

Septiembre 2010  
Revisión: Abril 2013

GUÍA TÉCNICA PARA LA CONDUCCIÓN DE ESTUDIOS DE  
METABOLISMO Y CINÉTICA DE RESIDUOS DE AGENTES  
FARMACOLÓGICOS DE USO VETERINARIO EN ANIMALES  
PRODUCTORES DE ALIMENTOS

ESTUDIOS DE ELIMINACIÓN DE RESIDUOS PARA  
ESTABLECER PERÍODOS DE RETIRO DEL MEDICAMENTO  
VETERINARIO



Guía n° 1 - G.F.



## **AUTORES**

Participaron en la confección de la guía miembros de las siguientes instituciones que forman parte del grupo ad hoc de Fármacos Veterinarios de la Fundación PROSAIA:

Aparición según orden alfabético:

### **Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria**

### **Cámara Argentina de la Industria de Productos Veterinarios (CAPROVE):**

### **Cámara de Laboratorios Argentinos Medicinales Veterinarios (CLAMEVET):**

### **Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)**

### **Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA)**

- Dirección de Productos Veterinarios y Alimentos para Animales. Dirección Nacional de Agroquímicos, Productos Veterinarios y Alimentos – SENASA.
- Coordinación de Residuos Químicos de la Dirección de Laboratorio Animal - Dirección General de Laboratorio y Control Técnico – SENASA.

### **Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (UNCPBA):**

- Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Bs. As. – Tandil.

### **Universidad Nacional del Litoral (UNL):**

- Cátedra de Farmacología de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral.
- Laboratorio de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral.

### **Universidad Nacional de La Plata (UNLP)**

- Cátedra de Farmacología, Facultad de Ciencias Veterinarias y Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata.

Coordinación del grupo a cargo del Dr. Javier Pardo (Fundación PROSAIA)

## Tabla de contenidos

Prólogo .....	4
1. Introducción .....	6
1.1 Objetivo de la guía .....	6
1.2 Antecedentes .....	6
2. Alcance.....	6
3. Glosario .....	7
4. Estudios de eliminación del residuo marcador.....	7
4.1. Medicamento veterinario en evaluación .....	9
4.2 Animales y cría de animales.....	9
4.2.1. Estudios intramamarios .....	10
4.2.2. Otros parámetros .....	10
4.3. Número de animales para el estudio .....	10
4.3.1. Rumiantes, porcinos y equinos para estudios de residuos en tejidos .....	10
4.3.2. Animales lecheros para estudios de residuos en leche .....	10
4.3.3. Aves de corral .....	11
4.4. Vía de administración .....	11
4.4.1. Guía general .....	11
4.4.2. Consideraciones para medicamentos veterinarios elaborados para múltiples vías de administración .....	11
4.4.3. Recomendaciones para la aplicación de un medicamento veterinario por aspersion .....	11
4.5. Sacrificio Animal .....	12
4.6. Muestreo .....	12
4.6.1. Consideraciones generales .....	12
4.6.2. Sitios de inyección .....	14
4.6.3. Otras consideraciones .....	15
4.6.4. Muestreo de leche .....	16
4.6.5. Muestreo de huevos .....	16
5. Recomendaciones para los medicamentos veterinarios propuestos para períodos de retiro de 0 días .....	16
6. Estudios de comprobación de período de retiro .....	17
6.1. Criterios para determinar la necesidad de un estudio de residuos o de un estudio de comprobación de período de retiro .....	17
6.2. Interpretación de los resultados del estudio de comprobación de período de retiro ..	17
6.3. Diseño experimental .....	18
7. Método analítico para ensayos de residuos marcadores .....	18

## Prólogo

### ***PROSAIA: La Seguridad Alimentaria y la producción de medicamentos veterinarios.***

“Animales sanos, alimentos sanos, gente sana”.

La Argentina como productora de alimentos de calidad afronta entre otros desafíos el auge de enfermedades infecciosas emergentes y re-emergentes que, debido a los cambios culturales ocurridos en el mundo en los últimos años, se hallan en continua expansión (BSE, Influenza Aviar, Nipah, West Nile Fever, Rift Valley Fever entre otras). Muchas de estas son zoonosis, lo que ha ocasionado cambios muy profundos en los sistemas de garantías exigidos por las autoridades sanitarias, entre las cuales la seguridad sanitaria de los alimentos es un requisito indispensable. Para alcanzar la seguridad alimentaria de los alimentos es necesario, entre otras condiciones, disponer de medicamentos veterinarios de seguridad y pureza probadas que garanticen, junto con su correcta aplicación, que los productos y subproductos obtenidos de los animales se conviertan en alimentos que no sean causantes de enfermedades por la presencia de contaminantes o agentes patógenos, en forma involuntaria -inocuidad- o deliberada -bioterrorismo- y contribuir así a preservar la salud y protección de los consumidores.

Para eso existen principios fundamentales que se deben tener en cuenta en la formulación de los insumos para los animales de abasto incluidos los alimentos y los medicamentos veterinarios. Estos principios incluyen el control de la fuente, la manipulación de los materiales utilizados y el diseño de un sistema de elaboración adecuado que contemple:

#### ***La normativa, recomendaciones y estándares nacionales e internacionales.***

Este es un aspecto primordial que deben cumplir todos los medicamentos veterinarios ya que, de no ser así, se corre el riesgo de que los productos y subproductos obtenidos de los animales tratados queden fuera de los mercados.

#### ***Las Buenas Prácticas de Manufactura.***

“Buenas Prácticas de Manufactura es aquella parte del aseguramiento de la calidad que garantiza que los productos sean consistentemente producidos y controlados de acuerdo a los estándares de calidad apropiados al uso al que están destinados y según lo requiera su autorización de comercialización.” WHO Good Manufacturing Practices for Pharmaceutical Products.

Por lo tanto, mantenerse y desarrollar un negocio competitivo como proveedores de alimentos dentro de este contexto presupone además cumplir con los requisitos implícitos y explícitos que los consumidores demandan. Entre esos requisitos los atributos de inocuidad involucran la aplicación de sistemas de aseguramiento de la calidad tales como Buenas Prácticas Agrícolas, Buenas Prácticas de Manufactura, HACCP, determinación de niveles o ausencia de residuos, de pesticidas, de antibióticos, garantía de que los medicamentos veterinarios utilizados en el control de las enfermedades de los animales cumplen con las normas internacionales.

Dentro de este marco de referencia y en cumplimiento de los objetivos de su creación, PROSAIA convocó a los principales referentes en la materia del organismo regulador SENASA, la Academia y las cámaras representativas a conformar un Grupo Ad-Hoc para

la Redacción y Actualización de Guías, Protocolos y Normativas para el Correcto Desarrollo de Medicamentos Veterinarios, como un aporte para la adecuación a los tiempos que vivimos.

A handwritten signature in black ink on a light pink background. The signature is highly stylized and cursive, appearing to be 'CVG'.

Dr. Carlos Van Gelderen

A handwritten signature in black ink on a light pink background. The signature is cursive and appears to be 'A. Schudel'.

Dr. Alejandro Schudel

## 1. Introducción

Como parte del proceso de aprobación de los medicamentos veterinarios para animales productores de alimentos, las autoridades reguladoras solicitan datos de estudios de eliminación del residuo marcador a fin de establecer períodos de retiro apropiados en productos comestibles, incluidos la carne, la leche, los huevos y la miel. El objetivo de esta guía es dar recomendaciones sobre el diseño de estudios que faciliten la aceptación universal de los datos generados sobre la eliminación de residuos para alcanzar ese requerimiento.

Las recomendaciones generales que se establecen se aplican a la mayoría de las situaciones en las que es necesario determinar un período de restricción de uso. Con todo, es imprescindible que se tenga en cuenta que pueden existir situaciones en las que resulten inadecuadas o inaplicables. En esos casos, la autoridad sanitaria evaluará los diseños específicos que se propongan toda vez que estén debidamente fundamentados.

### 1.1. Objetivo de la guía

El presente trabajo intenta, basándose en antecedentes reconocidos, proponer protocolos para la conducción de estudios de eliminación de residuos para establecer períodos de retiro de medicamentos veterinarios. Éstos protocolos han sido adaptados a las características de la realidad en los países miembros del CAMEVET y podrían ser útiles para otros países.

### 1.2. Antecedentes

VICH GL 48 (November 2009) – Marker Residue Depletion Studies.

EMEA/CVMP/036/95-Final (January 1997). Approach Towards Harmonization of Withdrawal Periods.

## 2. Alcance

Para registrar un medicamento veterinario destinado a animales productores de alimentos, se recomiendan estudios de eliminación del residuo marcador en la especie de destino a fin de:

- demostrar la eliminación del residuo marcador luego del cese del tratamiento farmacológico hasta alcanzar el nivel de seguridad permitido (ej. tolerancia o límite máximo de residuos [LMR]).
- Generar la debida información para establecer períodos de retiro apropiados a fin de asegurar la inocuidad de los alimentos

La idea es que un estudio de eliminación de residuos (por cada especie), llevado a cabo dentro de cualquier región global, sea suficiente para satisfacer los requisitos de información para establecer períodos de retiro apropiados para un medicamento específico para animales productores de alimentos. La guía comprende las especies más comunes, eso es, bovinos, porcinos, ovinos y aves; sin embargo, los principios de esta guía son lo suficientemente flexibles para poder aplicarse a especies relacionadas no mencionadas en este grupo (por ej., ganado vacuno vs. rumiantes en general, pollos vs. aves de corral en general).

En esta guía no se incluyen consideraciones para productos de acuicultura ni apicultura.

Los estudios deben realizarse de acuerdo con los principios aplicables de las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) y Buenas Prácticas Clínicas (BPC).

### 3. Glosario

**Canasta alimenticia estándar:** Es una estimación de la cantidad total de alimento de origen animal que es consumida diariamente por un adulto de 60 kg. La canasta alimenticia básica usa cifras arbitrarias de consumo que se basan en los percentiles superiores de la ingesta diaria de alimentos de origen animal.

Las cifras de consumo diario de alimentos de origen animal son:

Para mamíferos:

300 g de músculo, 50 g de grasa o grasa y piel, 100 g de hígado y 50 g de riñón.

Para aves:

300 g de músculo, 90 g de grasa y piel, 100 g de hígado y 10 g de riñón.

Para peces:

300 g de músculo y piel en proporciones naturales

Se consideran además un consumo de 1,5 l de leche, 100 g de huevos y 20 g de miel.

La estimación del riesgo del consumo de residuos presentes en una canasta alimenticia, se realiza teniendo en cuenta la IDA.

**Principio activo – Agente Farmacológico (del inglés API: Active Pharmacological Ingredient) – Sustancia Farmacológicamente Activa:** Es toda sustancia que puede utilizarse para la curación, mitigación, tratamiento, prevención o diagnóstico de las enfermedades del hombre o de los animales.

**Ingesta Diaria Admisible (IDA):** Es la estimación del residuo, expresado en términos de unidades de peso por kilogramo de peso vivo (kg/pv), que puede ser ingerida diariamente durante toda la vida, sin riesgo apreciable para la salud del consumidor.

**Intervalo de confianza:** Valores entre los cuales se espera hallar con cierto grado de certeza el valor de un parámetro poblacional.

**Límite Máximo de Residuo (LMR):** Es la concentración máxima de residuos presente en los productos y subproductos pecuarios que no implican riesgo para la salud del consumidor, sobre la base de hechos conocidos hasta su recomendación. (Definición Codex)

**Límite de cuantificación (LOQ):** Es la menor concentración de un analito, cuya presencia se puede determinar con un grado específico de exactitud y precisión, dentro de límites estadísticos establecidos.

**Límite de detección (LOD):** Es la menor concentración de un analito que puede detectarse pero no necesariamente cuantificarse en una muestra dentro de límites estadísticos establecidos.

**Límites de tolerancia:** Son los valores extremos de una serie de valores (intervalo) entre los cuales se espera hallar con cierto grado de certeza un determinado porcentaje de los individuos de una población determinada.

**Medicamento veterinario:** toda sustancia química, biológica, biotecnológica o preparación manufacturada (elaborada) que se administra de forma individual o colectiva, directa o mezclada con los alimentos, destinada a la prevención, cura o tratamiento de las enfermedades de los animales.

**Carencia – Período de Resguardo – Restricción de Uso – Período de Retiro – Período de Supresión:** Período de tiempo mínimo que debe transcurrir entre la última aplicación de un medicamento veterinario a un animal, en las condiciones normales de empleo, y la obtención de productos alimenticios de dicho animal, para garantizar que dichos productos alimenticios no contengan residuos en cantidades que superen los límites máximos establecidos.

**Producto Veterinario (definido según CAMEVET):** Se entiende por producto veterinario a toda sustancia química, biológica, biotecnológica o preparación manufacturada cuya administración sea individual o colectiva directamente suministrado o mezclado con los alimentos o agua de bebida, con destino a la prevención, diagnóstico, curación o tratamiento de las enfermedades de los animales incluyendo en ello a aditivos, suplementos, promotores, mejoradores de la producción animal, antisépticos, desinfectantes de uso ambiental o en equipamientos y ectoparasiticidas y todo otro producto que, utilizado en los animales y su hábitat, proteja, restaure o modifique sus funciones orgánicas y biológicas. Comprende además los productos destinados al embellecimiento de los animales.

**Residuo marcador:** Es un analito que es confiable para determinar la presencia de residuos de un determinado principio activo en un tejido. El residuo marcador, puede ser la molécula madre o cualquiera de sus metabolitos, productos de degradación o una combinación de cualquiera de estos. El marcador también puede ser un derivado químico de uno o varios de los componentes del residuo. La relación entre el residuo marcador y la concentración de los residuos de interés en los tejidos comestibles debe ser conocida (residuo marcador/residuos de interés). El LMR refleja entonces la mayor concentración permitida del residuo marcador en los tejidos comestibles.

**Residuo total:** Consiste en la fracción del medicamento original conjuntamente con todos los metabolitos y productos provenientes de este medicamento, que permanecen en el alimento después que el medicamento haya sido suministrado a los animales productores de alimentos.

El total de residuos normalmente incluye todos los residuos relacionados al agente farmacológico (molécula madre junto con sus metabolitos), y en la mayoría de los casos es idéntica a la totalidad de residuos determinada por estudios de eliminación tisular radiométricos.

**Residuos de importancia toxicológica:** Para la estimación de una exposición basada en una IDA toxicológica, el residuo de interés es el residuo de importancia toxicológica. Este incluye normalmente todos los compuestos relacionados con la molécula (molécula madre con los metabolitos) y en la mayoría de los casos es idéntica a la totalidad de residuos determinada por estudios de depleción tisular radiométricos. Sin embargo, si se demuestra que un componente del residuo o una fracción de la totalidad de los residuos es toxicológicamente inactiva, es posible descontar ésta del residuo total o cualquier otra fracción de residuos que no sea biodisponible por vía oral o de metabolitos de los que se sabe que son toxicológicamente inactivos.

**Residuos de interés farmacológico:** Para la estimación de una exposición basada en una IDA farmacológica, el residuo de interés es el residuo de importancia farmacológica. Normalmente se considera a la molécula madre más cualquier otro residuo de la misma. En ausencia de datos sobre actividad farmacológica de los componentes del residuo total, se asume que el total de residuos presentan la misma actividad farmacológica que la molécula madre.

**Residuos de interés microbiológico:** Para la estimación de una exposición basada en una IDA microbiológica, el residuo de interés es el que tiene importancia microbiológica. En la mayoría de los casos este es idéntico a los residuos que se determinan en ensayos microbiológicos. En ausencia de tales datos, puede ser usado el residuo total o alternativamente la suma de los

componentes individuales de los que se conoce que presentan actividad microbiológica. Por lo tanto, se asume que la actividad microbiológica del residuo total o de los metabolitos y/o productos de degradación es igual a la molécula madre.

**Sitio de inyección:** Es un área de tejido en donde el medicamento veterinario ha sido inyectado. Las muestras de tejido obtenidas de los sitios de inyección para la realización de estudios de residuos, deben ser representativas de lo que con probabilidad puede ser seleccionado como tejido comestible en los procedimientos de faena. La muestra de tejidos deberá incluir tejido muscular, tejido conectivo y grasa subcutánea en proporciones naturales (el recorte de las muestras para eliminar el tejido conectivo y la grasa adherida al músculo se consideran procedimientos artificiales que se alejan de la situación real). Los sitios de inyección no deben incluir la porción de piel que recubre al mismo, dado que esta no es requerida para el análisis de los residuos.

**Tejido:** Todo tejido animal comestible, inclusive músculos y subproductos (Definiciones establecidas y adoptadas por el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios - JECFA).

## **4. Estudios de eliminación del residuo marcador**

### **4.1. Medicamento Veterinario en evaluación**

El medicamento veterinario en evaluación utilizado debe ser representativo de la formulación comercial. Preferentemente, debe proceder del material elaborado con el uso de buenas prácticas de manufactura (GMP) (a escala piloto o a escala comercial); sin embargo, las preparaciones a escala de laboratorio debidamente documentadas también son aceptables.

### **4.2. Animales y cría de animales**

En general, se puede realizar un solo estudio de eliminación del residuo marcador (en tejidos) en porcinos, equinos y en aves de corral. En el caso de los rumiantes, se puede aplicar un solo estudio para animales productores de carne y leche. Sin embargo, debido a las diferencias en la fisiología de rumiantes y pre-rumiantes, se recomiendan estudios separados cuando las especies blanco abarcan tanto a adultos como a pre-rumiantes. Se debe llevar a cabo un estudio separado para demostrar el perfil de eliminación de residuos en la leche de animales lecheros o en los huevos producidos por gallinas.

Los animales deben estar sanos y, preferentemente, no deben haber recibido medicamentos antes. Sin embargo, se puede permitir que los animales reciban vacunas y que hayan sido tratados anteriormente con, por ejemplo, antihelmínticos. En ese último caso, se debe observar un período de reposo farmacológico (*wash-out time*), adecuado a la terapia utilizada en el animal antes de que inicie el ensayo actual. Los animales en evaluación deben ser representativos de las razas comerciales y de la población animal blanco que será tratada. La procedencia, el peso, el estado de salud, la edad y el sexo del animal deben informarse.

Se debe dar a los animales el tiempo suficiente para acostumbrarse a las condiciones experimentales, y se deben aplicar, buenas prácticas clínicas. Los alimentos y el agua suministrados a los animales deben estar libres de otros fármacos y/o contaminantes y las condiciones ambientales adecuadas deben estar garantizadas, de acuerdo con las prácticas de bienestar animal.

#### **4.2.1. Estudios intramamarios**

Para los estudios con medicamentos veterinarios que se aplican por vía intramamaria, todos los animales deben tener ubres sanas, libres de los efectos de mastitis. Para los estudios de medicamentos que se usan en terapias de secado o parto, los animales preñados con fecha de parición prevista deben ingresar en las instalaciones donde se llevará a cabo el estudio antes de que éste comience.

#### **4.2.2. Otros parámetros**

En la planificación y realización de los ensayos se deben tener en cuenta todos los factores que puedan contribuir a la variabilidad de los niveles de residuos en los productos de origen animal. La intención es que esos factores (por ej., las razas animales, la madurez física) se consideren sin necesidad de incrementar el número de animales recomendado en 4.3. Por ejemplo, si un estudio de eliminación de residuos en leche recomienda 20 animales, todo factor que determine variabilidad debe estar representado en los 20 animales seleccionados inicialmente (no se agregarán 20 animales más que representen “otros factores”).

#### **4.3. Número de animales para el estudio**

La cantidad de animales empleados debe ser lo suficientemente numerosa para permitir una evaluación estadísticamente significativa de los datos. Desde un punto de vista estadístico, se recomienda, para estudios de residuos en carne, reunir datos de un mínimo de 16 animales: 4 animales sacrificados en 4 intervalos de tiempo apropiadamente distribuidos. Se puede considerar un número mayor de animales si se anticipa que la variabilidad biológica será sustancial, ya que el incremento en la cantidad puede contribuir a determinar con mayor precisión el período de retiro. No se requieren necesariamente animales control (no tratados) como parte del estudio de eliminación del residuo marcador; sin embargo, se debe disponer de una cantidad suficiente de tejidos blanco para la preparación de patrones en la evaluación de métodos analíticos relacionados. La siguiente sección da recomendaciones generales sobre el número de animales que se deben incluir en el diseño del estudio.

##### **4.3.1. Rumiantes, porcinos y equinos para estudios de residuos en tejidos**

Se recomiendan por lo menos 4 (aproximadamente la mitad de cada sexo) para cada tiempo de faena. El peso corporal debe ser acorde a la categoría para la cual está indicado el medicamento veterinario. Según lo expuesto en la sección 4.2, las vacas lecheras también pueden ser utilizadas para estos estudios de residuos en tejidos.

##### **4.3.2. Animales lecheros para estudios de residuos en leche**

Para los estudios con animales en lactación, se recomienda el empleo de, por lo menos, 20 animales, seleccionados al azar de un rodeo en el que todas las etapas de la lactación estén representadas. Se deben incluir animales con alta producción al inicio de la lactancia y animales con baja producción al final de la lactancia.

Para los estudios de secado y terapia parto se recomienda un mínimo de 20 animales. El estudio debe incluir vacas seleccionadas al azar, representativas de las prácticas lecheras comerciales.

##### **4.3.3. Aves de corral**

Se debe utilizar un número suficiente de aves para obtener, por lo menos, 6 muestras en cada tiempo de faena para los estudios de residuos en tejidos.

Para los estudios de residuos en huevos, se debe emplear un número suficiente de aves para recolectar, al menos, 10 o más huevos en cada punto del intervalo de tiempo.

#### **4.4. Vía de Administración**

##### **4.4.1. Guía general**

El tratamiento de animales debe realizarse de acuerdo con la dosis y las indicaciones que se le desea asignar al medicamento veterinario en proceso de aprobación y debe incluir, en los productos inyectables, el sitio y el método de inyección. En los tratamientos múltiples, las inyecciones deben aplicarse alternativamente en el lado izquierdo y derecho del animal.

La dosis debe ser la máxima concentración prevista de tratamiento y debe administrarse durante la máxima duración prevista. Para tratamientos prolongados que incluyen varias dosificaciones, si se dispone de datos que indiquen que la concentración del principio activo (API) alcanza un estado estacionario (momento en el cual la concentración del principio activo en el tejido blanco no aumenta ni disminuye, porque su velocidad de absorción es igual a su velocidad de eliminación) antes del final del tratamiento, el muestreo puede comenzar a partir de ese momento. Los medicamentos veterinarios de administración intramamaria deben aplicarse en los cuatro cuartos de cada vaca.

Para los estudios de secado y parto el medicamento veterinario en evaluación debe administrarse luego del último ordeño (secado) y respetando el intervalo hasta el nacimiento del ternero (usualmente 60 días).

##### **4.4.2. Consideraciones para medicamentos veterinarios elaborados para múltiples vías de administración**

Si el medicamento veterinario fue elaborado para ser administrado a través de más de una vía parenteral inyectable (intramuscular, subcutánea o intravenosa), se debe presentar un estudio de eliminación del residuo marcador por separado para cada vía. *[Nota: Si el período de retiro se define claramente por la eliminación de residuos del sitio de inyección luego de la dosis SC (subcutánea) o IM (intramuscular), no sería necesario presentar un estudio por separado de residuos intravenosos (a la misma dosis), siempre y cuando se pueda aplicar para la vía IV el mismo período de retiro que se aplicó para la vía IM o SC].*

##### **4.4.3. Recomendaciones para la aplicación de un medicamento veterinario por aspersión:**

Los productos que se aplican por aspersión son ampliamente utilizados en muchos de los países miembros para el tratamiento de ectoparásitos. La estandarización de la dosificación es un requisito crítico y debe realizarse previamente a un estudio de residuos. Con este fin se recomienda el siguiente esquema:

- a- Se deberá cargar el equipo de aspersión con una cantidad previamente medida del medicamento veterinario preparado y listo para su aplicación
- b- Luego de cargada la mochila o equipo de aspersión se deberá purgar el sistema.
- c- Comenzar la aspersión por la parte dorsal del animal y desde la cabeza hacia la cola para luego volver nuevamente hacia craneal por la zona baja contigua, describiendo de esta manera un recorrido que asegure un correcto mojado del animal. Esto se deberá realizar en ambos lados del animal hasta el punto de goteo y siempre evitando aplicar producto en los ojos del animal. El punto de goteo es un indicador de que el animal ha sido correctamente mojado, y que a partir de ahí todo el producto que se aplique no quedara

sobre el animal y por lo tanto escurrirá hacia al piso. Este es el parámetro que normalmente se utiliza para tratar animales en condiciones de campo, y uno de los más apropiados para acotar las variables de dosificación que este tipo de aplicaciones tiene.

- d- De ser factible una vez finalizada la aplicación se deberá recolectar en un vaso graduado el producto remanente del equipo de aspersión para calcular el volumen aplicado. Este dato, deberá ser registrado en el “registro de tratamiento” .

$$\text{Volumen cargado} - \text{Volumen remanente} = \text{Volumen aplicado}$$

Volumen aplicado se deberá correlacionar con el peso del animal para conocer de forma certera la dosis aplicada por animal en términos de miligramos totales y miligramos por kilogramo.

#### 4.5. Sacrificio animal

Los animales deben sacrificarse siguiendo las normativas de bienestar animal recomendadas por la OIE, empleando de ser posible procedimientos aplicables comercialmente, asegurándose de cumplir con los tiempos de desangrado establecidos. Se debe evitar la muerte con productos químicos.

#### 4.6. Muestreo

##### 4.6.1. Consideraciones Generales

Luego del sacrificio, se deben recolectar suficientes muestras de tejido comestible, recortar el tejido superfluo, pesar y dividir en porciones. Si el análisis no puede completarse inmediatamente, las muestras deben almacenarse adecuadamente a la espera del análisis. Si las muestras se almacenan luego de la recolección, se debe demostrar la estabilidad del residuo durante el tiempo de evaluación.

La Tabla 1 indica las muestras que se recomienda sean recolectadas en el sacrificio.

**Tabla 1. Recolección de muestras de animales en un estudio de eliminación del residuo marcador (Todas las regiones)**

Tipo de tejido comestible	Descripción de la muestra por especie	
	Bovinos / Ovinos / Porcinos / Equinos	Aves de corral
Músculo	Músculo de la región lumbar	Pechuga
Sitio de inyección	Centro de tejido muscular ~0,5 kg. 10 cm diámetro x 6 cm de profundidad para IM; 15 cm diámetro x 2,5 cm de profundidad para SC	---

Hígado	Sección transversal de lóbulos	Entero
Riñón	Compuesta de ambos riñones	Compuesta de ambos riñones
Grasa (excluyendo porcinos)	Omental y/o perirrenal	---
Piel (porcinos y aves)	Piel con grasa en proporciones naturales	Músculo con piel en proporciones naturales
Leche (ovinos y bovinos)	Leche entera	---
Huevos	---	Limpiar la cáscara, romper el huevo, la clara y la yema se pueden combinar

Los tejidos que se muestran en la [Tabla 1](#) se deben analizar para el registro en todas las regiones. Sin embargo, la guía del VICH para llevar a cabo “Estudios de metabolismo para determinar la cantidad e identificar la naturaleza de los residuos” recomienda la recolección de tejidos adicionales para cuantificar los residuos totales a fin de responder a las preocupaciones regionales específicas. Los tejidos adicionales sugeridos para las muestras se presentan en la [Tabla 2](#).

**Tabla 2. Tejidos adicionales que se deben recolectar para responder a las preocupaciones regionales en el estudio de eliminación del residuo marcador.**

Tipo de tejido comestible	Descripción de las muestra por especie		
	Bovinos / Ovinos / Porcinos / Equinos	Aves de corral	
Estómago muscular	---	Entero	
Corazón	Sección transversal	Entero	
Intestino Delgado	Compuesto, enjuagado de contenido	---	

Otros órganos	Compuesto	Compuesto	
---------------	-----------	-----------	--

En caso de considerarse necesario, a los fines de esta guía, se seleccionará uno de los tejidos adicionales (por especie) para evaluar el residuo marcador y responder a las preocupaciones regionales. El tejido adicional elegido se basa en los resultados del estudio de residuo total (TTR, por su sigla en inglés) y típicamente es el tejido adicional con mayor concentración de residuos o con la menor tasa de eliminación de residuos. Por ejemplo, si el estudio TTR indica que el corazón de los bovinos tiene la tasa de eliminación más baja, ese tejido adicional será seleccionado para la evaluación en el estudio del residuo marcador, pero no hará falta generar datos sobre el residuo marcador del intestino delgado. De igual modo, si el estómago muscular de las aves de corral contienen la mayor concentración de residuos, no se recomienda el análisis del corazón de las aves.

#### 4.6.2. Sitios de inyección

Para preparaciones parenterales (IM o SC), se deben incluir los datos sobre la eliminación de residuos del sitio (o los sitios) de inyección. Las muestras se deben recolectar del último sitio de inyección. En el caso de productos que requieren múltiples inyecciones, el estudio debe estar diseñado de modo tal que el último sitio de inyección sea del lado en el que el animal recibió el mayor número de inyecciones. Se recomienda mantener una distancia mínima de 10 centímetros entre sitios de inyección con el propósito de obtener una mejor calidad de muestra. La extracción de muestras del tejido muscular del sitio de inyección (de los animales grandes) debe centrarse en el punto de inyección y de acuerdo con las recomendaciones de la Tabla 1.

Durante la realización del estudio de residuos, el sitio de inyección deberá estar permanentemente marcado, de manera que éste pueda ser fácil y correctamente identificado al momento del sacrificio. El medicamento veterinario deberá ser administrado en el centro del tejido subyacente y el sitio de inyección deberá ser extraído inmediatamente luego del sacrificio.

La técnica de recolección debe ser tal que incluya, cuando sea posible: el trayecto de la aguja, el área en la que se liberó el fármaco y cualquier área en la que haya reacción tisular.

Con el objeto de asegurar que el método de muestreo descrito ha sido adecuado para representar la concentración de residuos, se recomienda cuando sea posible, tomar de cada sitio de inyección una muestra control de aproximadamente 300 g en forma de anillo concéntrico a la muestra primaria.

La recolección de un círculo adicional o una muestra del lugar que rodea el sitio de inyección durante la realización de estudios de eliminación de residuos tisulares se requieren en la UE, pero generalmente no en otras regiones.

Se reconoce que no siempre es posible obtener esta segunda muestra, particularmente en las inyecciones realizadas en la región del cuello, por lo tanto el tamaño de la muestra de tejido de la región periférica a la muestra primaria puede reducirse tanto como sea posible. Es necesario sin embargo, que esta muestra presente un tamaño que permita su procesamiento analítico.

En los productos inyectables donde la dosis aplicada supere el volumen recomendado por sitio de aplicación, la inyección se deberá realizar en más de un sitio (ej: Dosis IM o SC de 1 mL/10 kg para un animal de 360 Kg donde el volumen máximo recomendado es de 20 mL). En estos

casos la muestra de sitio de inyección se deberá realizar del sitio inyectado que recibió el mayor volumen (el sitio donde se inyectó 20 mL y no el del segundo sitio con 16 mL).

En la práctica, la obtención de muestras con el peso exacto al propuesto es difícil de realizar, por lo tanto se acepta que el peso real puede variar dentro de ciertos límites respecto del peso teórico propuesto. Se considera que son aceptables las muestras del centro del sitio de inyección (muestra primaria) que presenten un peso que fluctúe entre 400 g a 600 g ( $500 \text{ g} \pm 20\%$ ).

Seguidamente a la remoción del tejido, las muestras del sitio de inyección colectadas (centro y periferia) deberán ser apropiadamente homogeneizadas antes de realizar el muestreo final (300 g) para la determinación de los residuos, y así evitar el procesamiento analítico de un material potencialmente no homogéneo.

Las dimensiones y los pesos de las muestras de los tejidos en el sitio de inyección propuestas no pueden ser aplicadas en animales de pequeña talla, en donde el tamaño y la anatomía de los mismos no permiten tomar una muestra de 500 g.

Aquí no puede aplicarse una estrategia general, sino que esta debe ser diseñada caso por caso y la técnica de muestreo elegida y el peso del tejido a analizar deberán ser convenientemente justificados. En este caso, también deberá en la medida de lo posible, tomarse una muestra de tejido periférico al sitio de inyección para corroborar la confiabilidad del método analítico utilizado.

Deberá tenerse en cuenta que la concentración de residuos determinada a partir de muestras obtenidas en animales de pequeña talla o muestras de tejido con un peso y tamaño menor al propuesto en esta guía, deberán ser usadas sin ningún tipo de corrección o dilución para el cálculo del tiempo de retiro.

#### **4.6.3. Otras consideraciones**

- Para las formulaciones que pueden dejar residuos locales, como los medicamentos veterinarios de aplicación tópica por derrame (pour on), se deben recoger muestras de tejidos relevantes (por ej., músculos, grasa subcutánea o piel/grasa del lugar de aplicación) para el análisis (además de las muestras especificadas en la Tabla 1).
- Para mayor claridad, si uno o más tejidos se analiza como tejido compuesto, como piel más grasa en proporciones naturales (porcinos y aves), no hace falta analizar muestras de piel y grasa por separado.
- Las muestras de músculos se pueden obtener de los músculos esqueléticos que incluyan grasa intramuscular en proporciones naturales.
- Se recomienda recoger sólo un tipo de muestra de grasa (omental para rumiantes y equinos) o de piel con grasa (porcinos y aves de corral).

#### **4.6.4. Muestreo de leche**

Las muestras de leche se deben extraer de todos los animales incluidos en el ensayo. La extracción debe realizarse en cada ordeño, espaciados por intervalos iguales (aproximadamente 12 hs.). Las muestras de cada animal estarán compuestas por leche de los cuatro cuartos. Cuando el tratamiento esté compuesto por varias dosificaciones, las muestras se deben tomar luego de la última dosificación, excepto cuando pueden calificar para períodos de retiro de 0 días, en cuyo caso las muestras también se deben recoger durante el tratamiento. No existe un número estándar de tiempos de muestreo. La recolección de leche debe continuar hasta que los residuos estén por debajo del punto de referencia apropiado (por ej., LMR, tolerancia, límite de cuantificación, etc.) según se determina en las propiedades químicas del principio activo.

Si bien se encuentra fuera del alcance de esta guía, al patrocinador del estudio se le puede solicitar que realice el estudio de residuos en los tejidos de los terneros que se alimentaron de leche (incluido el calostro) de los animales adultos tratados (por ej., las madres), si esos animales serán destinados al consumo humano.

#### **4.6.5. Muestreo de huevos**

Las muestras de huevos se deben obtener de 10 o más gallinas ponedoras en cada momento en que ponen huevos durante el período de medicación y luego de la última medicación. Las muestras deben recogerse luego del tiempo necesario para que se complete el desarrollo de la yema del huevo, que es de 12 días. La clara y la yema del huevo se pueden combinar para el análisis.

### **5. Recomendaciones para los medicamentos veterinarios propuestos para períodos de retiro de 0 días (Estudios de un solo punto temporal)**

Para los medicamentos veterinarios administrados en una o varias dosificaciones (por ej. diariamente de 3 a 5 días) o para aquellos de uso continuo en los que los residuos han alcanzado un estado estacionario, un estudio de un solo punto temporal es suficiente para determinar el período de retiro de 0 días, siempre y cuando las características de eliminación de residuos totales del fármaco hayan sido descritas adecuadamente. Si esos datos están disponibles, se recomienda la realización de un estudio de un solo punto temporal con el menor número especificado de animales para confirmar la aceptabilidad del período de retiro de 0 días.

- Aves de corral: 12 aves
- Rumiantes y porcinos: 6 animales
- Leche: 10 animales

El momento elegido para el sacrificio para este estudio debe determinarse de acuerdo con las concentraciones máximas observadas durante el estudio de eliminación de residuos totales, un tiempo de transporte mínimo (por ej., no menor de 3 hs.) y un tiempo máximo que siga calificando para tiempo de retiro de 0 días (por ej.,  $\leq 12$  hr).

El número incrementado en comparación con el recomendado en la Sección 4.3 se justifica para un solo punto temporal. Sin embargo, para hembras en producción de leche para consumo o industrialización, se recomienda un mínimo de 10 animales, ya que esa cantidad es suficiente para definir la concentración de leche en un solo punto temporal (0 días). Las concentraciones

del principio activo que se mantienen por debajo del punto de referencia apropiado (por ej, LMR, tolerancia) se considerarán para el establecimiento de un tiempo de retiro de 0 días.

Mientras que el establecimiento de un tiempo de retiro de 0 días es posible, basándose en un protocolo de muestra de un sólo punto de muestreo (por ej. 12 horas), se recomienda que se recolecten muestras adicionales (por ej. 1-4 ordeños) para una evaluación exhaustiva del perfil de residuos, en caso de no contar con dicha información. Dado que los estudios de leche no requieren el sacrificio final para la recolección de muestras, esta recomendación debe seguirse sin excepciones.

En el caso de gallinas en producción de huevos, podrá establecerse un tiempo de retiro de cero días a partir de la obtención de muestras consecutivas por debajo del punto de referencia (Límite Máximo de Residuos o tolerancia) durante los 12 días de la etapa de recolección de huevos para su análisis, dadas las condiciones fisiológicas del proceso de ovogénesis.

## **6. Estudios de comprobación de periodo de retiro.**

La prueba en un único punto de comprobación, es una prueba especial que tiene validez técnica pero circunscrita a la comparación de los resultados de la eliminación de residuos con un medicamento veterinario ampliamente conocido y utilizado en la práctica veterinaria y del cual han sido previamente registradas formulaciones semejantes en el país donde se presenta. En este estudio se utilizan menos animales y el resultado solo indica si puede aplicarse la misma restricción de uso o no. Esta prueba hace sólo una cosa: indica si los residuos están iguales o por debajo del LMR permitido en el punto (en el tiempo) que se ha seleccionado para la prueba. Prácticamente no calcula el periodo de retiro, pero si confirma un periodo específico de retiro comparado con el del medicamento veterinario ya conocido.

### **6.1. Criterios para determinar la necesidad de un estudio de residuos o de un estudio de comprobación de periodo de retiro**

Cada autoridad regulatoria definirá los criterios que determinarán la posibilidad de recurrir a un estudio de comprobación de período de retiro dependiendo del tipo de producto (genérico o similar) de que se trate y del(los) principio(s) activo(s) presente(s).

### **6.2. Interpretación de los resultados del estudio de comprobación de periodo de retiro**

- Si el estudio demuestra que los residuos del medicamento veterinario sometido a ensayo están por debajo del LMR, la comprobación es aceptada.
- Si el estudio demuestra lo contrario, es decir, que los residuos están por encima del LMR entonces la prueba no se acepta, y no se puede utilizar el periodo establecido por el producto de referencia, y debe realizarse un estudio completo de eliminación de residuos.

### 6.3. Diseño experimental

Se debe detallar la especie, edad, raza, línea genéticas, sexo y origen de los animales utilizados. La prueba deberá realizarse con el número mínimo de animales que se detalla en la tabla que sigue:

<b>Especie animal/producto</b>	<b>Estado productivo</b>	<b>Número mínimo</b>
Rumiantes/porcinos	Cualquier	6
Vacas lecheras	Lactación/secado/pre-parto	10
Aves	Cualquier	10
Conejos/cuyes	Cualquier	10
Huevos	---	12

El ensayo deberá cumplir con las indicaciones que constan en los puntos 4.2; 4.4; 4.5 de la presente guía. Para el muestreo (punto 4.6.) solamente será necesario procesar muestras del tejido blanco, entendiéndose por tejido blanco aquél que en estudios previos ha sido el que se utilizó para determinar el período de restricción de uso.

### 7. Método analítico para ensayos de residuos marcadores

El patrocinador del estudio se responsabiliza por la presentación de métodos analíticos validados para la determinación del residuo marcador en muestras generadas en los estudios de eliminación de residuos en los tejidos comestibles y, cuando fuera necesario, en leche, huevos y miel. El/Los método(s) deben ser capaces de determinar con fiabilidad las concentraciones del residuo marcador que abarca el punto de referencia apropiado (eso es, LMR /tolerancia) para los respectivos tejidos o productos. (Ver: Guía de Recomendaciones para Validación de Métodos Analíticos).

---

**Fecha de vigencia**

**Periodicidad de revisión**

5 años