



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

**IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CONCENTRACIONES
DE SULFONAMIDAS EN DEYECCIONES DE POLLOS BROILERS.**

Fernando Camilo Pérez Maturana

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

PROFESORA GUÍA: JAVIERA CORNEJO KELLY

Proyecto FONDECYT de iniciación a la investigación 11140530

SANTIAGO, CHILE
2019



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

**IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE
CONCENTRACIONES DE SULFONAMIDAS EN DEYECCIONES
DE POLLOS BROILERS.**

Fernando Camilo Pérez Maturana

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

NOTA FINAL:

PROFESORA GUÍA: JAVIERA CORNEJO KELLY

PROFESORA CORRECTORA: LISETTE LAPIERRE

PROFESORA CORRECTORA: DANIELA IRAGÜEN

SANTIAGO, CHILE
2019

ÍNDICE DE CAPÍTULOS

INTRODUCCIÓN.....	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	2
HIPÓTESIS.....	5
OBJETIVO GENERAL.....	5
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	5
MATERIALES Y MÉTODOS.....	5
1. Animales experimentales y tratamiento.....	5
2. Formulaciones farmacéuticas.....	7
3. Tratamientos de las muestras y análisis cromatográficos.....	7
Metodología de extracción de sulfonamidas.....	7
Verificación de metodología analítica.....	8
Bioseguridad.....	8
RESULTADOS.....	9
Parámetros.....	9
Cuantificación.....	11
Depleción.....	12
DISCUSIÓN.....	14
CONCLUSIONES.....	15
BIBLIOGRAFÍA.....	17
PLANIFICACIÓN.....	22
ANEXOS.....	23

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tabla 1. Tiempos de retención de 6 inyecciones de droga pura (sulfacloropiridazina) y 6 inyecciones de estándar interno (sulfametazina 13C6) y sus respectivos CV%.....	9
Tabla 2. Cálculo del LC del analito sulfacloropiridazina a partir del análisis de 10 controles en matrices de heces de pollos broilers fortificadas.....	10
Tabla 3. Tabla 3. Cuantificación de sulfacloropiridazina en heces de pollos broilers de los 7 muestreos postratamiento.....	13

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Curva de calibración de 5 puntos en matrices de heces de pollos broilers fortificadas a 10, 20, 40, 80 y 100 ppb.....	10
Figura 2. Curva baja para la cuantificación de sulfacloropiridazina en la matriz de heces de pollos broilers a partir de 4 puntos: 10, 20, 80 y 160 ng/g.....	11
Figura 3. Curva alta para la cuantificación de sulfacloropiridazina en la matriz de heces de pollos broilers a partir de 4 puntos: 80, 160, 600 y 800 ng/g.....	11
Figura 4. Línea de tiempo de la fase experimental.....	12
Figura 5. Gráfico de depleción de las concentraciones de sulfacloropiridazina en heces de pollos broilers.....	13

RESUMEN

Los antimicrobianos siguen siendo la principal herramienta terapéutica en el tratamiento de enfermedades bacterianas presentes en la industria avícola. Sin embargo, no cumplir con las indicaciones de dosis y/o periodos de resguardo, resultan ser causantes de efectos toxicológicos, carcinogénicos, inmunológicos, microbiológicos y de contribución a la emergencia de resistencia bacteriana, generando una adversidad para el medio ambiente, los animales y el ser humano.

Las sulfonamidas son un grupo de antibióticos sintéticos y uno de los más utilizados en la industria avícola para el tratamiento de enfermedades digestivas y respiratorias. En este estudio se ha utilizado sulfacloropiridazina Coliprim 10% vía oral durante 5 días consecutivos.

La cama broiler es un subproducto generado en la industria avícola, y sus diversas utilidades significan un riesgo de transmisión de bacterias patógenas y residuos de antimicrobianos que hayan sido administrados a los animales tratados. Existe evidencia científica que residuos de variados antibióticos persisten en las heces de animales tratados, este estudio tiene por objetivo identificar y cuantificar las concentraciones de sulfonamidas en deyecciones de pollos broilers.

Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MSMS) fue la metodología analítica empleada en este estudio, que para su implementación y verificación se trabajó en las dependencias del laboratorio de farmacología veterinaria de FAVET. Los resultados obtenidos permitieron establecer un trabajo sustentado en la evaluación de parámetros, que corresponden al tiempo de retención del analito, especificidad, límite de detección (LD), límite de cuantificación (LC) y linealidad de la curva de calibración, cada uno de ellos cumpliendo con sus criterios de aceptación.

Las concentraciones de sulfacloropiridazina fueron cuantificadas a través de la ecuación del análisis de regresión lineal de las curvas de calibración en matriz fortificada. El estudio de depleción determina que las concentraciones de sulfonamidas en deyecciones de pollos broilers tratados, son detectables superando el límite máximo residual de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para tejidos comestibles hasta 5 días postratamiento. Sin embargo, a los 32 días postratamiento ya

finalizado el periodo de resguardo, las concentraciones de sulfonamidas en las deyecciones de los pollos broilers tratados están bajo el límite de detección.

En este estudio se evidencia que la cama broiler representa un riesgo de reingreso de residuos de antibióticos para la cadena alimenticia y el medio ambiente, siendo una buena oportunidad de muestreo no invasivo para el monitoreo de medicamentos veterinarios.

Palabras clave: Implementación y verificación de metodología analítica, cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, sulfonamidas, cama broiler, residuos antimicrobianos, depleción.

ABSTRACT

Antimicrobials are still the main therapeutic tool in the treatment of bacterial diseases present in the poultry industry. However, failure to comply with the indications of dose and/or periods of receipt, turn out to be toxicological effects, carcinogenic, immune microbiological cause and contribution to the emergence of bacterial resistance, generating an adversity for the environment, animals and human beings.

Sulfonamides are a group of synthetic antibiotics and one of the most used in the poultry industry for the treatment of digestive and respiratory diseases. In this study has been used sulfachloropyridazine Coliprim 10% orally for 5 consecutive days.

The broiler bed is a by-product produced in the poultry industry, and their various uses mean a risk of transmission of pathogenic bacteria and antimicrobial residues that have been administered to the animals treated. There is scientific evidence that various antibiotic residues persist in the feces of treated animals, this study aims to identify and quantify the concentrations of sulfonamides in chickens broilers manure.

Liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MSMS) was the analytical methodology used in this study, for its implementation and verification were worked in the in the outbuildings of the laboratory of veterinary pharmacology of FAVET. The results obtained allowed to establish a work based on the evaluation of parameters, corresponding

to the retention time of the analyte, specificity, detection limit (LD), limit of quantification (LC) and linearity of the calibration curve, each of them fulfilling their acceptance criteria.

Sulfachloropyridazine concentrations were quantified through the equation of linear regression analysis of the fortified matrix calibration curves. The study of depletion determines concentrations of sulfonamides in chickens treated broilers manure, they are undetectable to overcoming the residual maximum limit of 100 $\mu\text{g/kg}$ for fabrics grocery until 5 days after treatment. However, at 32 days post-treatment already finished the period of receipt, the concentrations of sulfonamides in the manure of treated broilers chickens are below the limit of detection.

This study shows that the broiler bed represents a risk of re-entry of antibiotic residues for the food chain and the environment, being a good non-invasive sampling opportunity for the monitoring of veterinary medicines.

Key words: implementation and verification of analytical methodology, liquid chromatography coupled to mass spectrometry, sulfonamides, broilers bed, antimicrobial residues, depletion.

INTRODUCCIÓN

Mundialmente el sector pecuario avícola ha mostrado un crecimiento explosivo en la historia de la producción animal, su tendencia al alza se ha dado en forma continua como respuesta a una creciente demanda de proteína animal en países como China, Brasil e India. El planeta en 2014 alcanzó una producción de carne de ave de 108,7 millones de toneladas, representando el 35% del total de carnes producidas.

En Chile la industria avícola está consolidada como una de las principales del sector agropecuario, esto se refleja en el beneficio total que ha crecido a una tasa anual promedio de 3% en los últimos veinte años. La industria avícola chilena en 2014 produjo un total de 669.054 toneladas de carne de ave, de las cuales 84,7% correspondió a carne de pollos broilers. Además, se destaca la inversión en tecnología, procesos productivos y capacitación, con especial preocupación en temas relacionados con sanidad, inocuidad, trazabilidad, sustentabilidad y bienestar animal.

Como en todo sistema productivo, los planteles avícolas se ven afectados por enfermedades bacterianas, que son combatidas a través de diversas medidas, entre ellas la aplicación de diversos antibióticos, siguiendo indicaciones de dosis y periodos de resguardos para cada fármaco. Los manejos inapropiados pueden resultar ser causantes de efectos adversos en animales, el ser humano y el ambiente. El uso de antibióticos aporta a la formación de resistencia bacteriana en el intestino de animales, siendo un efecto secundario de los sistemas productivos; y un impacto en el ambiente, que es considerado como un efecto ecotoxicológico.

Actualmente muchos sistemas productivos utilizan la cama broiler como pienso en formulaciones alimentarias, transformándose en una fuente potencial de reincorporación de residuos a la cadena alimentaria. Por lo mismo, es necesario determinar la concentración de antibióticos presentes en las deyecciones de las aves una vez finalizado algún tratamiento.

En el presente estudio se trabajará con sulfacloropiridazina (Coliprim Solución), para luego identificar y cuantificar concentraciones en deyecciones de pollos broilers.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El uso de antibióticos en el ámbito de la producción animal data de hace medio siglo. Las primeras experiencias en pollos que demostraron sus efectos beneficiosos se constatan a finales de los años 40, y en la década de los 60 su empleo comercial fue ampliamente extendido en Europa (Cepero, 2006). Los antibióticos son ampliamente utilizados para el tratamiento y prevención de enfermedades en producción aviar (APUA, 2010; Landoni y Albarelllos, 2015). Sin embargo, su uso en animales de producción puede afectar la salud de las personas, debido a la presencia de residuos de fármacos en los alimentos, que causan diversos efectos adversos y propagación de resistencia bacteriana (Martínez, 2012).

Las sulfonamidas son un grupo de antibióticos sintéticos, que han cumplido un rol importante como quimioterapéuticos eficaces en infecciones bacterianas y protozoarias. En medicina veterinaria han sido utilizadas como promotores del crecimiento y en la prevención de una serie de enfermedades digestivas y respiratorias (Shao *et al.*, 2005). En Chile se prohíbe su uso con fines exclusivamente preventivos y de promoción de crecimiento (SAG, 2017).

La multiplicación bacteriana es inhibida por la acción de sulfonamidas al actuar como inhibidor competitivo del ácido p-aminobenzoico, que junto a pteridina forman moléculas de ácido fólico (Yu *et al.*, 2011), el cual es necesario para la síntesis de material genético de una nueva bacteria; son compuestos que muestran una estabilidad considerable, de modo que no pueden ser fácilmente convertidos en productos seguros de degradación por medio de procesos metabólicos (Chen y Schwack, 2014).

En la Unión Europea las sulfonamidas se encuentran en los grupos de antibióticos mayormente administrados en la cría de animales. Por lo tanto, el control de sus residuos en los tejidos comestibles de origen animal es de suma importancia en el marco de la inocuidad alimentaria (Chen y Schwack, 2014). Los residuos de sulfonamidas en los alimentos de origen animal son de gran preocupación, debido a que son perjudiciales para la salud del consumidor y podrían inducir el desarrollo de resistencia bacteriana (Yu *et al.*, 2011). Los efectos adversos destacados en la población humana son reacciones alérgicas y tóxicas (Huang *et al.*, 2013) y potencial factor cancerígeno (Fang *et al.*, 2006).

Una variedad de métodos se ha utilizado para medir residuos de sulfonamidas en matrices biológicas, incluyendo cromatografía en capa fina (TLC), HPLC con UV, UV-DAD o detección de fluorescencia, LC-MSMS, electroforesis capilar de alto rendimiento (HPCE), electroforesis capilar de alta eficacia (HPCE), cromatografía de gases (GC), junto con inmunoensayos enzimáticos (ELISA), biosensores de inmunoensayo y métodos microbiológicos (Chitescu *et al.*, 2014). Yu *et al.* (2011) utilizaron un método cuantitativo de HPLC y un método confirmatorio de LC-MSMS para la determinación simultánea de 18 sulfonamidas en músculo, hígado y riñones de cerdos, bovinos y cerdos, resultando ser una metodología rápida, precisa y sensible.

Existe evidencia que los animales en sus heces y orina excretan de un 30 a 90% de una dosis administrada de antibiótico en forma no metabolizada o como metabolitos activos (Massé *et al.*, 2014). Berendsen *et al.* (2014) encontraron trazas de 44 tipos de antibióticos, analizaron 40 sistemas productivos de cerdos y terneros, tomando un total de 680 muestras de heces. En todas éstas encontraron altas concentraciones de antibióticos, el 55% de las muestras de heces de cerdos y el 75% de las muestras de heces de bovino, mostraron al menos un antimicrobiano detectado, más del 34% de las muestras mostraron 2 o más tipos de antibióticos (hasta ocho en un solo animal). Considerando estos resultados, los investigadores concluyeron que el traspaso de éstos en los sistemas productivos puede ser de importancia.

Estudios científicos han evidenciado que en deyecciones de aves se encuentran altas concentraciones de antibióticos, presentando actividad microbiológica, las cuales son liberadas al ambiente. Rosenblatt-Farrell (2009) documentó que la aplicación de heces de los sistemas productivos sobre las praderas es una práctica habitual que busca fertilizar los cultivos. Sin embargo, tal acto genera aparición de bacterias resistentes a nivel de suelo y en los cursos de agua más cercanos. Martínez *et al.* (2016) hicieron aislamiento de cepas de *Salmonella* multirresistentes en ríos y canales de la Región Metropolitana de Chile, correspondiendo a serotipos zoonóticos, por ende, se sugiere que el agua de riego representa un riesgo sanitario para la población humana, además los resultados indicaron que la dispersión ambiental de las cepas está probablemente relacionada con actividades humanas como aguas residuales o escorrentías de granjas de producción animal.

Al respecto, es importante señalar que la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha declarado que la resistencia bacteriana, es una amenaza para la seguridad sanitaria, que genera limitaciones en las opciones terapéuticas y que, debido al aumento del comercio mundial y viajes internacionales, se propicia que los microorganismos resistentes se propaguen rápidamente a otros países y continentes por medio de las personas y los alimentos.

La cama broiler es uno de los subproductos derivados y comercializados a partir de la industria avícola, se constituye por las deyecciones de las 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). En Chile se estima una producción anual del orden de las 200.612 toneladas (SAG, 2006). Algunos productores la consideran una buena opción alimenticia, sobre todo para rumiantes, que por sus características digestivas pueden hacer mejor uso de sus nutrientes. No obstante, existe el riesgo de transmitir bacterias patógenas, como lo es *Salmonella* spp., al igual que los residuos de antibióticos excretados por los pollos (Gadberry, 2014). A nivel nacional se prohíbe su uso para entrar en el programa de Planteles Animales Bajo Certificación Oficial A (PABCO A) (SAG, 2016). También, algunos mercados de exportación importantes para el país, como la Unión Europea, prohíben la comercialización de animales rumiantes alimentados con desechos avícolas (FABBL, 2016). Sin embargo, puede ser utilizada en aquellas producciones que estén fuera del control de estos programas.

Ante todas las problemáticas ya expuestas, es necesario establecer un método que monitoree cuantitativamente los residuos traza de sulfonamidas en deyecciones de pollos broilers. En este sentido es menester desarrollar técnicas analíticas, específicas y sensibles que permitan el monitoreo del uso de antibióticos en las deyecciones para así poder detectar y cuantificar los residuos de antimicrobianos. Esto permitirá estimar la diseminación de los residuos de medicamentos veterinarios a través de las heces de los animales tratados al medio ambiente.

HIPÓTESIS

Los residuos de sulfonamidas en deyecciones de pollos broilers tratados, permanecen en altas concentraciones superando los LMR establecidos para tejidos comestibles una vez finalizado el periodo de resguardo de la formulación utilizada.

OBJETIVO GENERAL

Identificar y cuantificar las concentraciones de sulfonamidas en deyecciones de pollos broilers.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Implementar y verificar una metodología analítica por LC-MSMS que permita la detección y cuantificación de sulfonamidas en deyecciones de pollos broilers.
2. Analizar y cuantificar las concentraciones de sulfonamidas por LC-MSMS en deyecciones de pollos broilers tratados con formulaciones farmacéuticas comerciales.

MATERIALES Y MÉTODOS

La presente memoria de título se realizó en el marco del proyecto FONDECYT de iniciación a la investigación 11140530 “Evaluación de la depleción de residuos de antimicrobianos en subproductos de aves y su relación con la concentración de estos residuos en tejidos comestibles”.

1. Animales experimentales y tratamiento

Se utilizaron 70 pollos de raza Ross 308. Se escogieron de esta genética, debido a que son animales precoces, 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 favorecieron su uso experimental, ya que evitaron una

condición de engorde excesivo, lo que colaboró al bienestar animal en las condiciones experimentales.

En la definición del tamaño del grupo experimental se consideró el criterio establecido por la Agencia Europea de Medicamentos, Guía: Aproximación hacia la armonización de los períodos de resguardo EMEA/CVMP/036/95 (1997).

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 y 50 - 60% de humedad relativa), acceso *ad libitum* al agua y alimento no medicado. El alimento fue formulado de acuerdo con 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. El protocolo de manejo y supervisión fue 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).

El inicio del tratamiento con sulfacloropiridazina fue definido considerando la duración del tratamiento en condiciones terapéuticas (5 días), la duración del período de resguardo de la formulación en músculo (30 días), y 10 días más una vez finalizado el período de resguardo de la droga en músculo para continuar el monitoreo en heces y observar la depleción de los residuos en esta matriz.

Al día 5 de vida de las aves se pesaron y se formaron 2 grupos experimentales al azar, Grupo A de 56 pollos y Grupo B de 14 pollos. El Grupo A fue tratado con la fórmula comercial de sulfacloropiridazina, y el Grupo B se mantuvo como control no tratado. Se administraron una dosis terapéutica de sulfacloropiridazina de 30 mg/kg de forma oral una vez al día durante 5 días consecutivos, es decir hasta el día 9. Los días de toma de muestra fueron los siguientes días post tratamiento: 2, 5, 21, 30, 32, 34 y 36 (total 7 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 para análisis cromatográfico.

2. Formulaciones farmacéuticas

Se utilizó la solución oral “Coliprim Solución” 10%. Formulación escogida de acuerdo con los fármacos que se encuentran autorizados por el Registro de Medicamentos de Uso Veterinario del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG, 2015) disponibles para ser usados en pollos broilers.

3. Tratamientos de las muestras y análisis cromatográficos

Se realizó la extracción y análisis cromatográfico de las muestras de las 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 sulfonamidas en deyecciones de pollos broilers, se implementó una metodología analítica a través LC-MSMS, que se sustenta sobre la base de metodologías analíticas publicadas anteriormente: (Cherlet *et al.*, 2002), (Prats *et al.*, 2002) y (Thompson *et al.*, 2005).

Metodología de extracción de sulfonamidas

Se pesaron $2 \pm 0,02$ g de muestra en un tubo de 50 ml. Se agregaron 10 ml de acetato de etilo y 5 g de sulfato de sodio anhidro. Las muestras se llevaron a un vórtex durante 15 min y se sonicaron por 5 min. A continuación, se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 min. Se vertieron los sobrenadantes en tubos de 50 ml. Los sólidos que quedaron al centrifugar se Re hizo extracción 2 veces con 10 ml de acetato de etilo. Las muestras se llevaron por 5 min en vórtex y se centrifugaron por 10 min a 3000 rpm cada vez. Los sobrenadantes se mezclaron con los primeros de ellos. Los sobrenadantes de acetato de etilo se concentraron hasta 15 ml en baño de agua entre 40° a 50° C con corriente de nitrógeno. A continuación, se acondicionaron columnas de fase sólida de 6 ml y 500 mg SCX (J. Baker), tipo catiónico ácido sulfónico. El acondicionamiento se efectuó pasando a través de la columna 6 ml de

hexano y 6 ml de acetato de etilo, cuidando que no se secan. Las muestras se pasaron a través de las columnas acondicionadas, en forma lenta, ayudándose de vacío cuando fue necesario. Las columnas se lavaron con 3 ml de agua y 3 ml de metanol. El eluido se obtuvo con 10 ml de una solución compuesta por metanol:amoníaco en razón 48,5:1,5. El eluido se llevó a sequedad en baño de agua entre 40° a 50° C con flujo de nitrógeno. Las muestras se reconstituyeron con 500 uL de fase móvil y se aplicó ultrasonido durante 5 min. Las muestras se traspasaron a viales Eppendorf rotulados. Las muestras se centrifugaron por 10 min a 3000 rpm. Finalmente, las muestras se traspasaron a viales autosampler para su análisis cromatográfico.

Verificación de metodología analítica

Para el análisis instrumental se utilizó un cromatógrafo líquido acoplado a un espectrómetro de masas (API 4000, ABSCIEX). Este instrumento ha sido empleado para fines similares por San Martín *et al.* (2007) y Cornejo *et al.* (2010, 2012 y 2018).

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: Tiempo de retención del analito, especificidad, Límite de Detección (LD), Límite de Cuantificación (LC), y linealidad de la curva de calibración.

Bioseguridad

Se consideraron las medidas de bioseguridad tanto para el trabajo con animales experimentales como el trabajo de laboratorio, sugeridas por el Manual de Normas de Bioseguridad de CONYCIT (2008) y del comité de bioseguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

RESULTADOS

Parámetros

La verificación de la metodología analítica para su uso en laboratorio se sustenta en la evaluación de parámetros, que corresponden al tiempo de retención del analito, especificidad, límite de detección (LD), límite de cuantificación (LC) y linealidad de la curva de calibración.

Tiempo de retención del analito: Se realizó inyección de 6 drogas puras, cumpliendo con el criterio de aceptación de no existir una diferencia mayor al 5% entre las inyecciones, pues los coeficientes de variación de sulfacloropiridazina y el estándar interno fueron de 1,89% y 1,07% respectivamente.

Tabla 1. Tiempos de retención de 6 inyecciones de droga pura (sulfacloropiridazina) y 6 inyecciones de estándar interno (sulfametazina 13C6) y sus respectivos CV%.

Analito	Tiempo de Retención (min)						Promedio	Desv. Est.	CV
	1	2	3	4	5	6			
Sulfacloropiridazina	1,96	1,96	1,93	2,01	2,03	1,96	1,975	0,0373	1,89%
Sulfametazina 13C6	2,03	2,02	1,99	2	1,97	2	2,002	0,0214	1,07%

Especificidad: Se realizó inyección de 20 muestras blanco, cumpliendo con el criterio de aceptación de no presentar interferencia en la zona de interés.

Límite de detección (LD): Se estableció en 10 repeticiones cumpliendo con el criterio de aceptación de tener una relación señal/ruido de 2 o 3:1 y un $CV \leq 25\%$.

Límite de cuantificación (LC): Se estableció en 10 repeticiones y por la fórmula $LC = LD + 1,64*LD$, cumpliendo con el criterio de aceptación de tener una relación señal/ruido de 10:1.

Linealidad de la curva de calibración: Se trabajó con una curva de calibración de matrices fortificadas, estableciendo una ecuación del análisis de regresión a partir de 5 puntos, obteniendo un coeficiente de correlación $R^2 \geq 0,95$ y un CV entre pendientes $\leq 25\%$.

Tabla 2. Cálculo del LC del analito sulfacloropiridazina a partir del análisis de 10 controles en matrices de heces de pollos broilers fortificadas.

Análisis	Concentración (ng/gr)	Área Ratio	Concentración Cuantificada (ng/gr)
1	10	2,16	12,54
2	10	2,86	14,61
3	10	1,09	9,37
4	10	1,48	10,53
5	10	1,92	11,83
6	10	2,08	12,31
7	10	2,62	13,90
8	10	2,10	12,36
9	10	1,51	10,62
10	10	2,05	12,22
Promedio		1,987	12,030
Desv. Estándar		0,528	1,564
CV (%)		26,59	13

LC = LD + 1,64*LD	
LD (ppb)	10
LC (ppb)	12,6

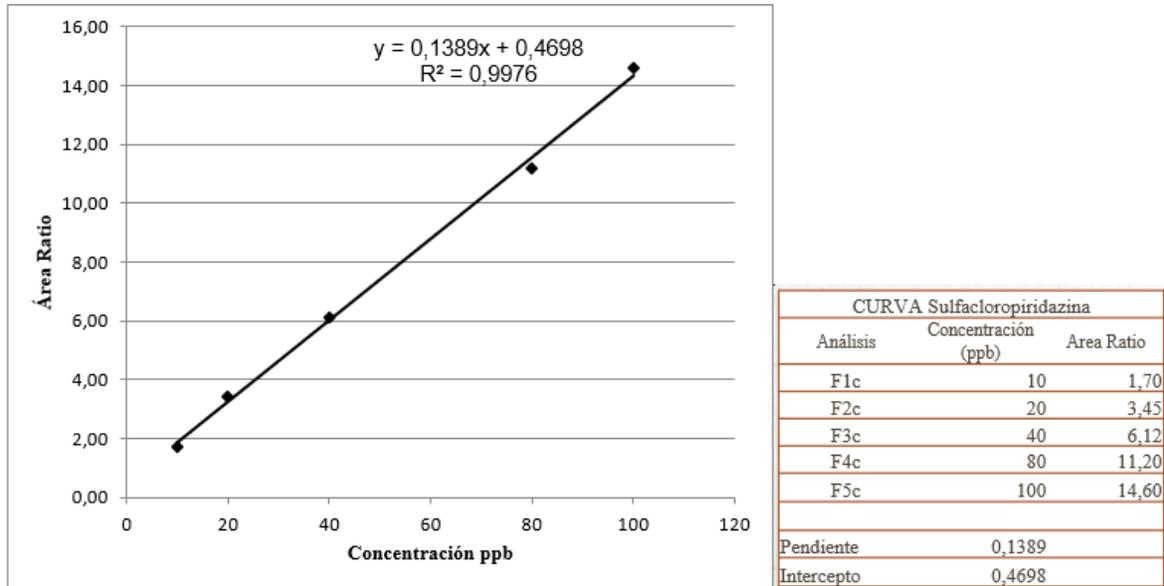


Figura 1. Curva de calibración de 5 puntos en matrices de heces de pollos broilers fortificadas a 10, 20, 40, 80 y 100 ppb.

Cuantificación

Para realizar la cuantificación de los 7 muestreos de la fase experimental, se trabajó con 2 curvas, una curva baja que cuantificó las muestras a partir de los 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ hasta los 160 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y una curva alta que cuantificó las muestras desde los 80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ hasta los 800 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Ambas curvas tuvieron un coeficiente de correlación $R^2 \geq 0,95$.

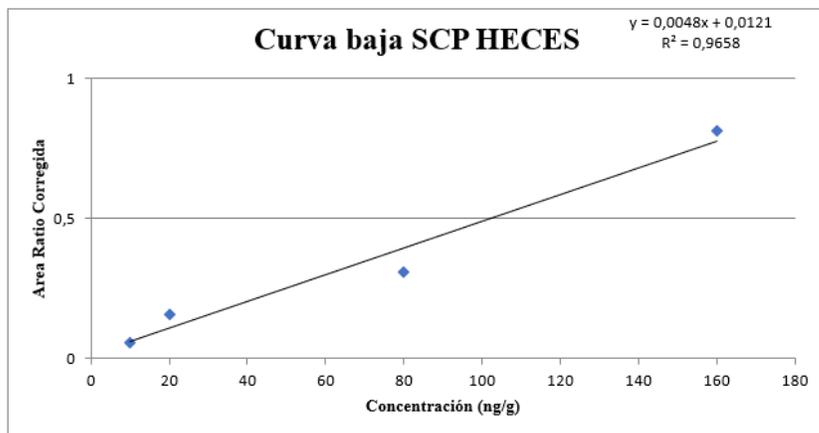


Figura 2. Curva baja para la cuantificación de sulfacloropiridazina en la matriz de heces de pollos broilers a partir de 4 puntos: 10, 20, 80 y 160 ng/g .

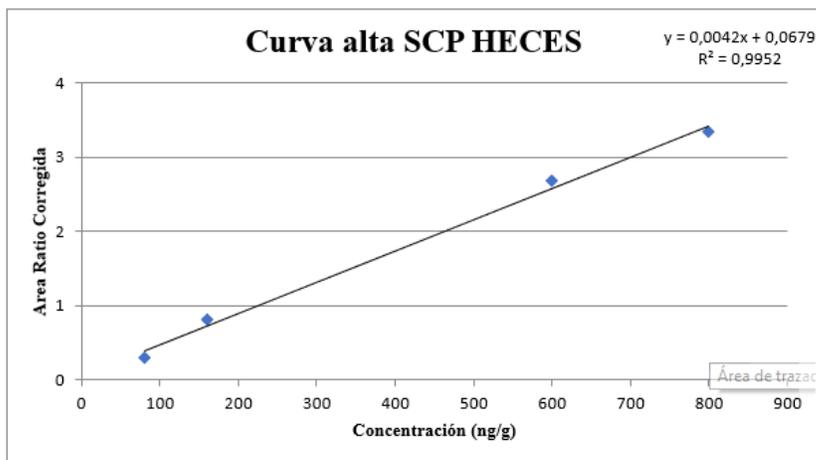


Figura 3. Curva alta para la cuantificación de sulfacloropiridazina en la matriz de heces de pollos broilers a partir de 4 puntos: 80, 160, 600 y 800 ng/g .

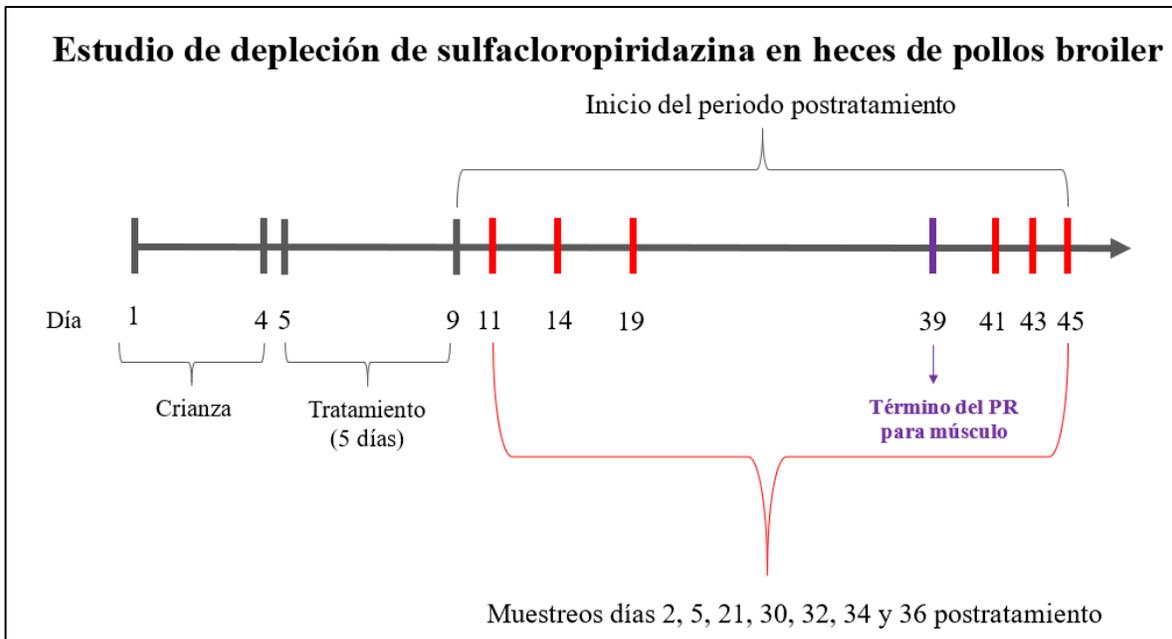


Figura 4. Línea de tiempo de la fase experimental.

Depleción

Los primeros 4 muestreos estuvieron sobre el LD, y los últimos 3 muestreos estuvieron bajo el LD. Cabe destacar, que el muestreo 5 corresponde a los 32 días postratamiento, es decir supera en 2 días al periodo de resguardo de sulfacloropiridazina en músculo, siendo el dato que determina que el estudio realizado no cumple con la hipótesis propuesta (encontrar una permanencia de los residuos de sulfonamidas en deyecciones de pollos broilers tratados, en altas concentraciones superando los LMR establecidos para tejidos comestibles una vez finalizado el periodo de resguardo de la formulación utilizada). Sin embargo, las cuantificaciones de los 2 primeros muestreos son considerables en el estudio, debido a que superan los 100 µg/kg, que corresponde al LMR de sulfacloropiridazina para alimentos de origen animal destinados a consumo humano.

Tabla 3. Cuantificación de sulfacloropiridazina en heces de pollos broilers de los 7 muestreos postratamiento.

Nº de muestreo	Días post tto	Edad de pollos (días)	Concentración SCP (µg/kg)
1	2	11	382,318
2	5	14	124,748
3	10	19	38,186
4	21	30	14,420
5	32	41	< LD
6	34	43	< LD
7	36	45	< LD

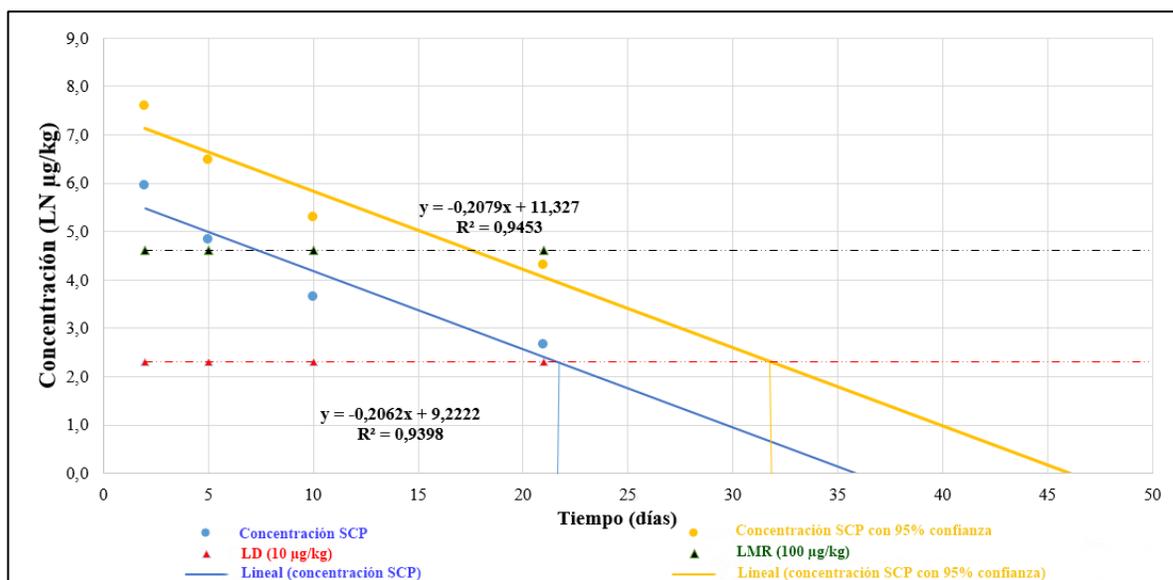


Figura 5. Gráfico de depleción de las concentraciones de sulfacloropiridazina en heces de pollos broilers.

DISCUSIÓN

El análisis de los antibióticos en las heces de los animales es importante para obtener más información sobre la posible formación de resistencia bacteriana en el intestino de los animales, para aprender sobre la diseminación de los antibióticos al medio ambiente, para monitorear las tendencias en el uso de antibióticos y para detectar los efectos ilegales (Berendsen *et al.*, 2014).

El uso inapropiado de antimicrobianos puede generar efectos ecotoxicológicos y contribuir a la emergencia de resistencia bacteriana. Se estima que para el año 2050 las muertes atribuibles a resistencia a los antimicrobianos alcancen una cifra de 10 millones en todo el mundo, y que genere un impacto de 100,2 trillones de dólares en el Producto Interno Bruto a nivel mundial (O'Neill, 2014).

En un estudio de tendencias globales en el uso de antimicrobianos en alimentos de origen animal realizado por Van Boeckel *et al.* (2015), se proyecta un aumento excesivo en el uso antibióticos, incluso en algunos países como China se espera una duplicación en las cantidades de uso para el año 2030. La OIE en un informe anual sobre el uso de agentes antimicrobianos en animales, documentó que las sulfonamidas corresponden al grupo de antimicrobianos mayormente utilizados, luego de las tetraciclinas y los macrólidos durante el periodo 2010 – 2015 en 89 países miembros.

En una investigación realizada por Vann Epps y Blaney (2016) sobre residuos de antibióticos en heces de animales, se determinó que los antibióticos mayormente reportados correspondieron a fluoroquinolonas, sulfonamidas y tetraciclinas. Además, en el mismo estudio se da a conocer que las prácticas convencionales de manejo de desechos agrícolas no aseguran la degradación de antimicrobianos en las heces de los animales. Residuos de clortetraciclina en heces de pollos en condiciones terapéuticas, fueron estudiados por Cornejo *et al.* (2018) presentándose actividad antimicrobiana en todas las muestras del estudio. Sin embargo, en el caso de las sulfonamidas Berendsen *et al.* (2018) en un estudio de persistencia de una amplia gama de antibióticos durante el almacenamiento de heces de bovinos, cerdos y pollos, establecieron que este tipo de antibióticos se disipan con relativa rapidez en todos

los tipos de heces, y que en el caso específico de sulfacloropiridazina la vida media es de 2,9 días.

La cama broiler, es utilizada como fertilizante en la agricultura, por lo tanto, los residuos de antibióticos presentes en ella pueden llegar de manera más directa al medio ambiente, y en el caso de las sulfonamidas ser disipados en gran magnitud al ser un antibiótico hidrosoluble. Martínez-Carballo *et al.*, 2007 en cultivos fertilizados con heces de pollos, detectaron por medio de LC MSMS una concentración máxima de sulfonamida de 91 mg/kg. Si bien las sulfonamidas son metabolizadas a N4-acetilsulfonamidas, que tienen una menor actividad microbiana activa en comparación con los medicamentos originales, si presentan una gran toxicidad (Anderson *et al.*, 2012).

La bioacumulación de residuos de sulfacloropiridazina en plumas de pollos broilers y su relación con la concentración en tejidos comestibles fue publicada por Pokrant *et al* 2018. Los resultados obtenidos mostraron que los residuos de sulfacloropiridazina en las plumas de los animales tratados, persistieron en altas concentraciones hasta 55 días después de cesar el tratamiento y sus concentraciones fueron más altas que en los tejidos comestibles.

El estudio de depleción realizado en esta investigación demuestra que altas concentraciones de sulfonamidas en deyecciones de pollos broilers tratados, son detectables superando el límite máximo residual de 100 µg/kg para tejidos comestibles hasta 5 días postratamiento. Sin embargo, a los 32 días postratamiento ya finalizado el periodo de resguardo, las concentraciones de sulfonamidas en las deyecciones de los pollos broilers tratados están bajo el límite de detección, información que establece que no se cumple la hipótesis planteada en este estudio. Estudios de persistencia de sulfacloropiridazina en heces de aves de corral indican que las concentraciones de sulfacloropiridazina disminuyen de un 58 a 82% luego de 8 días de compostaje (Van Dijk y Keukens, 2000), además la vida media de sulfacloropiridazina en heces de pollos determinada por Berendsen *et al.*, 2018 es de 2,9 días, caracterizándose por tener una disipación rápida en todos los tipos de heces estudiadas

Se debe considerar que el periodo de resguardo de la formulación farmacéutica utilizada en este estudio es bastante largo en comparación a otros antimicrobianos, por lo tanto, la

administración en pollos broilers no debiese ser posterior a los 15 día de vida, sabiendo que el beneficio de estas aves no supera los 45 días de vida.

Considerando que en la composición de la cama broiler hay restos de plumas, y que los estudios demuestran que en esta matriz existe una bioacumulación mucho más persistente en comparación a las deyecciones de los animales tratados, no debiese utilizarse como subproducto destinado a la alimentación de otros animales ni como fertilizante en la agricultura, sin ser debidamente monitoreada. Por lo tanto, es relevante monitorear y fiscalizar la industria avícola para así evitar el reingreso de residuos farmacológicos en la cadena alimenticia y su propagación en el medio ambiente, significando un riesgo para la salud pública y una contribución en la emergencia de resistencia bacteriana.

Finalmente, a partir de los estudios de prácticas convencionales de manejo de los desechos animales, queda en evidencia que es necesario contar con tecnologías que aseguren una degradación completa de los antimicrobianos, si se decide continuar con los usos actuales de la cama broiler.

CONCLUSIONES

La cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MSMS), fue la herramienta analítica utilizada en este estudio, que cumplió con sus características de brindar una alta rapidez, precisión y sensibilidad para la identificación y cuantificación de las concentraciones de sulfonamidas en deyecciones de pollos broilers. En cuanto a la verificación de la metodología analítica para su uso en laboratorio, se consideró apropiada al obtener resultados de evaluación que cumplieran con todos los criterios de aceptación para los diferentes parámetros.

Las sulfonamidas son una de las clases de antibióticos más utilizadas dentro de la práctica de la medicina veterinaria, por lo tanto, la eventual reincorporación de sus residuos por medio de las heces de animales tratados podría estar significando un alto impacto en la salud pública.

Los resultados de este estudio muestran la presencia de residuos de sulfacloropiridazina en altas concentraciones en las heces de pollos broilers tratados con sulfacloropiridazina Coliprim 10%, los primeros 5 días postratamiento superando el límite máximo residual para tejidos comestibles de origen animal. Este subproducto de la industria avícola representa un riesgo de reingreso de residuos de antibióticos para la cadena alimenticia y el medio ambiente.

La utilización de la cama broiler, es una buena oportunidad de muestreo no invasivo para el monitoreo de medicamentos veterinarios. Su destinación como ingrediente en la dieta de otros animales debiese ser reconsiderada, así como también las medidas que podrían implementarse para el manejo de este subproducto de la industria avícola.

BIBLIOGRAFÍA

ALLIANCE FOR THE PRUDENT USE OF ANTIBIOTICS. APUA. 2010. Antibiotics in food animal production: A forty year debate. APUA (Alliance for the Prudent Use of Antibiotic). 18 (2): 1-27.

ANDERSON, R.; GROUNDWATER, P.; TODD, A.; WORSLEY, A. 2012. Antibacterial Agents: Chemistry, Mode of Action, Mechanisms of Resistance and Clinical Applications. John Wiley & Sons, Ltd

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.; LAHR, J.; NIBBELING, C.; JANSEN, L.; BONGERS, I.; WIPFLER, E.; VAN DE SCHANS, M. 2018. The persistence of a broad range of antibiotics during calve, pig and broiler manure storage. *Chemosphere* (204): 267-276.

CEPERO, R. 2006. Retirada de los antibióticos promotores de crecimiento en la Unión Europea: Causas y consecuencias. Dpto. de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza

CHEN, Y.; SCHWACK, W. 2014. Rapid and selective determination of multi-sulfonamides by high-performance thin layer chromatography coupled to fluorescent densitometry and electrospray ionization mass detection. *Journal of Chromatography A* (1331): 108-116.

CHILE. MINISTERIO DE SALUD. 2009. Ley 20.380 sobre protección de animales. 03 octubre 2009.

CHITESCU, C.; NICOLAU, A.; CSUMA, A.; MOISOIU, E. 2014. Simultaneous analysis of four sulfonamides in chicken muscle tissue by HPLC. *Food Additives and Contaminants* (28): 1013-1020.

CHERLET, M.; DE BAERE, S. CROUBELS, S.; DE BACKER, P. 2002. Quantitation of tylosin in swine tissues by liquid chromatography combined with electrospray ionization mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* (473): 167-175.

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. In: Residues of veterinary drugs in food: Proceedings of the Euro Residue VII Conference. Egmond aan Zee, The Netherlands. (1, 2 and 3): 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. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* (34): 168-175.

CORNEJO, J.; YEVENES, K.; AVELLO, C.; POKRANT, K.; MADDALENO, A.; SAN MARTÍN, B.; LAPIERRE, L. 2018. Determination of Chlortetracycline Residues, Antimicrobial Activity and Presence of Resistance Genes in Droppings of Experimentally Treated Broiler Chickens. *Molecules* 23, 1264.

EC. EUROPEAN COMMISSION. 2002. Commission 2002/657/EC of Journal European Communication (221): 8-36.

EMEA. EUROPEAN MEDICINES AGENCY. 1997. Note for guidance: Approach towards harmonization of withdrawal periods, EMEA/CVMP/036/95.

FABBL. 2016. Farm Assurance Beef and Lamb Scheme. Winterhill House, Milton Keynes, UK. <<https://www.saiglobal.com/assurance/farm-assurance/>> [consulta: 27-05-2016].

FANG, G.; HE, J.; WANG, S. 2006. Multiwalled carbon nanotubes as sorbent for on-line coupling of solid-phase extraction to high-performance liquid chromatography for simultaneous determination of 10 sulfonamides in eggs and pork. *Journal of Chromatography A* (1127): 12-17.

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.

HUANG, X.; CHEN, L.; YUAN, D. 2013. Development of monolith-based stir bar sorptive extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry method for sensitive determination of ten sulfonamides in pork and chicken sample. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (405): 6885-6889.

MARCU, A.; VACARU-OPRIȘ, I.; DUMITRESCU, G.; PETCULESCU, L.; NICULA, M.; PEȚI, I.; DRONCA, D.; KELCIOV, B.; MARIȘ, C. 2013. The influence of genetics on economic efficiency of broiler chickens growth. *Animal Science and Biotechnologies* (46): 330-346.

MARTÍNEZ, A. 2012. Uso de Antimicrobianos en la Avicultura: Sus Implicaciones en Salud Pública. Facultad de Medicina, Instituto de Salud Pública, Universidad Nacional de Colombia.

MARTÍNEZ-CARBALLO, E.; GONZÁLEZ-BARREIRO, C.; SCHARF, S.; GANS, O. 2007. Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria. *Environmental Pollution* (2): 570-579.

MARTÍNEZ, M.; RETAMAL, P.; ROJAS-AEDO, J.; FERNÁNDEZ, J.; FERNÁNDEZ, A.; LAPIERRE, L. 2016. Multidrug-Resistant Outbreak-Associated Salmonella Strains in Irrigation Water from the Metropolitan Region, Chile. *Zoonoses and Public Health* 12311.

MASSÉ, D.; SAADY, N.; GILBERT, Y. 2014. Potential of biological processes to eliminate antibiotics in livestock manure: An overview. *Animals* (4): 146-163.

OIE. 2016. Annual report on the use of antimicrobial agents in animals. [en línea]. <http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Our_scientific_expertise/docs/pdf/AMR/Survey_on_monitoring_antimicrobial_agents_Dec2016.pdf> [consulta: 25-09-2018].

O'NEILL, J. 2014. Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. Review on Antimicrobial Resistance.

POKRANT, E.; MEDINA, F.; MADDALENO, A.; SAN MARTÍN, B.; CORNEJO, J. 2018. Determination of sulfachloropyridazine residue levels in feathers from broiler chickens

after oral administration using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. Public Library of Science One (7): 200-206.

PRATS, C.; FRANCESCH, R.; ARBOIX, M.; PEREZ, B. 2002. Determination of tylosin residues in different animal tissues by high performance liquid chromatography. Journal of Chromatography B (1): 57-65.

ROSENBLATT-FARRELL, N. 2009. El paisaje de la Resistencia a los antibióticos. Environmental Health Perspectives (117): 244-250.

SAN MARTIN, 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 coupled with tandem mass spectrometry. Journal Food Protection (8): 1952-7.

SAG. SERVICIO AGRICOLA Y GANADERO. 2016. Planteles Animales Bajo Certificación Oficial (PABCO). <http://www.sag.gov.cl/busqueda-general?search_api_multi_fulltext=pabco> [consulta: 27-05-2016].

SAG. SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO. 2015. Medicamentos Veterinarios que no deben ser utilizados en predios que exportan a la Unión Europea. [en línea]. <http://www.sag.cl/sites/default/files/medicamentos_prohibidos_ue_pabco_a_17-9-2015.pdf> [consulta: 20-11-2015].

SAG. SERVICIO AGRICOLA 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> [consulta: 20-11-2015].

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> [consulta: 20-11-2015].

SAG. SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO. 2017. Resolución exenta n°:6801/2017 Establece requisitos para el registro, comercialización y uso de antimicrobianos. [en línea]. <http://www.sag.cl/sites/default/files/res_6801-2017.pdf> [consulta: 20-11-2015].

SHAO, B.; DONG, D.; WU, Y.; HU, J.; MENG, J.; TU, X.; XU, S. 2005. Simultaneous determination of 17 sulfonamide residues in porcine meat, kidney and liver by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* (546): 174-181.

THOMPSON, T.S.; NOOT, D.K.; CALVERT, J.; PERNAL, S.F. 2005. Determination of lincomycin and tylosin residues in honey by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* (3): 309-316.

VAN EPPS, A. BLANEY, L. 2016. Antibiotic Residues in Animal Waste: Occurrence and Degradation in Conventional Agricultural Waste Management Practices. *Current Pollution Reports* (2): 135-155.

VAN BOECKEL, T.; BROWER, C.; GILBERT, M.; GRENFELL, B.; LEVIN, S.; ROBISON, T.; TEILLANT, A.; LAXMINARAYAN, R. 2015. Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (18): 5649-5654.

VAN DER WATT, H.; SUMMER, M.; CABRERA, M. 1994. Bioavailability of copper, manganese, and zinc in poultry litter. *Journal of Environmental Quality* (23): 43-49.

VAN DIJK, J.; KEUKENS, H. 2000. The stability of some veterinary drugs and coccidiostats during composting and storage of laying hen and broiler faeces. *Residues of veterinary drugs in food.* (8) 356–360.

YU, H.; TAO, Y.; CHEN, D.; WANG, Y.; HUANG, L.; PENG, D.; DAI, M.; LIU., Z.; WANG, X.; YUAN, Z. 2011. Development of a high performance liquid chromatography method and liquid chromatography-tandem mass spectrometry method with the pressurized liquid extraction for the quantification and confirmation of sulfonamides in the foods of animal origin. *Journal of Chromatography B* (879): 2653-2662.

PLANIFICACIÓN

Periodos	Mes 1	Mes 2	Mes 3	Mes 4	Mes 5	Mes 6
Actividades						
Crianza y tratamiento de pollos						
Recolección de muestras						
Implementación metodología analítica por LC-MSMS						
Análisis cromatográfico						
Construcción de curvas de calibración						
Análisis de resultados						
Preparación del manuscrito						
Informe y presentación de Avance						
Informe Final						

ANEXOS

Anexo 1

Certificado de comité de bioética



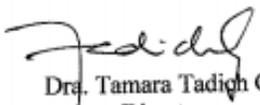
UNIVERSIDAD DE CHILE
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias
Comité de Bioética Animal

Santiago, 20 de noviembre de 2014

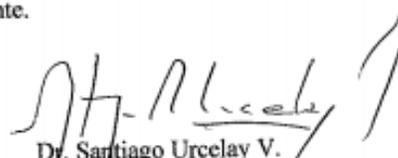
CERTIFICADO N° 23-2014

En relación con los procedimientos propuestos para el uso de animales experimentales, tenida a la vista la metodología del Proyecto: **“Evaluation of the bioaccumulation of antimicrobial residues in feathers of broiler chickens treated with commercial pharmaceutical formulations and their relation with the concentration of these residues in edible tissues”**. Dicho proyecto será financiado por el Laboratorio de Farmacología Veterinaria de la Universidad de Chile, donde el Investigador Responsable será la **Dra. Javiera Cornejo K.**, 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 utilizará aves Ross 308 (total de 224) que serán mantenidos en la Unidad de Patología Aviar de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. Al término del estudio las aves serán eutanasiadas de acuerdo a lo especificado en el formulario y según las recomendaciones de AVMA (2013) por personal competente.


Dra. Tamara Tadigh G.
Director
Comité de Bioética Animal




Dr. Santiago Urcelay V.
Presidente
Comité de Bioética Animal

Anexo 2



CERTIFICADO N° 40

Santiago 21 de Noviembre 2014

El Comité de Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, ha revisado el proyecto titulado: "Evaluation of the bioaccumulation of antimicrobial residues in feathers of broiler chickens treated with commercial pharmaceutical formulations and their relation with the concentration of these residues in edible tissues." cuya Investigadora Responsable es la Dra. Javiera Cornejo K., y que fue presentado al concurso FONDECYT de Iniciación 2014.

En el proyecto se estipulan entre otras las siguientes medidas de Bioseguridad:

- 1.- Uso de vestimenta y mascarilla adecuada para realizar el trabajo en terreno y para el trabajo en laboratorio. Se le realizará inducción al personal sobre medidas de bioseguridad.
- 2.- Los animales serán manejados por médicos veterinarios o memoristas supervisados con la vestimenta y medidas de manejo adecuadas.
- 3.- La eliminación de residuos tóxicos se hará siguiendo las normas de bioseguridad y mediante los protocolos que realiza el Laboratorio FARMAVET.
- 4.- Se realizará desinfección con desinfectantes adecuados y en las concentraciones adecuadas.
- 5.- Se utilizarán campanas de extracción y protección adecuada para el trabajo con solventes y reactivos tóxicos.
- 6.- Las carcasas y órganos de los animales serán incineradas.

El proyecto fue revisado en base a las especificaciones contenidas en el "Manual de Normas de Bioseguridad" editado por CONICYT versión 2008 y que previenen los riesgos para las personas, los animales y el medioambiente.

LISETTE LAPIERRE ACEVEDO

Coordinadora
Comité de Bioseguridad

