



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

**Implementación de un método de screening microbiológico
para la detección de residuos de seis familias de
antimicrobianos en deyecciones de pollos broiler.**

Diego Andrés Astudillo Vidal

Proyecto de Memoria para optar al
Título Profesional de Médico
Veterinario

Departamento de Medicina
Preventiva Animal

PROFESOR GUÍA: Dra. Lisette Lapierre Acevedo
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

**Implementación de un método de screening microbiológico para
la detección de residuos de seis familias de antimicrobianos en
deyecciones de pollos broiler.**

Diego Andrés Astudillo Vidal

Proyecto de Memoria para optar al
Título Profesional de Médico
Veterinario

Departamento de Medicina
Preventiva Animal

Nota Final

Profesora Guía: Lisette Lapierre Acevedo

Profesora Corrector: Javiera Cornejo Kelly

Profesor Corrector: Nicolas Galarce Gálvez

SANTIAGO, CHILE

2022

ÍNDICE DE CAPÍTULOS

RESUMEN	6
ABSTRACT	7
INTRODUCCIÓN	8
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	10
OBJETIVO GENERAL	15
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
MATERIALES Y MÉTODOS	16
Cepas de referencia y su preparación para los ensayos.	16
Preparación de los antimicrobianos para los ensayos	17
Método de análisis microbiológico utilizado	18
Obtención de las muestras utilizadas en el estudio	18
Determinación de la susceptibilidad de las cepas bacterianas frente a seis familias de antimicrobianos.....	19
Estandarización de las condiciones experimentales del análisis microbiológico.	20
Estandarización de las condiciones experimentales para la extracción de residuos de antimicrobianos desde la matriz heces.....	21
Verificación del método de extracción estandarizado, utilizando muestras de deyecciones de pollos fortificadas con concentraciones conocidas de los analitos, mediante LC-MS/MS.....	22
Análisis instrumental	23
Cuantificación de los analitos y recuperación de los analitos.	23
RESULTADOS	24
Objetivo específico 1. Determinar la susceptibilidad de las cepas bacterianas frente a seis familias de antimicrobianos.....	24
Objetivo específico 2. Estandarizar las condiciones experimentales, tanto para la extracción como para la detección de residuos de antimicrobianos, en la matriz de heces.....	29

Objetivo específico 3. Verificar el método de extracción de analitos, utilizado en el screening microbiológico, mediante LC-MS/MS	32
DISCUSIÓN	36
CONCLUSIÓN	40
BIBLIOGRAFIA	41
ANEXOS	45

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. Condiciones de preparación de medios de cultivos para las distintas familias de antibióticos.....	19
TABLA 2. Concentración final en el medio de cultivo de las cepas bacterianas de referencia..	24
TABLA 3. Resultados del estudio de susceptibilidad a la familia de los macrólidos en cepas de referencia.....	25
TABLA 4. Resultados del estudio de susceptibilidad a la familia de las quinolonas en cepas de referencia.....	25
TABLA 5. Resultados del estudio de susceptibilidad a la familia de los β -lactámicos en cepas de referencia.....	26
TABLA 6. Resultados del estudio de susceptibilidad a la familia de las sulfonamidas en cepas de referencia.....	26
TABLA 7. Resultados del estudio de susceptibilidad a la familia de los aminoglucósidos en cepas de referencia.....	27
TABLA 8. Resultados del estudio de susceptibilidad a la familia de las tetraciclinas en cepas de referencia.....	27
TABLA 9. Condiciones de preparación de medios de cultivos para las distintas familias de antibióticos, utilizadas para la extracción de antimicrobianos..	28
TABLA 10. Resultados de extracción en muestras blanco (no fortificadas), con distintos solventes. Se utilizaron dos gramos de muestras para cada solvente...	29
TABLA 11. Comparación de los resultados de extracción de quinolonas entre E. coli y B. subtilis, utilizando distintos solventes.	30
TABLA 12. Promedio de los resultados de los ensayos de extracción utilizando distintos solventes.....	31
TABLA 13. Tabla de resultados con el porcentaje de recuperación, y la concentración cuantificada mediante LC-MS/MS.....	33

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Cromatogramas representativos a partir de la inyección de estándar certificado de neomicina (arriba) y del análisis de muestras de deyecciones fortificadas con neomicina a concentraciones de 2000 µg/kg (abajo..34

FIGURA 2. Cromatogramas representativos a partir de la inyección de estándar certificado (izquierda) y del análisis de muestras de deyecciones fortificadas a concentraciones de 400 µg/kg (derecha). (a.1 y a.2: OTC + EPI; b.1 y b.2: ENR; c.1 y c.2: CIP; d.1 y d.2: SCP; e.1 y e.2: ERI; f.1 y f.2: AMP)...35

RESUMEN

Los antimicrobianos son la principal herramienta terapéutica para el tratamiento de enfermedades bacterianas en animales de producción. Sin embargo, los residuos de estos fármacos pueden permanecer en productos y subproductos de origen animal, causando diferentes efectos adversos sobre la población humana. La cama de broiler, compuesta principalmente por deyecciones, es un subproducto importante de la industria avícola debido a su uso en sistemas agrícolas y su uso como suplemento alimenticio para animales de producción. No obstante, se ha descrito que residuos de antimicrobianos pueden persistir en este subproducto por tiempos prolongados y en altas concentraciones.

A pesar de esto, hasta la fecha no se ha descrito un método de detección de residuos de antimicrobianos en la matriz de deyecciones de aves, que sea rápido y de bajo costo. Por esta razón, en la presente tesis se implementó un método de screening microbiológico en base a cilindros en placas, para la detección de residuos de β -lactámicos, macrólidos, sulfonamidas, quinolonas, tetraciclinas y aminoglucósidos, en muestras de deyecciones de pollos broiler.

Para implementar del método de screening, primero se realizaron ensayos de sensibilidad para determinar las cepas bacterianas más susceptibles a cada una de las familias de antimicrobianos. Luego se desarrolló un método de extracción de residuos de antimicrobianos desde la matriz de deyecciones de pollos broiler para ser utilizado por el screening microbiológico. La metodología fue verificada posteriormente por un análisis de cromatografía líquida asociada a espectrometría de masas (LC-MS/MS), para asegurar que el método de extracción extraiga los analitos de interés desde la matriz.

Se logró implementar un método de screening microbiológico para detectar cinco familias de antimicrobianos en deyecciones de pollos broiler, en concentraciones cercanas al límite máximo residual definido por la Comisión Europea para músculos de aves.

Palabras clave: Implementación, Residuos antimicrobianos, Deyecciones de aves, Screening microbiológico.

ABSTRACT

Antimicrobials are the main therapeutic tool for the treatment of bacterial diseases in production animals. However, residues of these drugs can remain in products and by-products of animal origin, causing different adverse effects on the human population. Broiler litter, composed mainly of droppings, is an important by-product of the poultry industry due to its use in agricultural systems and its use as a feed supplement for production animals. However, it has been described those antimicrobial residues can persist in this by-product for long periods of time and in high concentrations.

Despite this, to date no method of detecting antimicrobial residues in the bird dropping matrix has been described, that are fast and inexpensive. For this reason, in this thesis a microbiological screening method based on cylinders in plates was implemented, for the detection of residues of β -lactams, macrolides, sulfonamides, quinolones, tetracyclines and aminoglycosides, in samples of droppings of broiler chickens.

To implement the screening method, sensitivity assays were first performed to determine the bacterial strains most susceptible to each of the antimicrobial families. A method of extracting antimicrobial residues from the dropping matrix of broiler chickens was then developed to be used by microbiological screening. The methodology was subsequently verified by a liquid chromatography analysis associated with mass spectrometry (LC-MS/MS), to ensure that the extraction method extracts the analytes of interest from the matrix.

It was possible to implement a microbiological screening method to detect five families of antimicrobials in broiler chicken droppings, in concentrations close to the maximum residual limit defined by the European Commission for bird muscles.

Keywords: Implementation, Antimicrobial residues, Bird droppings, Microbiological screening.

INTRODUCCIÓN

Los antimicrobianos poseen un rol importante en la medicina veterinaria, ya que son la principal herramienta terapéutica utilizada a nivel mundial en animales de producción para el tratamiento de enfermedades infecciosas. Entre las familias de antimicrobianos usados se encuentran los β -lactámicos, las tetraciclinas, los aminoglucósidos, los macrólidos, las sulfonamidas y las quinolonas. A pesar de sus beneficios sobre la salud animal, su uso puede representar un riesgo para la salud pública, debido a que pueden persistir residuos de estos fármacos en los productos de origen animal. Estos residuos podrían causar diversos efectos en la salud de los consumidores, pérdidas económicas en la industria alimentaria, y actuar como presión de selección para el desarrollo de cepas bacterianas resistentes a los antimicrobianos por lo que es de suma importancia mantener la vigilancia en las posibles fuentes de residuos de estas drogas.

Cabe destacar que otra de las fuentes de origen animal que disemina residuos de antimicrobianos son las excretas de animales productivos tratados previamente con antimicrobianos, y entre éstas se encuentran las deyecciones de las aves de producción, componente principal de las camas broiler, que es un subproducto de la industria avícola. Este subproducto es utilizado como suplemento alimenticio para algunas especies de animales productivo, y además es utilizado como fertilizante en sistemas agrícolas, actuando este subproducto como una ruta de entrada de antimicrobianos al medio ambiente, ya que existe evidencia que indica que, incluso una vez finalizado tanto el tratamiento en los animales como los periodos de resguardo establecidos para la formulación farmacéutica utilizada, residuos de estos antimicrobianos siguen eliminándose a través de las heces.

De esta forma, el uso de las deposiciones de los animales productivos como una matriz de análisis, es una alternativa para el monitoreo de las buenas prácticas en el uso de antimicrobiano y la contaminación cruzada. Además, al ser una matriz no invasiva, permitiría detectar residuos de antimicrobianos durante la crianza y previo a la faena, para así evitar los efectos adversos al medio ambiente y a la salud de los consumidores.

Es por esto que el objetivo de esta memoria de título es implementar una metodología de screening microbiológico como herramienta de bajo costo para la detección rápida y temprana de residuos de antimicrobianos pertenecientes a las familias de las tetraciclinas, β -

lactámicos, macrólidos, quinolonas, sulfonamidas y aminoglucósidos en deyecciones de pollos broiler.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

En el mundo, un porcentaje significativo de fármacos son utilizados en animales de producción debido a su importante rol en la medicina veterinaria como herramienta terapéutica (Tasho y Cho, 2016). Entre ellos, se encuentran los antimicrobianos, y algunas de las familias más usadas en estos animales son los β -lactámicos, las tetraciclinas, los aminoglucósidos, los macrólidos, las sulfonamidas y las quinolonas (Gaudin *et al.*, 2004; Muhammad *et al.*, 2020). Si bien estos pueden ser beneficiosos para la salud de los animales, entre las consecuencias del uso de antimicrobianos está la presencia de sus residuos en alimentos de origen animal, como por ejemplo en la leche, huevos y en la carne (Pikkemaat *et al.*, 2009; Gaudin, 2017; Ozdemir *et al.*, 2018). Estos pueden causar diversos efectos adversos en la salud de los consumidores, como es el trastorno de la microbiota intestinal, carcinogénesis, mutagénesis, teratogénesis, reacciones de hipersensibilidad en personas alérgicas, pérdidas económicas en la industria alimentaria al afectar los procesos tecnológicos, y propiciar el desarrollo de cepas bacterianas resistentes a los antimicrobianos (Gaudin *et al.*, 2004; Berendsen *et al.*, 2015; Gouvêa *et al.*, 2015; Kožárová *et al.*, 2020).

Estos residuos no solo pueden persistir en los productos animales destinados al consumo humano, también se ha descrito que, en los subproductos de la industria avícola, como las plumas y garras de pollos de engorda, persisten residuos de antimicrobianos por un tiempo más prolongado que el periodo de resguardo y en mayores concentraciones que los límites máximos residuales (LMR) establecidos para los tejidos comestibles (Berendsen, *et al.*, 2015; Cornejo *et al.*, 2017; Cornejo *et al.*, 2018; Pokrant *et al.*, 2018). Estos subproductos pueden ser utilizados como materia prima en la elaboración de harinas para la alimentación de especies animales productoras de alimento, debido a su alto valor nutricional (Cornejo *et al.*, 2017; Pokrant *et al.*, 2018). Así mismo, las deyecciones de pollos de engorda son otro subproducto importante al ser el principal componente de las camas de broiler (Sanchuki *et al.*, 2011). Se debe tener en cuenta que en Chile se faenaron aproximadamente 289.785.747 unidades de pollos broiler durante el año 2021 (Instituto Nacional de Estadística de Chile, 2021), lo que generaría 289.785 toneladas de cama de broiler como estimado, considerando que cada pollo broiler produce durante su etapa productiva, 1 kg de cama de broiler. Estas grandes cantidades de cama de broiler son utilizadas en sistemas agrícolas como fertilizante o incluso como suplemento alimenticio para animales productivos, debido a que son una

opción nutricional especialmente en el caso de rumiantes (Tasho y Cho, 2016; Universidad de Arkansas, 2021).

El riesgo del uso de camas de broiler en sistemas agrícolas reside en la evidencia de que los animales excretan en sus heces y orina hasta un 90% de una dosis administrada de antimicrobianos en forma no metabolizada o como metabolitos activos, es decir, persiste en ellos su actividad antimicrobiana (Massé *et al.*, 2014; Pokrant *et al.*, 2021). En este contexto, Daghrir y Drogui (2013) reportaron que más del 70% de las tetraciclinas son excretadas y liberadas al medio ambiente en su forma activa a través de la orina y heces, tanto en humanos como en animales. Otras investigaciones demuestran que algunos antimicrobianos de las familias de las tetraciclinas, sulfonamidas, quinolonas y macrólidos persisten en deyecciones de aves tratadas previamente, incluso por tiempos más largos que los periodos de resguardo; por lo tanto, podrían mantenerse y propagarse por el ambiente o a otros animales como parte de la dieta (Massé *et al.*, 2014; Pokrant *et al.*, 2021). De esta forma, el uso de las deposiciones de los animales productivos, como las deyecciones de pollos broiler, es una alternativa como una matriz no invasiva de análisis para el monitoreo de las buenas prácticas en el uso de antimicrobianos y la contaminación cruzada durante la crianza y previo a la faena, para así evitar los efectos adversos al medio ambiente y a la salud de los consumidores.

Relacionado a lo anterior, la implementación de una metodología de análisis en heces, permite establecer una estrategia de vigilancia simple y no invasiva para controlar eficazmente el uso de antimicrobianos en la crianza de animales, estudiar las tendencias sobre el uso de drogas en los sistemas productivos, obtener información sobre la diseminación de antimicrobianos al medio ambiente y además, obtener conocimiento sobre el desarrollo de cepas resistentes a los antimicrobianos en el intestino de animales domésticos (Berendsen *et al.*, 2015). Si bien en la actualidad, existen diversas metodologías analíticas ampliamente disponibles que permiten determinar los residuos de antimicrobianos (Chen *et al.*, 2019), estas son técnicamente complejas, costosas, requieren de mucho tiempo, y a veces sólo pueden detectar un número limitado de analitos de forma simultánea. Entre ellas, se encuentran metodologías instrumentales cromatográficas acopladas a espectrometría de masas, que permiten la detección de múltiples familias de antimicrobianos en heces de animales de producción (Pokrant *et al.*, 2021). A pesar de ser metodologías sensibles y confirmatorias, requieren una capacidad analítica instalada de alto costo, así como de un alto

nivel de capacitación técnica. Esto hace que su acceso sea difícil para los productores, por lo que los métodos rápidos de screening han sido ampliamente utilizados para monitorear la presencia de residuos de antimicrobianos en alimentos por su alta efectividad y bajo costo (Pikkemaat, 2009).

Como primera aproximación cualitativa de screening, se encuentran los ensayos a base de inhibición microbiológica, los cuales son capaces de detectar una o varias familias de antimicrobianos, y permiten analizar un gran número de muestras rápidamente y a bajo costo. Esto, en contraste con los sistemas confirmatorios, como cromatografía líquida con espectrometría de masas (LC-MS/MS), método utilizado para la detección y cuantificación de residuos de antimicrobianos en diversas matrices de origen animal de forma confirmatoria (Maddaleno et al., 2019; Magalhães et al., 2020; Ramos-Payán et al., 2020). Estos métodos confirmatorios se aplican comúnmente a compuestos previamente seleccionados como objetivos, de modo que no serían capaces de detectar otro antimicrobiano presente. Por sus características, es que los métodos de screening microbiológicos permitirían reducir la cantidad de muestras que necesitan ser analizadas por los métodos confirmatorios, además de un monitoreo rápido de productos alimenticios previo a la faena del animal, buscando pesquisar la presencia de residuos de antimicrobianos (Pikkemaat *et al.*, 2010; Kožárová *et al.*, 2020).

A la fecha, se han desarrollado distintos tipos de métodos de screening microbiológico para diversas matrices de origen animal. En este contexto, Sophila *et al.* (2018) optimizaron un método de screening microbiológico de cinco placas para la detección de residuos de antimicrobianos en músculo de pollo, utilizando placas de agar Müller-Hinton sembradas con *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli*. Lograron detectar enrofloxacino desde concentraciones de 1 ng/mL y oxitetraciclina desde concentraciones de 0,5 ng/mL. De igual manera, Tumini *et al.* (2019) desarrollaron un método de screening microbiológico de cinco placas para la detección de residuos de antimicrobianos en leche, pero utilizando placas de microtitulación. Así, lograron optimizar este método para la detección de β -lactámicos, macrólidos, tetraciclinas, quinolonas y sulfamidas a concentraciones cercanas al LMR, utilizando las bacterias indicadoras *G. stearothermophilus*, *B. megaterium* y *B. licheniformis*. Posteriormente, Wu et al. (2020) desarrollaron un método de screening microbiológico utilizando *G. stearothermophilus* en

placas de microtitulación para la detección de residuos de antimicrobianos en músculos de porcinos, bovinos, aves de corral y peces, el cual fue validado bajo la pauta establecida por la norma ISO13969:2003. Con el método desarrollado lograron detectar, en músculos de aves de corral, concentraciones cercanas al LMR establecida por la Comisión Europea (CE) (2010): ampicilina y amoxicilina desde concentraciones de 10 ng/mL y 2.5 ng/mL respectivamente; oxitetraciclina desde concentraciones de 100 ng/mL; y tilosina desde concentraciones de 200 ng/mL. Para aminoglucósidos, solo lograron detectar neomicina desde los 1500 ng/mL superando el LMR de 500 ng/mL para músculos de aves de corral.

En cuanto al desarrollo de pruebas comerciales registradas para el screening *in situ* de residuos de antimicrobianos, se encuentra Premi®Test, producido por DSM Food Specialties Ltd., que está diseñado como tubos listos para usar, que contienen microorganismos diana, nutrientes, indicadores y una base de agar. Se basa en la inhibición del crecimiento de una cepa de *G. stearothermophilus*, una bacteria termófila sensible a diferentes antimicrobianos, pero particularmente sensible a los β -lactámicos (Pikkemaat, 2009). Premi®Test fue validado de acuerdo con la AFNOR (Asociación Francesa para la Normalización) y ha sido autorizado para su uso en laboratorios de campo para la detección de antimicrobianos en músculo y riñón desde el año 2006. Sin embargo, no permite diferenciar entre familias de antimicrobianos y presenta una alta tasa de falsos negativos (Pikkemaat, 2009; Pikkemaat *et al.*, 2011). Debido a su baja sensibilidad, este método de screening microbiológico debe ser acompañado de una confirmación posterior mediante LC-MS/MS (Ngoc Do *et al.*, 2016). Por otra parte, en Estados Unidos la US Food Safety (USDA-FSIS) utiliza un método como confirmación microbiológica de residuos de antimicrobianos en carne y tejidos de aves de corral, que consiste en siete placas. El método se basa en la preparación de placas con las bacterias *Kocuria rhizophila* para la detección de β -lactámicos y macrólidos, *B. subtilis* para la detección de estreptomicina, *B. cereus* para la detección de tetraciclinas, y *Staphylococcus epidermidis* para la detección de aminoglucósidos (USDA-FSIS, 2011).

Teniendo en cuenta que no se ha desarrollado una metodología para realizar pruebas de screening microbiológicos para detectar residuos de antimicrobianos en heces, y considerando la evidencia de actividad antimicrobiana en subproductos de origen animal (Cornejo *et al.*, 2018), es que se busca implementar una nueva metodología que permita detectar antimicrobianos en heces de animales de producción. El uso de esta matriz permitiría

realizar una detección temprana de residuos de antimicrobianos. De la misma manera, también se podría monitorear el uso de estos fármacos durante toda la etapa productiva del animal y así determinar las rutas de contaminación con residuos de antimicrobianos en estos animales a otros animales o al ambiente.

OBJETIVO GENERAL

Implementar una metodología de screening microbiológico para la detección simultánea de residuos de antimicrobianos pertenecientes a las familias de las tetraciclinas, β -lactámicos, macrólidos, quinolonas, sulfonamidas y aminoglucósidos en deyecciones de pollos broiler.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la susceptibilidad de las cepas bacterianas frente a seis familias de antimicrobianos.
2. Estandarizar las condiciones experimentales, tanto para la extracción como para la detección de residuos de antimicrobianos, en la matriz de heces.
3. Verificar el método de extracción de analitos, utilizado en el screening microbiológico, mediante LC-MS/MS.

MATERIALES Y MÉTODOS

El desarrollo de la implementación del método de screening microbiológico fue realizado en el Laboratorio de Inocuidad de los Alimentos (LIA) del Departamento de Medicina Preventiva Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile (FAVET), y el análisis confirmatorio fue realizado en el laboratorio FARMAVET de FAVET. Ambos laboratorios trabajan de acuerdo con estándares internacionales de alta calidad y procedimientos estandarizados, bajo la certificación ISO 17.025. Además, el Comité de Bioseguridad de FAVET ha certificado que el proyecto FONDEF ID19I10033 cumple con las normas de bioseguridad necesarias para su desarrollo (Anexo 1).

1. Cepas de referencia y su preparación para los ensayos.

Para determinar la susceptibilidad a los antimicrobianos de las seis familias mencionadas, se utilizaron las siguientes cepas pertenecientes a la colección americana de cepas de referencia ATCC (American Type Culture Collection): *B. subtilis* ATCC 6633, *B. cereus* ATCC 11778, *E. coli* ATCC 10536, *S. epidermidis* ATCC 12228, *K. rhizophila* ATCC 9341, y *G. stearothermophilus* ATCC 10149. Las cepas de referencia *B. subtilis*, *B. cereus*, *S. epidermidis* y *K. rhizophila*, son utilizadas por la USDA-FSIS (2011) para la detección de estreptomicina, tetraciclinas, aminoglucósidos, y β -lactámicos y macrólidos respectivamente, en músculos y tejidos de aves de corral. Por otra parte *G. stearothermophilus* ha sido utilizado para la detección de un amplio espectro de antimicrobianos en leche y musculo de origen animal a concentraciones cercanas al LMR establecidos por la CE (Tumini *et al.*, 2019, Wu *et al.*, 2020). *E. coli* ha sido utilizado para la detección de quinolonas en músculos de aves de corral debido a su sensibilidad a esta familia, además es resistente a múltiples familias de antimicrobianos, como los macrólidos (Sophila *et al.*, 2018).

Los liofilizados adquiridos de la ATCC fueron rehidratados según las instrucciones del fabricante y almacenados en crio tubos de 2 mL con caldo glicerol a -20°C. Para ser utilizadas en los ensayos, las cepas de *K. rhizophila*, *E. coli* y *S. epidermidis* fueron traspasadas de los crio tubos a tubos estériles con 3 mL de caldo infusión cerebro corazón (BHI) e incubados a 35°C por 24 horas. Una vez transcurrido el tiempo, las bacterias se sembraron desde el caldo BHI a placas de agar triptona-soya (TSA) e incubadas a 35°C por 24 horas, y posteriormente

las placas se almacenaron a 4°C hasta por un mes. De las placas de TSA se traspasó una asada a un tubo estéril con 3 mL de caldo BHI que luego se incubó a 35°C. De este último traspaso se utilizan las bacterias el mismo día, para realizar los distintos ensayos.

Las cepas de *B. subtilis* y *B. cereus* para ser utilizadas en los ensayos, son traspasadas de los crios tubos a tubos estériles con 3 mL de BHI e incubados a 30°C por 24 horas, y a 55°C por 24 horas para *G. stearothermophilus*. Para la esporulación de *B. subtilis* y *B. cereus*, se transfirieron las bacterias del caldo BHI a una botella Roux con 250 mL de Medio N°1 con 0,3 g/L de sulfato de manganeso, y se incubó la botella por 7 días a 30°C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se recolectó el crecimiento de la botella con 25 mL de agua destilada estéril en tubos Falcón de 50 mL, y luego se centrifugó el tubo a 4000 revoluciones por minutos (rpm) por 10 minutos. Luego se eliminó el sobrenadante y se lavó el pellet resultante con 15 mL de agua destilada estéril y se centrifugó nuevamente a 4000 rpm por 10 minutos. Se repitió una vez más el último paso y se eliminó el sobrenadante resultante, para luego agregar 10 mL de solución salina estéril al 0,8%. Posteriormente el tubo se agitó por 1 minuto en un vortex y luego se incubó a 70°C, en un baño termostático, por 30 minutos. Una vez incubado, el contenido del tubo se alicuotó en tubos estériles con sello hermético, y luego se almacenaron a 4°C hasta por tres meses. Para los ensayos, se extraen las bacterias directamente de los tubos con sello hermético.

Para la esporulación de *G. stearothermophilus*, se transfirió la bacteria del caldo BHI a una botella Roux con 250 mL de Medio N°1 con 0,3 g/L de sulfato de manganeso a pH 7,5, y se incubó la botella por 3 días a 55°C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se recolectó el crecimiento de la botella con 25 mL de agua destilada estéril en tubos Falcón de 50 mL, y se prosiguió con el mismo protocolo de lavado y almacenamiento descrito para *B. subtilis* y *B. cereus*. Para los ensayos, se extraen la bacteria directamente de los tubos con sello hermético. Los protocolos de esporulación utilizados corresponden a los documentos internos del LIA sobre la esporulación de *B. subtilis* y *B. cereus*.

2. Preparación de los antimicrobianos para los ensayos

Para los estándares de referencia de cada familia de antimicrobianos, se utilizaron los siguientes estándares de pureza certificada: para los macrólidos se utilizó eritromicina (ERI) y tilosina (TIL); para los β -lactámicos se utilizó ampicilina (AMP) y amoxicilina (AMX);

para las quinolonas se utilizó enrofloxacino (ENR) y ciprofloxacino (CIP); para las sulfonamidas se utilizó sulfacloropiridazina (SCP); para las tetraciclinas se utilizó oxitetraciclina (OTC) y 4-epi-oxitetraciclina (EPI); y para los aminoglucósidos se utilizó espectinomina (ESP) y neomicina (NEO). Todos los antimicrobianos fueron adquiridos de Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Alemania). Estos antimicrobianos fueron seleccionados como representantes de sus respectivas familias debido a su amplia utilización en la medicina veterinaria (Gaudin *et al.*, 2004; Muhammad *et al.*, 2020). Para cada antimicrobiano, se preparó una solución stock (S.S.) de 1000 mg/L en metanol, los cuales se almacenaron a -20°C. De estas S.S. se prepararon soluciones intermedias (S.I.) a 5000 ng/mL con agua destilada estéril para ser utilizada en los distintos ensayos, las que fueron almacenadas a -20°C hasta por 3 meses.

3. Método de análisis microbiológico utilizado.

La técnica de análisis utilizado para la implementación del método de screening microbiológico corresponde a la técnica de cilindro en placa, basado en el método propuesto en 1980 conocido como *EU four-plate test* (Bogaerts y Wolf, 1980). Este consiste en depositar una muestra en un cilindro dispuesto en una placa de agar, que contiene un inóculo de una cepa bacteriana sensible al antimicrobiano que se quiere detectar. El resultado se observa como la presencia o ausencia de una zona de inhibición del crecimiento bacteriano en torno al cilindro que contiene la muestra. El radio de los halos de inhibición formados es proporcional al efecto de los analitos presentes en la muestra.

4. Obtención de las muestras utilizadas en el estudio

Las muestras utilizadas durante el desarrollo de esta tesis corresponden a deyecciones de pollos broiler congeladas, provenientes del proyecto de investigación titulado "Development, Validation and Implementation of Isotopic Analytical Methods for Multi-Class Contaminants in Animal Waste and Related Matrices: A Potentially Valuable Tool for Monitoring Mixed Contaminants in Food Producing Animals" del *Coordinated project of the International Atomic Energy Agency (IAEA)*. Estas muestras fueron analizadas por un método confirmatorio, corroborando que no tienen antimicrobianos.

5. Determinación de la susceptibilidad de las cepas bacterianas frente a seis familias de antimicrobianos.

Para cada antimicrobiano se depositó concentraciones de 25, 50, 100, 200 y 400 ng/mL y de 500, 600, 700, 800, 900 y 1000 ng/mL para aminoglucósidos, en los cilindros dispuestos en placas que han sido inoculada con distintas cepas de referencia, de tal manera que todas las cepas fueron probadas con todos los representantes de las familias de antimicrobianos. Además, como control negativo se depositaron 200 μ L de agua destilada estéril en cilindros. Se obtuvieron seis determinaciones, en dos ensayos independientes, por concentración con cada cepa de referencia. El resultado obtenido se observa como la presencia o ausencia de una zona de inhibición del crecimiento bacteriano en torno al cilindro que contiene la muestra. Se mide el radio de los halos de inhibición en milímetros con un pie de metro, donde el halo es proporcional al efecto de los analitos presentes en la muestra. Tanto el promedio de los halos como su correspondiente desviación estándar fueron considerados en el análisis para elegir la cepa más susceptible a los antimicrobianos de una familia. En la tabla 1 se puede observar las condiciones de las placas definidas para cada familia de antimicrobianos.

Tabla 1. Condiciones de preparación de medios de cultivos para las distintas familias de antibióticos.

Familia	Representante	Medio	pH
Macrólidos	Eritromicina	N°8	8
	Tilosina		
β -lactámicos	Ampicilina	N°5	6
	Amoxicilina		
Quinolonas	Enrofloxacino	N°5	8
	Ciprofloxacino		
Sulfonamidas	Sulfacloropiridazina	MH*	7,3
Aminoglucósidos	Espectinomicina	N°5	8
	Neomicina		
Tetraciclinas	Oxitetraciclina	N°8	6
	4-epioxitetraciclina		

*Después de inocular del agar se adicionan 100 μ L de TMP, de una S.I. de 5000 ng/mL, cada 100 mL de medio.

Los medios utilizados, para β -lactámicos, quinolonas y aminoglucósidos fueron el medio antibiótico N°5, mientras que para macrólidos y tetraciclinas se ocupó el medio antibiótico N°8. Para la familia de las sulfonamidas se ocupó el medio Mueller-Hinton (MH) al cual además se le agrego 100 μ L de trimetoprim (TMP), de una S.I. de 5000 ng/mL, cada 100 mL

de medio para mejorar la sensibilidad de la placa para la familia de las sulfonamidas (Pikkemaat *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2020). Los medios y sus respectivos pH fueron escogidos según el método de screening propuesto por la USDA-FSIS (2011). El medio MH para sulfonamidas, fue seleccionado basándonos en lo descrito por Sophila *et al.* (2018), y el pH es ajustado según lo descrito por el método *EU four-plate test* para la detección de sulfonamidas (Pikkemaat *et al.*, 2011).

6. Estandarización de las condiciones experimentales del análisis microbiológico.

La estandarización de las condiciones experimentales del análisis microbiológico fue realizada en paralelo a los ensayos de susceptibilidad. Los medios utilizados fueron preparados según las indicaciones del fabricante y luego se les ajustó el pH para favorecer la detección del analito. Estos medios fueron esterilizados y posteriormente inoculados con una de las cepas bacterianas. Para el caso de los medios inoculados con *B. cereus* y *B. subtilis*, estos requieren una incubación a 48°C, en un baño termorregulado posterior a la inoculación, por 45 y 75 minutos respectivamente (USDA-FSIS, 2011). La concentración de cada microorganismo en las placas de agar fue ajustada en UFC/mL, utilizando un espectrofotómetro (VIS-7220G/UV-9200, China), de modo que se logre un crecimiento homogéneo, similar a un tapiz, en la placa y que permita visualizar los halos de inhibición más fácilmente. Para ajustar la concentración se utilizaron tubos con 3 mL de BHI previamente incubados que contengan *E. coli*, *S. epidermidis* o *K. rhizophila*, y para *B. subtilis*, *B. cereus* y *G. stearothermophilus* tubos con esporas. Desde los tubos se depositan alícuotas en tubos con 6 mL de NaCl 0,8% de los cuales se miden la concentración de bacterias utilizando el espectrofotómetro.

Posteriormente, se vertieron 10 mL de medio inoculado a una placa Petri estéril de 90 x 15 milímetros. Luego, las placas fueron incubadas por 18 a 24 horas a la temperatura óptima de crecimiento para cada bacteria. Para *K. rhizophila*, *S. epidermidis* y *E. coli*, la temperatura de incubación es de 35°C, para *B. cereus* y *B. subtilis*, la temperatura de incubación es de 30°C. Para las placas inoculadas con *G. stearothermophilus*, al ser incubadas a 55°C por 14 a 18 horas, se vierten 12,5 mL del medio para evitar que las placas se deshidraten rápidamente durante el periodo de incubación debido a la alta temperatura.

6.1. Estandarización de las condiciones experimentales para la extracción de residuos de antimicrobianos desde la matriz heces.

Como no existe un método de extracción de residuos de antimicrobianos desde heces para análisis de screening microbiológicos, que sea rápido y que no requiera equipos sofisticados de laboratorio, fue necesario desarrollar y determinar las condiciones para la extracción de residuos de las seis familias de antimicrobianos desde la matriz de heces, utilizando muestras de heces de pollos fortificadas. Para la extracción de residuos de antimicrobianos desde la matriz heces, se utilizó como base el protocolo descrito por Berendsen *et al.* (2015), el cual fue modificado para ser utilizado posteriormente en el screening microbiológico. Este protocolo involucra diversos pasos de lavado y extracción, con el objetivo de analizar la muestra mediante LC-MS/MS. Por esta razón, el protocolo fue modificado para ser utilizado en un screening microbiológico. De acuerdo con lo descrito en la literatura (Zhou *et al.*, 2012), los solventes orgánicos como metanol (MET), acetona (ACT) y acetonitrilo (ACN) son los más comúnmente utilizados para hacer extracción desde matrices de heces, por lo que se hicieron ensayos utilizando ACN (LiChrosolv® Merck, Darmstadt, Alemania), ACT y MET (EMSURE® Merck, Darmstadt, Alemania) para determinar con cual se obtiene mejores resultados de extracción. Para la selección del solvente, primero se hicieron ensayos con el fin de determinar si los solventes por si solos generan un halo de inhibición. Los ensayos consistieron en depositar 200 µL de cada solvente en cilindros dispuestos en las distintas placas inoculadas con bacterias. Se realizaron seis determinaciones de cada solvente, por cada placa definida en la tabla 1, las cuales estaban inoculadas con las distintas bacterias. Como control negativo para este ensayo, se utilizó 200 µL de agua destilada estéril depositado en los cilindros.

Para determinar la interacción entre la matriz y los distintos solventes, se pesaron de $2,0 \pm 0,01$ gramos de muestras blanco, las cuales fueron diluidas con 3 mL de cada solvente, obteniendo seis muestras para cada solvente. Luego se continuo con el protocolo de extracción, y los extractos obtenidos fueron alicuotados en cantidades de 200 µL en los cilindros dispuestos en las placas inoculadas con bacterias. Se realizaron seis determinaciones diferentes por mezcla de solvente con la matriz, en las distintas placas con el fin determinar si estas mezclas producen un halo de inhibición. Como control negativo, se utilizaron muestras de $2,0 \pm 0,01$ diluidas con 3 mL de agua destilada estéril. Se midió el

radio de los halos obtenidos, y tanto el promedio de los halos como su correspondiente desviación estándar fueron considerados en el análisis para elegir el solvente.

Para estandarizar la extracción con muestras fortificadas, se pesaron muestras de $1,0 \pm 0,01$ y $2,0 \pm 0,01$ gramos, las cuales fueron fortificadas con concentraciones de 25, 50, 100, 200, 400 y 600 ng/mL para macrólidos, β -lactámicos, quinolonas, sulfonamidas, y tetraciclinas; y de 500, 600, 700, 800, 900 y 1000 ng/mL para aminoglucósidos. Posteriormente para aminoglucósidos se probaron concentraciones de 2000, 4000, 6000, 8000, 10000, 15000 y 20000 ng/mL. La tabla de fortificación de muestras se encuentra en el Anexo 2. Se prepararon seis muestras para cada concentración de cada antimicrobiano. Como control negativo, se utilizaron muestras de $1,0 \pm 0,01$ y $2,0 \pm 0,01$ diluidas con 3 mL de agua destilada estéril. Después, se realizó el protocolo de extracción, el cual fue estandarizado previamente, con cada uno de los solventes, y el extracto obtenido se alicuotó por triplicado en las placas determinadas para cada antimicrobiano. Las placas fueron incubadas a la temperatura óptima de cada cepa bacteriana, y luego se midió el radio de los halos obtenidos. Se realizaron seis determinaciones diferentes, por cada concentración de antimicrobiano, en dos experimentos independientes. Tanto el promedio de los halos como su correspondiente desviación estándar fueron considerados en el análisis para elegir el solvente que permite extraer la menor concentración de los antimicrobianos, desde la matriz de deyecciones.

7. Verificación del método de extracción estandarizado en la etapa anterior, utilizando muestras de deyecciones de pollos fortificadas con concentraciones conocidas de los analitos, mediante LC-MS/MS.

Una vez estandarizadas las condiciones de extracción, se realizó el análisis de determinación de la recuperación de residuos de estos extractos obtenidos en el objetivo anterior, mediante LC-MS/MS. Durante la fortificación de las muestras que serán analizadas por LC-MS/MS se añadió, tanto a las muestras fortificadas como controles negativos, un estándar interno para cada familia de antimicrobianos como parte de los protocolos establecidos por FARMAVET para el análisis confirmatorio. Los estándares internos corresponden a: Sulfametoxazol 13C6, Enrofloxacino D5, Cloxacilina D6, Tetraciclina D6, Gentamicina (EI) y Estreptomycin (EI). El uso de un estándar interno proporciona una medida de control para la extracción, inyección de la cromatografía líquida y la variabilidad de ionización. Pese a que la metodología de

extracción implementada será diseñada específicamente para el método de screening, los extractos igualmente se analizaron por LC-MS/MS para confirmar si el método en estudio efectivamente extrae residuos de antimicrobianos desde las muestras fortificadas.

Una vez acabado el protocolo de extracción para análisis microbiólogo, los extractos obtenidos se llevaron a secado bajo un flujo suave de nitrógeno en baño de agua a 40 - 50°C. una vez secado la muestra, se reconstituyeron con 300 µL de metanol y con 200 µL de agua HPLC, y posteriormente se transfirió la muestra a un vial rotulado, utilizando una jeringa de 1 mL con un filtro Millex® de 0.22 mm

7.1. Análisis instrumental

El análisis instrumental de las muestras fue mediante 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, AB Sciex, Darmstadt, Alemania). La columna analítica fue una Synergi 4u fusión RP 30a 50 x 2,0 mm, y el software para el manejo del equipo fue Analyst 1.6.3 (SCIEX, Framingham, MA, USA) y para la integración de las muestras se utilizó el programa Multiquant 3.0. Los parámetros para el análisis instrumental y detección de los residuos de antimicrobianos se encuentran en el Anexo 3 y 4.

7.2. Cuantificación de los analitos y recuperación de los analitos.

Los residuos de antimicrobianos detectados por LC-MS/MS fueron cuantificados mediante la ecuación de la recta ($y = a + bx$, en donde $y =$ área, $a =$ intercepto en el eje y , $x =$ concentración, $b =$ pendiente), la cual fue obtenida a partir del análisis de regresión lineal de curvas de calibración de matriz fortificada a concentraciones conocidas.

Para la recuperación de los analitos, se seleccionaron nueve muestras blanco por antimicrobianos, los cuales se fortificaron en concentraciones de 25, 60 y 100 ng/mL (3 muestras por concentración). Mediante el siguiente cálculo se determinó la recuperación para cada nivel de concentración:

$$R (\%) = \frac{\text{Concentración Cuantificada}}{\text{Nivel de Fortificación}} \times 100$$

Nivel de Fortificación

RESULTADOS

1. Ensayos de susceptibilidad frente a las seis familias de antimicrobianos.

Antes de realizar los ensayos de susceptibilidad, se establecieron las concentraciones de las distintas cepas bacterianas en las placas de agar, para así lograr un crecimiento homogéneo en forma de tapiz. Las concentraciones están detalladas en la tabla 2.

Tabla 2. Concentración final en el medio de cultivo de las cepas bacterianas de referencia.

Cepas de referencia	Estándar McFarland	Volumen del estándar/100 mL de medio	Concentración final en agar (UFC/mL)
<i>K. rhizophila</i> ATCC 9341	0,5	1,0 mL	$1,5 \times 10^6$
<i>E. coli</i> ATCC 10536	0,5	200 μ L	3×10^5
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	1,0	1,0 mL	3×10^6
<i>G. stearothermophilus</i> ATCC 10149	1,0	1,5 mL	$4,5 \times 10^6$
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	1,0	1,0 mL	3×10^6
<i>B. cereus</i> ATCC 11778	1,0	1,0 mL	3×10^6

Los resultados de la medición del radio de los halos corresponden, para cada antimicrobiano, al promedio de seis determinaciones obtenidas en dos experimentos independientes con su correspondiente desviación estándar. Para cada cepa bacteriana se realizó una curva de droga pura, entre 25 ng/mL y 400 ng/mL para las familias de los macrólidos, quinolonas, β -lactámicos, sulfonamidas y tetraciclinas, y entre 500 ng/mL y 1000 ng/mL para la familia de los aminoglucósidos.

Para las seis familias se consideró entre las concentraciones, el LMR establecido para la matriz de musculo de aves de corral según la CE (2010). Se pudo observar para la mayoría de los casos, una relación lineal entre el valor de los halos y las distintas concentraciones probadas.

En la tabla 3 podemos evidenciar que para los representantes de los macrólidos (ERI y TIL), la cepa de *E. coli* no presentó halo de inhibición en ninguna de las concentraciones probadas, lo que se anotó como halo de 0 milímetros. Por otra parte, la cepa que obtuvo los halos de mayor tamaño a estos antimicrobianos fue *K. rhizophila*, que a una concentración de 100 ng/mL, que corresponde al LMR de TIL, se obtuvo un halo en milímetros de $12,6 \pm 0,4$ para ERI, y de $7,7 \pm 0,6$ para TIL.

Tabla 3. Resultados del estudio de susceptibilidad a la familia de los macrólidos en cepas de referencia.

Cepa Bacteriana	Antimicrobiano	25 (ng/mL)	50 (ng/mL)	100 (ng/mL)	200 (ng/mL)	400 (ng/mL)
<i>B. cereus</i>	Eritromicina	4,5 ± 0,5	6,0 ± 0,0	9,0 ± 0,0	9,8 ± 0,3	11,7 ± 0,6
<i>B. subtilis</i>	Eritromicina	3,0 ± 1,0	5,2 ± 0,3	7,2 ± 0,6	7,8 ± 0,3	8,2 ± 0,8
<i>E. coli</i>	Eritromicina	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
<i>G. stearothermophilus</i>	Eritromicina	2,0 ± 1,7	4,7 ± 0,8	5,8 ± 0,3	8,0 ± 0,5	9,0 ± 0,5
<i>K. rhizophila</i>	Eritromicina	8,8 ± 0,8	11,3 ± 0,8	12,6 ± 0,4	13,2 ± 1,0	14,8 ± 1,2
<i>S. epidermidis</i>	Eritromicina	3,9 ± 0,4	5,2 ± 0,3	5,8 ± 0,3	7,5 ± 0,5	8,8 ± 0,9
<i>B. cereus</i>	Tilosina	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	3,2 ± 0,6	4,5 ± 0,0	5,0 ± 0,5
<i>B. subtilis</i>	Tilosina	0,2 ± 0,3	1,5 ± 0,9	3,0 ± 0,5	4,3 ± 1,0	6,7 ± 1,6
<i>E. coli</i>	Tilosina	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
<i>G. stearothermophilus</i>	Tilosina	4,8 ± 0,3	6,8 ± 0,6	7,5 ± 0,0	8,8 ± 0,3	9,5 ± 0,5
<i>K. rhizophila</i>	Tilosina	3,8 ± 0,7	6,0 ± 0,6	7,7 ± 0,6	10,7 ± 1,6	9,4 ± 1,5
<i>S. epidermidis</i>	Tilosina	0,0 ± 0,0	1,8 ± 0,6	2,3 ± 0,3	4,2 ± 1,0	5,7 ± 1,0

Como se puede observar en la tabla 4, para los representantes de las quinolonas (ENR y CIP), las cepas de *K. rhizophila* y *G. stearothermophilus* no presentaron halos de inhibición. En este grupo las cepas más susceptibles fueron *E. coli* y *B. subtilis*, con valores respectivos en milímetros para el LMR de 100 ng/mL, de 9,8 ± 1,1 y 13,8 ± 1,3 para ENR, y de 9,6 ± 1,6 y 8,3 ± 1,1 para CIP.

Tabla 4. Resultados del estudio de susceptibilidad a la familia de las quinolonas en cepas de referencia.

Cepa Bacteriana	Antimicrobiano	25 (ng/mL)	50 (ng/mL)	100 (ng/mL)	200 (ng/mL)	400 (ng/mL)
<i>B. cereus</i>	Enrofloxacino	2,3 ± 0,8	3,2 ± 2,8	5,8 ± 0,3	6,5 ± 0,0	7,7 ± 0,3
<i>B. subtilis</i>	Enrofloxacino	6,4 ± 0,7	7,6 ± 0,7	9,6 ± 1,6	10,4 ± 2,0	10,9 ± 0,9
<i>E. coli</i>	Enrofloxacino	5,3 ± 0,6	8,4 ± 0,7	9,8 ± 1,1	10,8 ± 1,1	12,6 ± 1,1
<i>G. stearothermophilus</i>	Enrofloxacino	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	5,2 ± 1,5	7,0 ± 0,5
<i>K. rhizophila</i>	Enrofloxacino	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,4 ± 0,8
<i>S. epidermidis</i>	Enrofloxacino	1,3 ± 1,0	4,2 ± 1,0	5,3 ± 0,3	6,3 ± 0,3	7,3 ± 0,3
<i>B. cereus</i>	Ciprofloxacino	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	5,2 ± 0,6	5,8 ± 0,3	6,7 ± 0,8
<i>B. subtilis</i>	Ciprofloxacino	5,0 ± 0,6	7,3 ± 0,7	8,3 ± 1,1	10,2 ± 1,7	10,8 ± 1,0
<i>E. coli</i>	Ciprofloxacino	10,5 ± 0,6	12,2 ± 0,9	13,8 ± 1,3	14,3 ± 0,4	14,8 ± 1,7
<i>G. stearothermophilus</i>	Ciprofloxacino	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	3,0 ± 0,0	7,5 ± 1,3	8,2 ± 1,0
<i>K. rhizophila</i>	Ciprofloxacino	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,8 ± 1,1
<i>S. epidermidis</i>	Ciprofloxacino	2,3 ± 0,3	3,8 ± 0,8	6,0 ± 1,0	6,2 ± 1,4	6,8 ± 1,5

Para los representantes de los β -lactámicos (AMP y AMX), las cepas de *E. coli*, *B. cereus*, *B. subtilis* y *S. epidermidis* no presentaron halos de inhibición para ninguno de los dos antimicrobianos. Por otra parte, la cepa más susceptible a esta familia fue *K. rhizophila*, en donde para el LMR de 50 ng/mL se obtuvo un halo en milímetros de $13,2 \pm 0,6$ para AMP, y de $8,7 \pm 4,1$ para AMX. Los resultados se pueden observar en la tabla 5.

Tabla 5. Resultados del estudio de susceptibilidad a la familia de los β -lactámicos en cepas de referencia.

Cepa Bacteriana	Antimicrobiano	25 (ng/mL)	50 (ng/mL)	100 (ng/mL)	200 (ng/mL)	400 (ng/mL)
<i>B. cereus</i>	Amoxicilina	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
<i>B. subtilis</i>	Amoxicilina	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
<i>E. coli</i>	Amoxicilina	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
<i>G. stearothermophilus</i>	Amoxicilina	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
<i>K. rhizophila</i>	Amoxicilina	7,2 \pm 2,4	8,7 \pm 4,1	9,8 \pm 3,1	11,5 \pm 2,0	14,9 \pm 0,7
<i>S. epidermidis</i>	Amoxicilina	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
<i>B. cereus</i>	Ampicilina	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
<i>B. subtilis</i>	Ampicilina	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
<i>E. coli</i>	Ampicilina	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
<i>G. stearothermophilus</i>	Ampicilina	0,0 \pm 0,0	2,0 \pm 0,0	2,8 \pm 0,3	5,5 \pm 0,0	9,2 \pm 0,8
<i>K. rhizophila</i>	Ampicilina	8,5 \pm 0,5	13,2 \pm 0,6	15,2 \pm 1,0	16,3 \pm 0,5	17,6 \pm 0,7
<i>S. epidermidis</i>	Ampicilina	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0

En la tabla 6 se pueden observar los resultados para SCP representante de las sulfonamidas. Las cepas de *E. coli*, *B. cereus*, *B. subtilis* y *S. epidermidis* no presentaron halo de inhibición para este antimicrobiano. La cepa más susceptible a esta familia fue *G. stearothermophilus*, cuyo valor en milímetros para el LMR de 100 ng/ml fue de $8,4 \pm 0,8$.

Tabla 6. Resultados del estudio de susceptibilidad a la familia de las sulfonamidas en cepas de referencia.

Cepa Bacteriana	Antimicrobiano	25 (ng/mL)	50 (ng/mL)	100 (ng/mL)	200 (ng/mL)	400 (ng/mL)
<i>B. cereus</i>	Sulfaclopiridazina	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
<i>B. subtilis</i>	Sulfaclopiridazina	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
<i>E. coli</i>	Sulfaclopiridazina	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
<i>G. stearothermophilus</i>	Sulfaclopiridazina	2,4 \pm 0,7	5,3 \pm 0,6	8,4 \pm 0,8	11,8 \pm 1,0	13,9 \pm 0,7
<i>K. rhizophila</i>	Sulfaclopiridazina	4,2 \pm 1,0	4,8 \pm 4,4	4,8 \pm 0,6	8,3 \pm 2,5	9,0 \pm 2,2
<i>S. epidermidis</i>	Sulfaclopiridazina	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0

Para los representantes de los aminoglucósidos, la mayoría de las cepas no presentaron halos de inhibición para alguna de las concentraciones probadas. En el caso de ESP, los halos presentados en *B. subtilis* tenían desviaciones elevadas, y en *S. epidermidis* sólo se observaron halos en las concentraciones más altas (900 y 1000 ng/mL). Para NEO al LMR de 500 ng/mL, en *B. subtilis* se obtuvo un halo en milímetros de $3,1 \pm 1,2$ y en *S. epidermidis* de $3,5 \pm 0,4$. Los resultados se pueden observar en la tabla 7.

Tabla 7. Resultados del estudio de susceptibilidad a la familia de los aminoglucósidos en cepas de referencia.

Cepa Bacteriana	Antimicrobiano	500 (ng/mL)	600 (ng/mL)	700 (ng/mL)	800 (ng/mL)	900 (ng/mL)	1000 (ng/mL)
<i>B. cereus</i>	Neomicina	$1,7 \pm 0,4$	$1,5 \pm 0,4$	$1,8 \pm 0,7$	$1,3 \pm 0,8$	$1,9 \pm 0,9$	$1,9 \pm 0,7$
<i>B. subtilis</i>	Neomicina	$3,1 \pm 1,2$	$3,3 \pm 0,6$	$3,6 \pm 1,4$	$3,2 \pm 0,7$	$3,3 \pm 0,6$	$4,2 \pm 1,4$
<i>E. coli</i>	Neomicina	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$1,3 \pm 1,4$	$1,0 \pm 0,8$	$1,7 \pm 0,8$
<i>G. stearothermophilus</i>	Neomicina	$0,0 \pm 0,0$					
<i>K. rhizophila</i>	Neomicina	$2,3 \pm 0,7$	$2,2 \pm 0,9$	$2,7 \pm 1,1$	$2,4 \pm 0,6$	$1,8 \pm 0,6$	$2,3 \pm 0,7$
<i>S. epidermidis</i>	Neomicina	$3,5 \pm 0,4$	$3,6 \pm 0,2$	$4,3 \pm 0,4$	$4,5 \pm 0,5$	$4,5 \pm 1,1$	$5,1 \pm 0,7$
<i>B. cereus</i>	Espectinomicina	$0,0 \pm 0,0$	$2,9 \pm 2,1$				
<i>B. subtilis</i>	Espectinomicina	$0,8 \pm 1,2$	$1,6 \pm 2,6$	$1,6 \pm 2,4$	$1,9 \pm 1,9$	$2,2 \pm 2,3$	$2,1 \pm 1,9$
<i>E. coli</i>	Espectinomicina	$0,0 \pm 0,0$					
<i>G. stearothermophilus</i>	Espectinomicina	$0,0 \pm 0,0$					
<i>K. rhizophila</i>	Espectinomicina	$0,0 \pm 0,0$					
<i>S. epidermidis</i>	Espectinomicina	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$1,3 \pm 0,8$	$1,6 \pm 0,7$

Los resultados para los representantes de las tetraciclinas (OTC y EPI) se pueden observar en la tabla 8. Las cepas *E. coli*, *G. stearothermophilus*, *K. rhizophila* y *S. epidermidis* no presentaron halos de inhibición para ninguno de los dos antimicrobianos probados. Por otra parte, la cepa más susceptible a esta familia fue *B. cereus*, que para el LMR de 100 ng/mL se obtuvo un halo en milímetros de $8,9 \pm 0,6$ para OTC y de $6,7 \pm 0,3$ para EPI.

Tabla 8. Resultados del estudio de susceptibilidad a la familia de las tetraciclinas en cepas de referencia.

Cepa Bacteriana	Antimicrobiano	25 (ng/mL)	50 (ng/mL)	100 (ng/mL)	200 (ng/mL)	400 (ng/mL)
<i>B. cereus</i>	4-epioxitetraciclina	$2,2 \pm 1,0$	$4,2 \pm 0,4$	$6,7 \pm 0,3$	$7,9 \pm 1,0$	$7,5 \pm 0,7$
<i>B. subtilis</i>	4-epioxitetraciclina	$0,0 \pm 0,0$	$1,0 \pm 0,5$	$2,8 \pm 0,3$	$3,7 \pm 0,3$	$4,5 \pm 0,5$
<i>E. coli</i>	4-epioxitetraciclina	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$
<i>G. stearothermophilus</i>	4-epioxitetraciclina	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$3,2 \pm 0,3$
<i>K. rhizophila</i>	4-epioxitetraciclina	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$
<i>S. epidermidis</i>	4-epioxitetraciclina	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$

<i>B. cereus</i>	Oxitetraciclina	4,8 ± 0,5	6,2 ± 0,4	8,9 ± 0,6	9,5 ± 0,8	9,3 ± 1,4
<i>B. subtilis</i>	Oxitetraciclina	1,3 ± 0,6	3,2 ± 0,3	4,7 ± 0,6	6,2 ± 0,3	7,2 ± 0,6
<i>E. coli</i>	Oxitetraciclina	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
<i>G. stearothermophilus</i>	Oxitetraciclina	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	2,7 ± 0,6	6,0 ± 0,0
<i>K. rhizophila</i>	Oxitetraciclina	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,7 ± 0,6	3,3 ± 0,8	5,7 ± 0,7
<i>S. epidermidis</i>	Oxitetraciclina	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0

En la tabla 9 se puede observar las bacterias que fueron utilizadas para el método de extracción de residuos de antimicrobianos, según los resultados obtenidos en los ensayos de susceptibilidad. Al ser *K. rhizophila* la cepa bacteriana más susceptible, tanto como para la familia de los macrólidos como de los β -lactámicos, se continuo con esta cepa en los ensayos de extracción de antimicrobianos desde la matriz de deyecciones de pollos broiler. Para la familia de las sulfonamidas, *G. stearothermophilus* es la cepa bacteriana más susceptible, obteniendo los halos de mayor tamaño a partir de los 50 ng/mL, por lo que se continuo con esta cepa en los ensayos de extracción. Si bien para la familia de los aminoglucósidos, *S. epidermidis* obtuvo el halo de mayor tamaño para el representante NEO en todas las concentraciones, *B. subtilis* obtuvo halos en ambos representantes de la familia desde la mínima concentración analizada (500 ng/mL), por lo que se continuo con *B. subtilis* para los ensayos de extracción. *B. cereus* fue la cepa más susceptible a la familia de las tetraciclinas, obteniendo halos para ambos representantes desde la mínima concentración analizada (25 ng/mL), por lo que se continuo con esta cepa bacteriana en los ensayos de extracción. Para la familia de las quinolonas *E. coli* fue la cepa bacteriana más susceptible, por lo que se decidió continuar con esta cepa para los ensayos de extracción de antimicrobianos.

Tabla 9. Condiciones de preparación de medios de cultivos para las distintas familias de antibióticos, utilizadas para la extracción de antimicrobianos.

Cepa Bacteriana	Familia	Antimicrobiano	Medio	pH
<i>K. rhizophila</i>	Macrólidos	Eritromicina Tilosina	N°8	8
<i>K. rhizophila</i>	β -lactámicos	Ampicilina Amoxicilina	N°5	6
<i>B. subtilis/E. coli</i>	Quinolonas	Enrofloxacino Ciprofloxacino	N°5	8

<i>G. stearothermophilus</i>	Sulfonamidas	Sulfacoloropiridazina	MH	7,3
<i>B. subtilis</i>	Aminoglucósidos	Espectinomicina Neomicina	N°5	8
<i>B. cereus</i>	Tetraciclinas	Oxitetraciclina 4-epioxitetraciclina	N°8	6

2. Resultados de la estandarización de las condiciones experimentales para la extracción de residuos de antimicrobianos desde la matriz heces.

Para desarrollar el protocolo de extracción, nos basamos en el protocolo descrito por Berendsen *et al* (2015) para la extracción de antimicrobianos desde la matriz de heces para ser analizadas por LC-MS/MS. El protocolo final se encuentra en el anexo 5, y considera siete pasos para extraer los residuos de antimicrobianos rápidamente para luego ser analizados mediante el método de screening microbiológico. Este es el protocolo utilizado para estandarizar las condiciones experimentales durante el segundo objetivo del estudio.

Para la selección del solvente utilizado en el protocolo de extracción se realizaron ensayos con los distintos solventes. Los resultados obtenidos probando ACN, MET y ACT, mostraron que estos solventes por sí solos no producen halos de inhibición en las placas, pero los extractos de muestras blanco utilizando cada uno de estos solventes en la matriz resultó que en la mayoría de los casos se produce un halo de inhibición con una tendencia al aumento del radio de este en los medios con pH más ácidos (Tabla 10).

Tabla 10. Resultados de extracción en muestras blanco (no fortificadas), con distintos solventes. Se utilizaron dos gramos de muestras para cada solvente.

Medio	pH del medio	Solvente	Tamaño del halo (mm)	Medio	pH del medio	Solvente	Tamaño del halo (mm)
N°8	8	ACN	0,5 ± 0,6	MH	7,3	ACN	4,3 ± 0,4
		ACT	0,3 ± 0,3			ACT	2,0 ± 0,7
		MET	0,6 ± 0,2			MET	4,2 ± 0,5
N°5	6	ACN	3,3 ± 0,5	N°8	6	ACN	5,1 ± 0,9
		ACT	5,2 ± 0,6			ACT	2,5 ± 0,5
		MET	4,8 ± 0,4			MET	2,2 ± 0,5
N°5	8	ACN	1,3 ± 0,3				
		ACT	0,4 ± 0,4				

(1): Corresponde a las placas inoculadas con *B. subtilis* para la detección de quinolonas y aminoglucósidos

Si bien la cepa más susceptible a las quinolonas fue *E. coli*, en los ensayos de extracción de residuos de quinolonas, los halos que se obtuvieron en concentraciones de 25 a 600 ng/mL no se podían diferenciar de los halos de nuestros controles. Por esta razón, se realizaron ensayos de extracción de quinolonas con *B. subtilis* y *E. coli*, utilizando distintos solventes. En la tabla 11 podemos observar los resultados obtenidos durante este ensayo, que corresponden al promedio de seis determinaciones diferentes para cada concentración de antimicrobiano. Con el fin de potenciar el tamaño de los halos de inhibición con ACN, se probó ambos representantes de la familia en conjunto (enrofloxacino y ciprofloxacino).

Tabla 11. Comparación de los resultados de extracción de quinolonas entre *E. coli* y *B. subtilis*, utilizando distintos solventes.

Cepa bacteriana	Solvente	1ACN3	1ACT3	1MET3	2ACN3
	Antimicrobiano	Tamaño del halo (mm)			
<i>B. subtilis</i>	QUI 25 ng/mL	1,3 ± 0,5	0,0 ± 0,0	1,5 ± 1,0	1,3 ± 1,1
	QUI 50 ng/mL	1,6 ± 0,5	0,0 ± 0,0	1,0 ± 0,9	1,2 ± 0,2
	QUI 100 ng/mL	1,3 ± 0,5	0,0 ± 0,0	1,3 ± 0,7	1,1 ± 0,2
	QUI 200 ng/mL	1,3 ± 0,4	0,0 ± 0,0	1,5 ± 0,9	1,4 ± 0,7
	QUI 400 ng/mL	1,4 ± 0,2	1,3 ± 0,7	1,6 ± 0,3	3,3 ± 0,4
	QUI 600 ng/mL	1,6 ± 0,2	2,1 ± 0,5	2,0 ± 0,5	3,8 ± 0,3
<i>E. coli</i>	QUI 25 ng/mL	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	QUI 50 ng/mL	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	QUI 100 ng/mL	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,4
	QUI 200 ng/mL	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,2 ± 0,2
	QUI 400 ng/mL	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,8 ± 0,8	1,4 ± 0,3
	QUI 600 ng/mL	0,0 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,7 ± 0,5	1,8 ± 0,2

QUI: Enrofloxacino + ciprofloxacino.

1ACN3: Un mL de acetonitrilo cada tres gramos de muestra.

1ACT3: Un mL de acetona cada tres gramos de muestra.

1MET3: Un mL de metanol cada tres gramos de muestra.

2ACN3: Dos mL de acetonitrilo cada tres gramos de muestra.

Si bien en las pruebas de susceptibilidad a la familia de las quinolonas fue *E. coli* la cepa bacteriana más susceptible, en los ensayos de extracción *B. subtilis* obtuvo los halos de mayor tamaño, y en todas las concentraciones utilizando el solvente ACN. Por tanto, se escogió *B.*

subtilis como la cepa bacteriana a utilizar en el método de screening microbiológico para la detección de quinolonas.

En los ensayos de extracción de residuos de antimicrobianos desde deyecciones de pollos broiler, los resultados para ACN mostraron desviaciones estándar más bajas que para el caso de MET y ACT. Adicionalmente, para el solvente ACN con el cual se presentaron mejores resultados, se aumentó la cantidad de muestra a dos gramos para así disminuir la dilución de la muestra. Con el fin de potenciar el tamaño de los halos de inhibición con ACN, se probó una mezcla de antibióticos para los representantes de las tetraciclinas (oxitetraciclina y su epímero 4-epioxitetraciclina). Las concentraciones de antimicrobianos presentes en la tabla 12 corresponden a las concentraciones desde las cuales se puede observar una diferencia entre el halo de inhibición de las muestras fortificadas y de las muestras blanco, en muestras de tres gramos con 2 mL de ACN. Los detalles de estos análisis están en el Anexo 6 y 7.

Tabla 12. Promedio de los resultados de los ensayos de extracción utilizando distintos solventes.

Concentración de fortificación	1ACN3 Tamaño del halo (mm)	1ACT3 Tamaño del halo (mm)	1MET3 Tamaño del halo (mm)	2ACN3 Tamaño del halo (mm)
ERI 100 ng/mL	6,8 ± 0,3	2,0 ± 1,0	1,5 ± 0,5	4,0 ± 0,0
TIL 600 ng/mL	8,2 ± 0,3	2,3 ± 0,3	1,0 ± 0,0	4,2 ± 0,6
AMP 50 ng/mL	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,3 ± 0,6	5,1 ± 0,7
AMX 600 ng/mL	2,2 ± 0,8	7,7 ± 0,8	5,8 ± 0,8	3,8 ± 1,7
SCP 200 ng/mL	4,3 ± 0,3	3,8 ± 0,8	6,0 ± 1,0	6,5 ± 0,0
NEO 20000 ng/mL	1,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,3 ± 0,6
ESP 20000 ng/mL	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,2 ± 0,3
EPI 100 ng/mL	5,7 ± 0,8	2,8 ± 0,3	1,8 ± 0,3	-
OTC 100 ng/mL	5,5 ± 0,9	2,5 ± 0,0	2,8 ± 0,6	-
TET 25 ng/mL	-	-	-	7,4 ± 0,9
TET 600 ng/mL	-	-	-	4,2 ± 0,6

-: No se realizaron esos análisis.

TET: Oxitetraciclina + 4-epioxitetraciclina.

1ACN3: Un mL de acetonitrilo y tres gramos de muestra.

1ACT3: Un mL de acetona y tres gramos de muestra.

1MET3: Un mL de metanol y tres gramos de muestra.

2ACN3: Dos mL de acetonitrilo y tres gramos de muestra.

Los resultados del screening utilizando extractos de muestras fortificadas mostraron que, para las familias de los macrólidos, quinolonas, sulfonamidas y β -lactámicos, a medida que aumenta la concentración de fortificación, va aumentando el halo de inhibición. En las tetraciclinas (OTC y EPI), que fueron probados tanto por separado como en conjunto en una misma muestra, se observó que a medida que aumenta la concentración de fortificación, el halo tiende a disminuir su tamaño, contrario a lo esperado. En la concentración de 25 ng/mL de TET se logra diferenciar el halo de la muestra con el halo de la muestra blanco, pero a medida que aumenta la concentración se pierde la capacidad de diferenciar una muestra fortificada de una muestra blanco. La TIL, representante de los macrólidos, tuvo un aumento significativo del tamaño del halo de inhibición a partir de los 400 ng/mL, en comparación con ERI, el otro representante de grupo, cuyo aumento del halo se produjo desde los 100 ng/mL. La AMX, representante de los β -lactámicos, no obtuvo diferencias entre los halos de inhibición de las concentraciones analizadas. A la concentración máxima analiza (600 ng/mL) de AMX no se logró diferenciar de una muestra blanco, en comparación con AMP, que a partir de los 50 ng/mL se obtuvo una diferencia entre la muestra fortificada y una muestra blanco. Para los aminoglucósidos, no se observó diferencias entre los halos de inhibición para las distintas concentraciones cuando se utilizó ACN y dos gramos de muestra y tampoco se pudo diferenciar su tamaño del halo de las muestras blanco, incluso a una concentración de 20.000 ng/mL. Considerando los resultados de los ensayos de extracción de antimicrobianos, se estandarizaron las condiciones experimentales para los ensayos de extracción en la matriz de heces en 2 gramos de muestra y 3 mL de ACN. Debido a la baja sensibilidad de los antimicrobianos AMX y TIL, con las condiciones estandarizadas para nuestro método de screening microbiológico, es que se decidió eliminarlos para el resto del estudio.

3. Resultados de la verificación del método de extracción, utilizando muestras de deyecciones de pollos fortificadas, mediante LC-MS/MS.

En la cuantificación de los analitos en la matriz de deyecciones de aves, se logró determinar las concentraciones de fortificación en todos los analitos. La recuperación fue calculada con tres concentraciones distintas (25, 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$), y con esto se determinó una recuperación para la mayoría de los antimicrobianos, superior al 95% en muestras fortificadas a 25, 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, a excepción de eritromicina a 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y oxitetraciclina a 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$. En la Tabla

13 se puede observar los porcentajes de recuperación obtenidos para cada analito incluido en el estudio, junto a la concentración medida en la cuantificación de los analitos.

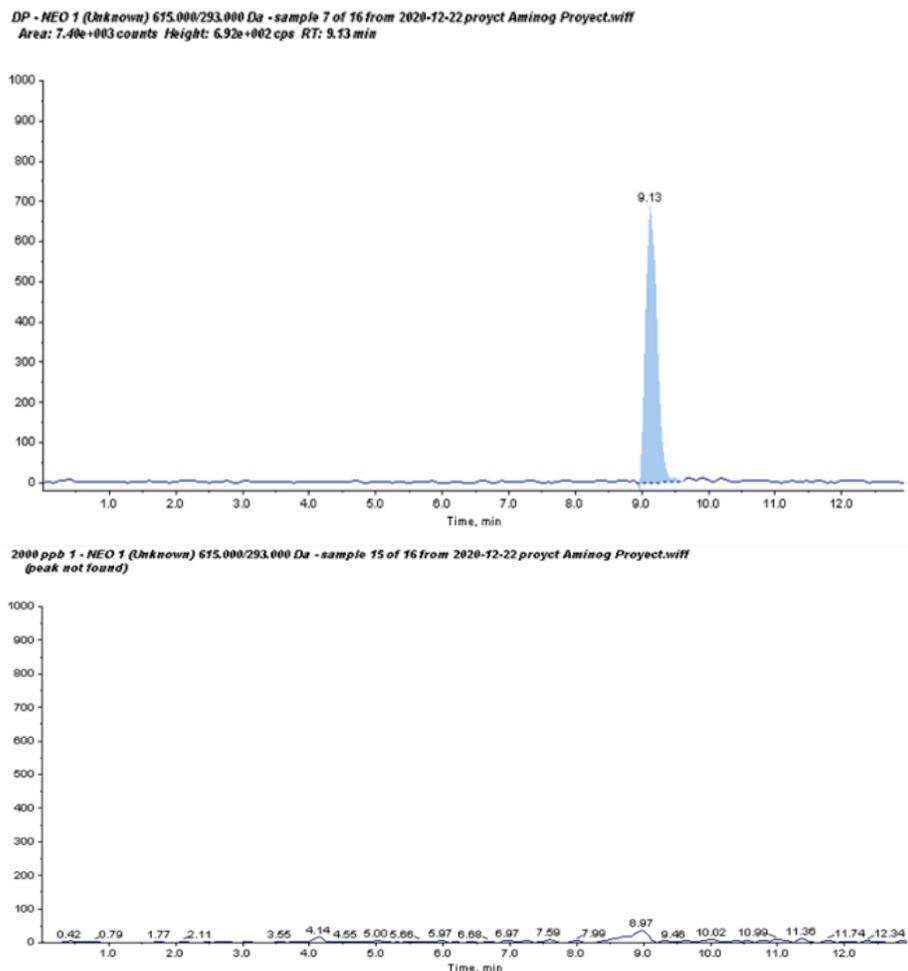
Tabla 13. Tabla de resultados con el porcentaje de recuperación, y la concentración cuantificada mediante LC-MS/MS.

Analito	Concentración de fortificación (µg kg⁻¹)	Concentración medida (µg kg⁻¹)	Recuperación (%)
Eritromicina	25	20,31	81,25
	50	57,02	114,05
	100	97,65	97,65
Ampicilina	25	24,53	98,15
	50	50,52	101,05
	100	99,76	99,76
Sulfacloropiridazina	25	25,51	102,07
	50	49,38	98,77
	100	100,26	100,26
Ciprofloxacino	25	24,66	98,64
	50	50,51	101,02
	100	99,83	99,83
Enrofloxacino	25	25,44	101,76
	50	49,33	98,67
	100	100,22	100,22
4-epioxitetraciclina	25	27,55	110,21
	50	46,17	92,34
	100	101,27	101,27
Oxitetraciclina	25	34,36	137,44
	50	35,96	71,92
	100	104,67	104,67

No se describe la familia de los aminoglucósidos en la tabla 13, ya que no fue posible detectar la señal cromatográfica en el tiempo de retención definido para el antimicrobiano neomicina, representante de la familia, a partir de las muestras procesadas mediante el método de extracción para análisis microbiológico. En la figura 1, en el cromatograma superior se observa un cromatograma representativo de la inyección de estándar certificado de

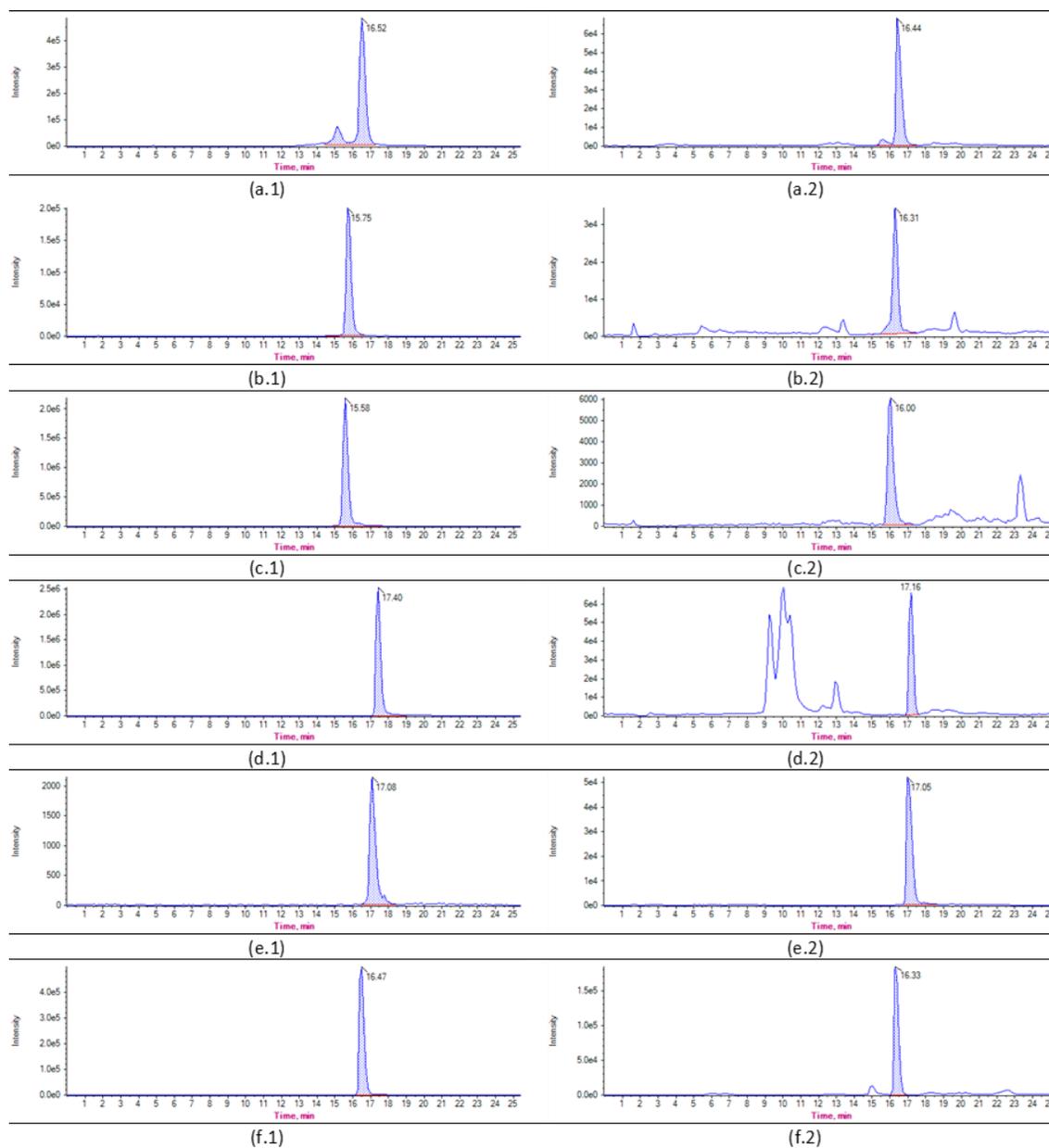
neomicina en donde se observa gráficamente la detección del estándar inyectado en el equipo en la forma de un peak. Mientras que en el cromatograma inferior se observa la ausencia de un peak representativo a partir de la inyección de muestras fortificadas con neomicina a 2000 ng/mL, extraídas mediante el método implementado en este proyecto.

Figura 1. Cromatogramas representativos a partir de la inyección de estándar certificado de neomicina (arriba) y del análisis de muestras de deyecciones fortificadas con neomicina a concentraciones de 2000 µg/kg (abajo).



Esto sugiere que el método de extracción para screening microbiológico no es capaz de extraer la familia de los aminoglucósidos. En comparación, en la figura 2 se observa un cromatograma representativo de la inyección de estándar certificado de los representantes de cada familia de antimicrobianos versus un cromatograma representativo a partir de la inyección de muestras extraídas mediante el método de extracción implementado en este estudio. Las muestras previo el análisis fueron fortificadas a una concentración de 400 µg/kg para todos los analitos de estudio.

Figura 2. Cromatogramas representativos a partir de la inyección de estándar certificado (izquierda) y del análisis de muestras de deyecciones fortificadas a concentraciones de 400 µg/kg (derecha). (a.1 y a.2: OTC + EPI; b.1 y b.2: ENR; c.1 y c.2: CIP; d.1 y d.2: SCP; e.1 y e.2: ERI; f.1 y f.2: AMP).



Se observa gráficamente la detección de un antibiótico inyectado en el equipo en la forma de un peak. Para el caso de OTC y EPI, se observan otros peaks correspondientes a impurezas propias de la matriz de heces.

DISCUSIÓN

Se logró implementar un método de screening microbiológico para la detección simultánea de residuos de antimicrobianos en la matriz de deyecciones de pollos broiler, lo cual hasta la fecha no se ha publicado. El método permite detectar antimicrobianos de las familias de los macrólidos, β -lactámicos, quinolonas, sulfonamidas y de las tetraciclinas. Cuando todas las placas implementadas en este estudio son utilizadas, cada una específica para una familia de antimicrobianos, según el patrón de halos de inhibición obtenido podremos dilucidar las familias de antimicrobianos con mayor probabilidad de estar presentes en la muestra. Esto permite reducir la cantidad de muestras que deben ser analizadas por un análisis confirmatorio posterior.

En nuestro método, para considerar una muestra positiva, la diferencia entre el radio del halo de una muestra y el radio del halo de una muestra blanco debe ser mayor o igual a dos milímetros (Gaudin *et al.*, 2010), permitiendo diferenciar definitivamente el halo de inhibición en la muestra. En los análisis de muestras blanco, se observó la presencia de un halo en muestras blanco con los distintos solventes, pero también se observó la ausencia de halos en alícuotas de los solventes en ausencia de la matriz, lo que indicaría que un efecto propio de la matriz analizada en conjunto con los solventes causaría un halo de inhibición en las distintas placas. Este efecto propio de una matriz ya ha sido descrito en otras metodologías (Pikkemaat *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2020), y se puede deber a los distintos micro-elementos que constituyen a la matriz de heces, como proteínas, grasas y metales, como también a una alta actividad bacteriana propia de la matriz (Berendsen *et al.*, 2015). La presencia de los halos de inhibición en las muestras blancos se puede deber también al efecto del pH propio de la matriz que puede afectar el crecimiento de las bacterias inoculadas en las placas. Es necesario continuar haciendo pruebas con la matriz, como por ejemplo la regulación del pH de las muestras con la utilización de un buffer, como el buffer fosfato, lo que ya ha sido descrito en otros métodos de screening microbiológico para matrices comestibles de origen animal (USDA-FSIS, 2011).

Si bien el objetivo de este estudio era desarrollar un método de screening microbiológico capaz de detectar seis familias de antimicrobianos, durante el desarrollo de este método se eliminó los aminoglucósidos como una de las familias que se buscaba detectar mediante el

método implementado. Esto se debe a que, en los ensayos de extracción de los representantes de esta familia, no se observó diferencias entre los halos de inhibición para las concentraciones entre 500 y 20000 ng/mL, utilizando ACN y dos gramos de muestra. Además, el tamaño de los halos no se pudo diferenciar del halo de las muestras blanco. Los resultados sugieren que, mediante las condiciones experimentales del método de screening implementado no es posible detectar aminoglucósidos en la matriz heces, razón por la cual esta familia fue eliminada del estudio. Esto se relaciona con lo descrito en la literatura para otras matrices, como músculo y leche, en donde se logran detectar concentraciones de más de 4000 µg/kg, pero no se logra validar la técnica (Gaudin *et al.*, 2010).

Nuestro método de screening microbiológico está basado en el método utilizado por la USDA-FSIS (2011), pero este carece de una placa suplementada con TMP por lo que es insuficiente para detectar sulfonamidas. Es por eso por lo que el método implementado en este estudio contempla una placa específica para sulfonamidas, la cual tiene TMP que actúa como un sensibilizador para esta familia (Pikkemaat *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2020). La adición de 5 ng/mL de TMP cada 100 mL de agar MH permite aumentar el tamaño de los halos de inhibición, mejorando la sensibilidad del método para esta familia, detectando desde una concentración de 200 ng/mL, por sobre el LMR establecido para músculo de aves.

Tanto para la familia de las quinolonas como para tetraciclinas se decidió considerar a ambos representantes de ambas familias, para así mejorar la sensibilidad del método frente a estas familias de antimicrobianos. En el caso de las tetraciclinas el halo aumento de 3 mm de cada representante a 6 mm con los representantes en conjunto. La detección de las tetraciclinas y las quinolonas en conjunto es considerada por la CE al establecer el LMR para matrices comestibles de origen animal (CE, 2010). Esto se debe a que 4-epioxitetraciclina es un epímero formado durante la biodegradación de las oxitetraciclinas (Zhao *et al.*, 2019), y el ciprofloxacino es un metabolito activo del enrofloxacino (Rao *et al.*, 2002).

En el caso de las tetraciclinas, se observó que a medida que aumenta la concentración de fortificación, el halo tiende a disminuir su tamaño, contrario a lo esperado. Si bien a 100 ng/mL, que corresponde al LMR considerado por la CE para la matriz de músculos, se logra obtener un halo promedio de $6,0 \pm 1,0$, no es posible diferenciar de las muestras blancos en las cuales se obtuvo un halo promedio de $5,1 \pm 0,9$, por lo que durante la validación, posterior

a este estudio, se realizaron ensayos de capacidad de detección de las tetraciclinas para dilucidar si el método permite detectar bajas concentraciones de esta familia de antimicrobianos. La baja sensibilidad hacia las tetraciclinas se puede deber a la presencia de cationes divalentes en las deyecciones, como por ejemplo Ca^{2+} (Dalólio *et al.*, 2017; Drózd *et al.*, 2020), que pueden quelar tetraciclinas, disminuyendo la actividad bacteriostática de estos antimicrobianos (Kuang *et al.*, 2009). Para disminuir el efecto de los cationes divalentes, se podría optimizar el método utilizando carboximetilcelulosa de sodio para quelar estos compuestos, aumentando la sensibilidad del método hacia las tetraciclinas, incluso en medios de pH alcalino. (Wu *et al.*, 2019). También se puede incorporar cloranfenicol al medio utilizado para detectar tetraciclinas, para mejorar la sensibilidad del método hacia esta familia (Nouws *et al.*, 1999; Nagel *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2020).

El método implementado utiliza *K. rhizophila* para detectar antimicrobianos de las familias de los macrólidos y β -lactámicos, al ser esta cepa la más susceptible a esas familias según los resultados de este estudio. Esto causa que en las placas de medio N°8 a pH 8.0, que si bien están designadas para la detección de macrólidos, presenten halos de inhibición causadas por β -lactámicos, aunque de menor tamaño que las presentadas en las placas de medio N°5 a pH 6.0 (designadas para β -lactámicos). También, según los resultados obtenidos en las pruebas de susceptibilidad, *G. stearothermophilus* es sensible a β -lactámicos por lo que esta familia puede presentar halos de inhibición en las placas destinadas a las sulfonamidas. Debido a esto, para poder discriminar la detección de los macrólidos y sulfonamidas de los β -lactámicos, se puede utilizar penicilinas en las placas destinadas a los macrólidos y sulfonamidas para poder inactivar los β -lactámicos (Przenioslo-Siwczyńska y Kwiatek, 2007, Pikkemaat *et al.*, 2011).

Por otra parte, los ensayos de verificación del método de extracción de residuos de antimicrobianos que se hizo mediante el método confirmatorio de LC-MS/MS, mostraron que el método de extracción desarrollado en este estudio efectivamente extrae los residuos de antimicrobianos desde las muestras fortificadas, a excepción de los aminoglucósidos. A partir de las muestras procesadas mediante el método de extracción, no fue posible detectar una señal cromatográfica en el tiempo de retención definido para el antimicrobiano neomicina, representante de la familia de los aminoglucósidos. Esto confirma que nuestro método no logra extraer la familia de aminoglucósidos desde la matriz de heces.

Teniendo en cuenta que hasta la fecha no se ha descrito un método de screening microbiológico que detecte residuos de antimicrobianos en la matriz de heces de forma rápida y de bajo costo, es significativo la implementación, y su posterior validación, del método desarrollado en esta tesis. La información otorgada por estudios, en donde concluyeron que residuos de antimicrobianos pueden permanecer por tiempos prolongados incluso más allá que la faena de las aves (Pokrant *et al.*, 2021), justifica que no solo se debe seguir investigando sobre las posibles rutas de ingreso de residuos de antimicrobianos a la cadena alimentaria, además, es necesario desarrollar métodos de detección rápidos y de bajo costo de estos residuos para poder establecer un sistema de vigilancia y fiscalización nacional de subproductos de origen animal.. Esto permitirá dar los primeros pasos para poder establecer un método de laboratorio para un programa de vigilancia de residuos de antimicrobianos en subproductos de origen animal, como lo son las deyecciones de pollos broiler, siendo la principal ventaja de esta matriz su obtención previo a la faena del animal, evitando el ingreso de residuos de antimicrobianos a la cadena alimentaria, y su potencial perjuicio a la salud pública.

CONCLUSIÓN

Se logró implementar un método de screening microbiológico para la detección de cinco familias de antimicrobianos en la matriz de deyecciones de pollos broiler, a concentraciones cercanas al LMR establecido para la matriz de músculos de aves. Nuestro método logró detectar ampicilina a 50 ng/mL, eritromicina a 100 ng/mL, quinolonas a 400 ng/mL y sulfacloropiridazina a 200 ng/mL. Si bien oxitetraciclina con su epímero 4-epioxitetraciclina se logró detectar a 100 ng/mL, pero con una baja especificidad, el análisis mediante LC-MS/MS confirma que se extraen las concentraciones de TET desde la matriz. Las condiciones para la detección de la familia de las tetraciclinas debieron ser optimizadas durante la posterior validación del método implementado, para detectar sus residuos en las placas. La detección de la familia de los aminoglucósidos no se logró implementar, debido a que el protocolo de extracción era incapaz de extraer esta familia.

Establecer un método de detección rápido de residuos de antimicrobianos en deyecciones de aves es de gran relevancia, debido a que las deyecciones de pollos broiler son el principal material de las camas de broiler, que son utilizadas para la alimentación de otras especies productivas y como fertilizante en sistemas agrícolas, actuando como vía de entrada de antimicrobianos hacia el medio ambiente. El uso de esta matriz permitirá detectar residuos de antimicrobianos previo a la faena, facilitando las labores de vigilancia y fiscalización del uso de estos subproductos, y así evitar el reingreso de residuos de antimicrobianos en la cadena alimenticia.

Con los resultados obtenidos en este estudio, se logró implementar las bases analíticas de un método de screening microbiológico, el cual se validó en otro estudio posterior, con el fin de demostrar que el método tiene las características adecuadas para poder desempeñarse como un análisis para la detección de residuos de antimicrobianos en las deyecciones de pollos broiler.

BIBLIOGRAFÍA

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

BOGAERTS, R.; WOLF, F. 1980. A standardized method for detection of residues of antibacterial substances in fresh meat. *Fleischwirtschaft*. 60: 672-674.

CHEN, J; YING, G.; DENG, W. 2019. Antibiotic Residues in Food: Extraction, Analysis, and Human Health Concerns. *J. Agric. Food Chem.* 67(27):7569-7586.

COMISIÓN EUROPEA. 2010. REGLAMENTO (UE) No 37/2010 DE LA COMISIÓN de 22 de diciembre de 2009 relativo a las sustancias farmacológicamente activas y su clasificación por lo que se refiere a los límites máximos de residuos en los productos alimenticios de origen animal. *Diario oficial de las Comunidades Europeas*. 470: 72

CORNEJO, J.; POKRANT, E.; ARAYA, D.; BRICEÑO, C.; HIDALGO, H.; MADDALENO, A.; ARAYA-JORDÁN, C.; SAN MARTIN, B. 2017. Residue depletion of oxytetracycline (OTC) and 4-epi-oxytetracycline (4-epi-OTC) in broiler chicken's claws by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Food Addit. Contam. Part A*. 34(4):494-500.

CORNEJO, J.; YEVENES, K.; AVELLO, C.; POKRANT, E.; 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(6):1264.

DAGHRIR, R; DROGUI, P. 2013. Tetracycline antibiotics in the environment: a review. *Environ. Chem. Lett.* 11(3):209-22.

DALÓLIO, F.; DA SILVA, J.; DE OLIVEIRA, A.; TINÔCO, I.; BARBOSA, R.; DE OLIVEIRA, M.; ALBINO, L.; COELHO, S. 2017. Poultry litter as biomass energy: A review and future perspectives. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 76:941-949.

DRÓZDZ, D.; WYSTALSKA, K.; MALINSKA, K.; GROSSER, A.; GROBELAK, A.; KACPRZAK, M. 2020. Management of poultry manure in Poland – Current state and future perspectives. *Environ. Manag. Today*. 264: 110327.

GAUDIN, V.; MARIS, P.; FUSELIER, RIBOUCHON, J.; 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. 2017. State of the art in the validation of screening methods for the control of antibiotic residues: is there a need for further development?. *Food Addit. Contam.* 34(9):1528-1552.

GOUVÊA, R.; DOS SANTOS, F. F.; DE AQUINO, M.H.C.; PEREIRA, A. 2015. Fluoroquinolones in industrial poultry production, bacterial resistance and food residues: a review. *Rev. Bras. Cienc. Avic.* 17(1): 1-10.

INSTITUTO NACIONAL DE ESTADISTICA DE CHILE. 2021. Ferias y mataderos de Ganado y aves. [en línea] <<https://www.ine.cl/estadisticas/economia/agricultura-agroindustria-y-pesca/mataderos-de-ganado>> [consulta: 02-06-2021].

KOŽÁROVÁ, I.; JUŠČÁKOVÁ, D.; ŠIMKOVÁ, J.; MILKOVIČOVÁ, M.; KOŽÁR, M. 2020. Effective screening of antibiotic and coccidiostat residues in food of animal origin by reliable broad-spectrum residue screening tests. *Ital. J. Anim. Sci.* 19(1): 487-501.

KUANG, Y.; JIA, H.; MIYANAGA, K.; TANJI, Y. 2009. Effect of milk on antibacterial activity of tetracycline against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 84(1): 135-42.

MADDALENO, A.; POKRANT, E.; YANTEN, F.; SAN MARTIN, B.; CORNEJO, J. 2019. Implementation and Validation of an Analytical Method for Lincomycin Determination in Feathers and Edible Tissues of Broiler Chickens by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *J Anal Methods Chem.* vol. 2019, Article ID 4569707: 8 páginas.

MAGALHÃES, D.; FREITAS, A.; VILA-POUCA, A.; BARBOSA, J.; RAMOS, F. 2020. The use of ultra-high-pressure-liquid-chromatography tandem time-of-flight mass spectrometry as a confirmatory method in drug residue analysis: Application to the determination of antibiotics in piglet liver. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* Epub: 1153:122264.

- MASSÉ, D.I.; SAADY, N.M.C.; GILBERT, Y.** 2014. Potential of biological processes to eliminate antibiotics in livestock manure: An overview. *Animals*. 4: 146–163.
- MUHAMMAD, J.; KHAN, S.; SU, J.; HESHAM, A.; DITTA, A.; NAWAB, J.; ALI, A.** 2020. Antibiotics in Poultry Manure and Their Associated Health Issues: A Systematic Review. *J. Soils Sediments*. 20:486-497.
- NAGEL, O.; ZAPATA, M.; BASÍLICO, J.; BERTERO, J.; MOLINA, M.; ALTHAUS, R.** 2009. Effect of Chloramphenicol on a Bioassay Response for the Detection of Tetracycline Residues in Milk. *J Food Drug Anal.* 17(1): 36-42.
- NGOC DO, M.; YAMAGUCHI, T.; OKIHASHI, M.; HARADA, K.; KONISHI, Y.; UCHIDA, K.; BUI, L.; NGUYEN, T.; PHAN, H.; BUI, H.; NGUYEN, P.; KAJIMURA, K.; KUMEDA, Y.; DANG, C.; HIRATA, K.; YAMAMOTO, Y.** 2016. Screening of antibiotic residues in pork meat in Ho Chi Minh City, Vietnam, using a microbiological test kit and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Food Control*. 69:262-266.
- NOUWS, J.; VAN EGMOND, H.; SMULDERS, I.; LOEFFEN, G.; SCHOUTEN, J.; STEGEMAN, H.** 1999. A microbiological assay system for assessment of raw milk exceeding EU maximum residue levels. *Int. Dairy J.* 85-90
- OZDEMIR, Z.; TRAS, B.; UNEY, K.** 2018. Distribution of Hydrophilic and Lipophilic Antibacterial Drugs in Skim Milk, Cream, and Casein. *J. Dairy Sci.* 101(12):10694-10702.
- PIKKEMAAT, M.** 2009. Microbial screening methods for detection of antibiotic residues in slaughter animals. *Anal. Bioanal. Chem.* 395(4):893-905.
- PIKKEMAAT, M.; MULDER, P.; ELFERINK, J.; DE COCQ, A.; NIELEN, M.; VAN EGMOND, H.** 2010. Improved microbial screening assay for the detection of quinolone residues in poultry and eggs. *Food Addit. Contam.* 24(8): 842-850.
- PIKKEMAAT, M.; RAPALLINI, M.; ZUIDEMA, T.; ELFERINK, J.; OOSTRA-VAN DIJK, S.; DRIESSEN-VAN LANKVELD, W.** 2011. Screening methods for the detection of antibiotic residues in slaughter animals: comparison of the European Union Four-Plate Test, the Nouws Antibiotic Test and the Premi®Test (applied to muscle and kidney). *Food Addit. Contam.* 28(1):26-34.

- 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. *PLoS One* 13(7):e0200206.
- 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. J.* 101313.
- PRZENIOSŁO-SIWCZYŃSKA, M.; KWIATEK, K.** 2007. Evaluation of multi-plate microbial assay for the screening of antibacterial substances in animal feedingstuffs. *Bull Vet Inst Pulawy.* 599-602
- RAMOS-PAYÁN, M.; OCAÑA-GONZÁLEZ, J.; FERNÁNDEZ-TORRES, R.; BELLO-LÓPEZ, M.** 2020. A Method for the Determination of Veterinary Drugs from Different Therapeutic Classes in Animal Urine. *J. Chromatogr. Sci.* 58(2):127-135.
- RAO, G.; RAMESH, S.; AHMAD, A.; TRIPATHI, H.; SHARMA, L.; MALIK, J.** 2002. Pharmacokinetics of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in goats given enrofloxacin alone and in combination with probenecid. *Vet J.* 63(1):85-93.
- SANCHUKI, C.; SOCCOL, R.; CARVALHO, J.; SOCCOL, V.; NASCIMENTO, C.; WOICIECHOWSKI, A.** 2011. Evaluation of poultry litter traditional composting process. *Braz. arch. biol. Technol.* 54(4).
- SOPHILA, J.; RAJ, G.; KUMANAN, K.; CHANDRA, G.; VAIRAMUTHU, S.** 2018. Microbial inhibition assay for detection of antibiotic residues in chicken meat using vegetative form of *Geobacillus stearothermophilus*. *J. Pharm. Innov.* 7(4): 753-757.
- TASHO, R.; CHO, J.** 2016. Veterinary antibiotics in animal waste, its distribution in soil and uptake by plants: A review. *Sci. Total Environ.* 563–564: 366–376.
- TUMINI, M.; NAGEL, O.; ALTHAUS, R.** 2019. Five-assay microbiological system for the screening of antibiotic residues. *Rev. Argent. Microbiol.* 51(4):345-353.

UNIVERSIDAD DE ARKANSAS. DIVISION DE AGRICULTURA. 2021. Feeding Broiler Litter to Beef Cattle. [en línea] <<https://www.uaex.edu/publications/pdf/FSA-3016.pdf>> [consulta: 02-06-2021].

USDA-FSIS. 2011. Bioassay for the Detection, Identification and Quantitation of Antimicrobial Residues in Meat and Poultry Tissue. [en línea] https://www.fsis.usda.gov/sites/default/files/media_file/2021-03/MLG_34_03.pdf [consulta: 02-06-2021].

WU, Q.; ZHU, Q.; LIU, Y.; SHABBIR, M.; SATTAR, A.; PENG, D.; TAO, Y.; CHEN, D.; WANG, Y.; YUAN, Z. 2019. A microbiological inhibition method for the rapid, broad-spectrum, and high-throughput screening of 34 antibiotic residues in milk. *J. Dairy Sci.* 102(12): 10825-10837.

WU, Q.; GAO, X.; SHABBIR, M.; PENG, D.; TAO, Y.; CHEN, D.; HAO, H.; CHENG, G.; LIU, Z.; YUAN, Z.; WANG, Y. 2020. Rapid multi-residue screening of antibiotics in muscle from different animal species by microbiological inhibition method. *Microchem. J.* 152: 104417.

ZHAO, L.; WEI, Q.; YAO, F.; YUAN, L.; SHEHATA, E.; LONG, J. 2019. Degradation mechanisms of oxytetracycline in the environment. *J. Integr. Agric.* 18(9): 1953–1960.

ZHOU, L.; YING, G.; LIU, S.; ZHAO, J.; CHEN, F.; ZHANG, R.; PENG, F.; ZHANG, Q. 2012. Simultaneous determination of human and veterinary antibiotics in various environmental matrices by rapid resolution liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 1244: 123-138.

ANEXO 1



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 2

Protocolo para la fortificación de muestras de heces de aves para detección mediante screening microbiológico

1. Pesar $1,0 \pm 0,01$ o $2,0 \pm 0,01$ gramos de muestra en un tubo Falcon de 50 ml.
2. Fortificar cada muestra con la concentración de droga pura que corresponda (incluir una muestra “blanco”, sin fortificar).

A partir de una solución intermedia de 5.000 ng/mL de macrólidos, β -lactámicos, quinolonas, sulfonamidas, tetraciclinas y aminoglucósidos:

Concentración en la muestra (ng/mL).	Volumen para $1,0 \pm 0,01$ gramos de muestra (μ l).	Volumen para $2,0 \pm 0,01$ gramos de muestra (μ l).
25	5	10
50	10	20
100	20	40
200	40	80
400	80	160
500	100	200
600	120	240
800	160	320
900	180	360
1000	200	400

ANEXO 3

Configuración de cromatografía, parámetros de fuente y especificaciones generales de espectrometría de masas.

Columna:	Sunfire™ C 18 3.5 μm, 150 × 2.1 mm (Waters Corp).
Volumen de inyección:	20 μl
Temperatura de columna:	35 °C +/- 1°C
Flujo:	0,2 mL/min
Fase A:	0.1% Formic Acid in water pH 2.7 +/- 0.2.
Fase B:	0.1% Formic Acid in methanol pH 3.0 +/- 0.3.
Ionización:	Electrospray ionization (ESI)
Temperatura:	550 °C
Curtain gas:	30 psi
Collision gas:	10 psi
Voltaje de pulverización de iones:	
Modo positivo:	3 500 V
Gas 1:	60 psi
Gas 2:	80 psi

ANEXO 4

Condiciones del espectrómetro de masas específicas para cada analito.

Analito	Ion Precursor (m/z)	Ion producto (m/z)	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
OTC / 4-epi-OTC	461.0	426.0	72.0	10.0	28.0	25.0
		381.0	73.0		36.0	22.0
ENRO	361.0	343.0	50.0	7.0	23.0	8.0
		317.0			28.0	20.0
CIPRO	331.0	231.0	56.0	4.5	47.0	4.0
		314.0			28.0	4.0
ERI	734.0	576.0	100.0		25.0	24.0
		540.0	100.0		25.0	14.0
SCP	285.2	156.0	61.0	10.0	21.0	12.0
		108.1			31.0	8.0
SMZ 13C6 (IS)	285.0	124.100	71.0	10.0	31.0	12.0
EFX D5 (IS)	365.0	321.000	50.0	7.0	23.0	8.0
TC D6 (IS)	451.0	160.000	34.0	10.0	25.0	30.0
ESPECT	351.0	333.0	80.0	10.0	24.0	22.0
		207.0			32.0	13.0
NEO	615.0	293.0	60.0	10.0	37.0	22.0
		161.0			40.0	8.0
GENTA EI	464.0	322.0	60.0	7.8	19.0	16.0
STREP EI	582.0	263.0	70.0	11.0	40.0	18.0
AMPI	350.0	106.0	50.0	7.0	25.0	10.0
		160.0			17.0	21.0
CLOXA EI	436.0	277.0	51.0	5.8	21.0	18.0
		160.0			21.0	18.0

DP: Declustering potential; EP: Entrance potential; CE: Collision energy; CXP: Collision cell exit potential.

ANEXO 5

Protocolo de extracción de antimicrobianos desde muestras de deyecciones de pollos broiler para análisis microbiológico.

1.	Fortificar una muestra con la concentración de droga pura que corresponda e incluir una muestra blanco, sin fortificar.
2.	Añadir 3 mL de acetonitrilo a cada uno de los tubos.
3.	Agitar cada muestra en un agitador rotatorio durante 10 minutos a velocidad máxima.
4.	Incubar las muestras a -20 °C por 10 minutos.
5.	Centrifugar las muestras a temperatura ambiente por 10 minutos a 4000 rpm
6.	Aspirar el sobrenadante con jeringa y luego filtrar utilizando un filtro de membrana hidrofílica de 0,2 µm de poro y 25 mm de diámetro. Transferir el extracto filtrado se a un tubo eppendorf.
7.	Alicuotar, por triplicado, 200 µL de este filtrado a un cilindro dispuesto en la placa con la cepa bacteriana inoculada en el agar, y elegido para cada familia de antimicrobianos.
8.	Incubar las placas por 24 horas a la temperatura óptima de crecimiento según cada cepa bacteriana.
9.	Una vez transcurrido el tiempo de incubación, medir el radio de los halos de inhibición en milímetros.

ANEXO 6

Tabla de los resultados de extracción de antimicrobianos desde deyecciones de pollos broiler. Los resultados corresponden al promedio de seis determinaciones distintas. (parte 1)

Representante	Concentración de fortificación (µg/kg)	1ACN3 Tamaño del halo (mm)	1ACT3 Tamaño del halo (mm)	1MET3 Tamaño del halo (mm)	2ACN3 Tamaño del halo (mm)
Eritromicina	25	6,0 +/- 1,0	0,0 +/- 0,0	0,0 +/- 0,0	2,0 +/- 0,0
Eritromicina	50	5,2 +/- 1,4	0,0 +/- 0,0	0,0 +/- 0,0	1,8 +/- 0,3
Eritromicina	100	6,8 +/- 0,3	2,0 +/- 1,0	1,5 +/- 0,5	4,0 +/- 0,0
Eritromicina	200	6,7 +/- 0,6	4,8 +/- 0,3	3,5 +/- 0,5	5,0 +/- 0,0
Eritromicina	400	7,3 +/- 0,6	6,3 +/- 0,6	5,2 +/- 1,2	5,5 +/- 0,5
Eritromicina	600	8,0 +/- 0,0	9,5 +/- 1,3	7,7 +/- 0,3	10,0 +/- 0,0
Tilosina	25	4,0 +/- 3,5	0,0 +/- 0,0	0,0 +/- 0,0	1,2 +/- 0,3
Tilosina	50	5,3 +/- 0,6	0,0 +/- 0,0	0,0 +/- 0,0	1,0 +/- 0,0
Tilosina	100	4,7 +/- 1,0	0,0 +/- 0,0	0,0 +/- 0,0	0,8 +/- 0,3
Tilosina	200	5,2 +/- 1,4	0,0 +/- 0,0	0,0 +/- 0,0	1,5 +/- 0,0
Tilosina	400	7,0 +/- 0,0	1,5 +/- 0,0	0,7 +/- 0,3	3,0 +/- 1,0
Tilosina	600	8,2 +/- 0,3	2,3 +/- 0,3	1,0 +/- 0,0	4,2 +/- 0,6
Ampicilina	25	0,5 +/- 0,9	0,0 +/- 0,0	2,3 +/- 0,8	2,7 +/- 0,5
Ampicilina	50	0,0 +/- 0,0	0,0 +/- 0,0	1,3 +/- 0,6	5,1 +/- 0,7
Ampicilina	100	1,3 +/- 0,6	1,2 +/- 0,3	2,5 +/- 1,3	7,6 +/- 0,9
Ampicilina	200	3,0 +/- 1,8	4,8 +/- 0,3	3,3 +/- 2,0	8,8 +/- 0,9
Ampicilina	400	6,0 +/- 0,0	6,7 +/- 0,3	5,0 +/- 1,0	10,1 +/- 0,7
Ampicilina	600	6,0 +/- 0,0	8,8 +/- 0,3	6,2 +/- 1,0	11,5 +/- 0,5
Amoxicilina	25	0,0 +/- 0,0	0,0 +/- 0,0	0,0 +/- 0,0	3,2 +/- 1,3
Amoxicilina	50	1,7 +/- 0,6	0,0 +/- 0,0	0,0 +/- 0,0	3,8 +/- 2,0
Amoxicilina	100	2,2 +/- 0,8	1,2 +/- 0,3	0,7 +/- 1,2	3,3 +/- 1,4
Amoxicilina	200	2,3 +/- 0,6	2,5 +/- 0,5	0,8 +/- 1,4	4,0 +/- 1,3
Amoxicilina	400	2,3 +/- 0,8	5,7 +/- 0,3	6,0 +/- 0,9	4,2 +/- 1,8
Amoxicilina	600	2,2 +/- 0,8	7,7 +/- 0,8	5,8 +/- 0,8	3,8 +/- 1,7
Ciprofloxacina (<i>E. coli</i>)	25	0,0 ± 0,0	0,0 +/- 0,0	0,0 ± 0,0	-
Ciprofloxacina (<i>E. coli</i>)	50	0,0 ± 0,0	0,0 +/- 0,0	0,0 ± 0,0	-
Ciprofloxacina (<i>E. coli</i>)	100	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	-
Ciprofloxacina (<i>E. coli</i>)	200	0,0 ± 0,0	0,0 +/- 0,0	0,0 ± 0,0	-
Ciprofloxacina (<i>E. coli</i>)	400	0,5 +/- 0,0	1,2 +/- 0,8	0,7 +/- 0,3	-
Ciprofloxacina (<i>E. coli</i>)	600	0,7 +/- 0,3	1,0 +/- 0,3	1,0 +/- 0,3	-
Enrofloxacin (<i>E. coli</i>)	25	0,0 ± 0,0	0,0 +/- 0,0	0,0 ± 0,0	-
Enrofloxacin (<i>E. coli</i>)	50	0,0 ± 0,0	0,0 +/- 0,0	0,0 ± 0,0	-
Enrofloxacin (<i>E. coli</i>)	100	1,4 +/- 0,6	0,0 +/- 0,0	2,6 +/- 1,7	-
Enrofloxacin (<i>E. coli</i>)	200	0,8 +/- 0,3	0,0 +/- 0,0	0,7 +/- 0,3	-
Enrofloxacin (<i>E. coli</i>)	400	1,0 +/- 0,5	0,0 +/- 0,0	1,2 +/- 0,6	-
Enrofloxacin (<i>E. coli</i>)	600	1,0 +/- 0,0	0,6 +/- 0,0	1,0 +/- 0,4	-
Quinolonas (<i>B. subtilis</i>)	25	-	-	-	1,3 ± 1,1
Quinolonas (<i>B. subtilis</i>)	50	-	-	-	1,2 ± 0,2
Quinolonas (<i>B. subtilis</i>)	100	-	-	-	1,1 ± 0,2
Quinolonas (<i>B. subtilis</i>)	200	-	-	-	1,4 ± 0,7
Quinolonas (<i>B. subtilis</i>)	400	-	-	-	3,3 ± 0,4
Quinolonas (<i>B. subtilis</i>)	600	-	-	-	3,8 ± 0,3
Quinolonas (<i>E. coli</i>)	25	-	-	-	0,0 ± 0,0
Quinolonas (<i>E. coli</i>)	50	-	-	-	0,0 ± 0,0
Quinolonas (<i>E. coli</i>)	100	-	-	-	0,2 ± 0,4
Quinolonas (<i>E. coli</i>)	200	-	-	-	1,2 ± 0,2
Quinolonas (<i>E. coli</i>)	400	-	-	-	1,4 ± 0,3
Quinolonas (<i>E. coli</i>)	600	-	-	-	1,8 ± 0,2

ANEXO 7

Tabla de los resultados de extracción de antimicrobianos desde deyecciones de pollos broiler. Los resultados corresponden al promedio de seis determinaciones distintas. (parte 2)

Representante	Concentración de fortificación (µg/kg)	1ACN3 Tamaño del halo (mm)	1ACT3 Tamaño del halo (mm)	1MET3 Tamaño del halo (mm)	2ACN3 Tamaño del halo (mm)
Sulfacoloropiridazina	25	4,0 +/- 0,0	4,3 +/- 0,3	0,0 +/- 0,0	5,7 +/- 0,3
Sulfacoloropiridazina	50	3,8 +/- 0,3	4,2 +/- 0,3	3,3 +/- 0,3	6,2 +/- 0,8
Sulfacoloropiridazina	100	4,7 +/- 0,3	5,0 +/- 0,0	4,0 +/- 0,9	5,5 +/- 0,5
Sulfacoloropiridazina	200	4,3 +/- 0,3	3,8 +/- 0,8	6,0 +/- 1,0	6,5 +/- 0,0
Sulfacoloropiridazina	400	4,7 +/- 0,3	4,8 +/- 0,3	5,7 +/- 0,8	6,2 +/- 0,3
Sulfacoloropiridazina	600	5,2 +/- 0,3	4,3 +/- 0,6	4,0 +/- 0,5	6,8 +/- 0,3
Espectinomicina	500	0,0 +/- 0,0	0,0 +/- 0,0	0,0 +/- 0,0	1,7 +/- 0,5
Espectinomicina	1000	0,0 +/- 0,0	0,0 +/- 0,0	0,0 +/- 0,0	1,0 +/- 0,0
Espectinomicina	2000	0,0 +/- 0,0	0,0 +/- 0,0	0,0 +/- 0,0	1,3 +/- 0,3
Espectinomicina	4000	0,0 +/- 0,0	0,0 +/- 0,0	0,0 +/- 0,0	1,0 +/- 0,0
Espectinomicina	6000	0,0 +/- 0,0	0,0 +/- 0,0	0,0 +/- 0,0	1,3 +/- 0,3
Espectinomicina	8000	0,0 +/- 0,0	0,0 +/- 0,0	0,0 +/- 0,0	1,8 +/- 0,3
Espectinomicina	10000	0,7 +/- 0,3	0,0 +/- 0,0	0,0 +/- 0,0	1,7 +/- 0,3
Espectinomicina	15000	0,0 +/- 0,0	0,0 +/- 0,0	0,0 +/- 0,0	1,2 +/- 0,0
Espectinomicina	20000	0,0 +/- 0,0	0,0 +/- 0,0	0,0 +/- 0,0	1,2 +/- 0,3
Neomicina	500	0,0 +/- 0,0	0,0 +/- 0,0	0,0 +/- 0,0	1,8 +/- 0,8
Neomicina	1000	0,0 +/- 0,0	0,0 +/- 0,0	0,0 +/- 0,0	1,8 +/- 0,3
Neomicina	2000	0,0 +/- 0,0	0,0 +/- 0,0	0,0 +/- 0,0	1,3 +/- 0,3
Neomicina	4000	0,0 +/- 0,0	0,0 +/- 0,0	0,0 +/- 0,0	1,0 +/- 0,0
Neomicina	6000	1,0 +/- 0,0	0,0 +/- 0,0	0,0 +/- 0,0	1,8 +/- 0,6
Neomicina	8000	1,2 +/- 0,3	0,0 +/- 0,0	0,0 +/- 0,0	1,8 +/- 0,3
Neomicina	10000	0,8 +/- 0,3	0,0 +/- 0,0	0,0 +/- 0,0	1,7 +/- 0,3
Neomicina	15000	1,5 +/- 0,5	0,0 +/- 0,0	0,0 +/- 0,0	1,2 +/- 0,3
Neomicina	20000	1,0 +/- 0,0	0,0 +/- 0,0	0,0 +/- 0,0	1,3 +/- 0,6
4-Epioxitetraciclina	25	2,7 +/- 0,8	3,0 +/- 0,9	1,2 +/- 1,3	-
4-Epioxitetraciclina	50	3,8 +/- 1,9	4,5 +/- 0,5	1,0 +/- 1,0	-
4-Epioxitetraciclina	100	5,7 +/- 0,8	2,8 +/- 0,3	1,8 +/- 0,3	-
4-Epioxitetraciclina	200	6,8 +/- 0,6	2,7 +/- 0,6	3,0 +/- 0,9	-
4-Epioxitetraciclina	400	6,2 +/- 0,3	4,2 +/- 0,8	4,5 +/- 0,5	-
4-Epioxitetraciclina	600	5,3 +/- 0,3	4,7 +/- 1,3	3,7 +/- 0,8	-
Oxitetraciclina	25	5,7 +/- 0,6	3,0 +/- 0,9	3,0 +/- 0,5	-
Oxitetraciclina	50	4,8 +/- 0,8	2,7 +/- 1,4	2,3 +/- 1,5	-
Oxitetraciclina	100	5,5 +/- 0,9	2,5 +/- 0,0	2,8 +/- 0,6	-
Oxitetraciclina	200	7,7 +/- 0,8	3,0 +/- 1,0	4,5 +/- 1,5	-
Oxitetraciclina	400	6,3 +/- 0,6	4,0 +/- 0,5	2,8 +/- 1,0	-
Oxitetraciclina	600	4,0 +/- 0,0	3,8 +/- 0,3	3,3 +/- 0,3	-
Tetraciclina	25	-	-	-	7,4 +/- 0,9
Tetraciclina	50	-	-	-	5,8 +/- 1,0
Tetraciclina	100	-	-	-	6,3 +/- 1,0
Tetraciclina	200	-	-	-	4,8 +/- 0,8
Tetraciclina	400	-	-	-	3,7 +/- 0,8
Tetraciclina	600	-	-	-	4,2 +/- 0,6