



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

**VERIFICACIÓN *IN VIVO* DE UN MÉTODO DE *SCREENING*
MICROBIOLÓGICO PARA LA DETECCIÓN DE RESIDUOS DE
ANTIMICROBIANOS EN DEYECCIONES DE POLLOS BROILER Y SU
CONFIRMACIÓN POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ACOPLADA A
ESPECTROMETRÍA DE MASAS (LC-MS/MS).**

Alejandra Patricia Ríos Theoduloz

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

PROFESOR GUÍA: Dra. Javiera Cornejo Kelly
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile

Proyecto FONDEF N° ID19I10033.

SANTIAGO, CHILE
2022



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

**VERIFICACIÓN *IN VIVO* DE UN MÉTODO DE *SCREENING*
MICROBIOLÓGICO PARA LA DETECCIÓN DE RESIDUOS DE
ANTIMICROBIANOS EN DEYECCIONES DE POLLOS BROILER Y SU
CONFIRMACIÓN POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ACOPLADA A
ESPECTROMETRÍA DE MASAS (LC-MS/MS).**

Alejandra Patricia Ríos Theoduloz

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

Nota Final:

	Nota	Firma
Profesor guía: Dra. Javiera Cornejo
Profesor Corrector: Dra. Lisette Lapierre
Profesor Corrector: Dr. Nicolás Galarce

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

A mi mamá, Paulette, que, gracias a sus esfuerzos y a su apoyo, tengo la posibilidad de culminar mis estudios de pregrado.

A mi hermana, Daniela, por siempre alentarme a seguir adelante y apoyarme.

A mis abuelos, María Cristina y Eduardo, por darnos su cariño y apoyo incondicional.

A Raúl, por siempre apoyarme y darme consejos cuando más los necesité.

Le agradezco enormemente, a la Dra. Javiera Cornejo, por brindarme la oportunidad de trabajar en este proyecto y enriquecer mi experiencia como estudiante de medicina veterinaria.

También agradezco a Ekaterina Pokrant por su ayuda durante el desarrollo de esta tesis y por responder mis dudas con la mejor disposición.

A mis profesores correctores, la Dra. Lisette Lapierre y el Dr. Nicolás Galarce por sus aportes constructivos que ayudaron al desarrollo de esta tesis.

A los equipos del LIA y FARMAVET por permitirme trabajar en sus instalaciones, por responder mis dudas y corregirme cuando fue necesario.

RESUMEN

A nivel mundial, una de las principales preocupaciones de las autoridades reguladoras es la presencia de residuos de antimicrobianos en los alimentos y la necesidad de establecer programas adecuados para monitorear el peligro.

La mayoría de los programas de vigilancia, se centran en la detección de los residuos de los antimicrobianos en el producto final, empleando matrices invasivas. Hasta la fecha, no existen métodos de *screening* microbiológico, que estén registrados para la detección de residuos de antimicrobianos en matrices no invasivas, es decir, que no requieren que el animal sea faenado para su obtención, como son las heces de los animales de producción.

Por esto, el objetivo de esta memoria de título fue verificar *in vivo* una metodología de *screening* microbiológico, para la detección de seis familias de antimicrobianos en deyecciones de pollos broiler y posteriormente se cuantificó la concentración de los residuos.

Para el desarrollo de esta tesis, se utilizaron 48 pollos broiler machos de genética Ross 308, los que se distribuyeron en seis grupos experimentales, compuestos por seis animales tratados y dos animales sin tratar, que correspondieron a los blancos. Todos los antimicrobianos se administraron vía oral mediante una sonda oro-esofágica, excepto en la ampicilina; ya que al no existir una formulación farmacéutica oral autorizada para pollos broiler se utilizó un estándar certificado, el cual fue administrado vía endovenosa en dosis única. Posteriormente, se recolectaron las muestras de deyecciones a las cuatro y ocho horas post-tratamiento, durante dos días consecutivos. En el caso de la ampicilina, se realizaron los muestreos a las horas uno, dos, cuatro y seis post-tratamiento, completando cuatro puntos de muestreo. Posteriormente, se realizó la extracción de las muestras mediante el método de *screening* microbiológico, se midió el radio del halo de inhibición y este se registró en milímetros. Las muestras positivas se confirmaron mediante LC-MS/MS, el método de extracción utilizado correspondió a un método analítico multi-residual implementado y validado previamente y se comparó si los resultados obtenidos mediante LC-MS/MS eran mayores o iguales a la capacidad de detección ($CC\beta$) del método de *screening* microbiológico.

Respecto a los resultados, para enrofloxacino y su metabolito activo ciprofloxacino, oxitetraciclina y su epímero 4-epi-oxitetraciclina, sulfaclopiridazina, eritromicina, ampicilina y lincomicina, las muestras analizadas mediante el método de *screening*

microbiológico provenientes de aves tratadas fueron positivas y las concentraciones cuantificadas por LC-MS/MS fueron superiores a la CC β del método de *screening* microbiológico. Respecto a los blancos, todos los antimicrobianos en estudio fueron negativos al *screening* microbiológico y no se detectaron concentraciones de los residuos mediante LC-MS/MS.

En conclusión, la metodología de *screening* microbiológico es capaz de detectar residuos de antimicrobianos en deyecciones de pollos tratados y existe concordancia entre lo obtenido en el método de *screening* microbiológico con los resultados obtenidos mediante LC-MS/MS.

Palabras clave: Verificación, *screening* microbiológico, residuos de antimicrobianos, pollos broiler, LC-MS/MS.

ABSTRACT

Globally, one of the main concerns of regulatory authorities is the presence of antimicrobial residues in food and the need to establish adequate programs to monitor the hazard.

Most surveillance programs focus on the detection of antimicrobial residues in the final product using invasive matrices. To date, there are no microbiological *screening* methods registered for the detection of antimicrobial residues in non-invasive matrices, i.e., those that do not require the animal to be slaughtered to obtain them, such as feces from production animals.

Therefore, the objective of this thesis was to verify in vivo a microbiological *screening* methodology for the detection of six families of antimicrobials in broiler chicken droppings and subsequently the concentration of the residues was quantified.

For the development of this thesis, 48 male broiler chickens of Ross 308 genetics were used, which were distributed in six experimental groups, composed of six treated animals and two untreated animals, which corresponded to the blanks. All the antimicrobials were administered orally through an oro-esophageal tube, except for ampicillin; since there was no authorized oral pharmaceutical formulation for broiler chickens, a certified standard was used, which was administered intravenously in a single dose. Subsequently, droppings samples were collected at four and eight hours post-treatment, for two consecutive days. In the case of ampicillin, samples were taken at one, two, four and six hours post-treatment, completing four sampling points. Subsequently, samples were extracted using the microbiological *screening* method, the inhibition halo radius was measured and recorded in millimeters. Positive samples were confirmed by LC-MS/MS, the extraction method used corresponded to a previously implemented and validated multi-residual analytical method and it was compared whether the results obtained by LC-MS/MS were greater than or equal to the detection capacity ($CC\beta$) of the microbiological *screening* method.

Regarding the results, for enrofloxacin and its active metabolite ciprofloxacin, oxytetracycline and its epimer 4-epi-oxytetracycline, sulfachloropyridazine, erythromycin, ampicillin and lincomycin, the samples analyzed by the microbiological *screening* method from treated birds were positive and the concentrations quantified by LC-MS/MS were higher than the $CC\beta$ of the microbiological *screening* method. Regarding the blanks, all

antimicrobials under study were negative to the microbiological *screening* and no concentrations of the residues were detected by LC-MS/MS.

In conclusion, the microbiological *screening* methodology is capable of detecting antimicrobial residues in treated chicken droppings and there is concordance between the results obtained in the microbiological *screening* method and the results obtained by LC-MS/MS.

Keywords: Verification, microbiological *screening*, antimicrobial residues, broiler chickens, LC-MS/MS.

ÍNDICE DE CAPÍTULOS

RESUMEN	I
ABSTRACT.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
1. Producción cama de Broiler.....	3
2. Usos de los antimicrobianos en animales de producción	3
3. Legislación internacional y nacional	4
4. Implicancias de los residuos de antimicrobianos en heces de animales productivos.....	5
5. Técnicas analíticas para la detección de residuos de antimicrobianos en alimentos de origen animal.....	7
6. Métodos de <i>screening</i> microbiológico.....	8
OBJETIVO GENERAL	11
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
MATERIALES Y MÉTODOS	12
RESULTADOS	19
DISCUSIÓN	28
CONCLUSIONES	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
BIBLIOGRAFÍA	34
ANEXOS.....	40

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla Nro. 1: Solvente utilizado para la extracción de cada antimicrobiano.....	15
Tabla Nro. 2: Condiciones experimentales de las cepas de referencia.....	16
Tabla Nro.3: Promedio radio halo (mm) y concentraciones cuantificadas para Enrofloxacino + Ciprofloxacino, Oxitetraciclina + 4-epi-oxitetraciclina, Sulfacloropiridazina, Eritromicina, Ampicilina y Lincomicina.	22

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura Nro. 1: Halos de inhibición de (a) enrofloxacino + ciprofloxacino, (b) oxitetraciclina + 4-epi-oxitetraciclina, (c) sulfacloropiridazina, (d) eritromicina, (e) ampicilina y (f) lincomicina.....	26
Figura Nro. 2: Cromatogramas de (a) enrofloxacino, (b) ciprofloxacino, (c) oxitetraciclina, (d) 4-epi-oxitetraciclina, (e) sulfacloropiridazina, (f) eritromicina, (g) ampicilina y (h) lincomicina.....	27

INTRODUCCIÓN

Según datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) en el año 2020, de los 328 millones de toneladas de carne mundial producida, la carne de ave correspondió a un 36,5%; lo que equivale a 134 millones de toneladas, siendo sus principales productores China, Brasil y Estados Unidos. Se prevé que el crecimiento del consumo mundial de proteínas cárnicas durante esta década aumentará un 14% hacia el 2030, impulsado en gran medida por el aumento de los ingresos y el crecimiento demográfico, mientras que la disponibilidad de carne de aves de corral se incrementará un 17,8% para el 2030. Es así como el consumo de carne ha ido cambiando hacia las aves de corral en comparación con otras carnes. En los países en desarrollo de ingresos más bajos esto refleja el menor precio de los productos cárnicos de las aves de corral, en comparación con otros animales productivos; en tanto que en los países de ingresos altos indica la mayor preferencia de carnes blancas, que son más fáciles de preparar y se perciben como una opción alimentaria más saludable. Por otra parte, a nivel nacional y según datos de la Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA), en el año 2020 se produjeron más de 760 mil toneladas de carne de ave, siendo 690 mil toneladas de pollo broiler, lo que equivale al 91% del total de la producción de carne de ave.

Es así que, debido a la gran producción de animales para consumo humano, el uso de antimicrobianos sigue siendo la principal herramienta para tratar las enfermedades de origen bacteriano. Dependiendo de la estructura, los antimicrobianos solo se absorben parcialmente en el intestino de los animales. En consecuencia, los antimicrobianos son eliminados a la orina y a las heces. Así, se ha descrito que entre un 30 a 90% del compuesto original se excreta. La tasa de excreción varía según el antimicrobiano, siendo de un 75% para clortetraciclina, 90% para sulfametazina, 50%-100% para tilosina y 74% para enrofloxacino.

Para detectar los residuos de los antimicrobianos en los productos comestibles de origen animal existen diferentes técnicas analíticas. En primer lugar, están los métodos de *screening*, dentro de los que se encuentran los métodos inmunológicos y microbiológicos. Los métodos de *screening* microbiológico permiten la detección de una o varias familias de antimicrobianos, utilizando microorganismos identificadores.

Por otra parte, los métodos analíticos confirmatorios basados en la técnica de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS), se utilizan para confirmar el resultado positivo de los métodos de *screening*. Si bien estos métodos son sensibles, precisos y cuantitativos, requieren de equipos costosos y personal calificado para la obtención de resultados.

Hasta la fecha, existen pruebas patentadas de análisis de residuos de antimicrobianos mediante el método de *screening* microbiológico, las que emplean matrices invasivas obtenidas después de la faena; es decir, que la detección se realiza en el producto final. No existen métodos de *screening* microbiológico que estén registrados para la detección de residuos de antimicrobianos de diferentes familias utilizadas en la producción animal en matrices no invasivas, como son las heces de los animales de producción.

Por lo anteriormente mencionado, en este estudio se verificó un método de *screening* microbiológico que ya se encuentra validado para la matriz heces, a través de muestras de deposiciones de animales experimentales tratados, para la detección de residuos de oxitetraciclina y su epímero 4-epi-oxitetraciclina, eritromicina, ampicilina, sulfacloropiridizina, enrofloxacino y su metabolito activo ciprofloxacino y lincomicina. Posteriormente se confirmó la presencia y concentración de los residuos de los antimicrobianos presentes en las heces de los animales, a través de la metodología analítica confirmatoria LC-MS/MS.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. Producción de cama de broiler

La cama de broiler constituye el principal subproducto de la industria avícola, y está constituido principalmente por las deyecciones de las aves, junto a los materiales de la cama, plumas, restos de comida y agua y la microbiota (Santos Dalólio *et al.*, 2017). Si se considera que para el año 2020 el número de pollos broiler beneficiados a nivel nacional correspondió a 297.285.853 (ODEPA, 2021) y que en promedio la producción de cama de broiler por ave por ciclo productivo es de 3,6 Kg (Santos Dalólio *et al.*, 2017), se estima que la producción de camas de broiler para el año 2020 correspondió a más de un millón de toneladas.

2. Usos de los antimicrobianos en animales de producción

Los antimicrobianos se definen como sustancias que pueden eliminar (bactericida) o inhibir (bacteriostático) el crecimiento de varios agentes bacterianos. Son producidos naturalmente por organismos vivos o sintéticamente bajo condiciones de laboratorio (Bacanli y Başaran, 2019).

Los antimicrobianos se administran a los animales de diferentes formas: oral, parenteral o tópica. El principal uso de los antimicrobianos en los animales productivos es para el tratamiento y prevención de enfermedades de origen bacteriano, que incluyen mastitis, artritis, enfermedades respiratorias e infecciones gastrointestinales. El uso de ellos como promotores del crecimiento se describió por primera vez a mediados de los 40 y luego se convirtió en una práctica común, a pesar de que en 2006 la Unión Europea la prohibió (Bacanli y Başaran, 2019). Por otra parte, en Argentina, Brasil, China, India, Indonesia, Filipinas, Rusia y Sudáfrica aún se encuentra autorizado el uso de los antimicrobianos como promotores del crecimiento (Laxminarayan *et al.*, 2015).

Es así, como en el quinto informe anual de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) sobre los agentes antimicrobianos destinados a ser utilizados en los animales, se describe que 112 países, , no utilizaron agentes antimicrobianos para la promoción del crecimiento en los animales, ya sea tengan o no legislación al respecto. Mientras que, 42 países, informaron el uso de antimicrobianos como promotores del crecimiento. Los países restantes, correspondientes a seis, indicaron que no estaban seguros de si se estaban

utilizando los antimicrobianos como promotores del crecimiento, cuatro países no tienen legislación relacionada con el uso de los antimicrobianos como promotores del crecimiento y dos países explicaron que contaban con un marco regulatorio que prohibía parcial o totalmente este uso. Cuando se diferencia por región, América, Asia, Extremo Oriente y Oceanía poseen los porcentajes más altos de países que utilizan antimicrobianos como promotores del crecimiento. Mientras que, Europa ha estado trabajando durante muchos años, ya que esta región es la que presenta el porcentaje más bajo de uso y autorización de los antimicrobianos como promotores del crecimiento en los animales (OIE, 2021).

Durante el año 2010 se estimó que el uso de antimicrobianos a nivel mundial fue de 63151 ± 1560 toneladas, en la producción de leche, huevos y carnes, con un aumento proyectado de $105,596 \pm 3605$ toneladas para el 2030 (Kumar *et al.*, 2020). A escala mundial, el consumo de antimicrobianos en promedio por año por Kg de animal producido varía entre las especies, con valores de 45 mg/Kg en bovinos, 148 mg/Kg en pollo y 172 mg/Kg en cerdo (Manyi-Loh *et al.*, 2018). China, con un 23%, es el país que más antibióticos usa en animales destinados a consumo humano, lo siguen Estados Unidos con un 13%, Brasil con un 9%, India y Alemania con un 3% (Bacanli y Başaran, 2019).

3. Legislación internacional y nacional sobre el uso de antimicrobianos en animales de producción

A nivel internacional, el Reglamento de la Comisión Europea N° 470/2009 establece los límites máximos residuales (LMR) de sustancias farmacológicamente activas en los alimentos de origen animal utilizadas en la medicina veterinaria, como los antibióticos, incluyendo la carne, el pescado, la leche, los huevos y la miel (CE, 2009).

A nivel nacional el uso de los antimicrobianos se encuentra regulado por el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), como por la Resolución exenta N°: 4854/2019 que autoriza el uso de los antimicrobianos en los animales de producción con los siguientes fines: terapéutico, metafiláctico, profiláctico y extra-etiqueta (SAG, 2019). En la lista de la OIE de agentes antimicrobianos importantes para la medicina veterinaria, se describe que los agentes antimicrobianos de importancia corresponden a la biclomicina, ácido fusídico, novobiocina, ortosaminas, quinoxalinas y estreptograminas. Los agentes antimicrobianos de importancia elevada incluyen a rifamicinas, fosfomicinas, ionóforos, lincosamidas,

pleuromutilinas y polipéptidos. Mientras que, los agentes antimicrobianos de importancia crítica son los aminoglucósidos, cefalosporinas, macrólidos, penicilinas, fenicoles, quinolonas, sulfonamidas y tetraciclinas (OIE, 2019).

Por otra parte, el uso de los antimicrobianos como promotores del crecimiento en nuestro país se encuentra prohibido desde el año 2006, bajo la Resolución Exenta N° 1992/2006 (SAG, 2006). De forma similar, la Resolución Exenta N° 3.599/1996 prohíbe el uso de fármacos que contengan cloranfenicol o cualquiera de sus sales, en animales cuyos productos y subproductos sean destinados a la alimentación humana. Asimismo, la Resolución Exenta SAG N° 1.500/ 1998 prohíbe el uso de productos farmacéuticos de uso veterinario que contengan sustancias derivadas de nitrofuranos y 5-nitroimidazoles, para ser administrados a animales cuyos productos sean o puedan ser destinados a la alimentación humana en cualquier etapa de su vida (SAG, 2019).

En el mismo contexto, la Resolución Exenta N° 551/2014 del Ministerio de Salud (MINSAL) fija los LMR de residuos de medicamentos veterinarios en alimentos destinados al consumo humano (MINSAL, 2019).

4. Implicancias de los residuos de antimicrobianos en heces de animales productivos

El uso de los antimicrobianos y la presencia de sus residuos en las heces de los animales para consumo humano tienen diversas implicancias. Una de ellas es la excreción de aproximadamente 30% a 90% de los antimicrobianos y sus metabolitos al medio ambiente a través de los desechos animales. Los metabolitos activos de los antibióticos pueden llegar a la capa superior del suelo a través de la fertilización con los desechos animales, transportarse al agua superficial a través de la escorrentía y al agua subterránea a través de la lixiviación y finalmente ingresar a la cadena alimentaria. Debido a la débil absorción en el suelo, las sulfonamidas se han detectado con frecuencia en las aguas superficiales, subterráneas e incluso en el agua de los poros del suelo. Por otra parte, las tetraciclinas y las fluoroquinolonas pueden persistir durante varios meses o años en el suelo (Gu *et al.*, 2019).

La microbiota fecal de los animales alberga una vasta reserva de genes de resistencia a antibióticos (ARG) que podrían ser adquiridos por bacterias comensales y patógenas, tanto para humanos como animales. Los residuos de los antibióticos, las bacterias resistentes y los ARG pueden ser transportados al medio ambiente a través del estiércol de los animales

(Xiong *et al.*, 2018). La adquisición de resistencia a los antibióticos puede producir cambios específicos en el metabolismo bacteriano, que pueden ser útiles para el crecimiento bacteriano en algunos hábitats o en condiciones ambientales particulares. Se ha demostrado que algunos elementos que sirven para resistir altas concentraciones de antibióticos también tienen otras funciones en sus huéspedes originales, este fenómeno se conoce como pleiotropía (Por ejemplo: las bacterias que se adaptan al aumento de temperatura se volvieron resistentes a la rifampicina) (Grenni *et al.*, 2017).

Puede haber dos formas, es decir, directa o indirectamente, a través de las cuáles estos antibióticos podrían dañar al ser humano y al medio ambiente. Los antibióticos y sus metabolitos, incluso a niveles traza, tienen el potencial de bioacumularse y causar un riesgo potencial para la salud humana y la microbiota presente en el suelo. Las pequeñas concentraciones de antibióticos afectan la actividad endocrina, el metabolismo y el desarrollo en los humanos (Muhammad *et al.*, 2019).

Tanto las bacterias resistentes a los antibióticos (ARB) como los ARG pueden reducir el potencial terapéutico de los antibióticos contra bacterias, patógenos humanos y animales. La infección puede persistir en el hospedero por un tiempo más prolongado y las bacterias que tienen resistencia a los antibióticos pueden no ser eliminadas con los antibióticos de primera línea. Los expertos internacionales consideran que la resistencia a los antibióticos es uno de los principales problemas de salud. Así, a nivel mundial se reportan 7 millones de muertes humanas anuales asociadas a la resistencia a los antibióticos, con 23 mil muertes cada año solo en los Estados Unidos (Xie *et al.*, 2018).

Debido a que las deyecciones de los pollos broiler se utilizan como fertilizante para la fertilización de campos de agricultura, diversos estudios han mostrado que las plantas cultivadas en el suelo modificado con las deyecciones absorben los antimicrobianos presentes en estas. Estos antimicrobianos crean riesgos potenciales para la salud, lo que es de especial preocupación para las personas que son alérgicas a los antimicrobianos. Además, se ha reportado que los antimicrobianos producen reacciones inflamatorias en el hígado y retraso del crecimiento de las células embrionarias (Li *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014).

Por otra parte, debido a que se generan grandes cantidades de estiércol de cerdo, estos deben tener una adecuada gestión para evitar problemas ambientales graves, siendo el

almacenamiento del estiércol en tanques o lagunas y la aplicación a los campos de cultivo como fertilizante sus usos más habituales (Vázquez *et al.*, 2015). En el caso de los bovinos, el estiércol puede terminar como purín, que combina los excrementos producidos por el ganado con agua de lluvia y agua de lavado, los purines y el estiércol sólido tradicionalmente son esparcidos directamente sobre el suelo como fertilizante (Font-Palma, 2019). Es así, como varios estudios han revelado que la aplicación de estiércol con antibióticos, residuos de antibióticos o poblaciones resistentes a los antibióticos ha conducido a una prevalencia de ARG en los suelos (Wang *et al.*, 2015).

5. Técnicas analíticas para la detección de residuos de antimicrobianos en alimentos de origen animal

Los métodos analíticos cuantitativos basados en cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS), cromatografía líquida con detección ultravioleta y la cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS), son los métodos estándar para detectar y cuantificar antimicrobianos (Majdinasab *et al.*, 2020). En algunos estudios, otros métodos basados en electroforesis capilar han demostrado ser efectivos en la detección de residuos de antibióticos (Bacanli y Başaran, 2019).

Hoy en día, los métodos basados en la cromatografía líquida-espectrometría de masas de tiempo de vuelo cuádruplo (LC-QTOF-MS) proporcionan el grado de confianza necesario para el análisis de residuos de medicamentos veterinarios en muestras biológicas, debido a su mayor confianza, sensibilidad y especificidad. Utilizando LC-QTOF-MS se han detectado con éxito medicamentos veterinarios en diferentes matrices como piensos de bovinos, conejos, aves, cabras y cerdos, leche, tejido de pescado, músculo de aves de corral, hígado, tejido renal y orina humana. La LC-QTOF-MS tiene una amplia gama de aplicaciones y buena viabilidad; sin embargo, su aplicación para la determinación de varias clases de antibióticos y hormonas esteroideas en heces de ganado y aves de corral sigue siendo limitada (Wang *et al.*, 2020).

El inconveniente con estas técnicas confirmatorias es que requieren una capacidad analítica instalada de alto costo, así como de un alto nivel de capacitación técnica (Majdinasab *et al.*, 2020). Esto, hace que su acceso sea difícil para los productores, por lo que los métodos

rápidos de *screening* han sido utilizados para monitorear la presencia de residuos de antimicrobianos en alimentos debido a la alta efectividad y bajo costo.

6. Métodos de *screening* microbiológico para la detección de residuos de antimicrobianos

Los métodos de *screening* se basan principalmente en la inhibición microbiológica, que fueron las primeras técnicas utilizadas para detectar residuos de antibióticos y todavía son muy utilizados para la detección preliminar de residuos de antibióticos en tejidos animales comestibles. Se utilizan debido a su bajo costo, portabilidad, fácil uso, amplio espectro y alto rendimiento. Se basan en la capacidad de los antibióticos de inhibir el crecimiento de bacterias en los sistemas de detección, por lo que tienen el potencial de cubrir y detectar todo el espectro de antibióticos dentro de un sistema de detección. Los métodos de inhibición microbiológica se dividen en dos categorías: métodos en placa de Petri y métodos en tubo. Los métodos de placa o multiplacas consisten en varios medios de cultivo con distintos valores de pH y con cepas bacterianas con sensibilidades variables a los antimicrobianos correspondientes y, a veces, complementadas con sustancias que mejoran o inhiben la actividad de ciertos antimicrobianos (Dang *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2021). Posterior a la incubación de las placas a la temperatura óptima de crecimiento de la cepa bacteriana, la presencia de un antimicrobiano se mostrará como una zona de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor de la muestra. El diámetro de la zona de inhibición se correlaciona teóricamente con la concentración del compuesto antimicrobiano (Pikkemaat *et al.*, 2009).

Los métodos de tubo (prueba de vial o ampolla) contienen un medio de cultivo sembrado con esporas de una bacteria sensible suplementada con un indicador de pH o redox. Posteriormente se aplica la muestra a la prueba de tubo. A la temperatura adecuada, las bacterias comienzan a crecer y a producir ácido, lo que provocará un cambio de color. La presencia de un compuesto antimicrobiano se hace evidente por un cambio de color retrasado o ausente, debido al crecimiento deficiente de la bacteria en la prueba (Pikkemaat *et al.*, 2011; Gandová *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2021).

En los últimos años, se han desarrollado diversos métodos de inhibición microbiológica para la detección de residuos de antimicrobianos en matrices animales como leche, huevo, músculo, hígado y riñón (Cháfer-Pélicas *et al.*, 2010, Gaudin *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2021).

Dentro de las pruebas de tubo se encuentran Charm®KIS y Premi®Test. Sin embargo, no son lo suficientemente sensibles a algunos antimicrobianos de uso común, incluidos los aminoglucósidos, macrólidos y quinolonas, e incluso no pueden clasificar y determinar diferentes grupos de antimicrobianos (Pikkemaat *et al.*, 2011). Entre los diversos métodos de placa Petri para la detección de residuos de antimicrobianos se encuentra el método *Screening Test for Antibiotic Residues* (STAR), que consiste en una prueba de cinco placas desarrollada en un laboratorio de Referencia de la Unión Europea para la detección de residuos de antimicrobianos en leche y músculo, y validado de acuerdo con la Decisión Europea 2002/657/EC (Gaudin *et al.*, 2010). Otro método validado para músculo y tejidos de pollo es el de siete placas utilizado por los laboratorios del Servicio de Inspección y Seguridad Alimentaria (FSIS) del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, 2011). En general, estos métodos en placa Petri utilizan varias placas, cada una con distintos medios de cultivo y condiciones de pH para mejorar la sensibilidad del método (Gaudin *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2021). A pesar de que estos métodos se utilizan frecuentemente en matrices comestibles, hasta el momento no existe información en la literatura respecto a métodos de *screening* en placa implementados y validados para la matriz heces.

El uso de las heces como matriz de análisis de residuos sería una herramienta de detección efectiva, ya que la mayoría de los compuestos farmacológicos son eliminados del organismo a través de ellas. Por ello, los métodos de análisis que permitan la detección simultánea de antibióticos en estas matrices, pueden convertirse en una herramienta útil para la detección de residuos de antibióticos en animales productivos, de manera no invasiva y de forma temprana, al ser posible su utilización durante toda la etapa productiva y previo a la faena. Al mismo tiempo, puede ser una herramienta eficaz para obtener información sobre la diseminación de antibióticos al medio ambiente pudiendo convertirse en una valiosa herramienta para monitorear las tendencias en el uso de antibióticos en las granjas (Berendsen *et al.*, 2015).

Actualmente, nuestro grupo de investigación, en el marco del proyecto FONDEF ID19I10033 ha implementado y validado un método de *screening* microbiológico en la matriz heces. Para verificar que este método sea capaz de detectar la presencia de antibióticos en muestras incurridas, es decir provenientes de animales tratados, en esta Memoria de Título

se utilizaron aves tratadas experimentalmente con representantes de las familias de las tetraciclinas, quinolonas, sulfonamidas, macrólidos, β -lactámicos y lincosamidas. Se verificó la presencia de residuos de antibióticos en las heces y se confirmó la presencia y concentración de estos residuos mediante la metodología analítica confirmatoria correspondiente a cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS).

Esta propuesta constituye un nuevo enfoque para la detección temprana de antimicrobianos en los animales productivos previo a la faena, con la finalidad de evitar o disminuir la presencia de residuos en el producto final, mejorando así la inocuidad de los alimentos y el impacto ambiental de la producción.

OBJETIVO GENERAL

Verificar una metodología de *screening* microbiológico para macrólidos, sulfonamidas, tetraciclinas, quinolonas, lincosamidas y β -lactámicos en muestras de deyecciones de aves tratadas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Detectar la presencia de seis familias de antimicrobianos en muestras de deyecciones de aves experimentalmente tratadas, mediante el método de *screening* microbiológico.
2. Evaluar la concordancia de lo obtenido en el método de *screening* microbiológico con los resultados obtenidos mediante LC-MS/MS.

MATERIALES Y MÉTODOS

La presente Memoria de Título se realizó entre los meses de julio de 2021 y diciembre de 2021, en el marco del proyecto ID19I10033 financiado por el Fondo de Fomento al Desarrollo Científico y Tecnológico (FONDEF), cuya investigadora responsable es la Dra. Javiera Cornejo.

Animales experimentales

Los animales experimentales correspondieron a pollos broiler machos, de genética Ross 308, los cuáles fueron distribuidos en seis grupos experimentales, para el estudio de cada uno de los antimicrobianos seleccionados, los que correspondieron a: oxitetraciclina, entofloxacino, sulfacloropiridazina, eritromicina, ampicilina y lincomicina. .

Las aves fueron mantenidas desde el día 1 de vida en baterías de crianza, con condiciones ambientales controladas ($25 \pm 5^{\circ}\text{C}$ de temperatura, la que varió de acuerdo a la edad de las aves 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 (Aviagen, 2018). Las jaulas contaron con un piso de alambre elevado, con el fin de poder obtener las muestras fecales. Las aves fueron criadas y monitoreadas durante todo el experimento en la Unidad de Manejo Animal (UMA) del Departamento de Medicina Preventiva Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la U. de Chile (FAVET). Para la mantención de los animales experimentales se respetaron las condiciones de bienestar animal, aprobadas por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Chile (Anexo 1). Además, se tomaron en consideración las medidas de bioseguridad para el trabajo con animales experimentales y el trabajo en laboratorios aprobadas por el Comité de Bioseguridad de FAVET (Anexo 2).

Grupos experimentales y tratamiento

Para definir los tamaños de los grupos experimentales se consideró el criterio establecido por la Agencia Europea de Medicamentos, Guía: Aproximación hacia la armonización de los períodos de resguardo EMEA/CVMP/SWP/735325 (2016). De esta forma se contó con seis animales tratados por cada punto de muestreo para asegurar la obtención de mínimo tres resultados necesarios para entregar validez al estudio.

Se trabajó con seis grupos experimentales diferentes, donde para cada grupo experimental se siguieron las mismas condiciones de manejo. Al día 21 de vida, las aves se pesaron y se formaron dos grupos experimentales al azar. Grupo A (tratamiento) de seis pollos y un grupo B (control) de dos pollos, los que se mantuvieron en las mismas condiciones que el grupo experimental, pero sin tratamiento. La administración de los fármacos fue vía oral, mediante una sonda oro-esofágica. En el caso de la ampicilina, al no existir una formulación farmacéutica oral autorizada para pollos broiler, se utilizó un estándar certificado, el cual fue administrado vía endovenosa en dosis única.

Se utilizaron formulaciones farmacéuticas autorizadas, para el tratamiento de los animales experimentales. Los antimicrobianos seleccionados correspondieron a los representantes de cada una de las familias de antimicrobianos más utilizadas en los diferentes animales destinados a consumo humano. Las formulaciones farmacéuticas correspondieron a: sulfaclorpiridazina (COLIPRIM[®]), eritromicina (ERITROFEED[®] 80%), enrofloxacino (ENROMIC[®] 20%), oxitetraciclina (ZANIL[®] HCL 80%), lincomicina (FUROCICLINA[®] 4,4%) y ampicilina trihidrato (Sigma Aldrich CAS: 7177-48-2).

Los Grupos experimentales correspondieron a:

1. Grupo 1: Fue tratado con sulfaclorpiridazina con una dosis de 30 mg/Kg.
2. Grupo 2: Fue tratado con eritromicina con una dosis de 90 mg/Kg.
3. Grupo 3: Fue tratado con enrofloxacino con una dosis de 10 mg/Kg.
4. Grupo 4: Fue tratado con ampicilina trihidrato con una dosis de 10 mg/Kg.
5. Grupo 5: Fue tratado con oxitetraciclina con una dosis de 59 mg/Kg.
6. Grupo 6: Fue tratado con lincomicina con una dosis de 0,4 mg/Kg.

Las muestras fueron recolectadas posterior a la administración, a las cuatro y ocho horas post-tratamiento (PT) durante dos días consecutivos, lo que da un total de cuatro puntos de muestreos totales y de 160 muestras, con la finalidad de dar tiempo a la metabolización de los antimicrobianos. En el caso de la ampicilina al ser dosis única endovenosa, se realizaron los muestreos a las horas uno, dos, cuatro y seis PT, completando cuatro puntos de muestreos, y un total de 32 muestras. Las muestras fueron almacenadas a -20°C de forma individual hasta su análisis.

Objetivo N°1: Detectar la presencia de seis familias de antimicrobianos en muestras de deyecciones de aves experimentalmente tratadas, mediante el método de *screening* microbiológico.

Método de *screening* microbiológico

Procesamiento de las muestras

La preparación y análisis de las muestras se realizó en el Laboratorio de Inocuidad de los Alimentos (LIA) de FAVET, ya que este cuenta con todo el equipamiento de laboratorio necesario para realizar la preparación, fortificación y extracción de este tipo de muestras. Del mismo modo, el laboratorio cuenta con todas las medidas de bioseguridad necesarias para realizar este tipo de investigaciones tales como campanas de extracción para trabajar con compuestos volátiles y reactivos peligrosos, gabinete de bioseguridad para trabajar con las cepas experimentales, zonas de manejo de estándares para evitar la contaminación de las muestras blanco, zona de preparación de muestras y zona de pesaje separadas para evitar la contaminación cruzada. El LIA está acreditado bajo las normas ISO 17025 Of.2017, por lo tanto, se trabajó acorde a las normas de calidad establecidas en sus procedimientos estandarizados.

Extracción de residuos de antimicrobianos en deyecciones de pollos broiler

El protocolo consistió en una extracción de los residuos de antimicrobianos con un solvente orgánico, desde muestras de deyecciones de pollos. Para esto, se pesó $2,0 \pm 0,01$ gramos de muestra en un tubo de polipropileno de 50 mL y se agregó 1,5 mL de acetonitrilo (ACN) LiChrosolv[®], grado HPLC (Merck) y 1,5 mL de un buffer fosfato con un pH en específico según el antimicrobiano a analizar, como se puede ver en la Tabla 1. Se agitó cada muestra en un agitador Multi Reax[®] (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Germany) durante 10 minutos a velocidad máxima y luego se incubaron a -20°C por 10 minutos. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a temperatura ambiente en una centrífuga Eppendorf[®] Centrifuge 5804 (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) por 10 minutos a 4000 rpm, se rescató el sobrenadante y se filtró utilizando un filtro de jeringa CLEAR PTFE-22/25 (Macherey Nagel) de $0,2 \mu\text{m}$ de poro y 25 mm de diámetro. El extracto filtrado se transfirió a un tubo de microcentrífuga estéril de 5 mL (Jet-Biofil[®]), e inmediatamente se inocularon 200 μL de este filtrado en cada cilindro dispuesto de forma vertical en la placa de Petri,

incluyendo además un control con droga pura. Las placas se incubaron por 18 a 24 horas a la temperatura óptima de crecimiento del microorganismo y, finalmente, con un pie de metro se midieron los radios de los halos de inhibición y se informaron en milímetros. La presencia de un halo de inhibición ≥ 2 mm respecto al blanco indicó una detección positiva del analito.

Tabla 1: Solvente utilizado para la extracción de cada antimicrobiano.

Cepa de referencia	Familia	Representante	Solvente
<i>Kocuria rhizophila</i> ATCC 9341	Macrólidos	Eritromicina	ACN
<i>Kocuria rhizophila</i> ATCC 9341	B-lactámicos	Ampicilina	ACN + Buffer Fosfato pH 8
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	Quinolonas	Enrofloxacino + Ciprofloxacino	ACN + Buffer Fosfato pH 8
<i>Geobacillus</i> <i>stearothermophilus</i> ATCC 9341	Sulfonamidas	Sulfacoloropiridazina	ACN + Buffer Fosfato pH 6
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	Tetraciclinas	Oxitetraciclina + 4- epi-oxitetraciclina	ACN + Buffer Fosfato pH 8
<i>Kocuria rhizophila</i> ATCC 9341	Lincosamidas	Lincomicina	ACN + Buffer Fosfato pH 8

Preparación de los medios de cultivo

Para la detección de cada antimicrobiano se utilizó un medio de cultivo específico al que se le ajustó el pH para favorecer la detección del analito: (Difco™) Antibiotic Medium 5 (Ref. N° 227710), (Difco™) Antibiotic Medium 8 (Ref. N° 266710), y (Difco™) Mueller Hinton Agar (Ref. N° 225250). Estos medios fueron esterilizados y posteriormente inoculados con

una cepa de colección sensible al analito en estudio. Posteriormente, se vertieron 10 mL de medio inoculado a una placa Petri estéril de 90 x 15 mm. Una vez solidificado el medio, se colocaron cilindros metálicos de 8 mm de diámetro sobre cada placa, en donde se depositaron por triplicado 200 µL del filtrado obtenido con el proceso de extracción.

Kocuria rhizophila ATCC 9341: se inoculó a una concentración final de $1,5 \times 10^6$ UFC/mL en: Medio N° 8 a pH 8,0 para la detección de eritromicina, Medio N° 5 pH 6,0 para la detección de ampicilina, y Medio Mueller Hinton (MH) pH 8,0 para la detección de lincomicina. Las placas fueron incubadas a 35°C por 18 – 24 horas.

Bacillus subtilis ATCC 6633: se inoculó a una concentración final de $3,0 \times 10^6$ esporas/mL en Medio N° 5 pH 8,0 para la detección de enrofloxacino y su metabolito activo ciprofloxacino. Las placas fueron incubadas a 30°C por 18 – 24 horas.

Geobacillus stearothermophilus ATCC 10149: se inoculó a una concentración final de $4,5 \times 10^6$ esporas/mL en Medio MH pH 7,3 para la detección de sulfacloropiridazina. Las placas fueron incubadas a 55°C por 18 horas.

Bacillus cereus ATCC 11778: se inoculó a una concentración final de $3,0 \times 10^6$ esporas/mL en Medio N° 8 pH 6,0 para la detección de oxitetraciclina y su epímero 4-epi-oxitetraciclina. Las placas fueron incubadas a 30°C por 18 – 24 horas.

Las condiciones experimentales para las cepas de referencia se encuentran en la Tabla 2.

Tabla 2: Condiciones experimentales de las cepas de referencia.

Familia	Representante	Agar*	pH	Cepa de referencia	T (°C) incubación
Macrólidos	Eritromicina	N°8	8	<i>Kocuria rhizophila</i> ATCC 9341	35
B-lactámicos	Ampicilina	N°5	6	<i>Kocuria rhizophila</i> ATCC 9341	35
Quinolonas	Enrofloxacino + Ciprofloxacino	N°5	8	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	30

Sulfonamidas	Sulfaclopiradizina	MH+5ppb TMT	7,3	<i>Geobacillus</i> <i>stearotherophilus</i> ATCC 10149	55
Lincosamidas	Lincomicina	MH	8	<i>Kocuria rhizophila</i> ATCC 9341	35
Tetraciclinas	Oxitetraciclina + 4-epi-oxitetraciclina	N°8	6	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	30

*Medio antibiótico N°5, Medio antibiótico N°8, y Medio MH (Mueller Hinton) son medios de cultivo usualmente recomendados para la preparación de placas para ensayos microbiológicos de antibióticos. Para la detección de sulfonamidas mediante sinergia *in vitro* con trimetoprim (TMP), se agregó TMP al medio MH, a una concentración final de 5 ng/ml para mejorar la detección de los halos de inhibición.

Objetivo N°2: Evaluar la concordancia mediante lo obtenido en el método de *screening* microbiológico con los resultados obtenidos mediante LC-MS/MS.

Detección y cuantificación de residuos en deyecciones mediante LC-MS/MS

Las muestras positivas al *screening* microbiológico se confirmaron mediante un método analítico multi-residual implementado y validado previamente en el laboratorio de Farmacología Veterinaria (FARMAVET) de FAVET. Para el análisis de las muestras se utilizó un cromatógrafo líquido, constituido por una bomba cuaternaria, un autosampler y un horno de columna, (Agilent serie 1290 infinity) acoplado a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (API 5500, ABSCIEX). La columna analítica correspondió a Synergi 4u fusión RP 30a 50 x 2,0 mm. El software para el manejo del equipo correspondió a Analyst 1.6.3 y para la integración de las muestras se utilizó el programa Multiquant 3.0. El protocolo del método confirmatorio se basó en la metodología analítica publicada previamente por Pokrant *et al.* (2021) (Anexo Nro.3), la cual fue optimizada para detectar y cuantificar residuos de antimicrobianos en heces de animales de producción mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS). Durante la confirmación, tanto las condiciones cromatográficas como las condiciones espectrométricas utilizadas, son las que se indican en esta publicación.

Los solventes usados para el análisis fueron: agua, metanol (MET) y ACN de la línea LiChrosolv®, grado HPLC. El buffer EDTA-McIlvaine se preparó con ácido cítrico monohidrato, hidrógeno fosfato disódico dihidrato y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Todos los solventes y reactivos fueron fabricados por Merck KgaA (Darmstadt, Germany). Las concentraciones de los residuos detectados fueron determinadas mediante la ecuación de la recta, la que fue obtenida partir de un análisis de regresión lineal de curvas de calibración en matriz fortificada, las que fueron analizadas junto a las muestras experimentales. Además, se consideró un coeficiente de determinación mayor o igual a 0,95. Finalmente, se comparó si los resultados obtenidos mediante LC-MS/MS eran mayores o iguales a la capacidad de detección ($CC\beta$) del método de *screening* microbiológico.

RESULTADOS

Verificación del método de *screening* microbiológico

En el proceso de verificación de la metodología de *screening* microbiológico de seis placas, la lectura de los resultados se realizó entre 18 y 24 horas posteriores a la incubación de los extractos de deyecciones, y se registró su radio en milímetros. Dependiendo de las muestras, estas contenían antimicrobianos representantes de las siguientes familias de antimicrobianos: tetraciclinas (representadas por la pareja de analitos oxitetraciclina y su epímero 4-epi-oxitetraciclina), β -lactámicos (representados por ampicilina), macrólidos (representados por eritromicina), quinolonas (representadas por la pareja de analitos enrofloxacino y su metabolito activo ciprofloxacino), sulfonamidas (representadas por sulfacloropiridazina) y lincosamidas (representadas por lincomicina). Posteriormente, las muestras que resultaron positivas al *screening* microbiológico, fueron analizadas mediante LC-MS/MS y se cuantificó su concentración. Tanto el promedio del radio de los halos y las concentraciones cuantificadas para todos los antimicrobianos en estudio se encuentran en la Tabla 3.

Respecto a enrofloxacino y su metabolito activo ciprofloxacino, el promedio del radio de los halos de las muestras analizadas mediante el *screening* microbiológico estuvo entre los $13,4 \pm 0,7$ y $15,8 \pm 0,3$ mm; mientras que los halos de los blancos, que corresponden a pollos sin tratar, fueron de $1,2 \pm 0,6$ y 0 mm. Por lo que las muestras de los cuatro tiempos de muestro analizadas fueron positivas al *screening* microbiológico. En la Figura (a) se puede ver el halo de inhibición correspondiente a una de las muestras analizadas para enrofloxacino más ciprofloxacino. Posteriormente, se cuantificó la concentración de las muestras positivas al *screening* por LC-MS/MS, obteniéndose concentraciones que fueron desde 15.111 ± 9.107 hasta 46.882 ± 4.568 ng/g. Por otra parte, en los blancos no se detectaron concentraciones de estos residuos mediante LC-MS/MS. Es así como en las Figuras 2 (a) y (b) se muestran dos cromatogramas representativos de las inyecciones de las muestras de enrofloxacino y ciprofloxacino, en donde se observan los peaks cromatográficos a los 12,41 minutos para ambos analitos.

Para oxitetraciclina y su epímero 4-epi-oxitetraciclina las muestras de los cuatro tiempos de muestreo analizadas fueron positivas al *screening* microbiológico, con un promedio de radio

de halo que estuvo entre los $14 \pm 0,7$ y $17,7 \pm 0,7$ mm, mientras que los halos de los blancos fueron de $1,3 \pm 0,3$ y $2,2 \pm 0,3$ mm por lo que fueron negativos al *screening*. En la Figura 1 (b) se puede ver el halo de inhibición para una de las muestras analizadas de oxitetraciclina y 4-epi-oxitetraciclina. Las concentraciones cuantificadas de las muestras positivas al *screening* fueron de los 4.442 ± 3.998 ng/g hasta los 12.916 ± 16.455 , mientras que en los blancos no se detectaron concentraciones de estos residuos. En la Figura 2 (c) y (d) se muestran dos cromatogramas representativos de las inyecciones de las muestras de oxitetraciclina y 4-epi-oxitetraciclina, en donde se observan los peaks cromatográficos a los 13,82 y 11,71 minutos, respectivamente.

Para sulfaclopiridazina, al igual que los dos antimicrobianos anteriores las muestras de los cuatro tiempos de muestreo analizadas fueron positivas al *screening* microbiológico, con un promedio de radio de halo que estuvo entre los $9,3 \pm 0,8$ y los $22,5 \pm 0$ mm, mientras que los blancos fueron de $4,3 \pm 0,3$ y $4,5 \pm 0$ mm, por lo que fueron negativos al *screening*. En la Figura 1 (c) se puede ver el halo de inhibición para una de las muestras analizadas de sulfaclopiridazina. Respecto a las concentraciones cuantificadas de las muestras positivas al *screening*, estas estuvieron entre los 895 ± 32 y 4.693 ± 1.032 ng/g; mientras que en los blancos no se detectaron concentraciones de estos residuos. En la Figura 2 (e) se muestra un cromatograma representativo de la inyección de las muestras en donde se observa un peak cromatográfico correspondiente a sulfaclopiridazina a los 14,82 minutos.

Continuando con eritromicina, las muestras analizadas de los cuatro puntos de muestreo fueron positivas al *screening*, con un promedio de radio de halo que estuvo entre los $15,3 \pm 0,4$ y los $17,4 \pm 3$ mm; mientras que los blancos fueron de $6,8 \pm 1,4$ y $9,2 \pm 1$ mm, por lo que fueron negativos al *screening*. En la Figura 1 (d) se puede ver el halo de inhibición correspondiente a una de las muestras analizadas para eritromicina. Posteriormente, las concentraciones cuantificadas de las muestras positivas al *screening* estuvieron entre los 13.076 ± 1.772 y 46.193 ± 28.545 ng/g; mientras que en los blancos no se detectaron concentraciones de estos residuos. En la Figura 2 (f) se muestra un cromatograma representativo de la inyección de las muestras, en donde se observa un peak cromatográfico correspondiente a eritromicina a los 15,75 minutos.

Para ampicilina, el promedio del radio de los halos para las muestras analizadas mediante el método de *screening* fue desde los $20,5 \pm 0$ hasta los $28,8 \pm 2,9$ mm, mientras que los blancos fueron de $3 \pm 0,9$ y $4,5 \pm 0,9$ mm, por lo que las muestras de los cuatro puntos de muestreo analizadas fueron positivas al *screening* microbiológico, mientras que los blancos fueron negativos. Así, en la Figura 1 (e) se puede observar el halo de inhibición correspondiente a una de las muestras analizadas de ampicilina. En cuanto a las concentraciones cuantificadas, estas estuvieron entre los 14.491 ± 16.133 y 57.751 ± 7.007 ng/g, mientras que en los blancos no se detectaron concentraciones de estos residuos. En la Figura 2 (g) se muestra un cromatograma representativo de la inyección de las muestras, en donde se observa un peak cromatográfico correspondiente a ampicilina a los 13,09 minutos.

Por último, para lincomicina igual que los cinco antimicrobianos anteriores las muestras de los cuatro tiempos de muestreo analizadas fueron positivas al método de *screening* microbiológico y los blancos fueron negativos, el promedio de radio de los halos de las muestras analizadas estuvo entre los $15,3 \pm 5$ y $17,9 \pm 0,2$ mm, mientras que los blancos fueron de 0 mm, lo que quiere decir que no presentaron un halo de inhibición, y $2,8 \pm 0,3$ milímetros. En la Figura 1 (f) se puede ver el halo de inhibición correspondiente a una de las muestras analizadas de lincomicina. Por otra parte, las concentraciones cuantificadas fueron de 404.562 ± 313.206 hasta los $1.578.003 \pm 1.453.197$ ng/g, mientras que en los blancos no se detectaron concentraciones de estos residuos. En la Figura 2 (h) se muestra un cromatograma representativo de la inyección de las muestras, en donde se observa un peak cromatográfico correspondiente a lincomicina a los 6,71 minutos.

Tabla 3: Promedio de radio de halos (mm) y concentraciones cuantificadas para enrofloxacino + ciprofloxacino, oxitetraciclina + 4-epi-oxitetraciclina, sulfacloropiridazina, eritromicina, ampicilina y lincomicina.

Antimicrobiano	Muestreo	Horas postratamiento	CCβ	Promedio radio halo (mm)	Concentración cuantificada (ng/gr)
----------------	----------	-------------------------	-----	--------------------------------	--

Enrofloxacin + Ciprofloxacin	T1	4	402 μg/Kg	15,8 ± 0,3	46882 ± 4568
Enrofloxacin + Ciprofloxacin	T2	8	402 μg/Kg	13,4 ± 0,7	45759 ± 4766
Enrofloxacin + Ciprofloxacin	T3	4	402 μg/Kg	14,5 ± 0,5	22725 ± 3787
Enrofloxacin + Ciprofloxacin	T4	8	402 μg/Kg	13,8 ± 0,3	15111 ± 9107
Enrofloxacin + Ciprofloxacin	Bco	Pollos sin tratamiento	402 μg/Kg	1,2 ± 0,6	ND
Enrofloxacin + Ciprofloxacin	Bco	Pollos sin tratamiento	402 μg/Kg	0 ± 0	ND
Oxitetraciclina + 4-epi-oxitetraciclina	T1	4	103 μg/Kg	16,4 ± 3,7	10769 ± 7544
Oxitetraciclina + 4-epi-oxitetraciclina	T2	8	103 μg/Kg	14 ± 0,7	12916 ± 16455
Oxitetraciclina 4-epi-oxitetraciclina	T3	4	103 μg/Kg	17,7 ± 0,7	4442 ± 3998
Oxitetraciclina + 4-epi-oxitetraciclina	T4	8	103 μg/Kg	16,6 ± 0,4	11613 ± 11844
Oxitetraciclina + 4-epi-oxitetraciclina	Bco	Pollos sin tratamiento	103 μg/Kg	2,2 ± 0,3	ND
Oxitetraciclina + 4-epi-oxitetraciclina	Bco	Pollos sin tratamiento	103 μg/Kg	1,3 ± 0,3	ND

Sulfaclopiridazina	T1	4	203 µg/Kg	22,5 ± 0	895 ± 32
Sulfaclopiridazina	T2	8	203 µg/Kg	19,2 ± 1,7	982 ± 297
Sulfaclopiridazina	T3	4	203 µg/Kg	14,3 ± 3,8	4693 ± 1032
Sulfaclopiridazina	T4	8	203 µg/Kg	9,3 ± 0,8	2578 ± 136
Sulfaclopiridazina	Bco	Pollos sin tratamiento	203 µg/Kg	4,5 ± 0	ND
Sulfaclopiridazina	Bco	Pollos sin tratamiento	203 µg/Kg	4,3 ± 0,3	ND
Eritromicina	T1	4	103 µg/Kg	14,7 ± 3	46193 ± 28545
Eritromicina	T2	8	103 µg/Kg	16,8 ± 0,4	13076 ± 1772
Eritromicina	T3	4	103 µg/Kg	15,3 ± 0,4	31919 ± 26833
Eritromicina	T4	8	103 µg/Kg	17,2 ± 1,6	15368 ± 7738
Eritromicina	Bco	Pollos sin tratamiento	103 µg/Kg	6,8 ± 1,4	ND
Eritromicina	Bco	Pollos sin tratamiento	103 µg/Kg	9,2 ± 1	ND

Ampicilina	T1	4	104 µg/Kg	28,8 ± 2,9	57751 ± 7007
Ampicilina	T2	8	104 µg/Kg	24,8 ± 2,8	27934 ± 26541
Ampicilina	T3	4	104 µg/Kg	21,5 ± 3,8	24429 ± 4717
Ampicilina	T4	6	104 µg/Kg	20,5 ± 0	14491 ± 16133
Ampicilina	Bco	Pollos sin tratamiento	104 µg/Kg	4,5 ± 0,9	ND
Ampicilina	Bco	Pollos sin tratamiento	104 µg/Kg	3 ± 0,9	ND
Lincomicina	T1	4	203 µg/Kg	16,9 ± 1,8	752118 ± 431729
Lincomicina	T2	8	203 µg/Kg	15,7 ± 0,4	731288 ± 4628
Lincomicina	T3	4	203 µg/Kg	15,3 ± 5	404562 ± 313206
Lincomicina	T4	8	203 µg/Kg	17,9 ± 0,2	1578003 ± 1453197
Lincomicina	Bco	Pollos sin tratamiento	203 µg/Kg	2,8 ± 0,3	ND
Lincomicina	Bco	Pollos sin tratamiento	203 µg/Kg	0 ± 0	ND

ND: No Detectado

Bco: Blanco

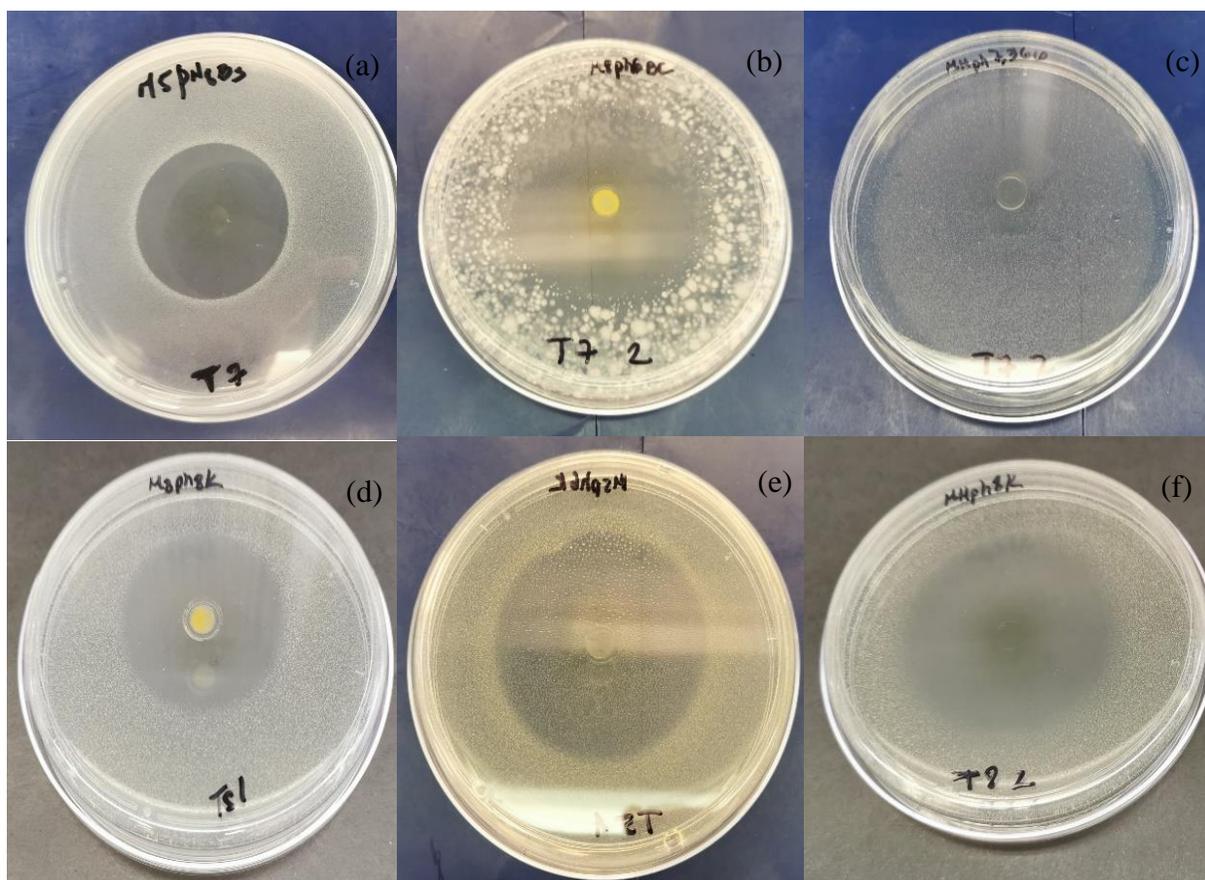


Figura 1: Halos de inhibición de (a) enrofloxacino + ciprofloxacino, (b) oxitetraciclina + 4-epi-oxitetraciclina, (c) sulfaclopiridazina, (d) eritromicina, (e) ampicilina y (f) lincomicina.

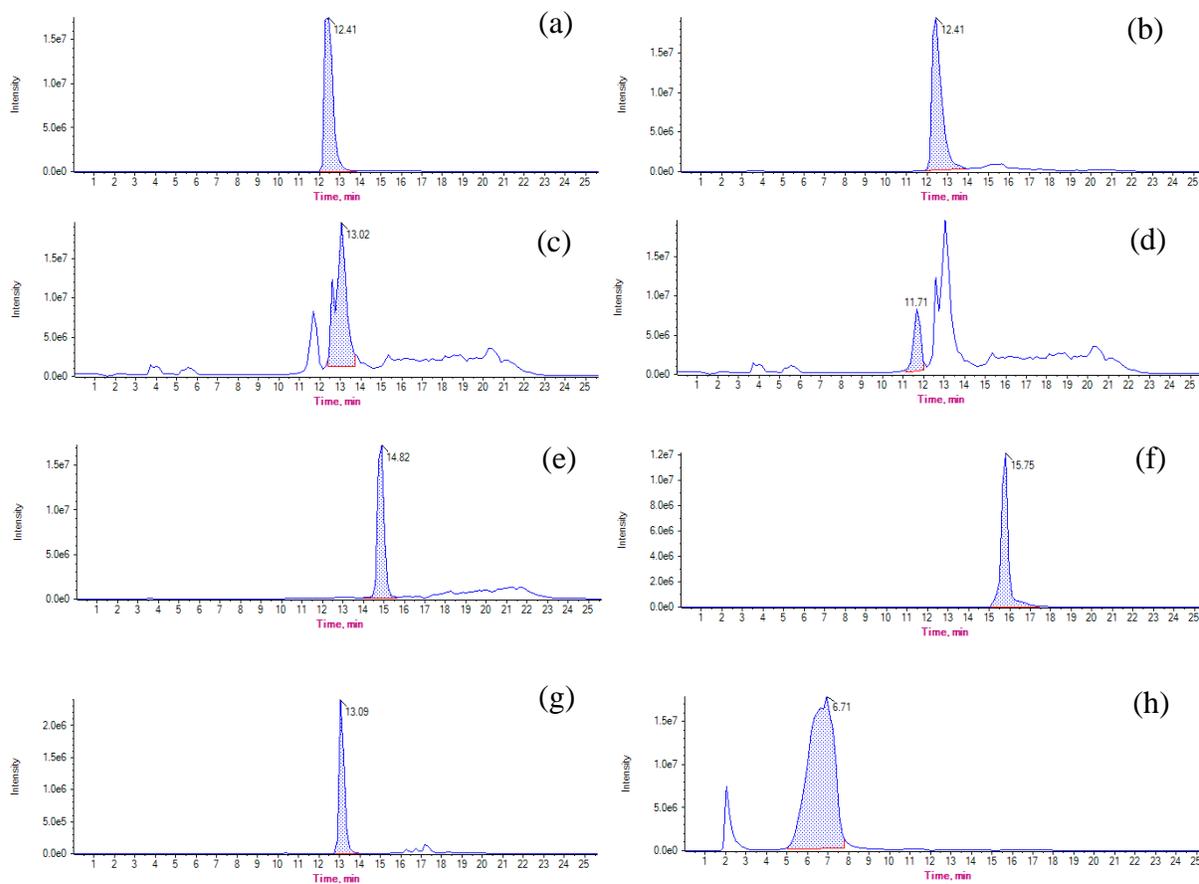


Figura 2: Cromatogramas de (a) enrofloxacin, (b) ciprofloxacin, (c) oxitetraciclina, (d) 4-epi-oxitetraciclina, (e) sulfaclopiridazina, (f) eritromicina, (g) ampicilina y (h) lincomicina.

DISCUSIÓN

Actualmente, a nivel mundial los gobiernos están intensificando sus esfuerzos para mejorar la inocuidad y calidad de los alimentos. Es así como una de las principales preocupaciones de las autoridades reguladoras es la presencia de contaminantes químicos en los alimentos y la necesidad de establecer programas adecuados para monitorear este peligro, salvaguardando a los consumidores, ya que la variedad de residuos en los alimentos aumenta continuamente como consecuencia del desarrollo industrial, las nuevas prácticas agrícolas, la contaminación ambiental y el cambio climático. Uno de estos contaminantes son los medicamentos veterinarios, y dentro de estos se encuentran los antimicrobianos, los que tienen una gran importancia en la producción de alimentos, ya que son utilizados como una herramienta terapéutica en los animales productivos; por lo que existe un aumento en la probabilidad de la presencia de estos residuos en los productos. La presencia de residuos de antimicrobianos en los alimentos puede tener diversas consecuencias, afectando la actividad endocrina, el desarrollo y el metabolismo en el ser humano, y, por otra parte, generando resistencia a los antimicrobianos. Esto ha llevado a las autoridades a una búsqueda constante de nuevas metodologías de análisis que permitan dar una respuesta rápida y efectiva tanto a las necesidades de los productores como de los consumidores.

Por otra parte, se ha descrito que un gran porcentaje de los antimicrobianos administrados a los animales son excretados en las heces de estos, tanto en su forma no metabolizada como sus metabolitos activos (Kyakuwaire *et al.*, 2019). Considerando la significativa producción de camas de pollos broiler a nivel nacional, y que esta es utilizada como fertilizante en la industria agrícola y como subproducto en la dieta de los bovinos, ya que contiene una amplia gama de diversos nutrientes y elementos como nitrógeno, fósforo, potasio, cobre, zinc, calcio, cobalto, hierro, selenio, molibdeno, manganeso y boro (Drózdź *et al.*, 2020).

Para disminuir o eliminar la presencia de los residuos de los antimicrobianos se podría realizar alguna práctica de manejo a la cama de broiler antes de utilizarla. Dentro de los procesos más utilizados se encuentran el compostaje, la digestión anaeróbica y las lagunas aeróbicas y anaeróbicas. Se ha descrito que la eficacia del tratamiento para diversos antimicrobianos es más alta para el compostaje, en comparación con la digestión anaeróbica y las lagunas aeróbicas y anaeróbicas. Sin embargo, dado que las remociones observadas

dependen de la sorción, los antimicrobianos no son transformados a través del proceso del compostaje, y, por lo tanto, los residuos de los antimicrobianos permanecen en el estiércol compostado. Por otro lado, la biodegradación es mayor en la digestión anaeróbica, mientras que la sorción y la biodegradación son mayores en las lagunas aeróbicas y anaeróbicas. Por lo que, en la digestión anaeróbica y en las lagunas aeróbicas y anaeróbicas ocurre la transformación de los antimicrobianos, lo que da como resultado concentraciones más bajas de estos en el estiércol tratado y en los efluentes resultantes del proceso. Sin embargo, aún se debe investigar la presencia de los metabolitos activos y los epímeros en el estiércol tratado. Dentro de los tres métodos mencionados, las lagunas anaeróbicas son el medio más común para tratar el estiércol, ya que requieren bajos costos y necesidades de mantención. Sin embargo, se ha demostrado que las lagunas anaeróbicas ofrecen las eficiencias más bajas para disminuir o eliminar la presencia de los residuos de los antimicrobianos. Por lo tanto, su uso continuado asegura que los antimicrobianos permanezcan en el estiércol y en los efluentes generados cuando son aplicados al suelo (Van Epps y Blaney, 2016).

Por lo anterior, la utilización de este subproducto avícola desde animales tratados con antimicrobianos podría ser de gran utilidad para el desarrollo de una metodología de *screening* microbiológico que permita detectar estos residuos de antimicrobianos, como una herramienta de bajo costo, que utilice una matriz no invasiva y que permita monitorear el uso de los antimicrobianos durante toda la cadena productiva de los animales. Así, se podría determinar si existen rutas no conocidas (no atribuidas al tratamiento) de contaminación con residuos de antimicrobianos al medio ambiente.

En esta memoria de título se realizó una verificación *in vivo*, mediante la obtención de muestras incurridas. Como modelo animal, se utilizaron pollos broiler, ya que, para conocer y estudiar la dinámica de diseminación de los antimicrobianos desde los animales productivos, es necesario realizar los estudios, en animales que puedan ser tratados con dosis terapéuticas de los antimicrobianos de interés y mantenidos en condiciones experimentales. El uso de pollos broiler permitió conocer la eliminación de los antimicrobianos ampliamente utilizados en producción aviar, los cuales también son utilizados en las otras especies productivas.

Para todos los antimicrobianos los halos se pudieron delimitar claramente a vista directa, excepto en el caso de la sulfacloropiridazina. Para este antimicrobiano, se observó una inhibición parcial ya que no se logró apreciar el desarrollo bacteriano en “forma de tapiz” para una lectura nítida. Esto es algo que se ha descrito en la validación de otros métodos de *screening* microbiológico, como lo reportado por Gaudin *et al.* (2004), en donde realizaron la validación de un método de *screening* microbiológico de cinco placas en leche, y vieron que en el caso de las sulfonamidas se observa un halo de inhibición parcial, lo que corresponde a un halo de inhibición en donde el crecimiento por parte de las bacterias es visible pero incompleto, es decir, que la mayoría, pero no el total de las bacterias son inhibidas en la presencia del antimicrobiano. Además, las placas correspondientes a sulfacloropiridazina fueron incubadas a 55°C, por lo que tendían a deshidratarse más rápido respecto a las otras placas, por lo que la lectura se hizo a las 18 horas de incubación. Además, para aplacar aún más el efecto de la deshidratación, en las placas incubadas a 55°C se añadieron 12,5 mL del medio de cultivo en vez de 10 mL, como en el resto de las placas.

Los resultados mostraron que el método de *screening* microbiológico es capaz de detectar todos los antimicrobianos en estudio en muestras de deyecciones de pollos broiler provenientes de animales tratados. También se pudo observar que existe una diferencia mayor a 2 mm para todas las muestras analizadas de los cuatro puntos de muestreo respecto a los blancos, lo que indica que todas las muestras analizadas mediante el *screening* microbiológico fueron positivas y todos los blancos analizados fueron negativos para los seis antimicrobianos en estudio. Posteriormente, mediante LC-MS/MS se confirmó la presencia de los residuos de estos antimicrobianos en las muestras de los puntos de muestreo positivas al *screening*. En todas las muestras analizadas las concentraciones cuantificadas fueron mayores que la CC β del método de *screening* microbiológico, mientras que en los blancos no se detectaron concentraciones de los residuos. Y, por otra parte, se confirmó la presencia de los residuos de antimicrobianos en estudio, en las muestras positivas al *screening*. Por otra parte, a pesar que en los blancos se registró un halo pequeño en algunos antimicrobianos, se pudo confirmar que no tienen residuos de los antimicrobianos en estudio, ya que no se detectaron concentraciones de los residuos mediante LC-MS/MS, por lo que no corresponden a falsos negativos del método de *screening* microbiológico. Por ello, existe concordancia

entre los resultados obtenidos del análisis mediante el *screening* y las concentraciones cuantificadas por LC-MS/MS.

La metodología de *screening* microbiológico verificada de las seis placas posee un amplio espectro de detección, y podría ser de gran utilidad en los sistemas de vigilancia, ya que detecta las principales familias de antimicrobianos que se utilizan en los animales productivos. Sin embargo, no detecta todas las clases de antimicrobianos que se utilizan en la industria, quedando fuera otras familias de antimicrobianos que son de interés en la salud pública, como es el caso de los aminoglucósidos, polimixinas, cefalosporinas y pleuromutilinas y otras sustancias que se encuentran prohibidas en nuestro país, que corresponden al cloranfenicol, nitrofuranos y nitroimidazoles, siendo esta una limitante y por lo que se podría expandir el espectro de detección del método de *screening* microbiológico.

Una expansión a este método, es lo que plantean Tajik *et al.* (2010), un método de *screening* microbiológico para agregar al espectro de detección la identificación de cloranfenicol, un antimicrobiano prohibido en nuestro país para ser utilizado en la industria de los animales productivos, debido a la presencia de residuos de este antimicrobiano en animales destinados al consumo humano, se han reportado diversos efectos adversos en las personas, como náuseas, diarrea y anemia aplásica.

Por otra parte, al hacer una comparación con las pruebas tipo tubo como Premi®Test (DSM), Explorer (Zeu-Inmunotech), and Kidney Inhibition Swab (KIS™) test (Charm Sciences), las desventajas del método estudiado serían que estos son métodos caseros y que requieren mantener una cepa bacteriana, mientras que en las pruebas de tubo casi sin excepción se utilizan esporas del microorganismo *G. stearotherophilus var. calidolactis*, lo que le permite una vida útil prolongada, por lo que la distribución comercial es más factible comparado con el método de las seis placas. Además, las pruebas de placas de Petri requieren un mayor tiempo de incubación (15-24 horas), mientras que en las pruebas de tubo los resultados se obtienen aproximadamente dentro de 4 horas. Respecto al equipamiento utilizado, las pruebas de tubo solo requieren un dispositivo para obtener el líquido tisular y una incubadora o baño termorregulado a la temperatura adecuada. Pero, las desventajas de las pruebas de tubo son que no tienen una sensibilidad tan alta y que presentan una tasa alta de falsos positivos, comparándolas con las pruebas de placa de Petri.

Dentro de los métodos de *screening* microbiológico multiplacas y que se encuentran registrados para su uso, se encuentran el método desarrollado por Okerman *et al.* (2001) para la detección e identificación presuntiva de tetraciclinas, β -lactámicos y quinolonas en aves de corral. El mismo año, Tsai y Kondo (2001) evaluaron los niveles de detección de 31 agentes antimicrobianos en varias combinaciones de siete cepas bacterianas y cinco medios de cultivo. Estos incluyeron microorganismos de prueba que son poco utilizados en los métodos de *screening* microbiológico, los que corresponden a *Clostridium perfringens* y *Photobacterium phosphoreum*. Por su parte, Ferrini *et al.* (2006) presentaron un método de seis placas, un ensayo microbiano en placa combinada (CPMA), que consiste en el EU4pt, ampliado con placas adicionales para *B. cereus* y *Escherichia coli*. Cuando las muestras son aplicadas al doble o cuádruple y son complementadas con una de las soluciones confirmatorias, que corresponden a penicililasa, 4-aminobenzoato o sulfato de magnesio, la prueba permite la identificación presuntiva del antimicrobiano y el *screening* inicial en un solo paso.

Por lo que, la tendencia más importante que se puede observar en el desarrollo de los métodos de *screening* microbiológico para los antimicrobianos, es que la detección adecuada de un amplio espectro de antimicrobianos solo es posible utilizando ensayos multiplaca basados en una combinación de diferentes microorganismos de prueba.

El método de *screening* verificado constituye una herramienta prometedora a la hora de monitorear los antimicrobianos en la producción animal, ya que permite la detección simultánea de seis familias de antimicrobianos, utilizando una matriz no invasiva, con la finalidad de evitar o disminuir la presencia de residuos en el producto final, lo cual permitirá aplicar políticas sobre el uso de antimicrobianos en la producción animal durante toda la cadena productiva. Se pudo desarrollar la adaptación de la prueba de seis placas al propósito por el cual fue diseñada, además de prevenir futuros obstáculos al comercio cuando la metodología sea desarrollada y facilitar la cooperación con otros grupos investigativos, gracias a los datos obtenidos.

CONCLUSIONES

1. El método de *screening* microbiológico, en la matriz deyecciones de pollos broiler, es capaz de detectar todos los antimicrobianos en estudio.
2. Existe una diferencia mayor a 2 mm entre las muestras de los cuatro puntos de muestreo y los blancos analizados, por antimicrobiano, mediante el *screening* microbiológico.
3. Las muestras de las aves que recibieron el antimicrobiano, analizadas para todos los antimicrobianos resultaron positivas al *screening* microbiológico.
4. Existe concordancia entre lo obtenido en el método de *screening* microbiológico con los resultados obtenidos mediante LC-MS/MS.
5. Las concentraciones obtenidas mediante LC-MS/MS son mayores que la CC β del método de *screening* microbiológico, para las muestras de los cuatro puntos de muestreo analizadas de todos los antimicrobianos.
6. De acuerdo al análisis mediante LC-MS/MS, ninguno de los antimicrobianos en estudio fue detectado en las muestras blanco, que correspondían a aves no tratadas.

BIBLIOGRAFÍA

BACANLI, M.; BAŞARAN, N. 2019. Importance of antibiotic residues in animal food. *Food Chem Toxicol.* 125: 462-466.

BERENDSEN, B.; WEGH, R.; MEMELINK, J.; ZUIDEMA.; STOLKER, L. 2015. The analysis of animal faeces as a tool to monitor antibiotic usage. *Talanta.* 132: 258-268.

COMISIÓN EUROPEA. 2015. Informe de la comisión al parlamento europeo y al consejo sobre el funcionamiento del Reglamento (CE) nº 470/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 6 de mayo de 2009, por el que se establecen procedimientos comunitarios para la fijación de los límites de residuos de las sustancias farmacológicamente activas en los alimentos de origen animal, se deroga el Reglamento (CEE) nº 2377/90 del Consejo y se modifican la Directiva 2001/82/CE del Parlamento Europeo y del Consejo y el Reglamento (CE) nº 726/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo. [en línea]. <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=CELEX%3A52015DC0056>> [consulta: 27-01-2022].

CHÁFER-PÉRICAS, C.; MAQUIEIRA, A.; PUCHADES, R. 2010. Fast screening methods to detect antibiotic residues in food samples. *Trends Analyt Chem.* 29(9): 1038-1049.

CHILE. MINSAL. 2019. Resolución N°1.560 Exenta. Fija límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en alimentos destinados al consumo humano. DO República de Chile. 3 de septiembre de 2019. 23 p.

DANG, P.; DEGAND, G.; DOUNY, C.; TON, V.; MAGHUIN-ROGISTER, G.; SCIPPO, M. 2011. Optimisation of a new two-plate screening method for the detection of antibiotic residues in meat. *Int. J. Food Sci.* 46: 2070-2076.

DRÓZDŹ.; D. WYSTALSKA, K.; MALIŃSKA, K.; GROSSER, A.; GROBELAK, A.; KACPRZAK. 2020. *J. Enviro. Manage.* 264: 1-16.

EMEA. EUROPEAN MEDICINES AGENCY. 2016. Note for guidance: Approach towards harmonization of withdrawal periods. EMEA/CVMP/SWP/735325.

FERRINI, A.; MANNONI, V.; AURELI, P. 2006. Combined Plate Microbial Assay (CPMA): A 6-plate-method for simultaneous first and second level screening of antibacterial residues in meat. *Food Addit. Contam.* 23(1): 16-24.

FONT-PALMA, C. 2019. Methods for the Treatment of Cattle Manure-A Review. *C.* 5(27): 1-20.

GAUDIN, V.; MARIS, P.; FUSELIER, R.; RIBOUCHON, J.-L.; CADIEU, N.; RAULT, A. 2004. Validation of a microbiological method: the STAR protocol, a five-plate test, for the screening of antibiotic residues in milk. *Food Addit. Contam.* 21(5): 422-433.

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: A.* 27(7): 935-952.

GONDOVÁ, Z.; KOŽÁROVÁ, I.; POLÁKOVÁ, Z.; MAD'AROVÁ, M. 2016. Comparison of Four Microbiological Inhibition Tests for the Screening of Antimicrobial Residues in the Tissues of Food-Producing Animals. *Ital J Anim Sci:* 728-734.

GRENNI, P.; ANCONA, V.; BARRA, A. 2017. Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: A review. *Microchem J:* 1-48.

GU, D.; FENG, Q.; GUO, C.; HOU, S.; LV, J.; ZHANG, Y.; YUAN, S.; ZHAO, X. 2019. Occurrence and Risk Assessment of Antibiotics in Manure, Soil, Wastewater, Groundwater from Livestock and Poultry Farms in Xuzhou, China. *Rev Environ Contam T:* 1-7.

KIM, K.; OWENS, G.; KWOON, S.; SO, K.; LEE, D.; OK, Y. 2011. Occurrence and Environmental Fate of Veterinary Antibiotics in the Terrestrial Environment. *Water Air Soil Pollut.* 214: 163-174.

KUMAR, S.; ARNIPALLI, S.; ZIOUZENKOVA, O. 2020. Antibiotics in Food Chain: The Consequences for Antibiotic Resistance. *Antibiotics.* 9: 1-26.

KYAKUWAIRE, M.; OLUPOR, G.; AMODING, A.; NKEDI-KIZZA, P.; ATEENYI BASAMBA, T. 2019. How Safe is Chicken Litter for Land Application as an Organic Fertilizer?: A Review. *Int.J. Environ. Res.* 16: 23p.

- LAXMINARAYAN, R.; VAN BOECKEL, T.; TEILLANT, A.** 2015. The Economic Costs of Withdrawing Antimicrobial Growth Promoters from the Livestock Sector. OECD. Food Agric. Fisher. Papers. 78: 1-42.
- LI, Y.; ZHU, G.; NG, W.; TAN, S.** 2014. A review on removing pharmaceutical contaminants from wastewater by constructed wetlands: Design, performance and mechanism. Sci Total Environ 468:908– 932.
- MAJDINASAB, M.; MISHRA, R.; TANG, X.; MARTY, J.** 2020. Detection of antibiotics in food: New achievements in the development of biosensors. Trend Anal Chem. 127: 1-17.
- MANYI-LOH, C.; MAMPHWELI, S.; MEYER, E.; OKOH, A.** 2018. Antibiotic Use in Agriculture and Its Consequential Resistance in Enviromental Sources: Potential Public Health Implications. Molecules. 23: 1-48.
- AVIAGEN.** 2018. Manual de manejo de pollos de engorde Ross. [en línea] <https://eu.aviagen.com/assets/Tech_Center/BB_Foreign_Language_Docs/Spanish_TechDocs/Ross-BroilerHandbook2018-ES.pdf> [consulta: 01-02-2022].
- MUHAMMAD, J.; KHAN, S.; SU, J.; HESHAM, A.; DITTA, A.; NAWAB, J.; ALI, A.** 2019. Antibiotics in poultry manure and their associated health issues: a systematic review. J Soil Sediment: 1-12.
- ODEPA.** 2021. Informe detallado por especie o categoría. [en línea] <<https://www.odepa.gob.cl/informe-detallado-por-especie-o-categoria-pecuario>> [consulta: 10-12-2021].
- OIE,** 2019. Lista de agentes antimicrobianos importantes para la medicina veterinaria. [en línea] <https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Our_scientific_expertise/docs/pdf/AMR/EOIE_Lista_antimicrobianos_Julio2019.pdf>. [consulta: 10-01-2022].
- OIE.** 2021. OIE Annual Report on Antimicrobial Agents Intended for Use in Animal. [en línea] <<https://www.oie.int/app/uploads/2021/05/a-fifth-annual-report-amr.pdf>> [consulta: 10-01-2022].

OKERMAN, L.; CROUBELS, S.; DE BAERE, S.; VAN HOOFF, J.; DE BACKER, P.; DE BRADANDER, H. 2001. Inhibition tests for detection and presumptive identification of tetracyclines, beta-lactam antibiotics and quinolones in poultry meat. *Food Addit Contam.* 18(5): 385-393.

PIKKEMAAT, M. 2009. Microbial *screening* methods for detection of antibiotic residues in slaughter animals. *Anal. Bioanal. Chem.* 395 (4): 893-905.

PIKKEMAAT, M.; RAPALLINI, M.; ZUIDEMA, T.; ELFERINK, J.; OOSTRA-V.; S.; DRIESSEN-V, L. 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.* 28(1): 26-34.

POKRANT, E.; TRINCADO, L.; YÉVENES, K.; TERRAZA, G.; MADDALENO, A.; SAN MARTÍN, B.; ZAVALA, S.; HIDALGO, H.; LAPIERRE, L.; CORNEJO, J. 2021. Determination of five antimicrobial families in droppings of therapeutically treated broiler chicken by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Poult Sci.* 100 (9): 1-12.

SAG. 2006. Resolución N°1992 Establece nómina de aditivos autorizados para la elaboración y fabricación de alimentos y suplementos para animales y deroga resoluciones que indica. [en línea] <<https://www.bcn.cl/leychile/navegar?idNorma=249643>> [consulta: 07-12-2021].

SAG. 2019. Programa de Control de Residuos en Productos Pecuarios. [en línea] <http://www.sag.cl/sites/default/files/plan_control_residuos-2019.pdf> [consulta: 25-08-21].

SAG. 2019. Resolución Exenta N°:4854/2019 Modifica Resolución Exenta N°6.801, De 2017. [en línea] <https://www.sag.gob.cl/sites/default/files/resol_4.854-2019.pdf>. [consulta: 07-12-2021].

SANTOS DALÓLIO, F.; DA SILVA, J.; CARNEIRO DE OLIVEIRA, A.; FERREIRA TINÔCO, I.; CHRISTIAM BARBOSA, R.; RESENDE, M. DE O.; TEIXEIRA ALBINO, L.; TEIXEIRA COELHO, S. 2017. Poultry litter as biomass energy: A review and future perspectives. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 76:941–949.

- SPIELMEYER, A.** 2018. Occurrence and fate of antibiotics in manure during manure treatments: A short review. *Sustain Chem Pharm.* 9: 76-86.
- TAJIK, H.; MALEKINEJAD, H.; RAZAVI-ROUHANI S.M.; PAJOUHI, M.R.; MAHMOUDI, R.; HAGHNAZARI, A.** 2010. Chloramphenicol residues in chicken liver, kidney and muscle: A comparison among the antibacterial residues monitoring methods of Four Plate Test, ELISA and HPLC. *Food Chem. Toxicol.* 48: 2464-2468.
- TSAI, CHIN-EN.; KONDO, F.** 2001. Improved Agar Diffusion Method for Detecting Residual Antimicrobial Agents. *J. Food. Prot.* 64(3): 361-366.
- USDA.** 2011. Bioassay for the detection, identification and quantitation of antimicrobial residues in meat and poultry. [en línea]. <https://www.fsis.usda.gov/sites/default/files/media_file/2021-03/MLG_34_03.pdf>. [consulta: 14-06-2021].
- VAN EPPS, A.; BLANEY, L.** 2016. Antibiotic Residues in Animal Waste: Occurrence and Degradation in Conventional Agricultural Waste Management Practices. *Curr. Pollut. Rep.* 2: 135-155.
- VÁZQUEZ, M.A.; DE LA VARGA, D.; PLANA, R.; SOTO, M.** 2015. Integrating liquid fraction of pig manure in the composting process for nutrient recovery and water re-use. *J. Clean Prod.* 104: 80-89.
- WANG, F.; QIAO, M.; CHEN, Z.; SU, J.; ZHU, Y.** 2015. Antibiotic resistance genes in manure-amended soil and vegetables at harvest. *J. Hazard. Mater.* 299: 215-221.
- WANG, K.; WANG, X.; XU, Z.; YANG, S.** 2020. Simultaneous determination of multi-class antibiotics and steroid hormones drugs in livestock and poultry faeces using liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Food Addit Contam A:* 1-15.
- WU, Q.; LIU, X.; DUN, X.; BAKR, M.; PENG, D.; YUAN, Z.; WANG, Y.** 2021. The screening and identification of six commonly used antibiotics in swine kidney a microbiological inhibition method. *Microchem J.* 161: 1-12.
- XIE, W.; SHEN, Q.; ZHAO, F.** 2018. Antibiotics and antibiotic resistance from animal manures to soil: a review. *Eur. J Soil Sci* 69: 181-195.

XIONG, W.; WANG, Y.; SUN, Y.; MA, L.; ZENG, Q.; JIANG, X.; ANDONG, L.; ZENG, Z.; ZHANG, T. 2018. Antibiotic-mediated changes in the fecal microbiome of broiler chickens define the incidence of antibiotic resistance genes. *Microbiome*. 6(34): 1-11.

ZHANG, D.; GERSBERG, R.; NG, W.; TAN, S. 2014. Removal of pharmaceutical and personal care products in aquatic plant-based systems: A review. *Environ Pollut* 184:620–639.

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

ANEXOS

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



Santiago, 18 de Noviembre de 2019

Certificado N°: 19331-VET-UCH

CERTIFICADO

El Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Chile, certifica que en el Protocolo **22-2019**, del Proyecto de Investigación titulado: **“Desarrollo y validación de una metodología rápida, económica y no invasiva para la detección de residuos de tetraciclinas, quinolonas, aminoglucósidos, macrólidos y β -lactámicos en heces de animales de producción”**, de la Investigadora responsable **Javiera Cornejo Kelly**, Profesor Asistente, Departamento de Medicina Preventiva, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, no se plantean acciones en sus procedimientos que contravengan las normas de Bioética de manejo y cuidado de animales, así mismo la metodología experimental planteada satisface lo estipulado en el Programa Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Chile.

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

Se otorga la presente certificación para el uso de un total de **60** pollos Broiler, genética Ross 308, provenientes de un criadero comercial (Agrícola Chorombo S.A., Región Metropolitana), desde Diciembre de 2019 a Octubre de 2021, tiempo estimado de ejecución del estudio, el cual será financiado por **Concurso IDeA I+D 2019 Fondef – Conicyt Nro. ID19I10033**.

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


Ronald Vargas Casanova
Director
CICUA – VID
Universidad de Chile




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

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

Anexo 2: Certificado Comité de bioseguridad FAVET.



CERTIFICADO N° 153

Santiago, 15 noviembre 2019.-

El Comité de Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, ha revisado el proyecto del Concurso FONDEF-IDeA 2019 ID19I10033. **"Desarrollo y validación de una metodología rápida, económica y no invasiva para la detección de residuos de tetraciclinas, quinolonas, aminoglucósidos, macrólidos y β -lactámicos en heces de animales de producción"** de la investigadora responsable Dra. Javiera Cornejo Kelly, Profesor Asistente, académica del Departamento de Medicina Preventiva Animal, de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

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

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


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



Anexo 3: Carta de trabajo para la extracción de oxitetraciclina, eritromicina, enrofloxacino, sulfacloropiridazina, lincomicina y ampicilina en deyecciones de aves mediante LC-MS/MS.

Pokrant <i>et al.</i> , 2021	Procedimiento de extracción LC-MS/MS	Matriz: Heces
1. Pese 1 ± 0.01 gramos de muestra en un tubo Falcon de 50 ml.		
2. Fortificar y agregar los estándares internos.		
3. Añadir 8 ml de MClvaine-EDTA. (0.1 M, pH 4.0) y 2 ml de acetonitrilo.		
4. Agitar la muestra en vortex durante 10 minutos.		
5. Sonicar 5 minutos.		
6. Centrifugar 10 minutos a 5000 rpm.		
7. Usar filtros de microfibra de vidrio para filtrar el sobrenadante y transferir a otro tubo Falcon de 50 ml.		
8. Agregue 13 ml de solución de MClvaine-EDTA 0.1 M para diluir la muestra.		
9. Agitar 2 minutos en vortex.		
10. Centrifugar a 5000 rpm durante 5 minutos.		
11. Acondicionar la columna de extracción en fase sólida (SPE) OASIS HLB (6cc) con 5 ml de metanol y 5 ml de agua HPLC.		
12. Aplicar las muestras sobre la columna SPE OASIS HLB (6cc).		
13. Lavar la columna SPE con 5 ml de agua HPLC.		
14. Secar aplicando vacío por 5 minutos.		
15. Eluir con 10 ml de metanol.		
16. Evaporar bajo flujo de nitrógeno en un baño de agua a 40 - 50 ° C.		
17. Reconstituir con 200 µl de metanol y 300 µl de agua.		
18. Agitar en vortex y sonicar por 5 minutos.		
19. Centrifugar 5 minutos a 1.700 rpm.		
20. Transferir la fase superior a un microtubo Eppendorf de 1.5 ml y centrifugar 5 minutos a 3.500 rpm.		
21. Transfiera a un vial con una jeringa de 1 ml usando filtros Millipore.		