



**UNIVERSIDAD DE CHILE**

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE RESIDUOS DE  
CLORTETRACICLINA Y SU ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EN  
DEYECCIONES DE POLLOS BROILER.**

**Constanza Paz Avello Lefno**

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

PROFESOR GUÍA: JAVIERA CORNEJO KELLY  
Universidad de Chile

FINANCIAMIENTO: Proyecto UINICIA 2013

SANTIAGO, CHILE  
2017



**UNIVERSIDAD DE CHILE**

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE RESIDUOS DE  
CLORTETRACICLINA Y SU ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EN  
DEYECCIONES DE POLLOS BROILER.**

**Constanza Paz Avello Lefno**

Proyecto de Memoria para optar al  
Título Profesional de Médico  
Veterinaria Departamento de  
Medicina Preventiva Animal

NOTA FINAL: .....

PROFESOR GUÍA: JAVIERA CORNEJO K. ....

PROFESOR CORRECTOR: CONSUELO BORIE P. ....

PROFESOR CORRECTOR: LISETTE LAPIERRE A. ....

SANTIAGO, CHILE  
2017

MEMORIA DE TÍTULO

**“DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE RESIDUOS DE CLORTETRACICLINA Y SU ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EN DEYECCIONES DE POLLOS BROILER”**

**“DETERMINATION OF CLORTETRACYCLINE RESIDUES CONCENTRATION AND THEIR ANTIMICROBIAL ACTIVITY IN BROILER CHICKEN DEJECTION”**

**Constanza Paz Avello Lefno\***

\*Departamento de Medicina Preventiva Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

**Financiamiento**

Proyecto Uinicia 2013

## ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN.....	7
ABSTRACT.....	8
INTRODUCCIÓN .....	9
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	10
Clortetraciclina.....	10
Residuos de medicamentos veterinarios en heces de animales de abasto.....	11
Actividad antimicrobiana.....	12
Cama broiler.....	13
Presencia de antimicrobianos en el medio ambiente y efectos ecotoxicológicos .....	14
Resistencia antimicrobiana .....	15
HIPÓTESIS.....	17
OBJETIVO GENERAL.....	17
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
MATERIALES Y MÉTODOS .....	18
Animales experimentales y tratamiento.....	18
Formulación farmacéutica.....	19
Tratamiento de las muestras y análisis cromatográfico .....	19
Inhibición de crecimiento bacteriano en placa.....	21
Bioseguridad .....	22
RESULTADOS.....	23
Objetivo específico 1: Evaluar la depleción de CTC y 4-epi CTC en deyecciones de pollos broiler tratados.....	23

Objetivo específico 2: Evaluar la actividad antimicrobiana de los residuos de CTC y 4 epi CTC presentes en deyecciones de pollo broiler mediante un método semicuantitativo de “screening” microbiológico. ....	26
DISCUSIÓN .....	29
CONCLUSIONES .....	35
BIBLIOGRAFÍA .....	36
ANEXOS .....	45

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla Nro: 1 Nivel de excreción de tetraciclinas en animales .....	12
Tabla Nro. 2 Iones parentales y productos según analito .....	20
Tabla Nro. 3: Depleción de CTC y 4 epi CTC en deyecciones de pollos broiler tratados	24
Tabla Nro.4: Evaluación de actividad antimicrobiana en deyecciones de pollos broiler tratados .....	27
Tabla Nro. 5: Verificación metodología de "screening" microbiológico para detección de actividad antimicrobiana de CTC y 4 epi CTC en deyecciones de pollos broiler .....	52

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura Nro. 1: Estudio de depleción de CTC y 4 epi CTC .....	25
Figura Nro. 2: Halo de inhibición de crecimiento bacteriano según punto de muestreo. .	28
Figura Nro. 3: Cromatograma de matriz blanco para CTC.....	48
Figura Nro. 4: Cromatograma de matriz blanco para 4 epi CTC.....	48
Figura Nro. 5: Cromatograma de droga pura para CTC .....	49
Figura Nro. 6: Cromatograma de droga pura para 4 epi CTC. ....	49
Figura Nro. 7: Curva de calibración “baja” para CTC.....	50
Figura Nro. 8: Curva de calibración “baja” para 4 epi CTC.....	50
Figura Nro. 9: Curva de calibración “alta” para CTC.....	51
Figura Nro. 10: Curva de calibración “alta” para 4 epi CTC.....	51

## RESUMEN

La familia de las tetraciclinas, es la segunda familia de antibióticos de mayor producción y uso a nivel mundial. En la industria avícola, son utilizadas para tratar enfermedades infecciosas de origen bacteriano, sin embargo, su uso no está exento de riesgos.

Luego de su administración, son excretadas en grandes proporciones a través de orina y heces de humanos y animales de manera activa. Esto resulta relevante debido a que la cama broiler, compuesta en su mayoría por deyecciones de pollo, es utilizada como opción alimenticia para rumiantes. Además, el estiércol es utilizado para optimizar el crecimiento y cosecha en la agricultura, implicando un traspaso de residuos al medio ambiente, generando efectos eco toxicológicos y contribuyendo a la emergencia de resistencia bacteriana.

Se llevó a cabo un estudio de depleción utilizando 80 pollos broiler, los cuales fueron tratados con clortetraciclina al 20% en condiciones terapéuticas. El objetivo fue evaluar las concentraciones de clortetraciclina y su epímero 4-epi-clortetraciclina, en las deyecciones de pollos broiler tratados, para lo cual se verificó una metodología analítica mediante cromatografía líquida asociada a un espectrómetro de masas (LC-MS/MS), según la normativa de la Unión Europea.

Paralelamente, se llevó a cabo la medición de actividad antimicrobiana mediante un método de “screening”, el cual fue verificado para su uso en deyecciones.

Clortetraciclina y su epímero 4-epi-clortetraciclina continuaron excretándose a través de las deyecciones aun cumplido el periodo de resguardo de la formulación farmacéutica en músculo, y sus concentraciones variaron entre 179,5 y 666 µg/kg. Además, del total de muestras analizadas mediante el “screening”, todas presentaron actividad antimicrobiana.

Se estableció un tiempo de depleción de 69 días para deyecciones.

**Palabras claves:** Depleción, Residuos antimicrobianos, Clortetraciclina, 4-epi-Clortetraciclina, Deyecciones, LC-MS/MS.

## ABSTRACT

The family of tetracyclines, is the second family of antibiotics of greater production and use worldwide. In the poultry industry, they are used to treat infectious diseases of bacterial origin, however, their use is not without risks.

After administration, they are excreted in large proportions through urine and feces of humans and animals actively. This is relevant because the poultry litter, composed mostly of poultry excreta, is used as a food option for ruminants. In addition, manure is used to optimize growth and harvesting in agriculture, implying a transfer of waste to the environment, generating ecotoxicological effects and contributing to the emergence of bacterial resistance.

A depletion study was carried out using 80 broiler chickens, which were treated with 20% chlortetracycline under therapeutic conditions. The objective was to evaluate the concentrations of chlortetracycline in the excrement of treated broiler chickens, for which an analytical methodology was verified by liquid chromatography associated with a mass spectrometer (LC-MS / MS), according to European Union regulations.

At the same time, the measurement of antimicrobial activity was carried out using a screening method, which was verified for use in excreta.

The concentrations of chlortetracycline plus its epimer 4-epichlortetracycline varied between 179.5 and 666  $\mu\text{g} / \text{kg}$ . Of the total samples analyzed, all of them had antimicrobial activity. A depletion time of 69 days for dejections was established.

**Key words:** Depletion, Antimicrobial residues, Chlortetracycline, 4-epi-Chlortetracycline, Excreta, LC-MS/MS

## INTRODUCCIÓN

Dentro de la producción avícola, los antimicrobianos siguen siendo la principal herramienta terapéutica para tratar las enfermedades de origen bacteriano. Sin embargo, al no respetar los periodos de resguardo, los residuos de estos fármacos sobre los niveles permitidos, provocan efectos adversos en el hombre. La presencia de residuos de medicamentos veterinarios en alimentos destinados a consumo humano por sobre los límites máximos residuales (LMR) establecidos, puede tener como consecuencia efectos tóxicos directos, inmunológicos, mutagénicos, carcinogénicos y teratogénicos. Además, puede causar efectos sobre la microflora intestinal, ya que concentraciones de estas drogas contribuyen a una persistente presión para la selección de bacterias resistentes en el intestino de estos animales. En el caso de los tejidos comestibles de pollos broiler (músculo, hígado, riñón) existen suficientes estudios que muestran el comportamiento de los antimicrobianos en estos una vez finalizado el tratamiento. Sin embargo, existe escasa información sobre los residuos de antimicrobianos en otros sub productos provenientes de la industria avícola tales como la cama broiler.

Los antimicrobianos administrados pueden ser excretados por las deyecciones de las aves en altas concentraciones, incluso una vez finalizado el tratamiento. Además, existe evidencia que demuestra la actividad microbiológica de estos antimicrobianos puede persistir en las deyecciones. Esto constituye un factor de riesgo en la contaminación ambiental, ya que las moléculas activas pueden generar efectos eco toxicológicos en su llegada al ambiente, tales como toxicidad y disrupción endocrina en organismos terrestres y acuáticos. Conjuntamente se debe considerar que actualmente la cama broiler, es utilizada como pienso en formulaciones alimentarias de otras especies productivas, transformándose en una fuente potencial de reincorporación de residuos de antimicrobianos a la cadena alimentaria. Considerando lo anterior, es que se hace necesario determinar la concentración de antimicrobianos presentes en las deyecciones de las aves una vez finalizado el tratamiento y detectar si además las moléculas presentan actividad antimicrobiana.

En el presente estudio se trabajará con clortetraciclina (CTC), antimicrobiano de la familia de las tetraciclinas que presenta formulación farmacéutica de uso en aves autorizada en el país por el Registro de Medicamentos Veterinarios del Servicio Agrícola y Ganadero del Ministerio de Agricultura, (SAG).

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### Clortetraciclina

Descubiertas a principios de 1950, las tetraciclinas conforman un grupo de antimicrobianos bacteriostáticos de amplio espectro producidos por *Streptomyces* sp. De éstas, se han formulado derivados sintéticos como la doxiciclina y minociclina, y se obtienen otras por cultivo natural como la clortetraciclina (CTC), oxitetraciclina (OTC), y tetraciclina (TC) (Sumano y Gutiérrez, 2010).

Su mecanismo de acción es inhibir la síntesis proteica bacteriana, impidiendo la unión aminoacil t-ARN con el ribosoma bacteriano, exhibiendo actividad contra una amplia gama de bacterias gram-positivas y gram-negativas, organismos atípicos tales como clamidias, micoplasmas, rickettsias, y parásitos protozoarios (Chopra y Roberts, 2001).

En cuanto a la magnitud del uso de esta familia, una investigación realizada por Xie *et al.* (2010), indicó que estas son la segunda familia de antimicrobianos de mayor producción y uso a nivel mundial; mientras que, de ellas, CTC, OTC y TC fueron las más utilizadas (López-Peñalver *et al.*, 2010). Datos similares son los reportados por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA), donde del total de productos veterinarios medicinales vendidos en 19 países de la Unión Europea, la mayor proporción correspondió a tetraciclinas (39%), seguida por la familia de las penicilinas (23%) (EMA, 2012).

Cabe destacar que, si bien el uso de antimicrobianos como promotores de crecimiento ha sido prohibido en la Unión Europea (CE/1831/2003), esta sigue siendo una práctica común en otras partes del mundo, donde por ejemplo en Estados Unidos, CTC y OTC son dos de los diez antimicrobianos autorizados para dicho uso (Jeong *et al.*, 2010).

Las propiedades antimicrobianas favorables de estos agentes, y la ausencia de efectos adversos de importancia, han llevado a su extenso uso para el tratamiento de infecciones en bovinos, ovinos, porcinos, mascotas domésticas, así como en el tratamiento de enfermedades en aves de corral (Chopra y Roberts, 2001). En estas últimas, las tetraciclinas son la familia de antimicrobianos que posee mayor número de presentaciones comerciales farmacéuticas inscritas en el Registro de Medicamentos Veterinarios Autorizados por el SAG (SAG, 2015). Éstas corresponden a formulaciones de OTC y CTC indicadas en pollos broiler en las

siguientes patologías: cólera aviar (por *Pasteurella multocida*), enfermedad crónica respiratoria (por *Mycoplasma gallisepticum* y *Escherichia coli*), coriza infeccioso (por *Avibacterium paragallinarum*), salmonelosis, afecciones digestivas (por enterobacterias), sinovitis infecciosa (por *Mycoplasma synoviae*), coliseptisemia y onfalitis (por *Escherichia coli*) (SAG, 2015).

Son administradas vía oral con el alimento y absorbidas en baja proporción a nivel del duodeno y el resto del intestino, describiéndose para CTC, una baja biodisponibilidad debido a que los iones bivalentes del alimento reaccionan por quelación, obligando a usar mayores dosis de medicamento (Sumano y Gutiérrez, 2010).

### **Residuos de medicamentos veterinarios en heces de animales de abasto**

A nivel mundial, son varios los estudios que han confirmado la presencia de residuos de antimicrobianos en heces de animales productivos, y en ellos la familia de las tetraciclinas ha sido frecuentemente reportada.

Martínez-Carballo *et al.*, (2006) analizaron la presencia de diversas familias de antibióticos en muestras provenientes de criaderos de cerdos, pollos y pavos en Austria. El análisis reveló concentraciones de CTC, OTC y TC de 46 mg/kg, 29 mg/kg y 23 mg/kg respectivamente en las muestras de cerdo, mientras que en pollos y pavos se detectaron concentraciones significativas de sulfadiazina (91 mg/kg). Del mismo modo, Jacobsen y Halling-Sorensen (2006) en Dinamarca, detectaron residuos de antibióticos en todas las muestras de cerdos, y las mayores concentraciones correspondieron a CTC (hasta 30mg/kg).

En China, Zhao *et al.*, (2009), identificaron residuos de fluoroquinolonas y tetraciclinas en cerdos y vacas, evidenciando concentraciones de hasta 60 mg/kg de OTC y 28 mg/kg de CTC, mientras que, en estiércol de pollo, pudieron ser detectadas concentraciones de hasta 1420 mg/kg de enrofloxacin. Por su parte, Hu *et al.*, (2010), detectaron todos los antibióticos objetivos del estudio, destacándose entre ellos la alta concentración de OTC 183,5 mg/kg.

En el mismo país, los contaminantes más elevados detectados en las muestras de estiércol de cerdos, fueron TC, OTC, CTC y sulfadiazina (Chen *et al.*, 2012). Similar fue lo reportado en un estudio realizado por Pan *et al.*, (2011), en el cual se encontraron frecuencias de detección

de 85% a 97% para la familia de las tetraciclinas, 0,8-51,6% para las sulfonamidas y 5% para los macrólidos, donde las máximas concentraciones de residuos en cerdos alcanzaron los 764,4 mg/kg para el caso de CTC.

En Holanda, Berendsen *et al.* (2014) encontraron altas concentraciones de antimicrobianos en heces de cerdos y vacas, donde en el 55% de las muestras de heces de cerdos y en el 75% de las muestras de heces de bovino, al menos un antimicrobiano fue detectado. Del mismo modo se encontraron mezclas de diferentes familias de antimicrobianos (hasta ocho en un solo animal) y en algunos casos las concentraciones fueron significativamente altas. En este estudio los antimicrobianos más detectados fueron OTC, DXC y Sulfadiazina.

### Actividad antimicrobiana

Luego de la administración de antimicrobianos, los animales excretan entre el 30 al 90% de la dosis en su forma no metabolizada o como metabolitos activos (epímeros o isómeros) del compuesto original, y como consecuencia se espera que altos niveles de estos estén presentes en las heces (Massé *et al.*, 2014). Para el caso particular de las tetraciclinas, se ha señalado que posterior a su medicación, más del 70% son excretadas y liberadas al ambiente en su forma activa a través de orina y heces, de humanos y animales (Daghrir y Drogui, 2013).

La Tabla Nro.1 entrega la proporción de tetraciclinas excretadas por animal con su estado metabólico (cambiado o inalterado desde su forma administrada).

**Tabla Nro: 1 Nivel de excreción de tetraciclinas en animales**

Antibiótico	Fuente de estiércol	Nivel de excreción (%)	Estado	Referencia
CTC	Novillos	75	No reportado	Elmund <i>et al.</i> , 1971
OTC	Carneros castrados	21	Inalterado	Montforts <i>et al.</i> , 1999

CTC	Toros jóvenes	17-75	Inalterado	Montforts <i>et al.</i> , 1999
OTC	Terneros	23	No reportado	Arikan 2008

Adaptado de Massé *et al.*, 2014

Tal como sucede con otras tetraciclinas, CTC parece no ser metabolizada (Eisner y Wulf, 1963). Este antimicrobiano bajo condiciones medianamente ácidas puede epimerizarse de manera reversible a su forma 4-epi-clortetraciclina, además, este epímero es producto de degradación de su precursor, teniendo menor actividad microbiológica.

Este metabolito es similar a CTC en crear complejos con iones metales, ácidos húmicos, proteínas y materia orgánica en la matriz de estiércol, por lo que se adsorben fuertemente en esta matriz (Sarmah *et al.*, 2006; Massé *et al.*, 2014).

### **Cama broiler**

La industria avícola nacional de carne ha evolucionado considerablemente en las últimas décadas, consolidándose como una de las principales industrias agropecuarias chilenas. Al año 2014, la producción de carne de aves llegó a ser un 46,8% de la producción total de carnes (bovinos, porcinos, aves, ovinos, caprinos y equinos) y dentro de la producción total de carne de ave, el 84,7% correspondió a carne de pollo broiler (Giacomozzi, 2015).

Los subproductos de origen animal pueden ser considerados como materia prima, o bien, como productos tradicionales de mayor valor agregado (Almeida *et al.*, 2012). En la industria avícola, son generados subproductos que conservan un alto valor nutricional (Herrera, 2008), donde son relevantes las harinas (de vísceras, huesos, plumas y/o sangre), las garras de aves y la cama broiler (Bolan *et al.*, 2010). Ésta última en nuestro país es producida en altas cantidades y de forma diaria, estimándose una producción anual del orden de las 200.612 toneladas (SAG, 2006).

Uno de los sub productos derivados y comercializados a partir de la producción avícola es la cama broiler, constituida por deyecciones de aves, material absorbente o cama propiamente tal, que generalmente es viruta de madera, paja de trigo o capotillo de arroz, plumas y restos

del alimento suministrado a las aves (Van der Watt *et al.*, 1994). Ésta es una buena opción alimenticia, sobre todo para rumiantes, que por sus características digestivas pueden hacer mejor uso de sus nutrientes, sin embargo, existe el riesgo de transmitir bacterias patógenas, como lo es *Salmonella* spp., al igual que residuos de antimicrobianos que pudieran haber sido administrados a los pollos (Gadberry, 2014).

Cabe destacar, que en nuestro país, la Resolución Exenta n°7352 del 25 de noviembre del 2010, aprueba el Instructivo Planteles de Animales Bovinos Bajo Certificación Oficial (PABCO Bovinos) en la cual se prohíbe a aquellos planteles bovinos PABCO nivel “A” la alimentación con estiércol o guano de cualquier especie a ningún animal bovino del plantel (SAG, 2010). Sin embargo, un gran número de productores a nivel nacional, presenta la certificación PABCO nivel “B” la cual permite la alimentación con estiércol o guano. Esto se explicaría principalmente, a que la mayoría de los productores utiliza en la ración alimenticia de los animales, desechos de aves (cama de broiler) y sustancias anabólicas para su crecimiento, lo que no permitiría acceder a la certificación nivel “A” (Álvarez, 2009).

Además, debido a que el estiércol es utilizado para optimizar el crecimiento y cosecha en la agricultura, si éste se encuentra contaminado con residuos de antimicrobianos, podrían ser diseminados al medio ambiente (Kang *et al.*, 2013). De esta forma, logran producir efectos eco toxicológicos adversos y al mismo tiempo contribuir a la emergencia de resistencia bacteriana (Li *et al.*, 2013).

### **Presencia de antimicrobianos en el medio ambiente y efectos eco toxicológicos**

De acuerdo a investigaciones previas (Xu *et al.*, 2007) los antibióticos pueden ingresar al ambiente acuático a través de la descarga directa de aguas residuales animales y la descarga de efluentes desde las plantas de tratamiento de aguas residuales. De igual manera, la aplicación del estiércol como abono en terrenos agrícolas, puede contaminar el suelo y consecuentemente aguas superficiales y subterráneas a través de procesos de lixiviación y escurrimiento (Chen *et al.*, 2011 y Dagher y Drogui, 2013).

Las tetraciclinas, dado su extenso uso, se han encontrado en diferentes compartimientos ecológicos, tales como aguas superficiales, aguas subterráneas, aguas residuales, suelo y

sedimentos, señalándose como consecuencia, la inhibición de crecimiento de algunas especies terrestres y acuáticas (Daghrir y Drogui, 2013).

Las microalgas foto autótrofas, como productores tróficos primarios, juegan un importante rol en la estructura y funcionamiento de todo el ecosistema acuático, y tal como se reporta en la literatura, son más sensibles a los agentes antimicrobianos en comparación a crustáceos y peces (Yang *et al.*, 2008). En dicha investigación, se demostró que la CTC podría potencialmente afectar el crecimiento de algas verdes de agua dulce.

Así mismo, Halling-Sorensen, (2000) demostró el efecto tóxico en especies acuáticas (*Microcystis aeruginosa* y *Selenastrum capricornutum*), las cuales fueron más sensibles a CTC y TC que a OTC. En el año 2004, Brain *et al.*, encontraron que CTC presentaba toxicidad para la planta acuática *Lemna gibba*.

Hui-Zhu *et al.* (2008) evaluaron la toxicidad aguda de la TC y CTC en organismos acuáticos tales como *Daphnia magna*, *Danio rerio* y *Carassius auratus*, resultando la toxicidad de CTC en los tres organismos significativamente mayor que la de TC. El primer reporte del efecto foto tóxico de las tetraciclinas en cultivos, mostró que la presencia de CTC influencia negativamente el crecimiento de porotos pinto (Michael *et al.*, 2007). También fue reportado por Xie *et al.* (2010) que la CTC a altas concentraciones, inhibía significativamente el porcentaje de germinación del trigo. Igualmente, las concentraciones residuales de dichas drogas podrían afectar la vía esteroidogénica y así causar alteraciones endocrinas en especies acuáticas mayores (Daghrir y Drogui, 2013).

### **Resistencia antimicrobiana**

La exposición a largo plazo a niveles sub-terapéuticos de agentes antimicrobianos en ambientes acuáticos impone un estrés de selección en microorganismos ambientales (Gullberg *et al.*, 2011). Una vez que los microorganismos resistentes a los antibióticos aparecen en el medio ambiente, aumenta la resistencia de la comunidad a través de la transferencia de genes de resistencia antimicrobiana entre las poblaciones microbianas (Adachi *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2008).

El riesgo que significa para la Salud Pública el incremento de estas bacterias en el medio ambiente y entre los animales de producción ha adquirido especial importancia durante la última década, señalándose en diferentes países a la industria avícola como una fuente de estos microorganismos al generar condiciones favorables para la selección, propagación y persistencia de bacterias zoonóticas antibiótico resistentes (US FDA, 2009; Agunos *et al.*, 2012). Esta situación se traduce en una disminución de la sensibilidad a uno o varios antimicrobianos, provocando la pérdida de efectividad del tratamiento y finalmente mayores tasas de hospitalización y muertes en los seres humanos (Lathers, 2001; Capita y Alonso-Calleja, 2013). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) la resistencia antimicrobiana se ha transformado en un importante problema para la salud pública, fundamentalmente cuando se origina frente a antimicrobianos de primera línea de elección, ya que la principal amenaza es que a corto plazo no existirán antimicrobianos para tratar este tipo de bacterias resistentes en la medicina humana (OMS, 2014).

Si bien existen estudios que datan la ocurrencia de residuos de antimicrobianos en deyecciones de pollo, éstos no determinan si una vez excretados, presentan actividad antimicrobiana. Para efectos de esta tesis, se determinaron las concentraciones de clortetraciclina y su epímero 4-epi-clortetraciclina en deyecciones de pollos broiler tratados terapéuticamente y se evaluó la persistencia de actividad antimicrobiana de estos residuos.

## **HIPÓTESIS**

Los residuos de CTC y su metabolito 4-epi CTC en deyecciones de pollos broiler tratados, permanecen en concentraciones altas y con capacidad antimicrobiana activa, una vez finalizado el periodo de resguardo de la formulación utilizada.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar las concentraciones de Clortetraciclina (CTC) y su metabolito activo (4-epi CTC), y la presencia de actividad antimicrobiana, en deyecciones de pollos broiler.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Evaluar la depleción de CTC y 4-epi CTC en deyecciones de pollos broiler tratados.
2. Evaluar la actividad antimicrobiana de los residuos de CTC presentes en deyecciones de pollo broiler mediante un método semicuantitativo de “screening” microbiológico.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

La presente memoria de título se realizó en el marco del proyecto U-INICIA 2013 “Evaluación de la depleción de residuos de antimicrobianos en subproductos de aves y su relación con la concentración de estos residuos en tejidos comestibles”.

### **Animales experimentales y tratamiento**

Para el tratamiento con CTC se utilizaron 80 pollos broiler machos, de genética Ross 308. Se escogieron de esta genética debido a que son una raza precoz, de buena conversión alimenticia, gran rusticidad y adaptabilidad y por presentar una tasa de crecimiento inferior a pollos de engorde de genética Cobb 500 (Marcu *et al.*, 2013). Estas características favorecen su uso experimental ya que evitan una condición de engorde excesivo, lo que colabora al bienestar animal en las condiciones experimentales.

Para definir el tamaño del grupo experimental se consideró el criterio establecido por la Agencia Europea de Medicamentos, en la guía “Aproximación hacia la armonización de los períodos de resguardo EMEA/CVMP/036/95” (1997). De esta forma se contó con ocho animales tratados por cada punto de muestreo.

Los animales experimentales fueron mantenidos desde el día 1 de vida en baterías de crianza, en condiciones ambientales controladas ( $25\pm 5^{\circ}$  C de temperatura, 50-60% de humedad relativa), acceso *ad libitum* al agua y alimento no medicado. El alimento fue formulado de acuerdo a los requerimientos de la raza. Las jaulas contaron con un piso de alambre elevado, con el fin de evitar la contaminación con heces. Las aves fueron criadas y monitoreadas por un médico veterinario especialista, en las dependencias del Laboratorio de Patología Aviar de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. Para la mantención de los animales experimentales se respetaron las condiciones de bienestar animal aprobadas por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile (Anexo 1). El protocolo de manejo y supervisión estuvo basado en la Ley N° 20.380 “Sobre Protección de Animales” (Chile, Ministerio de Salud, 2009) y en la Directiva 2010/63/UE relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos (CE, 2010). Los días de tratamientos con CTC fueron definidos considerando:

- Duración del tratamiento en condiciones terapéuticas: siete días.
- Duración del período de resguardo de la formulación en músculo: 15 días.
- Diez días más después de finalizado el período de resguardo de la droga en músculo para continuar el monitoreo en deyecciones y observar la depleción de los residuos en esta matriz.

Al día 14 las aves se pesaron y se formaron dos grupos experimentales al azar, grupo A de 64 pollos y un grupo B de 16 pollos. El grupo A fue tratado con una fórmula comercial de CTC al 20%. El grupo B se mantuvo como control no tratado. Se administró una dosis terapéutica de CTC de 50mg/kg de forma oral una vez al día durante siete días consecutivos, es decir hasta el día 20 de edad. Los días de toma de muestra fueron los siguientes días post tratamiento: 5, 8, 11, 15, 18, 21, 25 (total siete puntos de muestreo).

Se aseguró la ingestión completa de la dosis a través de la administración del fármaco vía sonda oro gástrica. Las muestras fueron recolectadas en bolsas de plástico y almacenadas a -20° C de forma individual hasta su extracción y posterior prueba de inhibición de crecimiento bacteriano en placa y análisis cromatográfico.

### **Formulación farmacéutica**

Se utilizó una formulación comercial en polvo para administración oral, registrada por el SAG y disponible en el mercado para ser utilizada en aves de corral: CTC al 20%: “Aurofac 200” periodo de resguardo 15 días. Esta formulación fue seleccionada de acuerdo a los fármacos que se encuentran autorizados de acuerdo al Registro de Medicamentos de Uso Veterinario del SAG (SAG, 2015) disponibles para ser usados en pollos broiler.

### **Tratamiento de las muestras y análisis cromatográfico**

Se realizó la extracción y análisis cromatográfico de las muestras de deyecciones de las aves tratadas, en las dependencias del Laboratorio de Farmacología Veterinaria de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, FARMAVET, el cual se encuentra acreditado bajo la norma ISO 17025 Of.2005.

Para la detección de CTC y 4-epi CTC, se implementó y verificó un método analítico para tetraciclinas en deyecciones por LC-MS/MS, detallado en el Anexo 2, el cual está basado en la metodología publicada por Berendensen *et al.* 2014, utilizada para fines similares en heces de cerdos y vacas de leche.

Para el análisis y cuantificación de CTC en heces se utilizaron estándares de pureza certificada *Dr. Ehrenstorfer GmbH, Sigma Aldrich* o equivalentes. Para cuantificar los metabolitos 4-epi CTC se utilizaron estándares 4-Epi Chlortetracycline de *Across Organic* y como estándar interno se utilizó tetraciclina Isotópica de pureza certificada obtenida de *Toronto Research Chemicals* (Canadá). Todos los solventes utilizados fueron de grado HPLC, y los reactivos grados Analítico, (*Fisher, Merck* o equivalente).

Las muestras fueron analizadas mediante cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masa (API 4000 ABSCIEX), utilizado para fines similares por San Martín *et al.* (2007), Cornejo *et al.* (2010, 2012). Como criterio de identificación de los analitos, se utilizaron los iones parentales y los iones productos cuantitativos y cualitativos, especificados en la Tabla Nro.2.

**Tabla Nro. 2 Iones parentales y productos según analito**

Iones	Ion precursor	Ion producto
CTC y 4-epi-CTC	479.0	444.0
	479.0	154.0
TC d-6 (E.I.)	451.0	416.0

Las concentraciones de CTC y 4-epi CTC en deyecciones de aves tratadas, fueron calculadas a través de la ecuación del análisis de regresión (lineal)  $y = a + bx$  (donde  $y$  es el área,  $a$  es el intercepto en  $y$ ,  $b$  es la pendiente y  $x$  es la concentración) de las curvas de calibración de la matriz fortificada. Se utilizaron muestras blanco provenientes del grupo control para construirlas. Estas fueron fortificadas a concentraciones diferentes y equidistantes, con un coeficiente de determinación  $R^2 \geq 0,95$ . El análisis de los datos se realizó según las indicaciones de EMEA (1997).

Los resultados de las muestras se llevaron a una gráfica en escala semilogarítmica de concentración versus tiempo, a la cual se le realizó un análisis de regresión lineal, considerando un nivel de confianza del 95%. A partir de esta gráfica, se logró definir el día en que las concentraciones eran iguales o menores al límite de detección (LD) establecido para las técnicas.

Para realizar la verificación del método analítico, se siguió un protocolo interno basado en las recomendaciones de La Unión Europea: Decisión de la Comisión 2002/657/CE (EC, 2002) y la FDA: *VICH GL49 validation of analytical methods used in residue depletion studies* (FDA, 2011), el cual contempla la evaluación de diferentes parámetros con el fin de que la metodología sea válida para su uso en el laboratorio.

La especificidad del método, corresponde a la capacidad de este para distinguir entre el analito de interés y otras sustancias presentes en la matriz. Para determinar este parámetro se evaluaron muestras blanco matriz, con el fin de verificar posibles interferencias en el tiempo de retención específico de CTC.

El límite de detección (LD) es la concentración más pequeña de un analito que proporciona una señal instrumental significativamente diferente, de tal forma que pueda ser distinguida de la señal de fondo o ruido del equipo. Para determinar este parámetro, se fortificaron muestras a distintas concentraciones y se seleccionó la concentración en la cual la señal ruido fue a lo menos 2 o 3:1.

Finalmente se evaluó la linealidad de la curva de calibración. Para esto se utilizaron cinco concentraciones, siendo la concentración más baja igual al LD. Los rangos de concentración se aceptaron si  $R^2 \geq 0,95$  y el  $CV \leq 25\%$ .

### **Inhibición de crecimiento bacteriano en placa**

Paralelamente, se evaluó si los residuos de CTC y epi CTC presentes en las deyecciones de las aves tratadas mantenían actividad antimicrobiana utilizando un método de inhibición de crecimiento bacteriano específico. Dicho procedimiento se realizó en las dependencias del Laboratorio de Inocuidad de los Alimentos de la Facultad de Ciencias Veterinarias y

Pecuarias de la Universidad de Chile (LIA), el cual fue recientemente acreditado por el Instituto Nacional de Normalización (INN) bajo la norma ISO 17025.

Esto se realizó utilizando un método analítico válido para la detección de residuos de antimicrobianos en hígado, riñón y músculo, el cual está basado en las siguientes metodologías publicadas:

1. Ministerio de Sanidad y Consumo de España, Instituto Carlos III, Método 3,4 “Detección de residuos de antibióticos en carnes-Método de screening rápido”.
2. Ministerio de Sanidad y Consumo de España, Instituto Carlos III, Método 3,5 “Detección de residuos de antibióticos y sulfonamidas: Técnica de cribado de las cuatro placas”.
3. Ministerio de Sanidad y Consumo de España, Instituto Carlos III, Método 3,6 “Identificación de residuos de antibióticos en tejidos animales por bioensayo”.
4. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility for bacteria isolated from animals. Approved standards National Committee for Clinical Laboratory Standards. M31-A (11)-12 1999.
5. Simplified test method of residual antibiotics in feedstock and fisheries (Revised).

Se sembraron previamente las placas Petri con una suspensión de esporas *Bacillus cereus* ATCC 11778, de acuerdo al protocolo descrito en el Anexo 3. Posteriormente, para la extracción del antibiótico en estudio desde la matriz, se siguió el protocolo descrito en el Anexo 4.

### **Bioseguridad**

Se consideraron las medidas de bioseguridad para el trabajo con animales experimentales y el trabajo de laboratorio, sugeridas por el Manual de Normas de Bioseguridad de CONICYT (2008).

## RESULTADOS

Dado que la metodología por LC-MS/MS fue anteriormente validada por Berendsen (2014), en heces de vacas y cerdos, se llevó a cabo una implementación y verificación para comprobar si dicha metodología era apta para su uso en deyecciones de pollos y pudiera ser utilizada en las condiciones del laboratorio.

Los datos de la verificación se encuentran detallados en el Anexo 5.

### **Objetivo específico 1: Evaluar la depleción de CTC y 4-epi CTC en deyecciones de pollos broiler tratados.**

Se evaluaron las concentraciones de CTC y 4-epi-CTC cuantificadas mediante la ecuación del análisis de regresión lineal de las curvas de calibración de matriz fortificada ( $r \geq 0,95$ ) en las muestras de deyecciones del grupo de pollos tratados terapéuticamente. Se construyeron curvas fortificadas a concentraciones altas, puesto que presentaron mejor ajuste para permitir cuantificar los residuos. Las curvas representativas para la cuantificación de los analitos, construidas a fortificación de 100, 200, 400, 800, 1200, y 1400  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , se encuentran en el Anexo 6.

El estudio indicó una disminución de las concentraciones de los analitos desde los cinco días post tratamiento (primer punto de muestreo) hasta los 25 días post tratamiento (último punto de muestreo). Cabe destacar que, una vez cumplido el período de resguardo de la formulación para músculo, los pollos seguían excretando concentraciones considerables de los analitos en estudio. En la Tabla Nro. 3 se describen las concentraciones de CTC y 4 epi CTC según punto de muestreo.

**Tabla Nro. 3: Depleción de CTC y 4 epi CTC en deyecciones de pollos broiler tratados**

<b>Número de muestreo</b>	<b>Días post tratamiento</b>	<b>Edad pollos (días)</b>	<b>Concentración CTC (µg/kg)</b>	<b>Concentración 4 epi CTC (µg/kg)</b>	<b>Concentración final (CTC+ 4 epi CTC) (µg/kg)</b>
1	5	25	316,23	349,59	665,82
2	8	28	173,01	195,16	368,17
3	11	31	166,38	93,02	258,4
4	15	35	90,79	46,09	136,88
5	18	38	49,54	56,93	106,47
6	21	41	51,67	60,34	112,01
7	25	45	88,80	90,65	179,45

Se estableció el periodo de resguardo para la matriz siguiendo las indicaciones de EMEA (1997). Los resultados de las muestras se llevaron a una gráfica en escala semi-logarítmica (logaritmo natural, LN) de concentración versus tiempo (días) (Figura Nro. 1), realizando un análisis de regresión lineal en la fase final de eliminación considerando un nivel de confianza del 95%. A partir de esta gráfica se definió el momento (días) en el cual las concentraciones son iguales o menores al LD establecido para la técnica, siendo de 68,733 días. Dado que en este caso coincidió con la fracción de un día, se consideró el período de resguardo incluyendo un nuevo día completo, siendo finalmente de 69 días para CTC y 4 epi-CTC.

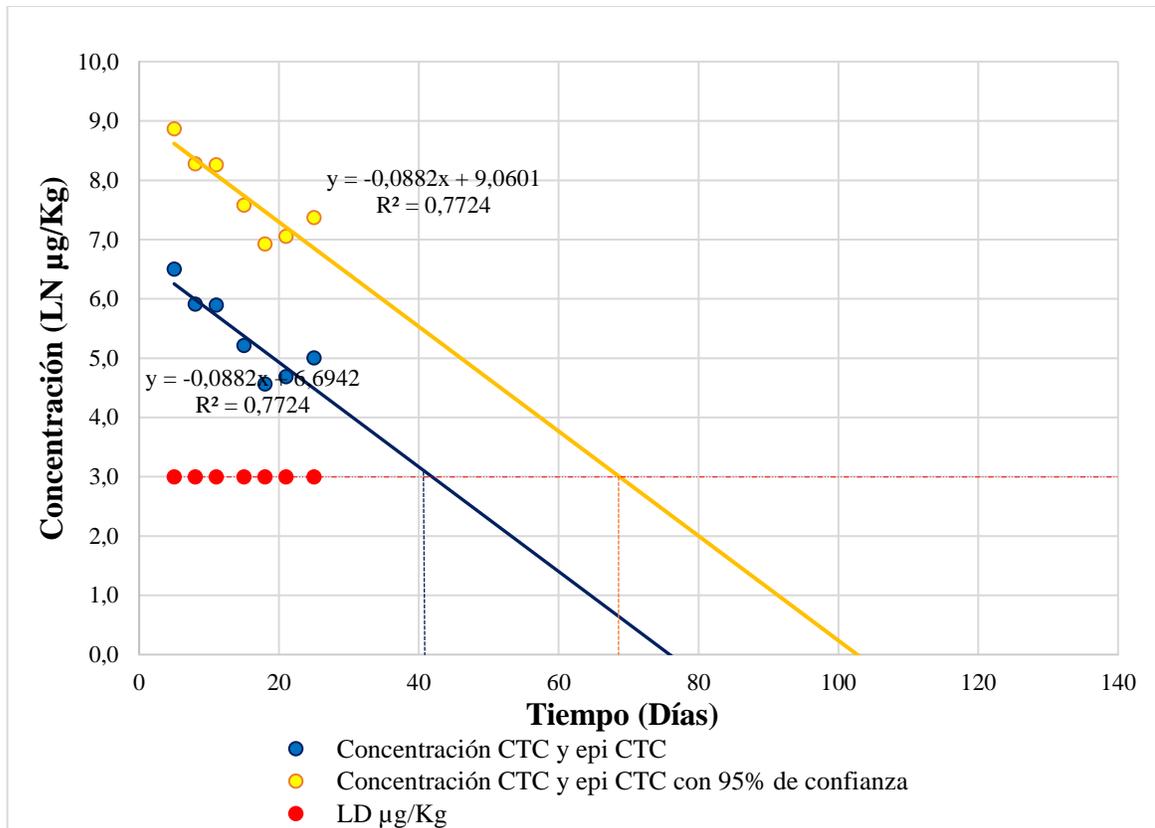


Figura Nro. 1: Estudio de depleción de CTC y 4 epi CTC en deyecciones de pollos broiler tratados

**Objetivo específico 2: Evaluar la actividad antimicrobiana de los residuos de CTC y 4 epi CTC presentes en deyecciones de pollo broiler mediante un método semicuantitativo de “screening” microbiológico.**

Este método de “screening” microbiológico, es aplicable a muestras de tejidos de origen animal, tales como músculo, hígado y riñón, donde se pesquisa residuos de antimicrobianos de la familia de las penicilinas, macrólidos, aminoglucósidos y tetraciclinas.

No obstante, no había sido utilizado para medir la actividad antimicrobiana de residuos de tetraciclinas en una matriz diferente, como lo son las deyecciones de pollo. En consecuencia, se realizó una verificación para comprobar que el protocolo fuera válido para su uso en la matriz de interés. Para efectos de evaluar la actividad antimicrobiana de la familia de las tetraciclinas, se utiliza una placa sembrada con esporas de un microorganismo sensible (*Bacillus cereus*).

La verificación de esta metodología analítica de “screening” microbiológico se llevó a cabo de la siguiente manera:

Se fortificaron muestras blanco de deyecciones de pollos broiler no tratados a una concentración de 240 µg/kg. Este nivel de fortificación es la concentración mínima capaz de expresar un halo de inhibición en la placa y permitió determinar una muestra como positiva. Además, se incubaron según protocolo, muestras blanco de deyecciones de pollos broiler no tratados para comprobar que la matriz no efectuara un halo de inhibición (control negativo). La Tabla de resultados de verificación, se encuentra detallada en el Anexo 7.

Conforme con la verificación, se procedió a medir la actividad antimicrobiana en las muestras de deyecciones de pollos broiler tratados terapéuticamente.

Se realizó el proceso de extracción de antibiótico de las deyecciones según lo descrito en el Anexo 4. El crecimiento bacteriano tornará el agar en una capa opaca, la cual luego de la incubación, resultará en un halo de inhibición de crecimiento bacteriano si la muestra contiene residuos de CTC y epi CTC. La tabla Nro.4 detalla los resultados del screening microbiológico según punto de muestreo.

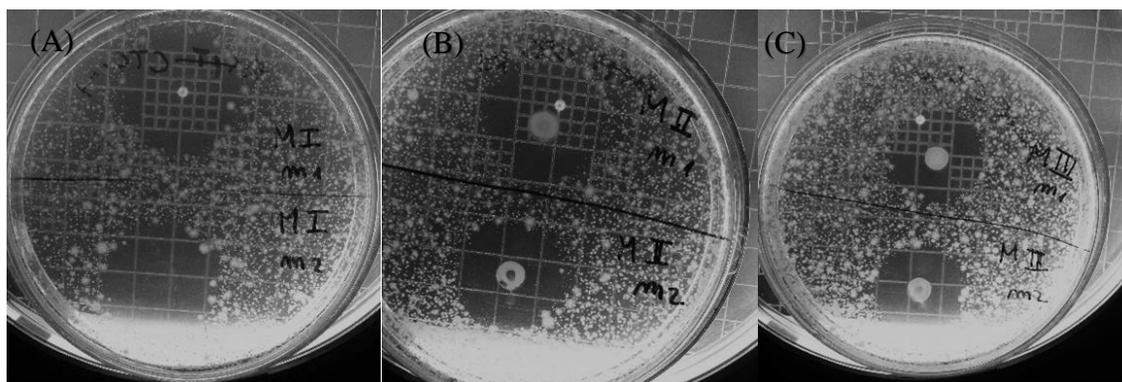
La medición de un halo de inhibición mayor o igual a  $1,4 \pm 0,2$  fue el criterio para determinar una muestra como positiva.

**Tabla Nro. 4: Evaluación de actividad antimicrobiana en deyecciones de pollos broiler tratados**

Número de muestreo	Día Post tratamiento	Edad pollos (días)	Halo de inhibición (cm)	Resultado
1	5	25	2,15	P*
2	8	28	2,2	P*
3	11	31	2,05	P*
4	15	35	1,7	P*
5	18	38	1,35	P*
6	21	41	1,2	P*
7	25	45	1,3	P*

**\*P: Positivo**

La Figura Nro. 2 muestra los halos de inhibición de crecimiento bacteriano por punto de muestreo. Cada punto de muestreo, fue evaluado mediante un duplicado de muestras (dos cilindros por placa); la medición final del halo por punto de muestreo, fue el resultado del promedio de las sub muestras.



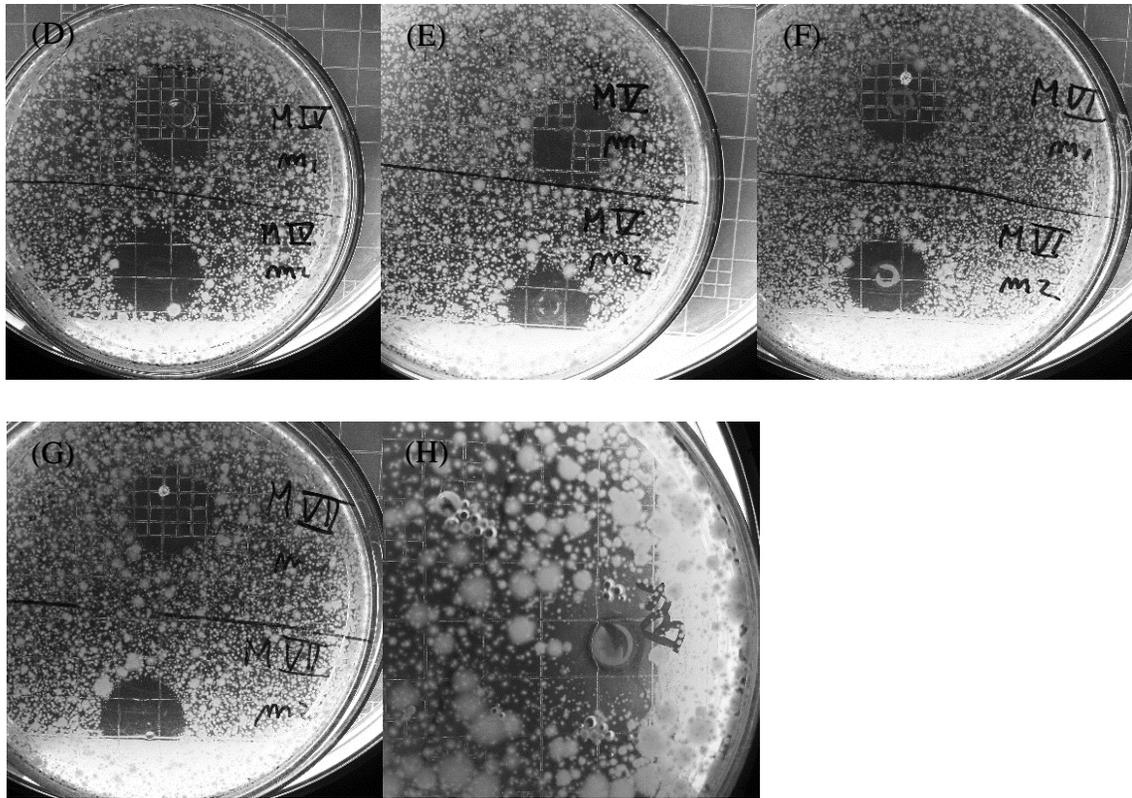


Figura Nro. 2: Halo de inhibición de crecimiento bacteriano según punto de muestreo.

(A) Halo de inhibición correspondiente al primer punto de muestreo; (B) Halo de inhibición correspondiente al segundo punto de muestreo; (C) Halo de inhibición correspondiente al tercer punto muestreo; (D) Halo de inhibición correspondiente al cuarto punto de muestreo; (E) Halo de inhibición correspondiente al quinto punto de muestreo; (F) Halo de inhibición correspondiente al sexto punto de muestreo; (G) Halo de inhibición correspondiente al séptimo punto de muestreo. (H) Muestra blanco, no presenta área de inhibición de crecimiento bacteriano, se observa el crecimiento de colonias cercano al cilindro.

## DISCUSIÓN

Los sistemas productivos de animales de abasto deben ampararse bajo normativas nacionales vigentes, para asegurar el uso prudente y eficiente de antimicrobianos, con el fin de evitar la presencia de residuos en alimentos por sobre los límites permitidos.

Para dar cumplimiento a estos objetivos, los países pueden elaborar planes de control, que permitan identificar residuos tanto autorizados como prohibidos y reconocer los sectores de la industria pecuaria donde se detecten problemas para realizar medidas correctivas.

Si bien los muestreos y análisis son comúnmente efectuados en aquellas matrices de consumo humano (músculo, hígado, riñón, miel y leche) procurando mantener la inocuidad de estos alimentos, los subproductos de la industria pecuaria que son utilizados como alimentos o insumos para otras especies productivas, como la cama broiler, no son objeto de vigilancia activa.

Para realizar el presente estudio, se verificó e implementó una metodología química cuantitativa que permitió detectar y cuantificar las concentraciones de CTC y 4 epi CTC en deyecciones, y una metodología microbiológica semicuantitativa que permitió medir la eventual capacidad antimicrobiana que mantenían estos compuestos una vez excretados.

Para implementar la metodología química de extracción de CTC y 4-epi-CTC en deyecciones de pollo, se tomó como referencia el método publicado por Berendsen *et al.*, (2014) el cual se encuentra completamente validado de acuerdo a la Decisión 2002/657/EC de la Comunidad Europea para la detección de 44 compuestos antimicrobianos incluyendo tetraciclinas, quinolonas, macrólidos y sulfonamidas en heces de animales, utilizando cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas. En consideración de esto y para comprobar el comportamiento de la metodología en nuestras condiciones de laboratorio, se realizó una verificación a través de la evaluación de los parámetros de Especificidad, Límite de Detección y Linealidad de la Curva, los cuales cumplieron con los criterios de aceptación y permitieron cuantificar las concentraciones de los metabolitos de estudio en deyecciones de pollos broiler tratados terapéuticamente.

Las concentraciones finales (CTC + 4-epi CTC) detectadas en los primeros muestreos, se mantuvieron altas incluso después de cumplido el periodo de resguardo de la formulación

para músculo, detectándose a los 15 días post tratamiento, una concentración final de 136,889 µg/kg. Si bien hasta el día 15 post tratamiento, las concentraciones fueron disminuyendo gradualmente, al día 21 y 25 post tratamiento (últimos muestreos) estas concentraciones vuelven a incrementarse, cuantificándose finalmente en el último día de muestreo, concentraciones de 179,5 µg/kg, la cual incluso sobrepasa el LMR establecido para músculo (100 µg/kg).

Esta prolongada excreción a través de las deyecciones, podría atribuirse en primer lugar a la farmacocinética de las tetraciclinas. CTC, al igual que OTC, se somete a ciclo entero hepático, limitando su biodisponibilidad, pero asegurando concentraciones importantes en el tracto gastrointestinal (Sumano y Gutiérrez, 2010). Sin embargo, es discutido si esto explicaría la excreción de CTC y epi CTC hasta los 25 días post tratamiento (último día de muestreo), puesto que Cornejo *et al.*, (2017a) detectaron concentraciones de OTC y epi OTC en hígados de pollos broiler tratados terapéuticamente, por bajo el límite de cuantificación (LOQ) entre el día 3 y 7 post tratamiento (25µg/kg y 27,2µg/kg para OTC y epi OTC respectivamente), e incluso las concentraciones fueron solo detectables hasta el día 13 post tratamiento con un LD de 20 µg/kg, haciendo suponer que es poco probable que al día 25 post tratamiento sigan en circulación entero hepática residuos de CTC y epi CTC.

Anadón *et al.*, (2012), en un estudio similar al de Cornejo *et al.*, (2017a), sugirieron que la eliminación de CTC en pollos, es más lenta que otras tetraciclinas análogas. En este estudio, el rango de absorción del medicamento, fue más lento que el rango de eliminación, explicado en parte, por las características particulares del tracto gastrointestinal de las aves. Las drogas administradas en solución, pasan rápidamente por el buche, proventrículo y molleja, llegando en pocos minutos al intestino (Vermeulen *et al.*, 2002). No obstante, Wu y Fassihi (2005) demostraron que tetraciclina clorhidrato a nivel del buche precipita, y luego se solubiliza lentamente, resultando en un retraso del tránsito intestinal del fármaco, sugiriendo que aquello podría ser el caso para CTC.

Si bien lo anterior puede explicar las altas concentraciones excretadas durante los primeros muestreos, existe evidencia que los metabolitos en estudio, no persisten en músculo ni riñón en la proporción de tiempo que se excretan en deyecciones (Cornejo *et al.*, 2017a). En

contraste a lo ocurrido en dichos tejidos, las concentraciones de tetraciclinas pueden persistir por tiempo prolongado en plumas y garras de pollo.

Berendsen *et al.*, (2013), concluyó que parte de la OTC administrada a pollos, se incorpora a las plumas durante el crecimiento del ave, y luego de cumplido el periodo de resguardo, las concentraciones de residuos en plumas fueron mucho más altas que en músculo e hígado. Esto último fue también reportado por Cornejo *et al.*, (2017a), donde los residuos de OTC y epi OTC permanecieron cuantificables en plumas hasta 46 días post tratamiento. Adicionalmente, Cornejo *et al.*, (2017b) evidenciaron residuos de OTC y epi OTC en garras de pollo, determinando periodos de resguardo de 39 y 54 días respectivamente, sobrepasando incluso el tiempo en que los pollos son sacrificados para consumo.

En consideración a esta evidencia, se sugiere entonces, que las altas concentraciones de CTC y epi CTC detectadas en deyecciones de pollos hasta el último punto de muestreo, e incluso el incremento de las concentraciones desde el día 21 al 25 post tratamiento, pueden ser atribuidas a la recirculación sistémica de estos residuos desde las matrices plumas y garras de pollo. De esta manera incrementaría el tiempo de eliminación del fármaco a través de riñón, descrita como la principal vía de eliminación de antimicrobianos en aves (Sumano y Gutiérrez, 2010). De todos modos, sería necesario complementar esta aseveración en conjunto con un estudio de depleción midiendo paralelamente las concentraciones plasmáticas de los metabolitos.

Si bien existían estudios previos que evidenciaran concentraciones de residuos de antimicrobianos en deyecciones de pollos, no existían, a nuestro conocimiento, estudios que dieran cuenta de la persistencia de actividad antimicrobiana en esta matriz. Es por esto, que paralelo al análisis químico de las muestras, se realizó la medición de actividad antimicrobiana de los residuos de CTC y epi- CTC en las deyecciones de pollos tratados, mediante un método de inhibición microbiana, válido para los tejidos hígado, músculo y riñón.

Los ensayos de inhibición microbiana fueron los primeros métodos empleados para la detección de residuos de antimicrobianos, siendo en la actualidad, utilizados por su buena relación costo/efectividad y por su capacidad de cubrir un amplio espectro de familias antimicrobianas en un solo test (Pikkemaat, 2009). Las metodologías actuales son

implementadas generalmente en tejidos como músculo, hígado, riñón, líquido de pelvis renal, huevo y leche, ya sea en ensayos en tubos o multi placas (Pikkemaat, 2009), pero no en subproductos de la industria pecuaria, como la cama broiler.

Korsrud *et al.*, (1998) y Pikkemaat *et al.*, (2011) señalaron que las matrices más adecuadas para realizar detección de antibióticos por medio de screening microbiológico, son aquellas que poseen LMR más altos, como es el caso de riñón y líquido de la pelvis renal, para así aumentar la sensibilidad del ensayo y con ello identificar correctamente los resultados no conformes o verdaderos positivos. Desde esta lógica, conforme a los resultados del presente estudio, las deyecciones de pollo son una matriz que podría ser objeto de vigilancia para clortetraciclina, por contar con niveles de excreción del orden de 666  $\mu\text{g}/\text{kg}$  a los 5 días post tratamiento hasta 179  $\mu\text{g}/\text{kg}$  a los 25 días post tratamiento.

Según lo descrito en la “Guía de validación de métodos de screening para residuos de medicamentos veterinarios”, de la Comunidad de Laboratorios de Referencia (CRLs, 2010), para validar un método, el antimicrobiano representativo de una familia de antimicrobianos, debe ser aquel que manifieste el halo de inhibición más pequeño en las condiciones utilizadas. De esta manera, los controles positivos fueron fortificados con OTC, de acuerdo a lo realizado por otros autores para validar métodos en riñón, músculo y fluido de pelvis renal (Myllyniemi *et al.*, 2001; Pikkemaat *et al.*, 2008; Gaudin *et al.*, 2010).

La capacidad de detección, definida como el contenido más pequeño del analito que puede ser detectado, identificado y/o cuantificado en una muestra con una probabilidad de error definida (EC, 2002), fue definida en 240  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , según la metodología original. Sin embargo, el método logró detectar actividad antimicrobiana a una concentración de 106,482  $\mu\text{g}/\text{kg}$  a los 18 días post tratamiento (menor concentración cuantificada), por lo que se sugiere que la metodología tendría una capacidad de detección igual o menor a esta concentración para deyecciones. Adicionalmente, los blancos matrices no manifestaron halo de inhibición, por lo que se puede aseverar que los componentes de las deyecciones que podrían actuar como factores inespecíficos inhibidores de crecimiento bacteriano no interfirieron en la interpretación del resultado.

Cabe destacar, que la metodología fue utilizada con el fin de medir la actividad antimicrobiana de los residuos, y no como un método de cribado, más aún contando con los

resultados de la cuantificación por LC-MS/MS, por lo tanto, se realizó una verificación para comprobar la veracidad de los resultados de los muestreos, y no necesariamente para validarlo como una nueva metodología. Respecto a lo último, Gaudin *et al.*, (2010) señalan que incluso son pocos los laboratorios que validan sus métodos de screening de acuerdo a la decisión 2002/657/EC, por considerarse una guía que entrega escasa información técnica, requerir de gran trabajo, y ser muy costoso. De todas maneras, de acuerdo a las altas concentraciones excretadas de CTC y epi CTC, y de que éstos mantenían su actividad antimicrobiana, sería apreciable validar un método de screening microbiológico en deyecciones de pollos para las distintas familias de antimicrobianos utilizadas en la industria avícola. Esto podría permitir el monitoreo del uso de antibióticos antes del beneficio del animal, la colección de muestras de manera no invasiva protegiendo su bienestar, y reducir los costos de los métodos químicos confirmatorios, a través de la introducción de un procedimiento preliminar de identificación microbiana.

Las tetraciclinas son una de las familias de antimicrobianos de mayor uso veterinario y humano. El tratamiento de enfermedades a través del uso de ellos en los animales, no solo trae como consecuencia intrínseca la emergencia de bacterias resistentes, sino que ello resulta también en la liberación de residuos al medio ambiente.

Respecto a la emergencia de bacterias resistentes, se conoce poco a qué concentraciones los antimicrobianos generan presión selectiva para generar bacterias resistentes y su proliferación en el medio ambiente, sin embargo, el ambiente selectivo puede ocurrir a concentraciones bajo las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI), la cual tradicionalmente es considerada como la concentración mínima capaz de provocar la resistencia (Pikkemaat *et al.*, 2016).

En lo que se refiere a la liberación de residuos al medio ambiente, las tetraciclinas han sido encontradas en diferentes compartimentos ecológicos, siendo una de las familias que exhiben mayor número de reportes de problemas ambientales, como lo es la inhibición del crecimiento de algunos organismos terrestres y acuáticos.

Berendsen *et al.*, (2014) sugieren que el análisis de antimicrobianos en heces de animales no solo permitiría obtener información sobre las tendencias de uso de antimicrobiano en los planteles productivos a través de un método de muestreo no invasivo, sino también, conocer

la diseminación de antibióticos al medio ambiente y sus posibles efectos eco toxicológicos. Además, podría llevar a un mejor entendimiento sobre la posible formación de resistencia bacteriana en el intestino de los animales, tema que ha cobrado gran relevancia a nivel de salud pública.

Desde esta perspectiva, el desarrollo de metodologías analíticas tanto cualitativas como cuantitativas, que permitan la detección y cuantificación de residuos antimicrobianos, en matrices alternativas, como deyecciones, puede contribuir a la mejor comprensión de estos temas, a la par que se permite el desarrollo de planes de control que actúen de manera eficaz y eficiente, aprovechando de mejor manera los recursos dispuestos para ello.

## CONCLUSIONES

1. Clortetraciclina y su epímero 4 epi clortetraciclina, continúan excretándose a través de deyecciones de pollos broiler tratados terapéuticamente, aun cumplido el periodo de resguardo para la formulación farmacéutica en músculo.
2. Los pollos tratados terapéuticamente, permanecen excretando clortetraciclina y su epímero 4 epi clortetraclina hasta el día de su beneficio, en altas concentraciones y de manera microbiológicamente activa.
3. De acuerdo al estudio de depleción, las concentraciones de estos residuos llegarían al día 69 post tratamiento a concentraciones igual o mayor al límite de detección definido para la técnica analítica (20µg/kg).
4. La cama broiler, compuesta principalmente por deyecciones de aves, es un subproducto de potencial riesgo de reingreso de residuos de clortetraciclina a la cadena alimentaria.
5. Las deyecciones podrían ser utilizadas como matriz de muestreo no invasivo en el monitoreo de uso de clortetraciclina en la industria avícola.

## BIBLIOGRAFÍA

- **ADACHI, F.; YAMAMOTO, A.; TAKAKURA, KI.; KAWAHARA, R.** 2013. Occurrence of fluoroquinolones and fluoroquinolone-resistance genes in the aquatic environment. *Sci. Total Environ.* 444: 508–514.
- **AGUNOS, A.; LÉGER, D.; CARSON, C.** 2012. Review of antimicrobial therapy of selected bacterial diseases in broiler chickens in Canada. *Can. Vet. J.* 2012(53): 1289–1300.
- **ALMEIDA, P.; SALLES, J.; FARÍAS, T.; CURVELO, J.** 2012. Aprovechamiento de patas de pollos como alternativa para disminuir residuos generados en los mataderos. *Inf. Tecnol.* 23 (4): 45 -52.
- **ÁLVAREZ, V.** 2009. Descripción de Sistemas de Producción de Engorda Bovina Utilizados por Productores Pertenecientes al Programa de Desarrollo Proveedores de Carnes Nuble S.A. Optar al Título de Ingeniero Agrónomo. Chillán, Chile. Facultad de Agronomía de la Universidad de Concepción. 19 p
- **ANADÓN, A.; GAMBOA, F.; MARTÍNEZ, MA.; CASTELLANO, V.; MARTÍNEZ, M.; ARES, i.; RAMOS, E.; SUAREZ, F.; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.** 2012. Plasma disposition and tissue depletion of chlortetracycline in the food producing animals, chickens for fattening. *Food Chem. Toxicol.* 50(8): 2714-2721.
- **ARIKAN, O.** 2008. Degradation and metabolization of chlortetracycline during the anaerobic digestion of manure from medicated calves. *J. Hazard. Mater.* 158: 485–490.
- **BERENDSEN, B.; WEGH, R.; MEMELINK, J.; ZUIDEMA, T.** 2014. The analysis of animal faeces as a tool to monitor antibiotic usage. *Talanta.* 132: 258-268.
- **BERENDSEN, B.J.; BOR, G.; GERRITSEN, H.W.; JANSEN, L.J.; ZUIDEMA, T.** 2013. The disposition of oxytetracycline to feathers after poultry treatment. *Food Addit. Contam.* 30(12):2102–2107

- **BOLAN, N.; SZOGI, A.; CHUASAVATHI, T.; SESHADRI, B.; ROTHRO CK, M.; PANNEERS ELVAM, P.** 2010. Uses and management of poultry litter. *World Poultry Sci. J.* 66: 673-698.
- **BRAIN, RA.; JOHNSON, D.; RICHARDS, SM.; SANDERSON, H.; SIBLEY, PK.; SOLOMON, KR.** 2004. Effects of 25 pharmaceutical compounds to *Lemna gibba* using a seven-day static-renewal test. *Environ. Toxicol. Chem.* 23:371–382.
- **CAPITA, R.; ALONSO-CALLEJA, C.** 2013. Antibiotic-resistant bacteria: A challenge for the food industry. *Crit. Rev. Food Sci.* 53: 11-48.
- **CE. COMISIÓN EUROPEA.** 2010. Directiva 2010/63/UE. *Diario oficial de la Unión Europea.* L 276: 33-79.
- **CHEN, G.; ZHAO, L.; DONG, Y.** 2011. Oxidative degradation kinetics and products of chlortetracycline by manganese dioxide. *J. Hazard Mater.* 193:128–138
- **CHEN, Y.; ZHANG, H.; LUO, Y.; SONG, J.** 2012. Occurrence and assessment of veterinary antibiotics in swine manures: A case study in East China. *Envir. Chem.* 57: 606-614
- **CHILE. MINISTERIO DE SALUD.** 2009. Ley 20.380 sobre protección de animales. 03 octubre 2009.
- **CHOPRA, I.; ROBERTS, M.** 2001. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, cations, molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65:232-260.
- **COMMUNITY REFERENCE LABORATORIES RESIDUES CRLs.** Guidelines for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines (initial validation and transfer) 20/1/2010.[en línea] <[https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/cs\\_vet-med-residues\\_guideline\\_validation\\_screening\\_en.pdf](https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/cs_vet-med-residues_guideline_validation_screening_en.pdf)> [consultado: 20-03-2017]
- **CONICYT. COMISIÓN NACIONAL DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA.** 2008. Manual de Normas de Bioseguridad. CONICYT. 2ª ed. Santiago, Chile.

- **CORNEJO, J.; GONZÁLEZ, P.; ARAYA, C.; MADDALENO, A.; SAN MARTIN, B.** 2012. Transfer and depletion of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in feathers of treated broiler chickens. Residues of veterinary drugs in food. Proceedings of the EuroResidue VII Conference, Egmond aan Zee, The Netherlands, 14-16 May, 2012. Volume 1, 2 and 3, 2012, pp. 683-688.
- **CORNEJO, J.; LAPIERRE, L.; IRAGÜEN, D.; PIZARRO, N.; HIDALGO, H.; SAN MARTIN, B.** 2010. Depletion study of three formulations of flumequine in edible tissues and drug transfer into chicken feathers. *J. Vet. Pharmacol. Therp.* 34(2): 168-175.
- **CORNEJO, J.; POKRANT, E.; KROGH, M.; BRICEÑO, C.; HIDALGO, H.; MADDALENO, A.; ARAYA, C.; SAN MARTÍN, B.** 2017a. Determination of Oxytetracycline and 4-Epi-Oxytetracycline Residues in Feathers and Edible Tissues of Broiler Chickens Using Liquid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry. *J. Food Prot.* 80(4): 619-625.
- **CORNEJO, J.; POKRANT, E.; ARAYA, D.; BRICEÑO, C.; HIDALGO, H.; MADDALENO, A.; ARAYA, C.; SAN MARTÍN, B.** 2017b. Residue depletion of oxytetracycline (OTC) and 4-epi-oxytetracycline (4-epi-OTC) in broiler chicken's claws by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Food Addit. Contam. Part A* 34(4): 494-500.
- **DAGHRIR, R.; DROGUI, P.** 2013. Tetracycline antibiotics in the environment: a review. *Environ. Chem. Lett.* 11:209–227
- **EC. EUROPEAN COMMISSION.** 2002. Comisión 2002/657/EC of Journal Europ. Comm. 221: 8-36.
- **EISNER, H.J.; WULF, R.J.** 1963. The metabolic fate of chlortetracycline and some comparisons with other tetracyclines. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 142: 122–131.
- **ELMUND, G.; MORRISON, S.; GRANT, D.; NEVINS, M.** 1971. Role of excreted chlortetracycline in modifying the decomposition process in feedlot waste. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 6: 129–132.

- **EMA. European Medicines Agency.** 2012. Sales of veterinary antimicrobial agents in 19 EU/EEA countries in 2010. EMA/88728/2012.
- **EMEA. EUROPEAN MEDICINES AGENCY.** 1997. Approach towards harmonisation of withdrawal periods. EMEA/CVMP/036/95. COMMITTEE FOR VETERINARY MEDICINAL PRODUCTS.
- **FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION.** 2011. VICH GL49 validation of analytical methods used in residue depletion studies. 22 p.
- **GADBERRY, S.** 2014. Feeding broiler litter to beef cattle. Arkansas, United States. University of Arkansas, Division of agriculture, Department of Animal Science, 6p. [consulta: 10-04-2015].
- **GAUDIN, V.; HEDOU, C.; RAULT, A.; VERDON, E.** (2010). Validation of a Five Plate Test, the STAR protocol, for the screening of antibiotic residues in muscle from different animal species according to European Decision 2002/657/EC. Food Addit. Contam. 27(7): 935-952.
- **GAUDIN, V.; HEDOU, C.; VERDON, E.** 2010. Validation of a five-plate test, the STAR protocol, for the screening of antibiotic residues in muscle from different animal species according to European Decision 2002/657/EC. Food. Addit. Contam. 27: 935-952.
- **GIACOMOZZI, J.** 2015. Actualización del mercado avícola. [en línea] <[http://www.odepa.cl/wp-content/files\\_mf/1428415820Aves201503.pdf](http://www.odepa.cl/wp-content/files_mf/1428415820Aves201503.pdf)> [consulta: 20-05-2015].
- **GULLBERG, E.; CAO, S.; BERG, OG.; ILLBÄCK, C.; SANDEGREN, L.; HUGHES, D.; ANDERSSON, D.** 2011. Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. PLOS pathog 7: e1002158.
- **HALLING-SORENSEN, B.** 2000. Algal toxicity of antibacterial agents used in intensive farming. Chemosphere 40:731–739.

- **HERRERA, M.** 2008. Aprovechamiento de los subproductos o residuos en la industria avícola para la producción de harinas de origen animal. *Rev. Virtual Pro.* 82: 1-16.
- **HU, JY.; SHI, JC.; CHANG, H.; LI, D.; YANG, M.** 2008. Phenotyping and genotyping of antibiotic-resistant *Escherichia coli* isolated from a natural river basin. *Environ. Sci. Technol.* 42: 3415–3420.
- **HU, X.; QIXING, Z.; LUO, Y.** 2010. Occurrence and source analysis of typical veterinary antibiotics in manure, soil, vegetables and groundwater from organic vegetable bases, northern China. *Environ. Pollut.* 158: 2992-2998
- **HUI-ZHU, W.; YI, L.; WEN-QING, X.; QI. XING, Z.; BAO-HUA, T.; YUAN-YUAN, W.** 2008. Ecotoxic effects of tetracycline and chlortetracycline on aquatic organisms. *J.Agro.Environ.Sci.*
- **JACOBSEN, AM.; HALLING-SORENSEN, B.** 2006. Multi-component analysis of tetracyclines, sulfonamides and tylosin in swine manure by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 384: 1164–1174.
- **JEONG, J.; SONG, W.; COOPER, WJ.; JUNG, J.; GREAVES, J.** 2010. Degradation of tetracycline antibiotics: mechanisms and kinetic studies for advanced oxidation/reduction processes. *Chemosphere* 78(5): 533–540
- **KANG, D.; GUPTA, S.; ROSEN, C.; FRITZ, V.; SINGH, A.; CHANDER, Y.; MURRAY, H.; ROHWER, C.** 2013. Antibiotic uptake by vegetable crops from manure-applied soils. *J.Agric. Food Chem.* 61: 9992-10001.
- **KORSRUD, G.; BOISON, J.; NOUWS, J.; MACNEIL, J.; MacNeil, J.** 1998. Bacterial inhibition tests used to screen for antimicrobial veterinary drug residues in slaughtered animals. *J AOAC. Int.* 81(1): 21-24.
- **LATHERS, C.** 2001. Role of Veterinary Medicine in Public Health: Antibiotic use in food animals and humans and the effect on evolution of antibacterial resistance. *J. Clin. Pharmacol.* 41: 595-599.

- **LI, Y.X.; ZHANG, X.L.; LI, W.; LU, X.; LIU, B.; WANG, J.** 2013. The residues and environmental risks of multiple veterinary antibiotics in animal faeces,” Environmental Monitoring and Assessment. Environ. Monit. Assess. 185: 2211-2220.
- **LÓPEZ-PEÑALVER, J.; SÁNCHEZ, M.; GÓMEZ, C.; RIVERA.** 2010. Photodegradation of tetracyclines in aqueous solution by using UV and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>oxidation processes. J. Chem.Technol. Biot. 85:1325–1333.
- **MARCU, A.; VACARU-OPRIȘ, I.; DUMITRESCU<sup>1</sup>, G.; PETCULESCU, L.; MARCU, A.; NICULA, M.; PEȚI, I.; DRONCA<sup>1</sup>, D.; KELCIOV, B.; MARIȘ, C.** 2013. The influence of genetics on economic efficiency of broiler chickens growth.J. Anim.Sci. Biotechnol. 46 (2): 330-346.
- **MARTÍNEZ-CARBALLO, E.; GONZALEZ-BARREIRO, C.; SCHARF, S.; GANS, O.** 2006. Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria. Environ. Pollut. 148: 570-579
- **MASSÉ, D.; SAADY, N.; GILBERT, Y.** 2014. Potential of biological processes to eliminate antibiotics in livestock manure: An overview. Animals. 4: 146-163.
- **MICHAEL, HF.; JAMES, OB.; DIANA, SA.** 2007. Chlortetracycline detoxification in maize via induction of Glutathione-S-transferases after antibiotic exposure. Environ. Sci. Technol. 41:1450–1456.
- **MONTFORTS, M.; KALF, D.; VAN VLAARDINGEN, P.; LINDERS, J.** 1999. The exposure assessment for veterinary medicinal products. Sci. Total Environ. 225: 119–133.
- **MYLLYNIEMI, A.; NUOTIO, L.; LINDFORS, E.; RANNIKKO, R.; NIEMI, A.; BÄCKMAN, C.** 2001. A microbiological six-plate method for the identification of certain antibiotic groups in incurred kidney and muscle samples. Analyst 126(5): 641-646.
- **OMS. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD.** 2014. Resistencia antimicrobiana, reporte global en vigilancia. [en línea] [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf?ua=1)

- **PAN, X.; QIANG, Z. BEN, W.; CHEN, M.** 2011. Residual veterinary antibiotics in swine manure from concentrated animal feeding operations in Shandong Province, China. *Chemosphere*. 84: 695-700
- **PIKKEMAAT, M.** 2009. Microbial screening methods for detection of antibiotic residues in slaughter animals. *Anal. Bioanal. Chem.* 395(4): 893-905.
- **PIKKEMAAT, M.; OOSTRA VAN DIJK, S.; SCHOUTEN, J.; RAPALLINI, M.; VAN EGMOND, H.** 2008. A new microbial screening method for the detection of antimicrobial residues in slaughter animals: The Nouws antibiotic test (NAT-screening). *Food Control* 19(8): 781-789.
- **PIKKEMAAT, M.; RAPALLINI, M.; ZUIDEMA, T.; ELFERINK, J.; OOSTRA VAN DIJK, S.; DRIESSEN VAN LANKVELD, W.** 2011. Screening methods for the detection of antibiotic residues in slaughter animals: comparison of the European Union Four-Plate Test, the Nouws Antibiotic Test and the Premi® Test (applied to muscle and kidney). *Food Addit Contam Part A* 28(1): 26-34.
- **PIKKEMAAT, M.; YASSIN, H.; FELLS, H.; BERENDSEN, B.** 2016. Antibiotic residues and resistance in the environment (No. 2016.009). RIKILT Wageningen UR. 32p.
- **REGULATION, O. J. E. U.** 2003. No 1831/2003 of the European Parliament and Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. *Official J. Eur. Commun.* 268: 29-43.
- **SAG. SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO.** 2006. Diagnóstico de la problemática ambiental de los residuos generados por la producción de aves y vacunos de leche en Chile y capacitación en la evaluación de planteles pecuarios. [en línea]. <[http://www.sag.cl/sites/default/files/RESIDUOS\\_AVES\\_VACUNOS\\_LECHE.pdf](http://www.sag.cl/sites/default/files/RESIDUOS_AVES_VACUNOS_LECHE.pdf)> [consulta: 10-06-2015].
- **SAG. SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO.** 2010. Planteles de Animales Bovinos Bajo Certificación Oficial. Gobierno de Chile. Ministerio de Agricultura. [en línea] <[http://www.sag.cl/sites/default/files/I-PP-IT-016\\_bovinos.pdf](http://www.sag.cl/sites/default/files/I-PP-IT-016_bovinos.pdf)> (consulta: 05-10-2017).

- **SAG. SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO.** 2015. Sistema en línea de búsqueda de medicamentos veterinarios autorizados por el SAG. [en línea]. <[http://medicamentos.sag.gob.cl/ConsultaUsrPublico/BusquedaMedicamentos\\_1.asp](http://medicamentos.sag.gob.cl/ConsultaUsrPublico/BusquedaMedicamentos_1.asp)> [consulta: 17-04-2015]
- **SAN MARTÍN, B.; CORNEJO, J.; IRAGÜEN, D.; HIDALGO, H.; ANADÓN, A.** 2007. Depletion study of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in edible tissues and feathers of white leghorn hens by liquid chromatography couple with tandem mass spectrometry. *J. Food Protect.* 70 (8): 1952-1957.
- **SARMAH, A.K.; MEYER, M.T.; BOXAL, A.B.A.** 2006. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere.* 65: 725–759.
- **SUMANO, H.; GUTIÉRREZ, L.** 2010. *Farmacología Clínica en Aves Comerciales.* 4a ed. Interamericana Mc-Graw-Hill. México, DF, México.
- **US FDA. United States Food and Drug Administration.** 2009. NARMS Retail meat annual report 2009. [en línea] <<http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/SafetyHealth/AntimicrobialResistance/NationalAntimicrobialResistanceMonitoringSystem/ucm257561.htm>> [consulta: 15-03-2014].
- **VAN DER WATT, H.; SUMMER, M.; CABRERA, M.** 1994. Bioavailability of copper, manganese, and zinc in poultry litter. *J. Environ. Qual.* 23:43-49.
- **VERMEULEN, B.; DE BACKER, P.; REMON, JP.** 2002. Drug administration to poultry. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54(6): 795-803.
- **WU, Y.; FASSIHI, R.** 2005. Stability of metronidazole, tetracycline HCl and famotidine alone and in combination *Int. J. Pharm. Int.* 290(1): 1-13.
- **XIE, X.; ZHOU, Q.; HE, Z.; BAO, Y.** 2010. Physiological and potential genetic toxicity of chlortetracycline as an emerging pollutant in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Environ. Toxicol. Chem.* 29:922–928.

- **XU, W.; ZHANG, G.; LI, X.; ZOU, S.; LI, P.; HU, Z.; LI, J.** 2007. Occurrence and elimination of antibiotics at four sewage treatment plants in the Pearl River Delta (PRD), South China. *Water Res.* 41:4526–4534.
- **YANG, L.; YING, G.; SU, H.; STAUBER, JL.; ADAMS, MS.; BINET, MT.** 2008. Growth-inhibiting effects of 12 antibacterial agents and their mixtures on the freshwater microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Environ.Toxicol.Chem.* 27:1201–1208.
- **ZHAO, L.; DONG, Y.; WANG, H.** 2009. Residues of veterinary antibiotics in manures from feedlot livestock in eight provinces of China. *Sci. Total Environ.* 408 (2010) 1069–1075.

## ANEXOS

### Anexo 1: Certificado Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.



UNIVERSIDAD DE CHILE  
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias  
Comité de Bioética Animal

Santiago, 11 de Noviembre de 2013

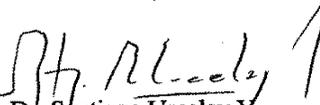
#### CERTIFICADO N° 03-2013

En relación con los procedimientos propuestos para el uso de animales experimentales, tenida a la vista la metodología del Proyecto: **“Bioacumulación de Oxitetraciclina, clortetraciclina y sus efímeros en plumas de aves tratadas y su relación con la concentración de estos residuos en tejidos comestibles”** presentado al concurso FIV-2013, cuyo investigador principal es la **Dra. Javiera Cornejo**, y sus detalles contenidos en el Formulario para obtención de certificado de Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, este Comité certifica que el Proyecto satisface lo estipulado en la guía de principios directrices internacionales para el uso de animales en investigación biomédica, elaborada por el Consejo para las Organizaciones Internacionales de las Ciencias Biomédicas, adecuada y adoptada por este Comité, y se ajusta a la legislación chilena vigente sobre la materia, incluida la Norma NCh 324-2011.

A este respecto este Comité entiende que el Investigador Responsable tiene la idoneidad necesaria para el manejo de las aves que serán sujeto de estudio, y cuenta con un recinto apto para la mantención y supervisión de éstas durante el transcurso de la investigación dentro de la unidad de Patología Aviar de FAVET.

  
Dra. Tamara Tadich G.  
Director  
Comité de Bioética Animal



  
Dr. Santiago Urcelay Y.  
Presidente  
Comité de Bioética Animal

## **Anexo 2: Metodología analítica para la extracción de Clortetraciclina y 4 epi Clortetraciclina en deyecciones, por LC-MS/MS.**

1. Homogeneizar la muestra con una varilla de madera.
2. Pesar 2gr en un tubo falcon de 50ml.
3. Fortificar y agregar estándar interno TC-d6.
4. Añadir 4ml de buffer EDTA- McIlvain y 1ml de acetonitrilo.
5. Agitar la muestra en vórtex durante 10 minutos.
6. Centrifugar a 3500 rpm durante 10min.
7. Pasar sobrenadante por una jeringa de 10ml acondicionada con lana de vidrio.
8. Transferir extracto a un tubo falcon y diluir por adición de 13ml de buffer EDTA-McIlvain.
9. Centrifugar a 3500 rpm durante 10min.
10. Acondicionar columna de extracción de fase sólida (SPE) OASIS™ HLB (6cc) con 5ml de metanol y 5ml de agua MilliQ.
11. Aplicar completamente el extracto en la columna.
12. Lavar la columna con 5ml de agua MilliQ.
13. Secar al vacío por 5 minutos.
14. Eluir con 5ml de metanol.
15. Evaporar bajo flujo de N<sub>2</sub>, a 40-50°C.
16. Reconstituir con 200µl de metanol y 300µl de agua MilliQ.
17. Centrifugar a 1700 rpm durante 5min.
18. Pasar extracto a tubo eppendorf y centrifugar a 3500 rpm durante 10min.
19. Traspasar a vial utilizando una jeringa de 1ml, filtrando por millipore.

Para la preparación del buffer EDTA-McIlvain, se pesaron 10,5gr de ácido cítrico y 14,2gr de fosfato disódico, los cuales se solubilizaron en 500ml de agua HPLC cada uno. Luego, se mezclaron en un frasco, 500ml de la solución ácido cítrico y 280ml de la solución fosfato disódico y se corroboró el pH 4 de la solución. Finalmente se agregó 3,025gr de Titriplex III.

**Anexo 3: Metodología analítica para la preparación de Medio de Cultivo con esporas *Bacillus cereus* ATCC 11778, para Screening Microbiológico**

1. Pesar 5 gr de Medio 8 y disolver con 200ml de agua Mili-Q.
2. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos en autoclave.
3. Enfriar a 50°C.
4. Agregar 2ml de una suspensión de esporas *B.cereus* ATCC 11778. Mezclar homogéneamente.
5. A cada placa agregar 10 ml de la mezcla agitando homogéneamente.
6. Dejar enfriar a T° ambiente (placa cerrada) en una superficie plana.

**Anexo 4: Metodología analítica para la extracción de Clortetraciclina y 4 epi Clortetraciclina en deyecciones, por Screening Microbiológico**

1. Mezclar 50ml de ácido cítrico con 50ml de hidróxido de potasio (Solución A).
2. Mezclar 35 ml de Solución A, 35ml de acetona y 30ml de agua destilada (buffer cítrico acetona).
3. Pesar 5gr de muestra en tubos falcon protegidos de la luz y diluirlo en 20ml de buffer cítrico acetona.
4. Homogeneizar por 15 minutos, sonicar por 15 minutos, homogeneizar por 10 minutos y sonicar por 15 minutos.
5. Centrifugar a 3000 rpm por 15 minutos.
6. Extraer sobrenadante para trabajar.
7. Disponer 200µl en cilindros metálicos dispuestos sobre las placas.
8. Refrigerar placas por 30 minutos.
9. Incubar a 30°C por 24 horas.
10. En una placa (control) poner un fortificado (extraído de acuerdo al protocolo) con Oxitetraciclina 0,24 µg/g (240 ppb).
11. Lectura halo con un vernier de precisión: 1,4cm ± 0,2 cm.

## Anexo 5: Verificación Metodología analítica para la extracción de Clortetraciclina y 4 epi-Clortetraciclina en deyecciones por LC-MS/MS.

- 1) **Especificidad:** En las muestras blanco de deyecciones no se detectaron interferencias en las zonas de elución esperada del analito para dicha matriz, por lo tanto, el método se consideró específico.

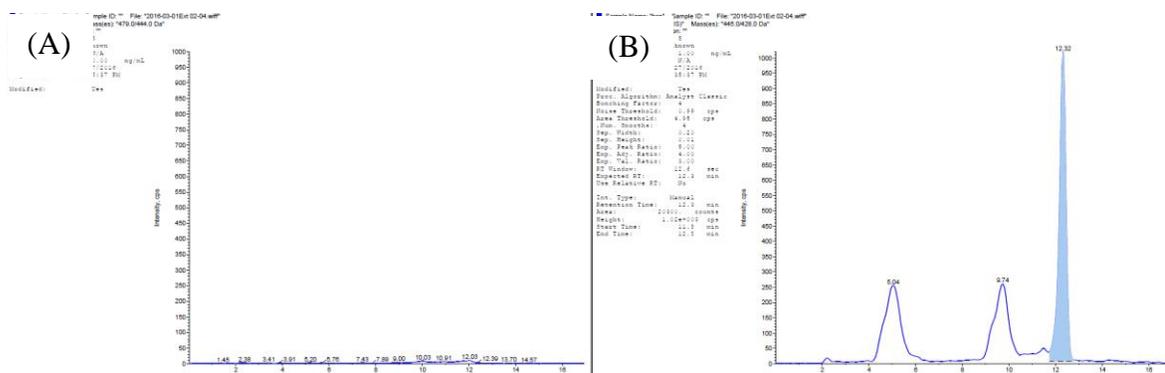


Figura Nro. 3: (A) Cromatograma representativo de una muestra matriz blanco, donde no se observan interferentes en el tiempo de elución esperado para CTC. (B) Peak cromatográfico del EI.

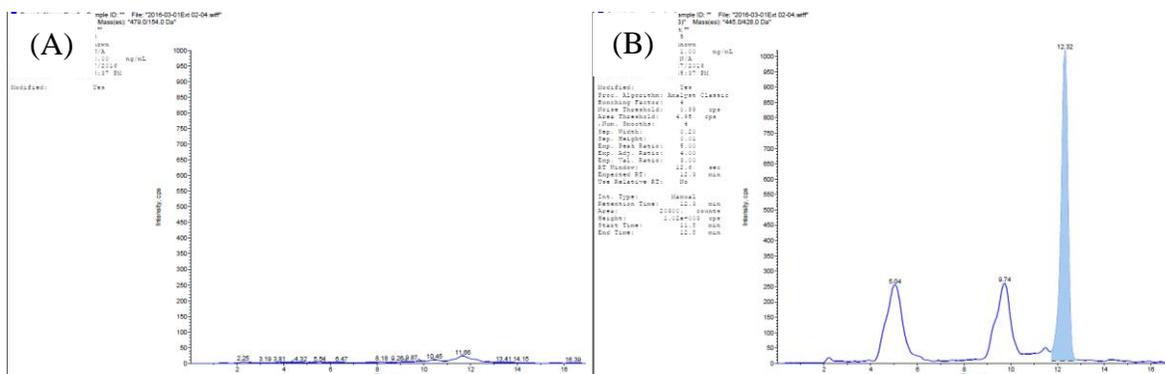


Figura Nro. 4: (A) Cromatograma representativo de una muestra matriz blanco, en donde no se observan interferentes en el tiempo de elución esperado para 4 epi CTC. (B) Peak cromatográfico del EI.

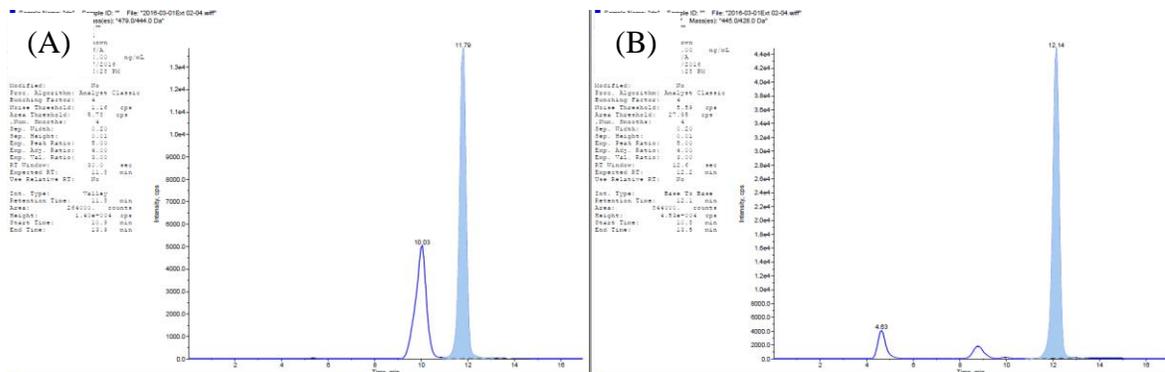


Figura Nro. 5: (A) Cromatograma representativo de inyecciones de droga pura donde se observa el peak cromatográfico de CTC. (B) Peak cromatográfico del EI.

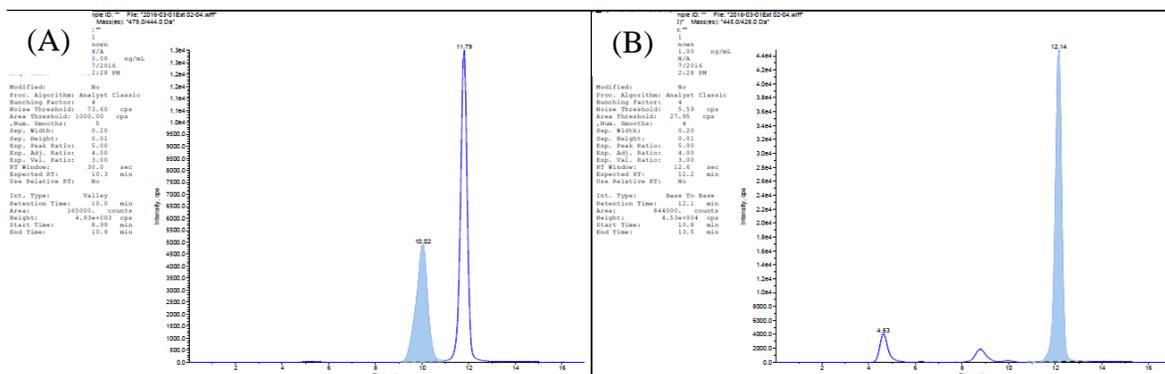


Figura Nro. 6: (A) Cromatograma representativo de inyecciones pura donde se observa el peak cromatográfico de 4 epi CTC. (B) Peak cromatográfico del EI.

**2) Límite de Detección (LD):** Para su determinación, se fortificaron muestras blanco con diferentes concentraciones de clortetraciclina (10, 20, 30, 40 y 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), seleccionándose la concentración en la cual la relación señal ruido (S/N) entregada por el pico cromatográfico fuera a lo menos 3:1. Esta relación fue observada al emplear una concentración de 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

**3) Linealidad (curva de calibración):** Para evaluar este parámetro, se realizaron curvas en replicado a diferentes concentraciones (20, 40, 60, 80, 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), siendo el punto más bajo la concentración definida como el LD. Se acepta el cumplimiento de las condiciones de linealidad de las curvas cuando el factor de determinación ( $R^2$ ) calculado, presenta un valor superior a 0,95. El cumplimiento de estas condiciones

permite la cuantificación de una muestra que presente concentraciones mayores al LD (20 µg/kg) utilizando las curvas de calibración y aplicando la fórmula  $y = a + bx$ .

**Curvas representativas de la verificación del parámetro de Linealidad para CTC y 4 epi CTC en deyecciones de pollos broiler.**

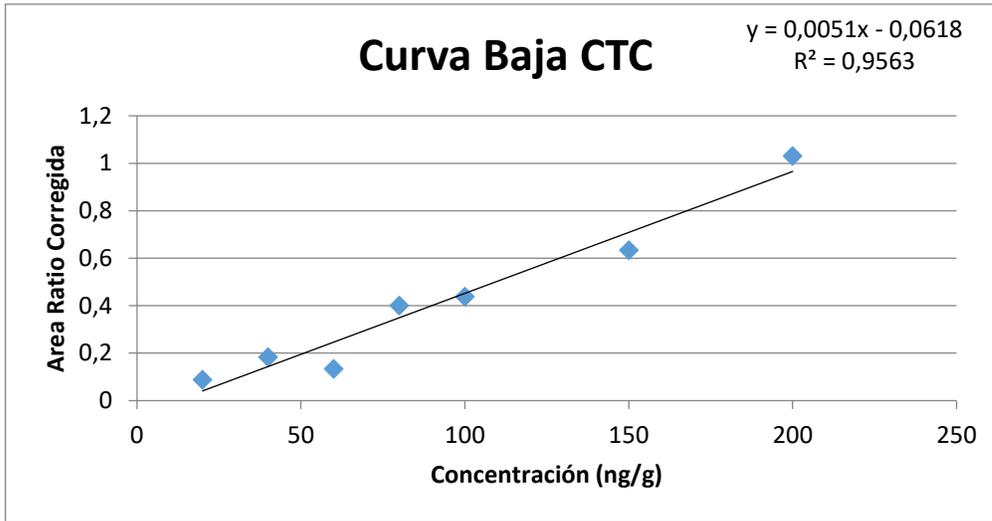


Figura Nro. 7: Curva de calibración “baja” fortificada a 20, 40, 60, 80, 100 µg/kg, construida para la verificación del parámetro de Linealidad, para el analito CTC.

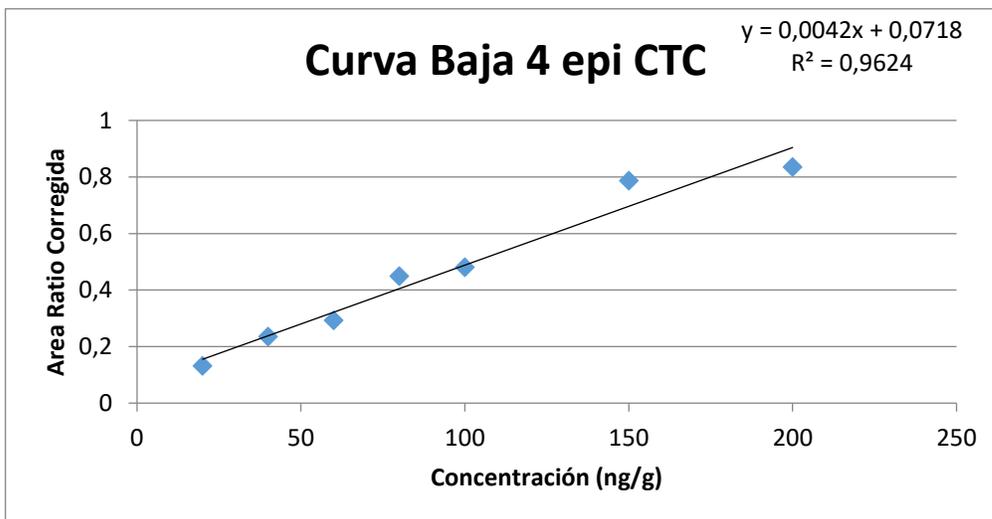


Figura Nro. 8: Curva de calibración “baja” fortificada a 20, 40, 60, 80, 100 µg/kg, construida para la verificación del parámetro de Linealidad, para el analito 4 epi CTC.

**Anexo 6: Curvas representativas para la cuantificación de las concentraciones de CTC y 4 epi CTC en deyecciones de pollos broiler.**

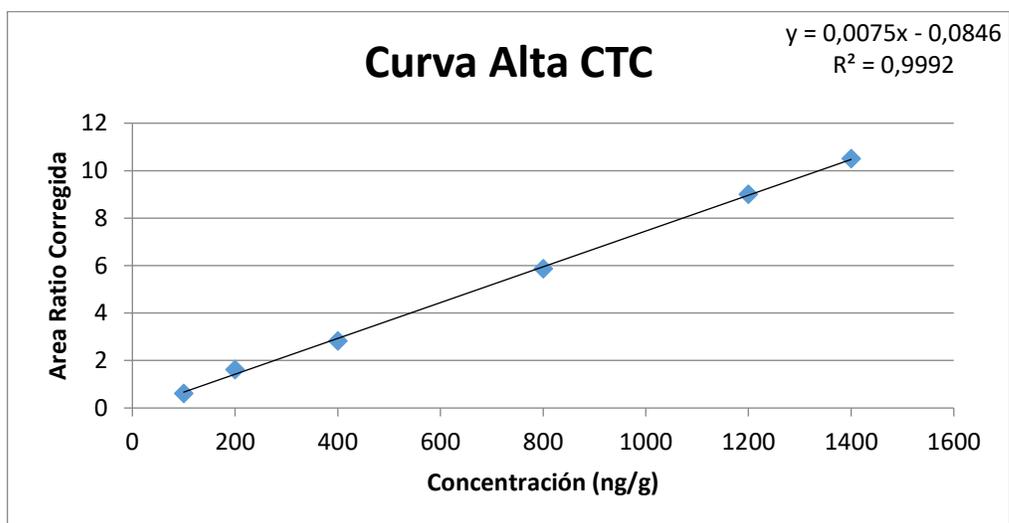


Figura Nro. 9: Curva de calibración “alta” fortificada a 100, 200,400, 800, 1200, y 1400  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , construida para la cuantificación de CTC en deyecciones de pollos broiler, a partir de muestras blanco.

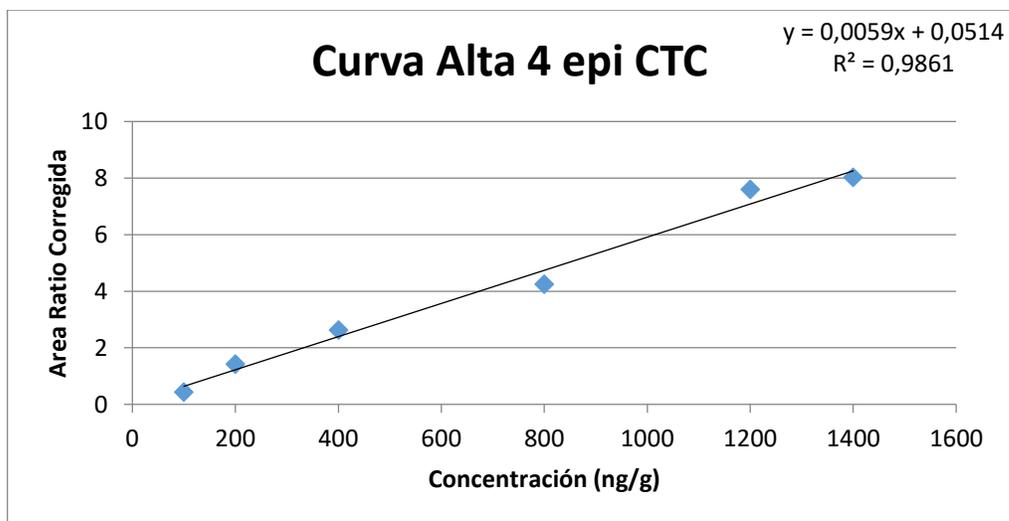


Figura Nro. 10: Curva de calibración “alta” fortificada a 100, 200,400, 800, 1200, y 1400  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , construida para la cuantificación de 4 epi CTC en deyecciones de pollos broiler, a partir de muestras blanco.

**Anexo 7: Verificación metodología analítica “screening microbiológico”.**

**Tabla Nro. 5: Verificación metodología de "screening" microbiológico para detección de actividad antimicrobiana de CTC y 4 epi CTC en deyecciones de pollos broiler**

Muestra	Halo	Muestra	Halo	Muestra	Halo
Droga pura	2,9	Fortificado	1,2	Blanco	ND*
Droga pura	2,7	Fortificado	1,2	Blanco	ND*
Droga pura	2,7	Fortificado	1,3	Blanco	ND*
Droga pura	2,7	Fortificado	1,2	Blanco	ND*
Droga pura	2,7	Fortificado	1,3	Blanco	ND*
Droga pura	2,7	Fortificado	1,2	Blanco	ND*
Droga pura	2,6	Fortificado	1,2	Blanco	ND*
Droga pura	2,7	Fortificado	1,2	Blanco	ND*
Droga pura	2,7	Fortificado	1,2	Blanco	ND*
Droga pura	2,9	Fortificado	1,6	Blanco	ND*

\* No Detectado, halo de inhibición menor a  $1,4 \pm 0,2$