Una muestra se catalogó como positiva, cuando generó un halo de inhibición mayor o igual a 8 mm incluyendo el diámetro de la tórula (6 mm) y negativa cuando el halo inhibitorio fue menor a este valor. A título complementario, se solicitó cuantificar la droga presente en el tejido mediante HPLC MS/MS (Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplado a espectrometría Masa/Masa) al Laboratorio de Farmacología Veterinaria de la Universidad de Chile para contrastar los halos inhibitorios con las concentraciones reales presentes en las muestras.

ESQUEMA 1. Tiempos de obtención de muestras renales para los grupos A y B.

Grupo	horas post-tratamiento								
	A	0	6	9	24	48	72	96	120
B	0	4	8	24	48	72	96	104	-

c.- Robustez de la técnica:

Se entiende por robustez a la susceptibilidad de un método analítico frente a los cambios de las condiciones experimentales. Para determinarla se utilizó el método Youden, cuyo procedimiento implica la introducción deliberada por el laboratorio de variaciones menores razonables, es decir, aquellas que puedan esperarse que ocurran durante el empleo normal del método, y la observación de sus consecuencias (Diario Oficial de las Comunidades Europeas, 2002). Para ello, se identificaron los posibles

factores o variables que pudieran influir en los resultados: factor operador (Op), pH del medio (pH), concentración de esporas (Conc esp.) y temperatura de incubación (T°). Cada variable se estudió mediante un valor (o cualidad) nominal representado por las letras mayúsculas A, B, C y D y otro valor (o cualidad) alternativo representado por las minúsculas a, b, c y d, diseñando ocho pruebas distintas según la combinación de los factores. Los resultados (halos de inhibición en mm.) se representaron con las letras s hasta la z. En la Tabla 2 se presenta la configuración del método.

TABLA 2. Prueba de robustez de Youden para un método analítico. Configuración del método.

FACTOR	ANÁLISIS							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A, a	A	A	A	A	a	a	a	a
B, b	B	B	b	b	B	B	b	b
C, c	C	c	C	c	c	C	c	C
D, d	D	d	d	D	D	d	d	D
Halo(mm)	s	t	u	v	w	x	y	z

Donde:

A = operador 1 B = pH 6,8 C = tórula saturada D = T° 44°C
a = operador 2 b = pH 6,6 y 7,0 c = tórula sobresaturada d = T° 42 y 46°C

Se realizaron dos pruebas de Youden con las combinaciones de los factores como se muestra en las Tablas 3a y 3b, considerando los distintos valores alternativos para las variables pH y temperatura.

TABLA 3a. “Test” de Youden 1. Variables pH y temperatura con valores alternativos bajos.

FACTOR	ANÁLISIS							
	1	1	1	1	2	2	2	2
Op	1	1	1	1	2	2	2	2
pH	6,8	6,8	6,6*	6,6*	6,8	6,8	6,6*	6,6*
Conc esp.	saturada	sobresat	saturada	sobresat	sobresat	saturada	sobresat	saturada
T°	44°C	42°C**	42°C**	44°C	44°C	42°C**	42°C**	44°C
Halo(mm)	s	t	u	v	w	x	y	z

Op= operador; Conc esp.= concentración de esporas; T°= temperatura.

* valores alternativos bajos para pH

** valores alternativos bajos para T°

TABLA 3b. “Test” de Youden 2. Variables pH y temperatura con valores alternativos altos.

FACTOR	ANÁLISIS							
Op	1	1	1	1	2	2	2	2
pH	6,8	6,8	7,0*	7,0*	6,8	6,8	7,0*	7,0*
Conc esp.	saturada	sobresat	saturada	sobresat	sobresat	saturada	sobresat	saturada
T°	44°C	46°C**	46°C**	44°C	44°C	46°C**	46°C**	44°C
Halo(mm)	s	t	u	v	w	x	y	z

Op= operador; Conc esp.= concentración de esporas; T°= temperatura.

* valores alternativos altos para pH

** valores alternativos altos para T°

La evaluación de los resultados, se realizó en dos etapas, la primera consideró el efecto de cada factor por si solo y la segunda, el efecto del conjunto de factores sobre la técnica “FAST”. La segunda etapa sólo se realizó cuando las variables por si solas no modificaron los resultados del “FAST”.

Para determinar el efecto de cada factor o variable, se calculó la media de los 4 análisis que contenían la variable en su valor nominal (mayúsculas) y la media de los valores alternativos (minúsculas), así, el efecto de cambio de “A” a “a” se midió por la diferencia. Para las cuatro variables se procedió de manera similar (Tabla 4). Cuando cualquiera de las diferencias sobrepasó al valor correspondiente a 0,5 x D.S entre los replicados llevados a cabo en las mismas condiciones, indicó que el método “FAST” fue sensible a los cambios del factor involucrado y que estas variables deben recibir especial atención al realizar el método. La desviación estándar de los replicados se obtuvo mediante 6 análisis de una muestra positiva a oxitetracilina realizados en las mismas condiciones de laboratorio.

TABLA 4. Evaluación del efecto de cada factor.

Factor	Media valores nominales	Media valores alternativos	Diferencia de medias
Op (A-a)	$\frac{s+t+u+v}{4}$	$\frac{w+x+y+z}{4}$	A-a
pH (B-b)	$\frac{s+t+w+x}{4}$	$\frac{u+v+y+z}{4}$	B-b
Conc esp (C-c)	$\frac{s+u+x+z}{4}$	$\frac{t+v+w+y}{4}$	C-c
T° (D-d)	$\frac{s+v+w+z}{4}$	$\frac{t+u+x+y}{4}$	D-d

Op= operador; Conc esp.= concentración de esporas; T°= temperatura

Para determinar el efecto del conjunto de factores se debió calcular la desviación estándar de las diferencias (SD) (ver Fórmula 1). Si el valor de la desviación estándar de las diferencias es mayor que la desviación estándar del método, podrá deducirse que el conjunto de los factores influye en el resultado, aunque cada factor aislado no presente una influencia significativa y que el método no es lo suficientemente robusto frente a las modificaciones escogidas.

FÓRMULA 1. Cálculo la desviación estándar de las diferencias (SD) según el método de Youden.

$$S_D = \sqrt{2 \times \sum (D^2/7)}$$

Donde D es: \sum valores nominales - \sum valores alternativos

RESULTADOS

En la implementación de la técnica, la lectura de los resultados se realizó a las 6 y 24 horas de incubación para los siguientes antimicrobianos como drogas puras: enrofloxacino, ampicilina, lincomicina, ácido oxolínico, amoxicilina y flumequina. Ambas mediciones fueron comparadas observándose que la lectura temprana indujo a una mayor variabilidad de los resultados debido a la dificultad para discernir entre un halo verdadero y el escaso desarrollo bacteriano producto del corto tiempo de incubación transcurrido, a diferencia de lo que ocurrió a las 24 horas de incubación, donde el desarrollo bacteriano fue bastante más nítido (Figura 5). Es por esta razón, que se decidió leer a las 24 horas de incubación todas las pruebas realizadas con posterioridad.

Otra observación que se hizo durante la implementación de la técnica, fue que la zona inhibitoria alrededor del sensidisco control N5 estuvo, en la mayoría de los casos, dentro de un rango de 25 a 30 mm, valor un poco más elevado que aquel descrito para la técnica (20 a 26 mm). Esto se determinó mediante el cálculo de promedio y desviación estándar obtenidos una vez realizado el “FAST” con las 16 drogas puras en estudio (Anexo 3). De esta forma, en esta experiencia, se aceptó como control válido un halo de inhibición entre 25 a 30 mm para el disco N5.

Para determinar la especificidad de la técnica, se realizó la prueba “FAST” (n=10) tanto a tejido renal “blanco”, en estado fresco y congelado, proveniente de cerdos, bovinos y aves, como también a los solventes y diluyentes empleados en la preparación de las soluciones stock (1000 µg/ml, excepto tilosina: 10 µg/ml) de las 16 drogas puras en estudio. Ninguna de las matrices o solventes/diluyentes analizados generó halo inhibitorio.

La capacidad de detección del método para cada una de las 16 drogas puras en estudio, se obtuvo por el análisis mediante “FAST” de 3 concentraciones correspondientes al valor del límite máximo residual (1 x MRL), la mitad del MRL (0.5 x MRL) y el doble del MRL (2 x MRL) de cada antibiótico, considerando 6 repeticiones. Los resultados, expresados en milímetros del halo de inhibición, para las diferentes concentraciones se analizaron a través de promedio, desviación estándar y

coeficiente de variación. A partir de estos valores se fijó el límite de determinación que correspondió a la menor concentración de droga que fue capaz de producir halo inhibitorio igual o mayor a 12 mm (incluyendo el diámetro del sensidisco = 10mm) con un coeficiente de variación no mayor a 15% (FAO/OMS, 1995), (Tablas 5a-5g).

El criterio que se utilizó para que la técnica se considerara factible para la detección de un antibiótico en particular, fue que las tres diluciones analizadas pudieran ser pesquisadas por el método, esto es, que el tamaño del halo inhibitorio promedio fuera igual o mayor a 12 mm en las tres concentraciones. Bajo este criterio, los antimicrobianos que pueden ser detectados en niveles violativos son: oxitetraciclina, ceftiofur, neomicina, gentamicina, estreptomicina, enrofloxacino, eritromicina, penicilina, ampicilina, amoxicilina y cloxacilina. Para las drogas florfenicol y flumequina, a pesar de observarse halo inhibitorio a las concentraciones correspondientes al MRL, la técnica no fue capaz de pesquisar halo inhibitorio en la concentración de 0,5 x MRL, situación que no permitiría considerar factible el método para la detección de estos antimicrobianos. En el caso de tilosina, si bien el “FAST” detectó concentraciones al doble del MRL, no fue capaz de hacerlo para las concentraciones menores, por lo tanto no podría ser utilizado para la detección de esta droga. En las tres concentraciones analizadas de lincomicina y ácido oxolínico, no se observó halo inhibitorio mayor a 12 mm, y por ello, tampoco podría ser utilizado para detectar estos niveles de MRL (Tabla 6).

Los resultados del límite de determinación en matrices renales provenientes de aves tratadas con enrofloxacino se señalan en la Tabla 7. Por medio de la prueba microbiológica, enrofloxacino presente en la matriz renal pudo detectarse hasta las 24 horas post-tratamiento con halos de 14 y 13 milímetros, tiempo después del cual no se observaron halos inhibitorios hasta el fin de la experiencia. De acuerdo a la cuantificación realizada por HPLC paralelamente a las muestras, se determinó que los halos de 14 y 13 mm correspondieron a 1265 µg/kg y 1669 µg/kg, respectivamente. Es importante destacar que, concentraciones cercanas a 0.5 x MRL de enrofloxacino (100 µg/kg para riñón) serían detectadas entre las 72 y 96 horas post-tratamiento, tiempo en el cual el “FAST” no fue capaz de producir un halo inhibitorio. Los resultados de la prueba microbiológica y del HPLC MS/MS se presentan simultáneamente en la Tabla 9.

De manera similar, los resultados del límite de determinación en matrices renales provenientes de aves tratadas con oxitetraciclina se señalan en la Tabla 8. La prueba “FAST” logró detectar al antibiótico hasta las 96 horas post-tratamiento, con halos correspondientes a 11 y 13 mm. En la siguiente y última medición de la experiencia, fijada a las 104 horas post-tratamiento, no se observaron halos inhibitorios. De acuerdo a la cuantificación realizada paralelamente a las muestras, se determinó que los halos de 11 y 13 mm correspondieron a 223 y 270 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente, valores menores a $0.5 \times \text{MRL}$ de oxitetraciclina en riñón. Los resultados de la prueba microbiológica y del HPLC MS/MS se presentan simultáneamente en la Tabla 9.

Al analizar la robustez del “FAST” mediante el método Youden se determinó que los factores operador y temperatura afectan los resultados cuando los valores alternativos de las variables pH y temperatura fueron 6,6 y 42°C respectivamente (Tabla 10). El análisis del efecto de cada factor reveló que la diferencia entre valores nominales y alternativos para el factor operador correspondió a 1.25, para el factor pH a 0.25, para el factor concentración de esporas a -0.25 y para el factor temperatura a 2.75 (Tabla 11). El valor de $0,5 \times \text{D.S}$ de los replicados, correspondió a 0,32. Dado que las diferencias del factor operador y temperatura son mayores a este valor, se dedujo que el método es sensible a estas dos variables.

Por otro lado, los resultados obtenidos del método de Youden cuando los valores alternativos de los factores pH y temperatura fueron 7,0 y 46°C respectivamente (Tabla 12), indicaron que el método se ve afectado por los cuatro factores. En la Tabla 13 se evidencia que la diferencia entre valores nominales y alternativos para el factor operador correspondió a 2, a -1 para el pH, a -0.5 para concentración de esporas corresponde y a -1.5 para la temperatura. De esta forma, las diferencias de los cuatro factores (considerando el valor absoluto) fueron mayores a 0.32, ($0,5 \times \text{D.S}$), lo que indicó que el método es sensible a estas cuatro variables.

TABLA 5a. Límite de determinación del “FAST” para antibióticos de la familia de los aminoglicósidos como drogas puras.

AMINOGLICÓSIDOS				
Concentración (µg/kg o ppb)	Promedio (mm)	DS	CV	Límite de determinación
gentamicina				
0.5 X MRL (375 µg/kg)	28,17	0,41	1,45	375 µg/Kg
1 X MRL (750 µg/kg)	30,67	0,52	1,68	
2 X MRL (1500 µg/kg)	32,67	0,82	2,50	
neomicina				
0.5 X MRL (2500 µg/kg)	28,33	0,82	2,88	2500 µg/Kg
1 X MRL (5000 µg/kg)	30,17	0,98	3,26	
2 X MRL (10000 µg/kg)	33,50	0,55	1,63	
estreptomina				
0.5 X MRL (500µg/kg)	18,33	0,82	4,45	500 µg/Kg
1 X MRL (1000 µg/kg)	20,83	0,75	3,61	
2 X MRL (2000µg/kg)	23,33	1,03	4,43	

TABLA 5b. Límite de determinación del “FAST” para antibióticos de la familia de las quinolonas como drogas puras

QUINOLONAS				
Concentración (µg/kg o ppb)	Promedio (mm)	DS	CV	Límite de determinación
enrofloxacino				
0.5 X MRL (100 µg/kg)	15,50	1,38	8,89	100 µg/Kg
1 X MRL (200 µg/kg)	19,00	1,41	7,44	
2 X MRL (400 µg/kg)	23,33	0,82	3,50	
flumequina				
0.5 X MRL (500 µg/kg)	10,00	0,00	0,00	1000 µg/Kg
1 X MRL (1000 µg/kg)	16,17	0,75	4,66	
2 X MRL (2000 µg/kg)	20,33	0,52	2,54	
ácido oxolínico				
0.5 X MRL (75 µg/kg)	10,00	0,00	0,00	No se determinó
1 X MRL (150 µg/kg)	10,00	0,00	0,00	
2 X MRL (300 µg/kg)	10,00	0,00	0,00	

TABLA 5c. Límite de determinación del “FAST” para antibióticos de la familia de los Beta-lactámicos como drogas puras

BETA-LACTÁMICOS				
Concentración (µg/kg o ppb)	Promedio (mm)	DS	CV	Límite de determinación
amoxicilina				
0.5 X MRL (25 µg/kg)	17,83	0,75	4,22	25 µg/Kg
1 X MRL (50 µg/kg)	20,33	0,52	2,54	
2 X MRL (100 µg/kg)	22,83	0,98	4,31	
ampicilina				
0.5 X MRL (25 µg/kg)	16,67	0,52	3,10	25 µg/Kg
1 X MRL (50 µg/kg)	19,17	0,75	3,93	
2 X MRL (100 µg/kg)	21,67	1,03	4,77	
penicilina				
0.5 X MRL (25 µg/kg)	19,67	0,82	4,15	25 µg/Kg
1 X MRL (50 µg/kg)	21,50	1,05	4,88	
2 X MRL (100 µg/kg)	24,17	1,17	4,84	
cloxacilina				
0.5 X MRL (25µg/kg)	14.50	0.55	3.78	25 µg/Kg
1 X MRL (50 µg/kg)	16.67	0.82	4.90	
2 X MRL (100µg/kg)	20.33	0.82	4.02	
ceftiofur				
0.5 X MRL (3000µg/kg)	34.33	0.52	1.50	3000 µg/Kg
1 X MRL (6000 µg/kg)	36.50	0.55	1.50	
2 X MRL (12000µg/kg)	38.33	0.82	2.13	

TABLA 5d. Límite de determinación del “FAST” para antibióticos de la familia de los macrólidos como drogas puras

MACRÓLIDOS				
Concentración (µg/kg o ppb)	Promedio (mm)	DS	CV	Límite de determinación
tilosina				
0.5 X MRL (50µg/kg)	10.00	0.00	0.00	200 µg/Kg
1 X MRL (100 µg/kg)	10.00	0.00	0.00	
2 X MRL (200µg/kg)	12.50	0.55	4.38	
eritromicina				
0.5 X MRL (100µg/Kg)	18.17	0.75	4,14	100 µg/Kg
1 X MRL (200 µg/kg)	22.00	0.63	2.87	
2 X MRL (400µg/kg)	24.50	0.84	3.41	

TABLA 5e. Límite de determinación del “FAST” para oxitetraciclina como droga pura

TETRACICLINAS				
Concentración ($\mu\text{g}/\text{kg}$ o ppb)	Promedio (mm)	DS	CV	Límite de determinación
oxitetraciclina				
0.5 X MRL (300 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	24.17	0.98	3.73	300 $\mu\text{g}/\text{Kg}$
1 X MRL (600 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	26.33	0.52	1.96	
2 X MRL (1200 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	29.33	0.82	2.78	

TABLA 5f. Límite de determinación del “FAST” para lincomicina como droga pura.

LINCOSAMIDAS				
Concentración ($\mu\text{g}/\text{kg}$ o ppb)	Promedio (mm)	DS	CV	Límite de determinación
lincomicina				
0.5 X MRL (250 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	10,00	0,00	0,00	no se determinó
1 X MRL (500 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	10,00	0,00	0,00	
2 X MRL (1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	10,00	0,00	0,00	

TABLA 5g. Límite de determinación del “FAST” para florfenicol como droga pura.

FENICOLES				
Concentración ($\mu\text{g}/\text{kg}$ o ppb)	Promedio (mm)	DS	CV	Límite de determinación
florfenicol				
0.5 X MRL (150 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	11.50	1.22	10.65	300 $\mu\text{g}/\text{Kg}$
1 X MRL (300 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	15.17	0.75	4.96	
2 X MRL (600 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	20.67	0.82	3.95	

TABLA 6. Antibióticos pesquisados por “FAST” según promedios de halos inhibitorios.

ANTIBIÓTICO	MRL *	HALO INHIBICIÓN **	APTO ***
Oxitetraciclina	600	0,5x MRL = 24,17 1x MRL = 26,33 2x MRL = 29,33	SI
Florfenicol	300	0,5x MRL = 11,5 1x MRL = 15,17 2x MRL = 20,67	NO
Ceftiofur	6000	0,5x MRL = 34,33 1x MRL = 36,50 2x MRL = 38,33	SI
Neomicina	5000	0,5x MRL = 28,33 1x MRL = 30,17 2x MRL = 33,50	SI
Gentamicina	750	0,5x MRL = 28,17 1x MRL = 30,67 2x MRL = 32,67	SI
Tilosina	100	0,5x MRL = 10,00 1x MRL = 10,00 2x MRL = 12,50	NO
Estreptomina	1000	0,5x MRL = 18,33 1x MRL = 20,83 2x MRL = 23,33	SI
Enrofloxacino	200	0,5x MRL = 15,50 1x MRL = 19,00 2x MRL = 23,33	SI
Eritromicina	200	0,5x MRL = 18,17 1x MRL = 22,00 2x MRL = 24,50	SI
Flumequina	1000	0,5x MRL = 10,00 1x MRL = 16,17 2x MRL = 20,33	NO
Penicilina	50	0,5x MRL = 19,67 1x MRL = 21,50 2x MRL = 24,17	SI
Ampicilina	50	0,5x MRL = 16,67 1x MRL = 19,17 2x MRL = 21,67	SI
Amoxicilina	50	0,5x MRL = 17,83 1x MRL = 20,33 2x MRL = 22,83	SI
Cloxacilina	50	0,5x MRL = 14,50 1x MRL = 16,67 2x MRL = 20,33	SI
Lincomicina	500	0,5x MRL = 10,00 1x MRL = 10,00 2x MRL = 10,00	NO
Ácido Oxolínico	150	0,5x MRL = 10,00 1x MRL = 10,00 2x MRL = 10,00	NO

*Límite máximo residual en µg/kg (ppb) más exigente para la matriz renal, dado por la U.E y/o EE.UU.

**Corresponde al promedio de las 6 curvas realizadas. Valor dado en milímetros incluyendo al sensidisco (10 mm.) Lectura realizada a las 24 horas de incubación.

***El método será considerado factible en la detección de un antibiótico en particular, cuando el tamaño del halo inhibitorio sea igual o mayor a 12 mm (incluyendo el diámetro del sensidisco) para las tres diluciones analizadas.

TABLA 7. Límite de determinación del “FAST” en matrices renales provenientes de aves tratadas con enrofloxacino.

AV E N°	TIEMPO DE SACRIFICIO POST- TRATAMIENTO (horas)	HALO DE INHIBICIÓN (mm)	CONCENTRACIÓN (ppb)*
1	0	< 8	< 0
2	6	16	5324
3	6	17	5409
4	9	17	3079
5	9	17	5494
6	24	14	1265
7	24	13	1669
8	48	< 8	343
9	72	< 8	234
10	72	< 8	79
11	96	< 8	43
12	96	< 8	47
13	120	< 8	25
14	120	< 8	8
15	144	< 8	9
16	144	< 8	12

Límite de
determinación

* medida por HPLC- MS/MS.

TABLA 8. Límite de determinación del “FAST” en matrices renales provenientes de aves tratadas con oxitetraciclina.

AVE N°	TIEMPO DE SACRIFICIO POST- TRATAMIENTO (horas)	HALO DE INHIBICIÓN (mm)	CONCENTRACIÓN (ppb)*
1	0	< 8	< 0
2	4	19	3100
3	4	20	2840
4	8	19	5080
5	8	21	5120
6	24	20	3100
7	24	18	1210
8	48	16	1030
9	48	14	1090
10	72	14	238
11	72	11	116
12	96	11	223
13	96	13	270
14	104	< 8	228
15	104	< 8	< 0

Límite de
determinación.

* medida por HPLC- MS/MS.

TABLA 9. Resultados de detección del “FAST” comparados con HPLC MS/MS en riñones obtenidos de animales tratados con enrofloxacino y oxitetraciclina.

HORAS	Enrofloxacino		Oxitetraciclina	
	“FAST”	HPLC MS/MS* µg/kg	“FAST”	HPLC MS/MS* µg/kg
4	-	-	D	2970
6	D	5367	-	-
8	-	-	D	5100
9	D	4287	-	-
24	D	1467	D	2155
48	ND	343	D	1060
72	ND	157	D	177
96	ND	45	D	247
104	-	-	ND	114
120	ND	17	-	-
144	ND	11	-	-

ND: No detectado; D: Halo de inhibición \geq a 8 mm.

* Las concentraciones obtenidas por HPLC MS/MS corresponden a los promedios de las observaciones (n=2).

TABLA 10. Resultados “test” de Youden 1. Variables pH y temperatura con valores alternativos bajos (6,6 y 42°C)

FACTOR	ANÁLISIS							
Op	1	1	1	1	2	2	2	2
pH	6,8	6,8	6,6	6,6	6,8	6,8	6,6	6,6
Conc esp.	saturada	sobresat	saturada	sobresat	sobresat	saturada	sobresat	saturada
T°	44°C	42°C	42°C	44°C	44°C	42°C	42°C	44°C
Halo*	20	18	18	22	20	18	16	19

Op= operador; Conc esp.= concentración de esporas; T°= temperatura.

*corresponden al diámetro del halo de inhibición generado alrededor de la tórula que contiene la muestra, expresado en milímetros.

TABLA 11. Evaluación del efecto de cada factor en el “test” de Youden 1.

Factor	Media valores nominales	Media valores alternativos	Diferencia de medias
Op (A-a)	19,5	18,25	1,25
pH (B-b)	19	18,75	0,25
Conc esp. (C-c)	18,75	19	-0,25
T° (D-d)	20,25	17,5	2,75

Op= operador; Conc esp.= concentración de esporas; T°= temperatura

TABLA 12. Resultados “test” de Youden 2. Variables pH y temperatura con valores alternativos altos (7,0 y 46°C)

FACTOR	ANÁLISIS							
Op	1	1	1	1	2	2	2	2
pH	6,8	6,8	7,0	7,0	6,8	6,8	7,0	7,0
Conc esp.	saturada	sobresat	saturada	sobresat	sobresat	saturada	sobresat	saturada
T°	44°C	46°C	46°C	44°C	44°C	46°C	46°C	44°C
Halo*	14	18	19	16	15	14	15	15

Op= operador; Conc esp.= concentración de esporas; T°= temperatura

***corresponden al diámetro del halo de inhibición generado alrededor de la tórula que contiene la muestra, expresado en milímetros.**

TABLA 13. Evaluación del efecto de cada factor en el “test” de Youden 2.

Factor	Media valores nominales	Media valores alternativos	Diferencia de medias
Op (A-a)	16,75	14,75	2
pH (B-b)	15,25	16,25	-1
Conc esp. (C-c)	15,5	16	-0,5
T° (D-d)	15	16,5	-1,5

Op= operador; Conc esp.= concentración de esporas; T°= temperatura

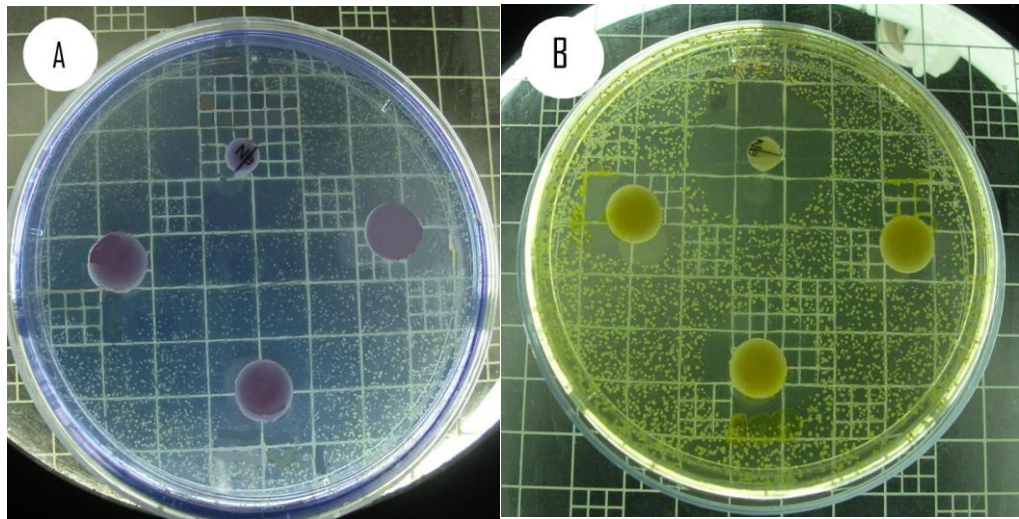


FIGURA 5. A. Placa “FAST” leída a las 6 horas. **B.** La misma placa leída a las 24 horas de incubación.

DISCUSIÓN

La globalización de los mercados internacionales, hoy en día, implica la necesidad de que los métodos analíticos utilizados en la detección de residuos, estén adecuadamente validados y cuenten con reconocimiento internacional. De esta forma, se asegura un suministro inocuo y sano de alimentos a la población.

Al implementar la técnica microbiológica “FAST” en el laboratorio de Farmacología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, algunas variables debieron ser modificadas en relación a lo descrito por el fabricante. Es así como, la medida del halo de inhibición alrededor del disco N5, estuvo dentro de un rango de 25 a 30 mm, según cálculo de promedio y desviación estándar de una serie de pruebas “FAST” realizadas. Esta evidencia se contrapone a lo planteado por el fabricante, el cual define un rango para este halo entre 20 y 26 mm. Esta diferencia, podría atribuirse a: origen del sensidisco control N5 y concentración de esporas. Si bien, los sensidiscos utilizados en este estudio contenían 5 µg de neomicina, tal como lo indica el método, éstos fueron fabricados en Chile y no por Medtox® en EE.UU. Es factible que los discos de origen nacional pudieran ser producidos en condiciones que limitaran la liberación y difusión de la droga en el medio de cultivo, sin embargo, al comenzar el estudio, se compararon sensidiscos Medtox® con los nacionales, generando ambos halos de inhibición semejantes. Esto descartaría el factor origen del sensidisco en el tamaño del halo control.

Por otro lado, es dable suponer que la concentración de esporas sembradas en las placas “FAST” haya sido menor que aquella recomendada por el fabricante y, por lo tanto, la actividad de la droga (neomicina) haya sido más evidente, generando con ello un halo inhibitorio de mayor tamaño (NCCLS, 1993). Esta diferencia en la concentración de esporas de las placas, podría explicarse principalmente por la técnica de siembra, ya que la suspensión de esporas utilizada en el estudio fue importada desde EE.UU (Medtox®) con una concentración pre-establecida de *Bacillus megaterium* ATCC 9885 (1×10^6 ufc/ml). De esta forma, la siembra debe realizarse de manera uniforme sobre el agar, con el fin de saturar completamente la superficie con el microorganismo. Un hecho que pudiera haber influido en la uniformidad de la siembra, es el diámetro de la placa petri. Las placas utilizadas en esta experiencia tuvieron un

tamaño de 90 mm x 15 mm, mientras que las placas del kit Medtox® son de 60 mm x 15 mm (Dey *et al.*, 2005b). Si bien las placas se sembraron siguiendo exactamente el procedimiento descrito por el instructivo, el área de siembra al ser más amplia, permitiría una mayor dispersión de las esporas que al realizar lo mismo en una placa de menor tamaño. Sin embargo, al analizar la concentración de esporas como factor que pudiera incidir en la robustez del método, no se observaron cambios en los halos inhibitorios cuando la tórula de siembra se sobresaturó con la suspensión comercial de esporas. Este hecho, permite sugerir que a futuro se diseñe un estudio que analice con mayor profundidad el efecto de la concentración de esporas sobre el desarrollo de la cepa control.

Otro factor que durante la implementación debió ser modificado fue el tiempo de incubación de las placas. Una de las principales ventajas señaladas para el “FAST” sobre los otros métodos desarrollados por el FSIS en EE.UU, es la de poder obtener resultados a partir de las 6 horas de iniciada la incubación (Korsrud *et al.*, 1998; Dey *et al.*, 2003; Dey *et al.*, 2005b). Lo que se observó en este estudio, fue que si bien la lectura de las placas pudo ser hecha tan temprano como a las 6 horas, la nitidez de los halos inhibitorios obtenidos a las 24 horas de incubación fue mucho mayor, lo cual permitió definir con mayor exactitud la positividad o negatividad de una muestra. Este hecho, puede deberse a que a las 6 horas de incubación aún no se han desarrollado todos los microorganismos y por lo tanto, la existencia de halos producto de inhibidores presentes en la muestra pudiera ser confundida con un pobre o incipiente crecimiento de *B. megaterium*. De esta forma, esta experiencia indica que toda placa que a las 6 horas de incubación presente un desarrollo bacteriano poco nítido, deberá mantenerse en la estufa hasta las 24 horas y luego proceder a su lectura. No obstante lo anterior, toda placa que demuestre un buen desarrollo bacteriano, podrá ser analizada a las 6 horas de incubación, tal como lo plantea la literatura revisada (Korsrud *et al.*, 1998; Dey *et al.*, 2003; Dey *et al.*, 2005b).

Finalmente, se observó que la implementación de la técnica “FAST” fue sencilla, tanto por los materiales e infraestructura necesaria para poner en marcha el método, como por el tiempo que implica su realización. Sin embargo, es importante asegurar una buena capacitación del personal operador, ya que factores como la técnica de siembra podrían influir en los resultados. Durante esta experiencia se percibió que

sólo después de muchas repeticiones de las distintas etapas de la implementación pudieron observarse placas con un adecuado crecimiento del microorganismo sensible en forma repetida en el tiempo.

En relación al análisis de la especificidad, los resultados indicaron que claramente el “FAST” logró discriminar entre antimicrobianos y sus solventes/diluyentes. La negatividad del “FAST” frente al agua destilada, NaOH 0.03 M, “buffer” fosfato pH 8.0, 0.1 mol/L, NaCl 0.9% y etanol 96%, fue importante en términos experimentales para los fines de este estudio. Éstos solventes/diluyentes son los tradicionalmente utilizados y recomendados por la literatura (The Merck Index, 2001). Si alguna de estas sustancias hubiera generado halo de inhibición, tendría que haberse remplazado por otra que permitiera la correcta disolución de cada droga en estudio.

Por otra parte, se analizó la matriz renal ya que, a pesar que la técnica está diseñada para este tejido, los animales que se encuentran en Chile y EE.UU, podrían estar expuestos a diferentes sustancias inhibidoras bacterianas propias del medio local, ya que el medio ambiente en el cual se desenvuelven los animales no es el mismo. En este contexto, algunos metales pesados que pueden acumularse en el riñón tales como zinc, cobre, plomo y cobalto, podrían tener efectos inhibidores del desarrollo bacteriano, En efecto, estudios realizados por Tong *et al.*, (2005), determinaron que el cobre tiene actividad antibacteriana inhibiendo el crecimiento de *Escherichia coli* K88 y *Salmonella choleraesuis*. Diversos estudios en humanos y animales han demostrado la acumulación de muchos de estos compuestos en el tejido renal (García *et al.*, 2001; Gardner *et al.*, 2006; Pedersen y Lierhagen, 2006). Esto haría pensar que, durante el procedimiento de introducción de la tórula en el tejido renal, podría provocarse la liberación de estos potenciales inhibidores pudiendo interferir luego con el desarrollo del microorganismo sensible del “test”. En este estudio, se observó que la matriz renal por sí misma (sin droga) no induce la aparición de halo inhibitorio, siendo éste un punto fundamental para que el método pueda cumplir los objetivos para los que fue diseñado. De no haber sido así, se debieran profundizar los estudios hasta determinar la o las sustancias inhibitorias propias de la matriz, para luego diseñar e implementar un procesamiento previo de las muestras capaz de neutralizar a estos factores interferentes. Ejemplo de esto, es lo que ocurre con la leche, la cual antes de ser analizada por métodos de “screening”

microbiológico, debe someterse 100°C durante 30 segundos (Rama *et al.*, 1985) o a 82°C durante 2 a 5 minutos (Cullor, 1993) con la finalidad de destruir inhibidores naturales presentes en las secreciones de la glándula mamaria tales como, lactoferrina, lisozimas, ribonucleasas y otros péptidos de bajo peso molecular (Cullor, 1993; Van Eenennaan *et al.*, 1993).

De manera similar, un punto importante de destacar es que la congelación de las muestras no provocó resultados falsos positivos como fue planteando en la literatura (Payne *et al.*, 1999; Payne *et al.*, 2004), donde se señala que el proceso congelación/descongelación provocaría una disrupción celular liberando compuestos endógenos del riñón, como lisozimas y defensinas, que interferirían con los microorganismos sensibles del método. Lo que se observó en este estudio es fundamental para la eventual aplicación de esta prueba en el país, ya que dada la particular distribución territorial de Chile, muchas veces las muestras deben ser transportadas entre puntos geográficos distantes, lo cual implica la necesidad de congelación de estas muestras para poder conservarlas en buen estado hasta llegar al lugar de destino.

La capacidad de detección del “FAST” para drogas puras, indicó que de los 16 antibióticos en estudio, ácido oxolínico y lincomicina no fueron detectados en ninguna de las tres concentraciones, ya que no generaron halos inhibitorios (Tabla 6). De los 14 restantes, 11 de ellos fueron detectados mediante el “FAST” en sus tres concentraciones (2 x MLR, 1 x MLR y 0,5 x MLR), mientras que en los otros 3, la técnica no fue capaz de pesquisar el nivel más bajo correspondiente a 0,5 x MLR (Tabla 6). De las drogas analizadas en este estudio, 7 (eritromicina, gentamicina, neomicina, oxitetraciclina, penicilina, estreptomina y tilosina) fueron consideradas en los estudios realizados por Dey *et al.*, (2003) y Dey *et al.*, (2005b) coincidiendo sus resultados con lo observado en esta experiencia, es decir, todas ellas fueron detectadas.

Al detectar solamente el límite exigido (1 x MRL) y no concentraciones más bajas (0,5 x MRL), el rango de error que tendría la técnica para detectar estas drogas sería muy pequeño por lo que muchas muestras podrían ser catalogadas como negativas siendo realmente positivas (falsos negativos), lo cual es de gran relevancia, ya que justamente las técnicas de “screening” deben evitar los falsos negativos (Korsrud *et al.*,

1998). Es por esta razón, que en el presente estudio se consideró importante analizar una concentración más pequeña que el MRL y en base a ésta, determinar la factibilidad eventual que tendría el método para pesquisar un antibiótico específico. Otros estudios de sensibilidad también han considerado concentraciones más pequeñas que las exigidas. Es así, como Dey *et al.* (2003; 2005b) analizaron 5 concentraciones de cada droga en estudio en relación al nivel violativo (Nivel de Tolerancia): 4x; 2x; 0,5x; 0,25x y 0,125x. Por otro lado, Dey *et al.*, (2005b) analizaron diferentes soluciones estándar de distintos antimicrobianos para determinar la sensibilidad del “CAST”. Algunas de ellas fueron: 0,0125; 0,025; 0,05; 0,1 y 0,2 µg/ml para penicilina y amoxicilina, mientras que para ampicilina, gentamicina, neomicina y estreptomina se analizaron 0,125; 0,25; 0,5; 1 y 2 µg/ml.

El hecho de que 11 de los antibióticos fueran pesquiados por el método, implica que el espectro de detección del “FAST” es más amplio que el del Método de las Cuatro Placas, por lo menos al probarlo con drogas puras. Con respecto a la sensibilidad de ésta técnica frente a los 11 antimicrobianos pesquiados en las tres concentraciones analizadas en este estudio, es importante tener en cuenta que como proyección a nuevas exigencias internacionales, se podrían realizar futuros estudios que analicen otras concentraciones de drogas puras más pequeñas y eventualmente fijar límites de determinación menores a los que se fijaron en esta experiencia.

En relación al análisis sobre sensibilidad del método “FAST” en la matriz renal, este estudio determinó por primera vez la capacidad de detección para enrofloxacino y oxitetraciclina en riñones de aves tratadas terapéuticamente con estos antibióticos. La selección de estos antimicrobianos se basó en que son fármacos frecuentemente usados en la producción animal y para los cuales se contaba con métodos cromatográficos previamente validados para su cuantificación. En el caso del enrofloxacino, la experiencia determinó que la prueba “FAST” no fue capaz de detectar concentraciones cercanas al MRL (200 µg/kg en riñón), sino que concentraciones tan elevadas como siete veces el valor del MRL (1467 µg/kg). Esto claramente no coincide con los resultados obtenidos con la droga pura. Esta observación preliminar, sugiere que la placa “FAST” es lo suficientemente sensible pero, el fluido tisular no tendría la cantidad adecuada de droga para saturar la tórula e inhibir los microorganismos. Por lo tanto, se piensa que el riñón tendría algún efecto en la detección de la droga, posiblemente

retención o captación de ésta por parte de componentes biológicos de la matriz que impedirían la liberación del antibiótico. Esto implicaría que la simple introducción de la tórula en el tejido renal, moviéndola para macerarlo y luego los 30 minutos de espera para embeber el algodón con el fluido tisular, no serían lo suficientemente eficaces para liberar el analito desde el riñón, requiriéndose de otros procesos capaces de extraerlo. Un ejemplo de esto, es el estudio realizado por Chiesa *et al.*, (2006) el cual indicó que el homogenizado de muestras renales, provenientes de bovinos tratados con gentamicina, permite una detección mucho mejor de la droga que cuando se realiza la misma técnica pero con muestras enteras.

Por el contrario, en el caso de oxitetraciclina, la técnica “FAST” fue capaz de detectar concentraciones promedios de 247 µg/kg en matriz renal de aves terapéuticamente tratadas. Este dato es importante, ya que indicaría que el método en estudio sería capaz de pesquisar esta droga en concentraciones menores a 0,5 x MRL (300 µg/kg en riñón), en concordancia con los resultados obtenidos con la droga pura los cuales indicaron la detección de las tres concentraciones, lo que haría factible el uso del “FAST” para la detección de este antibiótico en particular. Cabe señalar, que los estudios de sensibilidad *in vitro* para oxitetraciclina como droga pura realizados por Dey *et al.* (2003; 2005b) establecen un LLD de 125 µg/kg, valor menor a los 300 µg/kg establecidos por la presente experiencia. Sin embargo, esto se debe a que dichos estudios analizaron concentraciones menores (0,125 del nivel violativo) que 0,5 x MRL.

Las experiencias con matrices renales de aves tratadas, sugieren que para la validación de la técnica “FAST”, no bastan los estudios de sensibilidad *in vitro* realizados con drogas puras, sino que son necesarias también pruebas que determinen la capacidad de detección del método para los antimicrobianos cuando están presentes en la matriz. Sólo el conjunto de información recopilada podrá determinar si el método es apto o no para utilizarlo como “screening” de un antimicrobiano en particular. En este estudio, se siguieron las recomendaciones de la Unión Europea (Diario Oficial de las Comunidades Europeas, 2002) para validar métodos cualitativos de “screening”. De acuerdo a esto, se analizaron las drogas puras en concentraciones equidistantes al límite permitido (MRL) para determinar la sensibilidad de la técnica, sin embargo, el estudio en matrices renales naturalmente contaminadas no es especificado. A futuro debiera considerarse la importancia de este tipo de pruebas para la validación de métodos

analíticos a pesar de ser estudios caros y engorrosos que exigen muchos más recursos (animales, infraestructura, personal) que las pruebas exclusivamente de laboratorio.

El análisis de robustez indicó que el método no es lo suficientemente robusto frente a los 4 factores seleccionados, los cuales fueron operador, pH del medio, concentración de esporas y temperatura de incubación. Pese a lo anterior, cada factor presentó diferencias en su efecto sobre la robustez. Cuando los valores alternativos de las variables pH y temperatura fueron 2 puntos más bajos (6,6 y 42°C respectivamente) que los valores nominales, se determinó que el método sería sensible a las variables operador y temperatura, por lo cual habría de tenerse especial cuidado con ellos a la hora de realizar el método, es decir, ser bastante exactos en la fijación y control de estos dos factores (Diario Oficial de las Comunidades Europeas, 2002). Por otro lado, cuando los valores alternativos de estas mismas variables fueron 2 puntos más altos (7,0 y 46°C respectivamente) que los valores nominales, se determinó que el método sería sensible a las cuatro variables analizadas. Esto haría pensar que si bien, el método como tal, no es robusto, la forma en que varían los factores podría incidir de mayor o menor manera los resultados.

En resumen, los valores de pH y temperatura nunca debieran exceder los valores nominales establecidos por el fabricante para que los resultados puedan ser considerados válidos. La vulnerabilidad de la prueba está claramente dirigida hacia valores elevados de temperatura y pH. Esto coincide en parte con la literatura, ya que Korsrud *et al.*, (1998) plantean que el método “FAST” es menos robusto que el “STOP” requiriendo mayor precisión en la temperatura control. Al respecto, resulta importante recordar que el método “FAST” es un método microbiológico, es decir, está basado en el desarrollo de microorganismos y por lo tanto, factores como la temperatura y el pH son esenciales, sobre todo considerando que el *B. megaterium* se siembra en forma de esporas en el medio de cultivo, por lo cual requiere de condiciones aptas para su paso a la forma vegetativa (germinación) y posterior desarrollo.

El hecho de ser una técnica poco robusta implicaría la necesidad de un estricto control para obtener resultados de calidad, es decir, si se decide usar este método, las variables operador, pH, concentración de esporas y temperatura deberán ser establecidas

con valores exactos y controladas de manera que no sobrepasan los valores aplicados en la prueba de Youden.

Finalmente, se puede decir que para poder utilizar la técnica microbiológica “FAST” como método de “screening” en los programas de control de residuos de antimicrobianos en Chile, es fundamental que se continúen los estudios en relación a su capacidad de pesquisar las diferentes drogas en la matriz renal, ya que en esta experiencia se observaron grandes diferencias entre los resultados de los estudios en base a drogas puras versus matriz.

CONCLUSIONES

1. La implementación de la técnica de “screening” microbiológico “Fast Antimicrobial Screen Test” se realizó incorporando algunas modificaciones.
2. El método “FAST” fue específico para antimicrobianos, no siendo afectado por solventes/diluyentes ni la matriz renal.
3. Según el límite de determinación fijado previamente para drogas puras (0,5 x MRL), el “FAST” sería un método factible para pesquisar 11 de los 16 antimicrobianos analizados en este estudio.
4. Debido a que se observaron diferencias entre el límite de determinación de matriz renal versus droga pura para 2 antimicrobianos analizados, son insuficientes los estudios de sensibilidad *in vitro* realizados en la actualidad con drogas puras, siendo necesario también realizar pruebas que determinen la capacidad de detección del método para los antimicrobianos cuando están presentes en la matriz.
5. El método “FAST” no demostró ser robusto frente a los factores operador, pH del medio, concentración de esporas y temperatura de incubación. Las variables de operación del “FAST” deben ser cuidadosamente controladas durante la ejecución de la técnica para evitar obtener resultados erróneos.
6. Según los Programas de Control de Residuos que operan actualmente en el país, esta técnica podría ser implementada y validada por los laboratorios analíticos ante nuevas exigencias internacionales, sin embargo, aún hacen falta estudios que entreguen información suficiente acerca de la sensibilidad del “FAST” para pesquisar antimicrobianos en la matriz renal.

BIBLIOGRAFÍA

AARESTRUP, F.M. 2000. Occurrence, selection and spread of resistance to antimicrobial agents used for growth promotion for food animals in Denmark. *APMIS Suppl.* 101:1-48.

ACUÑA, G. 2003. Evolución de la terapia antimicrobiana: lo que era, lo que es y lo que será. *Rev Chil Infectol.* 20: S7 -S10.

BAVESTRELLO, L.; CABELLO, A.; CASANOVA, D. 2002. Impacto de medidas regulatorias en la tendencia de consumo comunitario de antibióticos en Chile. *Rev méd Chile.* 130:1265-1272.

BOOTH, N.H.; MCDONALD, L. 1988. Toxicología de los residuos medicamentosos y químicos. **In:** Farmacología y Terapéutica Veterinaria. Ed.Acribia. Zaragoza, España. pp:449-505.

CAMMERER, R.C.; ANDERSON, D.L.; BOYCE, H.W. JR.; BURDICK, G.E. 1976. Clinical spectrum of pseudomembranous colitis. *JAMA.* 235:2502-2505.

CASTILLO, B.; GONZALEZ, R. 1996. Protocolo de validación de métodos analíticos para la cuantificación de fármacos. [en línea]. *Rev Cubana Farm.* 30:0-0. <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75151996000100009&lng=es&nrm=iso> [consulta: 16-06-2005].

CERNIGLIA, C.E.; KOTARASKI, S. 2005. Approaches in the safety evaluations of veterinary antimicrobial agents in food to determine the effects on the human intestinal microflora. *J Vet Pharmacol Ther.* 28:3-20.

CHADWICK, R.W.; GEORGE, S.E.; CLAXTON, L.R. 1992. Role of gastrointestinal mucosa and microflora in the bioactivation of dietary and environmental mutagens or carcinogens. *Drug Metab Rev.* 24:425-492.

CHIESA, O.A.; BREDOW, J.; HELLER, D.; NOCHETTO, C.; SMITH, M.; MOULTON, K.; THOMAS, M. 2006. Use of tissue–fluid correlations to estimate gentamicin residues in kidney tissue of Holstein steers. *J Vet Pharmacol Ther.* 29:99-106.

CORNET, V.; GOVAERT, Y.; KOENEN-DIERICK, K.; OKERMAN, L.; DEGROODT, J.M. 2005. Interlaboratory study based on a one-plate screening method for the detection of antibiotic residues in bovine kidney tissue. *Food Addit Contam.* 22:415-422.

CORPET, D.E. 1987. Antibiotic residues and drug resistance in human intestinal flora. *Antimicrob Agents Chemother.* 31:587-593.

CORPET, D.E. 1992. Antibiotic residues and digestive microflora. *Ann Gastroenterol Hepatol.* 28:235-239.

CORPET, D.E. 1993. An evaluation of methods to assess the effect of antimicrobial residues on the human gut flora. *Vet Microbiol.* 35:199-212.

CORREA, E.; NARANJO, J. 2005. Las perspectivas de erradicación de la fiebre aftosa en la América del sur y su reflejo en el precio del arrebata de buey. Centro Panamericano de Fiebre Aftosa. Unidad de Salud Pública Veterinaria – OPS/OMS. [en línea]. <<http://bvs.panaftosa.org.br/textoc/Correa-Narajno-FMD-arroba-boi-2005esp.pdf>> [consulta: 16-06-2005].

CULLOR, J.S. 1992. Test for identifying antibiotic residues in milk: How well do they work? *Vet Med.* 87:1235-1241.

CULLOR, J.S. 1993. Antibiotic residue test for mammary gland secretions. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 9:609-629.

DEY, B.P.; WHITE, C.A.; THAKER, N.H. 1998. Detection of antimicrobial residue by Fast antimicrobial screen test (FAST). **In:** USDA/FSIS. Microbiology Laboratory Guidebook. 3^a Edition. pp.36-48.

DEY, B.P.; THALER, A.; GWOZDZ, F. 2003. Analysis of microbiological screen test data for antimicrobial residues in food animals. *J Environ Sci Health.* 38:391-404.

DEY, B.P.; REAMER, R.P.; THAKER, N.H.; THALER, A.M. 2005a. Calf antimicrobial and sulfonamide residues in calf carcasses. *JAOAC Int.* 88:440-446.

DEY, B.P.; THAKER, N.H.; BRIGHT, S.A.; THALER, A.M. 2005b. Fast antimicrobial screen test (FAST): Improved screen test for detecting antimicrobial residues in meat tissue. *JAOAC Int.* 88:447-454.

DIARIO OFICIAL DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS. 2002. Criterios de funcionamiento y otros requisitos y procedimientos de los métodos analíticos. Bruselas, Bélgica, 12 agosto. L 221-8, L 221-35.

EMEA. EUROPEAN MEDICINES AGENCY. 1997. Programa de trabajo de la Agencia Europea para la evaluación de medicamentos 1997-1998. [en línea] <<http://www.emea.eu.int/pdfs/general/direct/emeawp/000297es.pdf>> [consulta: 11-07-2006].

EMEA. EUROPEAN MEDICINES AGENCY. 2006. Veterinary medicines. MRL summary reports. [en línea]. <<http://www.emea.eu.int/index/indexv1.htm>> [consulta: 27-06-2006].

FAO. ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN. 1997. Comisión del Codex Alimentarius: Manual de procedimiento - Décima edición. Sección I. Definiciones para los fines del Codex Alimentarius. [en línea]. <<http://www.fao.org/docrep/W5975S/w5975s00.htm#Contents>> [consulta: 27-06-2006].

FAO. ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN. 2004. Uso de antimicrobianos en animales de consumo. Incidencia del desarrollo de resistencias en la salud pública [en línea]. <http://www.fao.org/documents/show_cdr.asp?url_file=/docrep/007/y5468s/y5468s00.htm> [consulta: 27-06-2006].

FAO. ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN. 2005. Qué es el *codex alimentarius*. [en línea]. <<http://www.fao.org/docrep/008/y7867s/y7867s00.htm>> [consulta: 27-06-2006].

FAO/OMS. PROGRAMA CONJUNTO SOBRE NORMAS ALIMENTARIAS COMISIÓN DEL CODEX ALIMENTARIUS. 1995. Residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos. 2ª ed. FAO. Roma, Italia. V.3.

FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. CENTER FOR VETERINARY MEDICINE. 2005. Information about center for veterinary medicine. [en línea]. <<http://www.fda.gov/cvm/aboutcvm.html>> [consulta: 07-07-2006].

FSIS. FOOD SAFETY AND INSPECTION SERVICE. 1994. Fast antimicrobial screen test (FAST) for detection of antibiotic and sulfonamide residues in livestock kidney tissue. A self-instructional guide. USDA, Human resource development division, Washington, D.C, USA. 43p

FSIS. FOOD SAFETY AND INSPECTION SERVICE. 2005. Codex committee on residues of veterinary drugs in foods host government: United States [en línea]. <http://www.fsis.usda.gov/Regulations_&_Policies/Codex_Committee_Vet_Drugs/index.asp> [consulta: 27-06-2005].

GARCÍA, F.; ORTEGA, A.; DOMINGO, J.L.; CORBELLA, J. 2001. Accumulation of metals in autopsy tissues of subjects living in Tarragona County, Spain. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng.* 36:1767-1786.

GARCÍA, P. 2003. Resistencia bacteriana en Chile. *Rev Chil Infectol.* 20: S11 - S23.

GARDNER, S.C.; FITZGERALD, S.L.; VARGAS, B.A.; RODRIGUEZ, L.M. 2006. Heavy metal accumulation in four species of sea turtles from the Baja California peninsula, México. *Biometals.* 19:91-99.

GEHRING, R.; HASKELL, S.R.; PAYNE, M.A.; CRAIGMILL, A.L.; WEBB, A.I.; RIVIERE, J.E. 2005. Aminoglycoside residues in food of animal origin. *J Am Vet Assoc.* 227: 63-66.

GESCHE, E. 1986. Detección de residuos de antibacterianos en carne. Técnica del *Bacillus subtilis* BGA. *Monografías Med Vet.* 8:1-5.

GESCHE, E.; MADRID, E.; AGUILA, C. 2001. Efecto del pH, cepa bacteriana y tipo de muestra, en la detección microbiológica, de ácido oxolínico y oxitetraciclina en peces. *Arch med Vet.* 33:21-29.

GUZMÁN, M.A.; SALINAS, J.; TOCHE P.; AFANI, A. 2004. Alergia a B-lactámicos. *Rev Chil Infectol.* 21: 285-298.

JECFA. COMITÉ MIXTO FAO/OMS DE EXPERTOS EN ADITIVOS ALIMENTARIOS. 2001. Hoja de información - ¿qué es jecfa? [En línea]. <<http://www.fao.org/ag/AGN/jecfa/files/what-s.pdf>> [consulta: 27/06/06].

KAPUSNIK-UNER, J.E.; SANDE, M.A.; CHAMBERS, H.F. 2003. Fármacos antimicrobianos, tetraciclinas, cloranfenicol, eritromicina y diversos antimicrobianos. **In:** Goodman, I.s; Gilman, a. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 10ª ed. Mc Graw-Hill Interamericana. Buenos aires, Argentina. pp:1193-1224.

KOENEN-DIERICK, K.; OKERMAN, L.; DE ZUTTER, L.; DEGROODT, J.M.; VAN HOOFF, J.; SREBRNIK, S. 1995. A one-plate microbiological screening test for antibiotic residue testing in kidney tissue and meat: an alternative to the EEC four-plate method? *Food Addit Contam.* 12:77-82.

KORSRUD, G.O.; BOISON, J.O.; NOUWS, J.F.; MACNEIL, J.D. 1998. Bacterial inhibition tests used to screen for antimicrobial veterinary drug residues in slaughtered animals. *JAOAC Int.* 81:21-24.

MAGARIÑOS, H. 2000. Producción higiénica de la leche cruda. cap.6 Contaminación de la leche por antibióticos. [En línea]. <http://www.science.oas.org/OEA_GTZ/LIBROS/LA_LECHE/leche.htm> [consulta: 25/07/06].

MAROTO, A. 2002. Incertidumbre en métodos analíticos de rutina. [En línea]. <http://www.tdx.cesca.es/TESIS_URV/AVAILABLE/TDX-0602103-133121/tesis_Alicia_Maroto.PDF> [consulta: 05/07/06].

MARTIN, F.L. 2005. Porcicultura- detección de antibióticos en alimentos mediante técnicas microbiológicas. Número 208. [En línea]. <http://www.midiatecavipec.com/articulos.php?id_sec=2&id_art=80> [consulta: 05/07/06].

MEDTOX DIAGNOSTICS INC. s.f. Performing the fast antimicrobial screen test. A self- instructional guide. North Carolina, USA. 9p.

MELLGREN, C.; STERNESJO, A.; HAMMER, P.; SUHREN, G.; BJORCK, L.; HEESCHEN, W. 1996. Comparison of biosensor, microbiological, immunochemical, and physical methods for detection of sulfamethazine residues in raw milk. *J Food Prot.* 59:1223-1226.

MINISTERIO DE SALUD, CHILE. 1999. Resolución exenta N° 1462 Límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en alimentos destinados al consumo humano. 4 de octubre de 1999. [En línea]. <<http://www.tecnoalimentos.cl/html2/limites.html>> [consulta: 17/05/06].

MINISTERIO DE SANIDAD Y CONSUMO. 1989. Métodos de análisis de residuos en alimentos. Detección de residuos de antibióticos y sulfamidas: técnica de cribado de las cuatro placas. Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, España. Método 3.5.

MITCHELL, J.M.; GRIFFITHS, M.W.; MCEWEN, S.A.; MCNAB, W.B.; YEE, A.J. 1998. Antimicrobial drug residues in milk and meat: causes, concerns, prevalence, regulations, tests, and test performance. *J Food Prot.* 61:742-756.

NCCLS. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. 1993. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for Bacteria that grow aerobically. 13:8-12.

NCCLS. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. 1998. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 18: pp 79.

NOUWS, J.F. 1981. Tolerances and detection of antimicrobial residues in slaughtered animals. *Arch. Lebensmittelhyg.* 32:103-110.

NOUWS, J.F.; SCHOTHORST, M.; ZIV, G. 1979. A critical evaluation of several microbiological test method for residues of antimicrobial drugs in ruminants. *Arch. Lebensmittelhyg.* 30:4-8.

ODEPA. OFICINA DE ESTUDIOS Y POLÍTICAS AGRARIAS. 2005a. Acuerdos comerciales suscritos por Chile. Entorno internacional. [En línea]. <<http://www.odepa.gob.cl>>. [consulta: 02/05/06].

ODEPA. OFICINA DE ESTUDIOS Y POLÍTICAS AGRARIAS. 2005b. Producción de carne. Mercados y rubros. [En línea]. <<http://www.odepa.gob.cl>>. [consulta: 02/05/06].

OIE. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL. 2006. Informar sobre la situación zoonosanitaria mundial con toda transparencia. [En línea]. <http://www.oie.int/esp/info/es_info.htm> [consulta: 16/06/06].

OMS. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. 2000. Contengamos la resistencia microbiana. [En línea]. <<http://disei.who.int/uhtbin/cgiirsi/qYSIFqzrvU/6950020/5/0>> [consulta: 21/06/06].

OMS. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. 2005. La contención de la resistencia a los antimicrobianos. [En línea]. <http://www.who.int/medicines/publications/policyperspectives/ppm_10_sp.pdf> [consulta: 27/06/06].

ORELLANA, C.; MAUREIRA, F. 2002. Control de residuos en productos pecuarios de Exportación. *Tecnovet.* 8:26-32.

ORMEROD, A.D.; REID, T.M.; MAIN, R.A. 1987. Penicillin in milk-its importance in urticaria. *Clin Allergy.* 17:229-234.

PAGE, S.W. 1991. Chloramphenicol 1. Hazards of use and the current regulatory environment. *Aust Vet J.* 68:1-2.

PAYNE, M.A.; MCBRIDE, M.D.; UTTERBACK, W.W.; BREITMEYER, R.E.; ALBERG, L.; MARTIN, D.; CULLOR, J. 1999. Specificity of assays used by regulatory agencies to detect antibiotic residues in tissues of culled dairy cows. *J Am Vet Med Assoc.* 214:1048-1050.

PAYNE, M.A.; WETZLICH, S.E.; ROBB, E.J.; BROWN, S.A.; GARDNER, I.A.; CULLOR, J.S.; CRAIGMILL, A.L. 2004. Comparison of the use of regulatory assays and high-performance liquid chromatography for detection of residues of ceftiofur sodium metabolites in tissue specimens of culled dairy cattle. *AJVR.* 65:1730-1733.

PEDERSEN, S.; LIERHAGEN, S. 2006. Heavy metal accumulation in arctic hares (*Lepus arcticus*) in Nunavut, Canada. *Sci Total Environ.* 368:951-955.

PROCHILE. 2005. Exportaciones chilenas registraron un incremento de 26,7%, en el primer semestre. Noticias y Agenda. [En línea]. <<http://www.prochile.cl>>. [consulta: 03/05/06].

RAMA, Y.; RAM, S.; SANJEEN, A. 1985. Diffusion test for detection of streptomycin in milk. *J Dairy Res.* 52:596.

SAG. SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO. MINISTERIO DE AGRICULTURA 2006a. Sanidad animal. [En línea]. <<http://www2.sag.gob.cl>> [consulta: 19/06/06].

SAG. SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO. 2006b. Medicamentos veterinarios. Regulaciones nacionales. Resolución exenta n° 3599. [en línea] <http://www2.sag.gob.cl/Pecuaria/medicamentos_veterinarios/regulaciones.htm > [consulta: 04-07-06].

SAG. SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO. MINISTERIO DE AGRICULTURA 2006c. Programa de Control de Residuos en Productos Pecuarios año 2006. [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>. [consulta: 03/05/06].

SAN MARTÍN, B. 2000. Métodos de análisis para el control de residuos químicos en productos de origen animal. *Tecnovet* 6: 12-14.

SAN MARTÍN, B.; CAÑÓN, H. 2000. Resistencia bacteriana: Un problema mundial en medicina veterinaria y humana. *Monografías Med Vet.* 20: 17-25.

SUNDLOF, S.F. 1989. Drug and chemical residues in livestock. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 5:411-449.

TEUBER, M. 2001. Veterinary use and antibiotic resistance. *Curr Opin Microbiol.* 4:493-499.

THE MERCK INDEX. 2001. An encyclopedia of chemicals, drugs and biological. 13th ed. Merck research laboratories, division of Merck & CO., INC. Whitehouse Station. New Jersey, USA.

TOLLEFSON, L.; MILLER, M.A. 2000. Antibiotic use in food animals: Controlling the human health impact. *JAOAC.* 83:245-254.

TONG, G.; YULONG, M.; PENG, G.; ZIRONG, X. 2005. Antibacterial effects of the Cu(II)-exchanged montmorillonite on Escherichia coli K88 and Salmonella choleraesuis. *Vet Microbiol.* 105:113-122.

VAN EENENNAAM, A.L.; CULLOR, J.S.; PERANI, L.; GARDNER, I.A.; SMITH, W.L.; DELLINGER, J.; GUTERBOCK, W.M.; JENSEN, L. 1993. Evaluation of milk antibiotic residue screening test in cattle with naturally occurring clinical mastitis. *J Dairy Sci.* 76:3041-3053.

ZURICH, L.; SAN MARTÍN, B. 1994. Residuos de antimicrobianos en leche.
Monografías Med Vet. 16: 19-27.

ANEXO 1. Solventes y diluyentes para la preparación de soluciones “stock” y diluciones de agentes antimicrobianos.

ANTIBIÓTICO	SOLVENTE	DILUYENTE
Oxitetraciclina	Agua	Agua
Florfenicol	96% Etanol	Agua
Ceftiofur	Agua	Agua
Neomicina	Agua	Agua
Gentamicina	Agua	Agua
Tilosina	0.9% NaCl	Agua
Estreptomicina	Agua	Agua
Enrofloxacino	NaOH 0.03 M	Agua
Eritromicina	“Buffer” fosfato, pH 8.0, 0.1 mol/L	Agua
Flumequina	NaOH 0.03 M	Agua
Penicilina	Agua	Agua
Ampicilina	Agua	Agua
Amoxicilina	Agua	Agua
Cloxacilina	Agua	Agua
Lincomicina	Agua	Agua
Ácido Oxolínico	NaOH 0.03 M	Agua

Fuente: NCCLS, 1998.

The Merck Index, 2001.

ANEXO 2. Límites máximos residuales (MRL) de drogas veterinarias aceptados por la U.E. y EE.UU.

ANTIBIÓTICO	ESPECIE	RIÑÓN	MÚSCULO
Oxitetraciclina	todas	600 µg/kg. * (1200 µg/kg.) **	100 µg/kg. (200 µg/kg.)
Florfenicol	bovinos	300 µg/kg (-----) **	200 µg/kg (-----)
	porcinos	500 µg/kg. (-----)	300 µg/kg. (-----)
	aves	750 µg/kg. (-----)	100 µg/kg. (-----)
Ceftiofur	bovinos; porcinos	6000 µg/kg. (6000 µg/kg.)	1000 µg/kg. (1000 µg/kg.)
Neomicina	bovinos; porcinos; aves	5000 µg/kg. (10000 µg/kg.)	500 µg/kg. (500 µg/kg.)
Gentamicina	bovinos; porcinos	750 µg/kg. (5000 µg/kg.)	50 µg/kg. (100 µg/kg.)
Tilosina	bovinos; porcinos; aves	100 µg/kg. (-----)	100 µg/kg. (-----)
Estreptomina	bovinos; ovinos; porcinos; aves	1000 µg/kg. (1000 µg/kg.)	500 µg/kg. (600 µg/kg.)
Enrofloxacino	bovinos; ovinos	200 µg/kg. (-----)	100 µg/kg. (-----)
	porcinos; aves	300 µg/kg. (-----)	100 µg/kg. (-----)
Eritromicina	bovinos; ovinos; porcinos; aves	200 µg/kg. (-----)	200 µg/kg. (-----)
Flumequina	bovinos; ovinos; porcinos	1500 µg/kg. (3000 µg/kg.)	200 µg/kg. (500 µg/kg.)
	aves	1000 µg/k (3000 µg/kg.)	400 µg/kg. (500 µg/kg.)
Penicilina	todas	50 µg/kg. (50 µg/kg.)	50 µg/kg. (50 µg/kg.)
Ampicilina	todas	50 µg/kg.	50 µg/kg.

		(50 µg/kg.)	(50 µg/kg.)
Amoxicilina	todas	50 µg/kg. (50 µg/kg.)	50 µg/kg. (50 µg/kg.)
Cloxacilina	todas	300 µg/kg. (50 µg/kg.)	300 µg/kg. (50 µg/kg.)
Lincomicina	bovinos; ovinos porcinos; aves	1500 µg/kg. (1500 µg/kg. porcinos; 500 µg/kg aves)	100 µg/kg. (200 µg/kg.)
Ácido Oxolínico	bovinos; porcinos; aves	150 µg/kg. (-----)	100 µg/kg. (-----)

* Límites máximos residuales aceptados por la U.E.

** Niveles de seguridad establecidos por EE.UU.

** (-----): Límites no determinados.

Fuente: EMEA, 2006.

FSIS, 2005.

ANEXO 3. Halos de inhibición alrededor de N5 obtenidos de la prueba “FAST” con 16 antibióticos como drogas puras con lectura a las 24 horas.

Drogas puras	Tamaño (mm) del halo inhibitorio alrededor de N5						Prom	DS	Rango
Oxitetraciclina	28	23	28	28	29	30	27,3	2,2	25-30
Florfenicol	26	28	24	22	28	28			
Ceftiofur	26	25	26	29	27	30			
Neomicina	28	29	22	30	28	29			
Gentamicina	30	24	24	27	29	23			
Tilosina	29	26	27	28	27	30			
Estreptomicina	29	25	27	29	28	28			
Enrofloxacino	22	28	26	28	26	26			
Eritromicina	27	26	28	28	24	29			
Flumequina	28	28	29	28	27	27			
Penicilina	27	29	30	26	28	26			
Ampicilina	28	27	28	25	29	28			
Amoxicilina	25	30	31	28	24	29			
Cloxacilina	30	27	28	29	22	30			
Lincomicina	30	25	29	29	30	27			
Ácido oxolínico	25	28	21	30	30	27			