



# Universidad Abierta y a Distancia de México

División de Investigación y Postgrado  
Maestría en Seguridad Alimentaria

***“Incidencia de fluoroquinolonas en huevos producidos en  
Costa Rica, avanzando en seguridad alimentaria.”***

## **Tesina Monográfica**

Que para obtener el grado de Maestra en Seguridad Alimentaria

### **Presenta:**

Wendy Barrantes Chaverri

### **Asesor:**

Eber Quintana Obregón

Costa Rica, Junio 2019

## **DEDICATORIA**

*A Mario, Lucy y JuanPa por siempre motivarme, acompañarme y apoyarme para  
atrapar mis sueños.....*

*No hay nada más maravilloso que ser un científico, en ninguna parte preferiría estar  
más que en mi laboratorio, manchando mi ropa y cobrando por jugar. **Marie Curie***

## **AGRADECIMIENTOS**

*A JLRM, Don José, que no sólo me orientó y animó en este proyecto, sino que además me enseñó cosas muy importantes, tanto a nivel profesional como personal y me continúa apoyando siempre incondicionalmente. Gracias por todo!!!*

Al Servicio Nacional de Salud Animal y al Laboratorio Nacional de Servicios Veterinarios la oportunidad y confianza de desarrollar este proyecto, así como el financiamiento de los gastos de recolección y análisis de las muestras analizadas.

A mi tutor y a los lectores toda la colaboración brindada para poder obtener este documento final.

A la UnADM por los conocimientos brindados y la oportunidad de ser parte de esta primera generación de Maestros en Seguridad Alimentaria.

## Índice de contenidos

Resumen.....	1
1. Introducción .....	1
2. Marco contextual.....	3
2.1 Hipótesis.....	6
2.2 Objetivos del proyecto .....	7
2.3 Preguntas de investigación.....	7
3. Marco referencial .....	9
3.1 Producción de huevos y su valor nutricional .....	9
3.2 Contexto internacional.....	13
3.3 Situación en Costa Rica .....	15
4. Marco teórico .....	16
4.1 Costa Rica, inocuidad de alimentos .....	16
4.2 Resistencia a los antibióticos .....	17
4.3 Las fluoroquinolonas (FQ).....	18
4.3.1 Resistencia a las Fluoroquinolonas.....	20
4.4 Normativas nacionales e internacionales para residuos de medicamentos .....	21
4.5 Proyecciones.....	24
5. Marco metodológico.....	25
5.1 Línea de investigación.....	25
5.2 Tipo de estudio .....	25
5.3 Descripción de población y muestra de estudio .....	26
5.4 Instrumentos y técnicas para la recolección de los datos .....	30
5.4.1 Metodología analítica para la cuantificación de los analitos.....	30

5.5 Tabulación, presentación y análisis de datos .....	37
5. Análisis y resultados .....	38
6.1 Ubicación y sitios de muestreo.....	38
6.2 Curvas de calibración.....	38
6.3 Límites de detección y cuantificación .....	42
6.4 Concentraciones cuantificadas de fluoroquinolonas en las muestras analizadas	43
6.5 Ubicación geográfica de las muestras positivas.....	45
6.6 Muestras detectadas con residuos.....	46
6.7 Encuesta a consumidores de huevo .....	47
7. Conclusiones y recomendaciones .....	51
7.1 Conclusiones.....	51
7.2 Recomendaciones.....	53
8. Fuentes de consulta.....	54
9. ANEXOS .....	54
Anexo 1: Límites máximos de residuos para Costa Rica .....	63
Anexo 2: Apéndice A del documento “Directrices para el diseño y la implementación de programas nacionales reglamentarios de aseguramiento de inocuidad alimentaria relacionados con el uso de medicamentos veterinarios en los animales destinados a la producción CAC/GL 71-2009/adaptado en 2015. ....	64
Anexo 3: Encuesta para consumidores de huevo .....	65
10. Abreviaturas.....	66

## Índice de figuras

Figura 1. Cantidad de gallinas ponedoras y granjas según su tipo, en Costa Rica en el 2014. ....	11
Figura 2. Estructura química de la ciprofloxacina. ....	19
Figura 3. Estructura química de la enrofloxacin.....	19
Figura 4. Estructura química de la sarafloxacin.....	20
Figura 5. Sitios de muestreo de huevos en Costa Rica, año 2016. ....	28
Figura 6. Curva de calibración para enrofloxacin. ....	40
Figura 7. Curva de calibración para ciprofloxacina.....	41
Figura 8. Curva de calibración para sarafloxacin.....	42
Figura 9. Ubicación geográfica de las muestras positivas de huevo. ....	46
Figura 10. Muestras detectadas con residuos de FQ.....	47
Figura 11. Resultados de la encuesta a consumidores de huevo en Costa Rica .....	50

## Índice de cuadros

Cuadro 1. Clasificación de las granjas. ....	11
Cuadro 2. Composición nutricional y vitamínica del huevo.....	12
Cuadro 3. Límites Máximos de Residuos legislados en Costa Rica, para medicamentos veterinarios que contienen enrofloxacin y sarafloxacin ..... 23	23
Cuadro 4. Estándares analíticos de fluoroquinolonas, marca SIGMA-ALDRICH, para la preparación de las soluciones de trabajo del método.....	31
Cuadro 5. Volúmenes de las disoluciones madre de fluoroquinolonas utilizados para preparar la mezcla de trabajo de FQ a una concentración final de 2000 µg/L para fortificar los controles y las curvas de calibración. ....	32
Cuadro 6. Volúmenes de mezcla de trabajo (MT) y de mezcla de estándares internos (ISTD) a adicionar a cada punto de la curva de calibración y a la muestra control .....	33
Cuadro 7. Concentraciones finales de los puntos de la curva de calibración .....	33
Cuadro 8. Condiciones del inyector. Temperatura de la columna 35 °C. ....	34
Cuadro 9. Condiciones de la bomba del HPLC.. ....	34
Cuadro 10. Parámetros del espectrómetro de masas QQQ. Modo MRM .....	35
Cuadro 11. Criterios de aceptación según concentración para las muestras control. ...	36
Cuadro 12. Concentraciones de analito cuantificadas y detectadas en las muestras....	44

## Resumen

Barrantes, W. (2019). *Diagnóstico de fluoroquinolonas en huevos producidos en Costa Rica, avanzando en seguridad alimentaria* (tesis de maestría). Universidad Abierta y a Distancia de México.

Tutor de tesis: *Eber Quintana Obregón, PHD*

### Summary

The objectives were to diagnose the prevalence of enrofloxacin, ciprofloxacin and sarafloxacin residues, classified as critically important antimicrobials (FAO, WHO, & OIE, 2007), in chicken eggs produced in Costa Rica to propose policies on the use of antimicrobial drugs in animals and to progress nationally on the issue of antimicrobial resistance.

The methodology consisted in analyzing sixty three egg samples taken around the country through a confirmatory technique by LC-MS/MS, and applying a questionnaire for national egg consumers. The quantity of samples collected was determined based on CODEX regulations CAC / GL 71-2009 (Codex Alimentarius, 2014).

Enrofloxacin and ciprofloxacin were quantified in ten samples and some concentrations were detected in eight others. Although the majority of samples were taken in the western central region, the positive samples are in five different provinces, which suggests that producers use those antibiotics nationally, although its use is prohibited. The survey conducted on three hundred and twenty seven people reveals that 97% consume eggs in their usual diet, the class of eggs that are consumed the most are the regular ones. The 96% of the respondents consider important that in Costa Rica a monitoring of antibiotic residues be carried out in this food and that it is important to have access to that information. Only 4% of the population consulted does not want to know about this.

The study shows that there is an inadequate use of veterinary drugs containing enrofloxacin as an active ingredient. It also confirms the need to create regulatory policies in this regard and to improve the education and communication with producers and national consumers.

## 1. Introducción

En los alimentos se puede encontrar gran variedad de sustancias tóxicas como antibióticos, plaguicidas y toxinas, razón por la cual hoy en día la inocuidad alimentaria es una de las mayores preocupaciones a nivel mundial para las organizaciones encargadas de la salud (González et al., 2007).

La utilización de medicamentos veterinarios en los procesos de producción de alimentos de origen animal para consumo humano, es necesaria, ya que estos ayudan a controlar las infecciones bacterianas de los animales y a preservar su salud y crecimiento (González et al., 2007). Sin embargo, su uso puede provocar la aparición de residuos en diferentes productos comestibles de los animales medicados, lo cual representa un riesgo potencial para la salud de los humanos y la aparición de organismos resistentes a los antibióticos (ORAs) (Junza, 2016).

Dentro de los medicamentos veterinarios que se utilizan en los procesos de producción de alimentos, los antibióticos son de los más frecuentes. Estos se aplican en dosis terapéuticas para curar infecciones y a concentraciones mucho más bajas, para prevenirlas, como profilácticos o como promotores del crecimiento para acelerar la ganancia de peso y mejorar los índices de transformación de alimentos (Talero et al., 2014).

Las quinolonas son una familia de antibióticos a la cual pertenecen las fluoroquinolonas (FQ); estas últimas se utilizan en el tratamiento de infecciones tanto en humanos como en animales. Dentro del grupo de las FQ, la sarafloxacin, la enrofloxacin y su metabolito la ciprofloxacina son usadas tanto en medicina veterinaria como humana para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias del género *Campylobacter*, asociadas a la gastroenteritis bacteriana (Wieczorek & Osek, 2013). No obstante, durante las últimas décadas, un número progresivo de aislamientos de cepas de *Campylobacter* ha presentado resistencia a las FQ y otros antimicrobianos (González, et al., 2013), lo cual se atribuye, en parte, al uso de estos antibióticos en la medicina veterinaria (Máttar et al., 2009).

Un uso frecuente que se les da a las FQ en la producción de alimentos es como promotores del crecimiento, debido a que tienen la capacidad de incrementar el peso de los animales en una proporción cercana al 5% (Hernández et al., 2017), razón por la que según Wieczorek & Osek (2013), en la medicina veterinaria, varios estudios relacionan el uso de las FQ con la llegada y difusión de la resistencia entre cepas de *Campylobacter* spp., las cuales muestran un alto porcentaje de resistencia a la ciprofloxacina en poblaciones estudiadas en Canadá y en Chile (Weiler et al., 2017).

A nivel mundial, las FQ son empleadas en áreas como la producción avícola, cerdos y ganado bovino, así como en procesos de acuicultura (Barrientos, 2006). Resulta, por tanto, de suma importancia mantener una vigilancia constante sobre los alimentos que se consumen a nivel nacional, con el fin de proteger la salud del consumidor. A su vez, es necesario cumplir con requisitos nacionales e internacionales de comercio y verificar el cumplimiento de los Límites Máximos de Residuos (LMR) establecidos para las FQ por el *Codex Alimentarius*, organización que se encarga de proteger la salud de los consumidores, facilitar prácticas justas en el comercio de alimentos y promover la coordinación de normas alimentarias acordadas por diversas organizaciones (Lozano & Arias, 2008).

A raíz de esta situación, surge la necesidad de realizar un estudio exploratorio que permita al Servicio Nacional de Salud Animal (SENASA) conocer si se siguen en Costa Rica las buenas prácticas de producción en este campo y si se están cumpliendo las normativas de buenas prácticas veterinarias respecto al uso adecuado y prudente de los antibióticos en la producción de huevos.

Este seguimiento se logró realizar mediante el análisis de 63 muestras de huevo tomadas al azar entre las granjas productoras a nivel nacional durante los meses de agosto a diciembre del año 2016. Se utilizó una metodología analítica validada capaz de detectar, identificar y cuantificar FQ a niveles de concentración del orden de  $\mu\text{g}/\text{kg}$  en alimentos de origen animal, la cual permita garantizar los resultados obtenidos de cuantificación y cumplimiento de los LMR establecidos para las FQ en esta matriz (Junza, 2016; González et al., 2007).

## 2. Marco contextual

La seguridad alimentaria, la inocuidad de los alimentos y la nutrición están íntimamente relacionadas. La inocuidad de los alimentos comprende acciones enfocadas a garantizar la máxima seguridad del producto, el acceso a alimentos inocuos y nutritivos en cantidad suficiente es fundamental para mantener la vida y fomentar la buena salud (OMS, 2015b).

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) constituyen una importante causa de morbilidad y mortalidad, así como un significativo impedimento al desarrollo socioeconómico en todo el mundo (OMS, 2015a). El crecimiento de la población mundial, la intensificación e industrialización de la agricultura y la producción ganadera para satisfacer la creciente demanda de alimentos, proyectan oportunidades y dificultades para la inocuidad de los alimentos.

A nivel mundial uno de los sectores productivos más afectado por las ETA es el avícola (Olaya et al., 2010). Entre las amenazas más relevantes que éste enfrenta se encuentran las enfermedades infecciosas y virales, las cuales actúan solas o en conjunto con otros microorganismos, generando diferentes cuadros de enfermedad al igual que diversos tipos de consecuencias económicas en el sistema productivo (Santander, 2015).

Costa Rica, por su parte, cuenta con una población de aves de corral, destinadas a la producción avícola en huevos, de 18 589 455, (Censo Agropecuario, 2014). Dichas granjas están ubicadas principalmente en la provincia de Alajuela, y producen entre 2,5 y 2,6 millones de huevos al día en condiciones normales de producción (INEC, 2014). La mayoría de éstas se encuentran en los cantones de Alajuela, San Ramón y San Carlos, de la provincia de Alajuela, donde se concentra el 54,7% de los animales de este tipo, posicionando a esta provincia como la de mayor producción con el 80,7% de las aves, seguida por Puntarenas con el 6,1%.

El consumo *per cápita de huevos*, se incrementó de 190 unidades en el 2012 a 202 unidades al año 2014 (Barquero, 2014). Este alimento está incluido en la canasta básica alimentaria (CBA) costarricense, formando parte importante de la alimentación a nivel nacional (Secretaría Ejecutiva de Planificación Sectorial Agropecuaria, 2014).

La producción de huevos, como se señala en “*Diagnóstico general sobre la situación de inocuidad de alimentos en Costa Rica*” (Saéñz, 2001), plantea una situación caracterizada por la alta densidad de población, alimentación a base de concentrados, acumulación de materia fecal y necesidad de rápido crecimiento de los animales. Por tanto, la producción avícola representa un ambiente más que apropiado para la transmisión endémica de enfermedades aviares, por esta razón es habitual el uso de antibióticos para tratar enfermedades en las aves ponedoras de huevos; aunque algunos de ellos estén contraindicados para su uso en estos animales.

El uso de medicamentos veterinarios es esencial durante la crianza de animales productores de alimentos. Estos productos son empleados con fines terapéuticos y/o preventivos en caso de infecciones o enfermedades no contagiosas y en otros casos se aplican como promotores del crecimiento (Lozano & Arias, 2008). Muchas veces los medicamentos utilizados con estos propósitos son antibióticos.

La presencia de antibióticos en los alimentos para consumo humano, podría generar en las personas efectos tóxicos, reacciones de hipersensibilidad alérgica, desórdenes en el desarrollo corporal, así como dar lugar al desarrollo de la resistencia antimicrobiana y a problemas ambientales como la contaminación de aguas y suelos (Hassouan, 2006; Lozano & Arias, 2008).

A pesar de que los riesgos que el consumo de residuos de antibióticos en alimentos para humanos, son conocidos y están probados y regulados por organizaciones como el *Codex Alimentarius* (Codex, 2003), Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés), la Agencia Europea de Medicamentos (EMA, por sus siglas en inglés), es común, que se dé un uso indebido de estos medicamentos en la producción de alimentos para mejorar la productividad.

El hecho de que los huevos consumidos por la población contengan trazas de estas moléculas, podría estar contribuyendo al aumento de la resistencia antimicrobiana (RAM) que está generando, actualmente, una gran problemática a nivel mundial, debido a que los medicamentos antimicrobianos juegan un papel indispensable en el tratamiento de enfermedades y su uso es imprescindible para proteger tanto la salud humana, como la animal.

La RAM denota una creciente preocupación mundial para el sector agrícola debido a que los medicamentos suelen manipularse inadecuadamente para tratar y prevenir enfermedades, tanto en animales como en humanos. Cuanto más se abuse de los fármacos, mayor es la probabilidad de promover resistencia microbiana, lo que pone en riesgo no sólo a las personas, sino también a los animales y el medio ambiente. (FAO, 2016).

La RAM es un problema que afecta por igual a todos los países (Rocha, Reynolds, & Simons, 2015). La globalización ha logrado que hoy en día se cuente con modernas rutas de comercio, lo cual facilita la diseminación de nuevas enfermedades; mismas que pueden pasar de un continente a otro en tiempo real. Las infecciones causadas por organismos resistentes a los antibióticos (ORAs) se pueden considerar como una infección emergente, debido a que su tratamiento es cada vez más limitado y cuentan con el potencial de afectar a todas las personas en el mundo.

Las fluoroquinolonas (FQ), son antibióticos ampliamente utilizados en la medicina humana y veterinaria, por su eficacia para el tratamiento de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Redgrave et al., 2014). La Organización Mundial de la Salud (OMS), por su parte, los ha catalogado como antibióticos de importancia crítica para la medicina humana (McCrackin et al., 2016), por lo que se han dado recomendaciones de reservar su uso y de evitar utilizarlos como promotores de crecimiento en animales.

Las advertencias de contención de su uso se basan en confirmaciones del empleo irracional de antibióticos en prácticas de cría de animales, con la aparición de residuos de estos medicamentos en productos alimenticios de origen animal (Moudgil et al., 2017) lo que ha provocado que los organismos resistentes a este tipo de antibióticos continúen creciendo en número (Redgrave et al., 2014).

La importancia de analizar las FQ es resultado de un incremento significativo en la resistencia a las FQ en cepas de bacterias como *Campylobacter jejuni*. y *Escherichia coli* en humanos los últimos 20 años (Šupraha & Balen, 2017). Estas bacterias, específicamente las *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*, son registradas como los agentes más comunes causales de la gastroenteritis bacteriana en el mundo, (Wieczorek & Osek, 2013). Además, son las bacterias responsables de ocasionar diarrea en unas

400-500 millones de personas en todo el mundo cada año, razón por la cual es imprescindible contar con antibióticos capaces de controlar la infección por estos patógenos.

La principal fuente de infección por *Campylobacter*, incluyendo la infección por *Campylobacter* resistente a FQ apunta a las aves de corral, (Nelson et al., 2007). Otras estimaciones señalan que, alrededor del 50-80% de las cepas de *Campylobacter* que infectan a humanos, provienen de las aves de corral, tanto de gallinas ponedoras como de aves de engorde (García, 2015).

En Costa Rica, previo al periodo comprendido entre agosto y noviembre del año 2016, no existía información relativa a la incidencia de residuos de FQ en huevos para mesa, producidos en las granjas a nivel nacional. Este escenario genera incertidumbre en cuanto a los problemas relativos de salud pública que eventualmente se podrían generar por el uso de estos antibióticos en las gallinas ponedoras para la producción de huevos. Estos medicamentos son considerados como antibióticos de prioridad en medicina humana (FAO, OMS, & OIE, 2011), por lo que se debe procurar un uso adecuado y prudente de los mismos en la medicina veterinaria. De ahí nació la idea de realizar un estudio diagnóstico para conocer si se utilizan o no dichos medicamentos en este proceso.

## **2.1 Hipótesis**

Los huevos producidos en Costa Rica para consumo humano contienen residuos de sarafloxacin, enrofloxacin y ciprofloxacina, antibióticos de uso prohibido en este proceso y los cuales eventualmente podrán contribuir a aumentar la resistencia antimicrobiana y causar pérdidas tanto humanas como económicas.

## 2.2 Objetivos del proyecto

### Objetivo General

1. Diagnosticar la prevalencia de residuos de enrofloxacin, ciprofloxacina y sarafloxacina, en los huevos de gallina producidos en Costa Rica para consumo humano.

### Objetivos Específicos

1. Muestrear lotes de huevos producidos en las granjas de Costa Rica.
2. Evaluar el contenido de enrofloxacin, ciprofloxacina y sarafloxacina de los lotes de huevos producidos en Costa Rica.
3. Generar datos y documentar los resultados del contenido de enrofloxacin, ciprofloxacina y sarafloxacina encontrados en los huevos muestreados, para proponer políticas regulatorias sobre el uso de medicamentos antimicrobianos en animales, progresar a nivel nacional en el tema de la resistencia antimicrobiana y mejorar la seguridad alimentaria de la población costarricense.

## 2.3 Preguntas de investigación

- ¿Se ha diagnosticado en Costa Rica la presencia de residuos de medicamentos veterinarios, específicamente las FQ, en los huevos ahí producidos?
- ¿Contienen los huevos producidos en Costa Rica residuos de sarafloxacina, enrofloxacin y ciprofloxacina?

## 2.4 Justificación

El huevo forma parte de los alimentos de origen animal (OECD/FAO, 2015), los cuales son una de las fuentes de proteína más consumidas a nivel mundial por su fácil acceso y bajo costo.

Las FQ, son antibióticos ampliamente utilizados en el tratamiento de infecciones, tanto en humanos como en animales, con el potencial de ser eficaces en el tratamiento

de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, razón por la cual son consideradas como antimicrobianos de prioridad por FAO/OMS/OIE (2011), frente a la gran problemática mundial que el tema de la resistencia antimicrobiana representa actualmente.

La resistencia a las FQ sigue sucediendo a un ritmo progresivo en numerosas especies bacterianas. Razón por la cual algunos países han regulado su uso y han recomendado pautas de prescripción para su empleo. La resistencia a estos fármacos continúa aumentando y es un problema importante encontrado en el entorno clínico (Redgrave et al., 2014).

Existen investigaciones que aseveran que la resistencia a estos antibióticos, apareció al mismo tiempo que se dio la inserción de estos agentes en la producción animal y la medicina veterinaria (Wieczorek & Osek, 2013).

Redgrave et al. (2014) reportan que en Reino Unido el porcentaje de cepas de *E. coli* resistentes a FQ pasó de 6% a 20% del 2001 al 2006 y durante el resto de la década se mantuvo en alrededor del 17%; además señala que Grecia es el mayor usuario de FQ y tiene la mayor incidencia de cepas de *E. coli* resistentes a estos antibióticos. En Costa Rica no se han desarrollado investigaciones que permitan diagnosticar la presencia o ausencia de antimicrobianos que generen resistencia en huevo para consumo. Por lo tanto, es necesario contar con estudios que permitan realizar un diagnóstico de la situación actual.

Debido a estas proyecciones, la importancia en la nutrición que este grupo de alimentos representa y el creciente uso de medicamentos veterinarios, específicamente, los antimicrobianos, se propone el desarrollo de un estudio de la prevalencia de algunas FQ en los huevos producidos en Costa Rica.

### **3. Marco referencial**

En el campo de la Zootecnia, es habitual el uso de antibióticos para el tratamiento y prevención de enfermedades y como aditivo alimentario para desarrollar el peso de los animales. El uso indiscriminado de antibióticos favorece la aparición de residuos en diferentes tejidos comestibles de los animales medicados, lo cual podría representar un riesgo potencial para la salud de los humanos debido a efectos tóxicos y mutagénicos, así como al crecimiento de la RAM (Hassouan, 2006).

El incremento en la demanda mundial de productos ricos en proteína ha provocado un aumento del 70% en el consumo de antibióticos en los animales durante la última década (Morrison, 2015). Residuos de principio activo de antibióticos encontrados en los productos alimenticios de origen animal, son indiscutibles y evidencian que el uso de antibióticos en la agricultura promueve la RAM en los seres humanos.

#### **3.1 Producción de huevos y su valor nutricional**

La producción de aves plantea una situación particular que se caracteriza por alta densidad de población, alimentación a base de concentrados y acumulación de materia fecal. Esto trae consigo un ambiente más que apto para la transmisión epidémica de enfermedades, por lo que es necesario el establecimiento de programas de prevención que incluyan diseño de infraestructura, limpieza, control de suministros y en última instancia uso de medicamentos (Saénz, 2001).

En los procesos de obtención de huevos, como en cualquier otro proceso de producción, se busca obtener la mayor eficiencia del proceso. Esto ha generado en el desarrollo de la avicultura, la crianza de aves bajo condiciones extremadamente intensivas, utilizando espacios vitales mínimos por ave, con la finalidad de alcanzar el máximo crecimiento y producción posibles.

El alto riesgo de enfermedades infecciosas y parasitarias presentes en el medio ambiente y evaluando el riesgo que representa para la producción de huevos, se recurre usualmente al uso de vacunas y medicamentos para evitarlas (OIE, 2012).

En estos métodos de producción intensivos los problemas infecto-contagiosos se diseminan rápidamente, causando enormes pérdidas económicas, e incrementando el uso de antimicrobianos veterinarios. El uso de las FQ en aves ponedoras es fundamental con fines terapéuticos para tratar infecciones intestinales, salmonelosis agudas, colibacilosis, osteomielitis y prostatitis (López, 2007).

En las granjas con alta producción de huevos el control de antibióticos y del tiempo de retiro es más controlado, sin embargo, *“los medianos y pequeños productores que tienen fácil acceso a estos medicamentos no se les puede controlar de una manera eficiente”*, según el encargado del programa nacional de aves (R. Chaves, comunicación personal, 10 de noviembre de 2015).

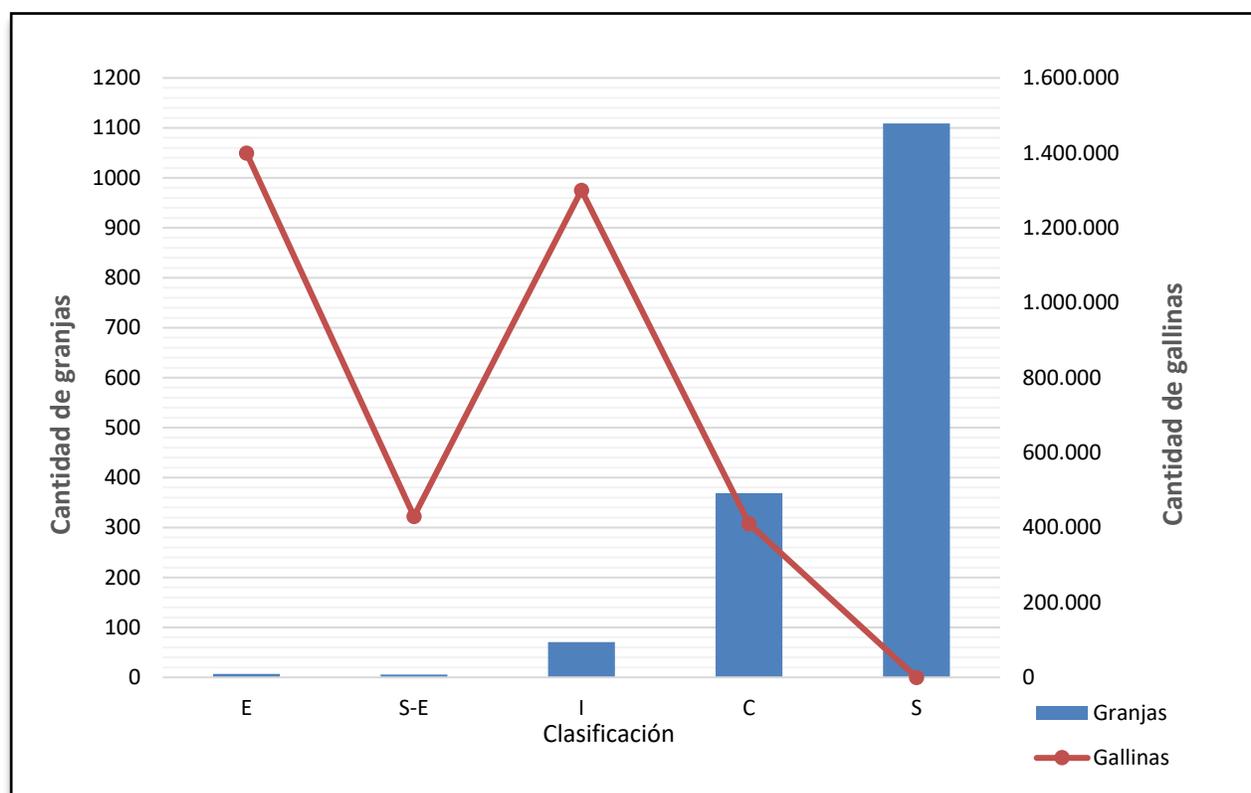
En Costa Rica, según Chaves, los grandes productores hacen uso de tierras e instalaciones propias para sus procesos. Importante destacar que la mayoría de los medianos productores utilizan tierras e instalaciones que los grandes productores les proporcionan, al igual que les proporcionan los insumos requeridos para el proceso de producción.

Por su parte los pequeños productores de las zonas rurales tienen sus granjas en sus patios, las cuales son generalmente de poco número de aves, por lo que la propagación de enfermedades e infecciones son menos comunes que en las granjas industrializadas.

El último Censo Nacional Agropecuario realizado en Costa Rica en el año 2014 sugiere que existen 1562 granjas dedicadas a la producción de huevos en el país, las cuales se clasifican dependiendo de la cantidad de gallinas que hay en la granja, según los tipos que se muestran en el Cuadro 1. Este cuadro señala que del total de granjas existentes en el país 453 están clasificadas como sistemas de producción extensivos, semi-extensivo, intensivos y de confinamiento, lo cual significa que esta es la actividad primaria de esas granjas (INEC, 2014). Esta información se evidencia en la Figura 1, misma que además muestra que las restantes 1109 granjas, que representan el 71% de la producción nacional y poseen el 0.5% de las gallinas, atañen una actividad de subsistencia dentro de granjas que se dedican a otra actividad principal, o bien granjas de patio en casas particulares.

**Cuadro 1. Clasificación de las granjas. (Fuente: Elaboración propia).**

Clasificación de granjas por cantidad de aves	
Extensivo	Más de 100,000
Semi-Extensivo	Entre 50,000 y 100,000
Intensivo	Entre 5,000 y 50,000
Confinamiento	Entre 100 y 5,000
Subsistencia	Entre 100 y menos de 10



**Figura 1. Cantidad de gallinas ponedoras y granjas según su tipo, en Costa Rica en el 2014. (Fuente: Elaboración propia, con datos tomados de INEC, 2014).**

En Costa Rica se producen entre 2,5 y 2,6 millones de huevos al día en condiciones normales de producción. El consumo por persona al año pasó de 190 unidades en el 2012 a 202 unidades actualmente (Barquero, 2014).

En promedio en cada granja hay 2212 aves y en Costa Rica se producen 67.436.225 kg de huevo al año, lo cual evidencia que la producción de huevos se concentra en pocas granjas (INEC, 2014). Además, el Censo confirma que estas granjas se ubican mayoritariamente en los cantones de San Mateo, Mora, Naranjo y Grecia, todos ellos pertenecientes a la provincia de Alajuela, donde se concentra el 54,7% de los animales de este tipo, posicionando a esta provincia como la de mayor producción con el 80,7% de las aves, seguida por Puntarenas con el 6,1%.

La importancia de la producción de este alimento radica en que es una fuente de empleo importante en la región occidental del país (IICA, 2010) .

Nutricionalmente el huevo es un alimento de gran valor, como se muestra en la información presentada en el Cuadro 2, donde se muestra que este alimento posee un alto contenido en nutrientes como proteínas, vitaminas, minerales y aminoácidos esenciales lo cual lo convierten en un alimento importante y un ingrediente básico en la alimentación nacional costarricense. Además, su precio, es relativamente bajo, respecto a las otras fuentes de proteínas incluidas en la CBA, situación que lo hace más apetecido por los consumidores de todas las edades y condición económica, tanto niños, adulto como adultos mayores (SAGARPA, 2007).

**Cuadro 2. Composición nutricional y vitamínica del huevo. (Fuente: (SAGARPA, 2007).**

<b>Contenido nutricional</b>		<b>Contenido vitamínico</b>	
Proteínas	5,6 g	A1	590 ui
Carbohidratos	0,5 g	B1	0,06 mg
Grasas	5,7 g	B2	0,15 mg
Calorías	83	B3 y B5	0,05 mg
Fibra dietética	0 g	B6	0,03 mg
Colesterol	225 mg	B12	0,8 mcg
		Acído fólico	16 mcg
		Colina	250 mg
		Inositol	11 mg
		D	35 ui
		E	1 mg
		K	6 mcg

Los huevos proporcionan proteínas, vitaminas y minerales importantes. La utilización neta de la proteína (UNP) es un índice de calidad de las proteínas que se calcula multiplicando la digestibilidad de la proteína por su valor biológico. La UNP de los huevos de gallina es de 87, muy alta en comparación con la de los cereales. Este alimento además es rico en aminoácidos esenciales y en luteína, que disminuye el riesgo de cataratas y regeneración macular (López et al., 2013).

En los países menos desarrollados, el aumento previsto en el consumo de huevos entre 2005 y 2015 se estima en un 26 por ciento en comparación con solo el 2,4 por ciento en los países más desarrollados (Farrell, 2013b).

En los países en desarrollo, la dieta de las personas que viven en las ciudades es más rica en proteínas de origen animal que las de la población rural, debido fundamentalmente a que la población urbana es más próspera, pero también a que suele tener acceso a una mayor variedad de alimentos en los mercados locales (Farrell, 2013a).

Además de su importancia nutricional, el huevo, tiene una gran variedad de usos. Es fácil de preparar, tiene bajo costo y es de fácil acceso lo cual lo convierte en un alimento muy versátil y saludable (Carbajal-Azcona, 2014).

Todas esas características mencionadas anteriormente convierten al huevo en una matriz interesante de estudiar para tratar de conocer el estado de la inocuidad de este alimento en Costa Rica, ya que a nivel nacional no existe aún registro de información que contribuya en este aspecto.

### **3.2 Contexto internacional**

Se ha estimado que el uso total de antibióticos en los países europeos oscila entre 20 y 188 mg kg<sup>-1</sup> de animales producidos (Pikkemaat et al., 2016). Otras evaluaciones sugieren que el uso promedio mundial de antimicrobianos por kilogramo de animal producido en el 2010 fue de 148 mg kg<sup>-1</sup> para pollos (Van Boeckel et al., 2015a).

El desarrollo de bacterias resistentes a las FQ se atribuye a la introducción de estos antibióticos para el tratamiento de animales, durante la década de los años 90 (Pikkemaat et al., 2016).

En los Estados Unidos, en el año, 2005 la FDA prohibió el uso de enrofloxacin en aves de corral, debido a la creciente prevalencia de *Campylobacter* resistentes a FQ en los seres humanos (Pikkemaat et al., 2016). Además, se han evidenciado brotes de *Salmonella* resistente a las quinolonas en ese país Taiwán, Japón y los Países Bajos (Yan et al., 2015).

En India, se da un uso excesivo de antibióticos en la cría de animales. Habitualmente esos antibióticos son de las mismas clases que los que se usan en humanos, lo que significa que tienen el mismo modo de acción contra las bacterias (Moudgil et al., 2017). Como consecuencia, el uso de quinolonas en la India, ha dado lugar a bacterias cada vez más resistentes, y la tasa de aislamiento de *Salmonella* resistentes a quinolonas y FQ ha aumentado cada año. La tasa de resistencia de *Salmonella* a la enrofloxacin para el año 2014 fue de 66,0 % mucho mayor que la reportada en el 2005 en India (Yan et al., 2015).

En Europa, el uso de FQ está permitido en veterinaria, aunque existe una conciencia creciente de los riesgos asociados con el uso ilimitado de antibióticos en la producción de animales (Maran, 2015). Estudios señalan que, por ejemplo en los Países Bajos, el uso de FQ causó un gran aumento en la prevalencia de cepas de *Salmonella* resistentes a ciprofloxacina en carne de aves de corral, la cual pasó de 0% en el año 2000 al 60% en el 2007 (Pikkemaat et al., 2016).

Los datos del primer informe mundial de la Organización Mundial de la Salud sobre la RAM, muestran que en las Américas hay una elevada resistencia de *E. coli* a las cefalosporinas de tercera generación y a las fluoroquinolonas, dos clases importantes de fármacos antibacterianos muy utilizadas en medicina (WHO, 2014).

Las bacterias *E. coli* y *Campylobacter* spp., representan una de las principales causas de infecciones zoonóticas entéricas en el mundo (Hao et al., 2016). *Campylobacter* es considerada por la OMS como el primer agente etiológico de diarrea en el ser humano en los países desarrollados, y el segundo o tercero en los países en vías de desarrollo, como los de América Latina (Mardones & López, 2017).

A nivel internacional *Campylobacter* spp. es registrado como uno de los mayores patógenos bacterianos, siendo *Campylobacter jejuni* la especie que mayor cantidad de casos genera (European Food Safety Authority & European Centre for Disease

Prevention and Control, 2016). En Dinamarca *Campylobacter* es la causa más común de enfermedad zoonótica transmitida por alimentos, mientras que en EE.UU. e Inglaterra, se aísla con mayor frecuencia que *Salmonella* y *Shigella* (Mardones & López, 2017).

Uno de los factores que contribuyen en mayor medida a que *Campylobacter* sea una bacteria tan patógena es la resistencia a los antibióticos (García, 2015). Rutinariamente *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* son patógenos que causan diarrea aguda en los seres humanos; y se ha reportado que 1% de los casos requieren hospitalización por complicaciones con secuelas post infecciosas que afectan principalmente al sistema nervioso, causando síndrome de Guillain-Barré, artritis reactiva y polineuropatía posinfecciosa que conduce a la parálisis (Szczepanska et al., 2017; Mardones & López, 2017).

### **3.3 Situación en Costa Rica**

En el ámbito nacional “durante el 2013 se confirmaron 112 aislamientos de *Salmonella* de origen no humano, de ellos 27 se aislaron de alimentos de origen animal para consumo humano”, según se menciona en *el Informe de vigilancia basada en laboratorio de Salmonella*, del Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud (INCIENSA, 2014). Los resultados de ese mismo estudio demuestran que en Costa Rica circulan clones de esta bacteria y, que estos presentan multiresistencia a los antibióticos o sensibilidad disminuida a la ciprofloxacina.

## **4. Marco teórico**

### **4.1 Costa Rica, inocuidad de alimentos**

A partir del año 2010, Costa Rica cuenta con una Política Nacional de Inocuidad de Alimentos oficializada, cuyo fin es “definir y establecer los lineamientos generales a seguir en materia de inocuidad de alimentos producidos, elaborados, importados y comercializados”, a efectos de asegurar la protección de la salud de las personas y de los derechos de los consumidores, como se menciona en (MAG-MEIC-COMEX, 2010).

El Gobierno de Costa Rica, a través del Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), tiene entre sus responsabilidades realizar en forma integral la inspección de los alimentos de origen animal para el consumo humano, funciones que son delegadas al Servicio Nacional de Salud Animal, como lo indica en el Programa Nacional de Residuos (PNR), (SENASA, 2014).

El Servicio Nacional de Salud Animal (SENASA) es la entidad oficial responsable del monitoreo del uso y control de medicamentos veterinarios utilizados en las diversas etapas de la producción, así como los contaminantes y sustancias prohibidas por nuestro país. Para cumplir con esta tarea el SENASA cuenta con un PNR que establece los Límites Máximos de Residuos (LMR).

Los LMR representan el nivel más bajo de un contaminante que pueda estar presente en los alimentos, con miras de proteger al consumidor. Estos LMR son establecidos en el Reglamento Técnico Centroamericano y por organismos internacionales como el CODEX, FDA, EMEA u otros organismos reconocidos por la comunidad científica (SENASA, 2015).

Dado que la salud pública es de interés nacional, es imprescindible velar porque estos residuos no estén presentes en cantidades que supongan un riesgo inaceptable para los seres humanos, animales y el ambiente (SENASA, 2015).

## 4.2 Resistencia a los antibióticos

La RAM se define como la capacidad que tienen los microbios para impedir la eficiente toxicidad de agentes diseñados para controlarlos. Los microorganismos adquieren habilidades para resistir y sobrevivir a los efectos de un antibiótico, o bien la bacteria disminuye o inactiva la acción de estos agentes (Calderón & Aguilar, 2016). Es muy importante señalar que las bacterias pueden presentar resistencia a diferentes antibióticos al mismo tiempo.

Esto significa una crisis creciente en la medicina clínica y veterinaria en todo el mundo, y es una consecuencia inevitable de la adaptación evolutiva de los microbios y del uso humano e indebido de los antimicrobianos. (Silbergeld et al., 2008)

La aparición de cepas resistentes es un fenómeno natural que ocurre cuando los microorganismos se reproducen de forma errónea o se intercambian características de resistencia, pero la utilización y el uso indebido de antimicrobianos también acelera su aparición. Otros factores críticos para la aparición de la resistencia, son las prácticas incorrectas de control de las infecciones, las malas condiciones sanitarias y la inadecuada manipulación de alimentos (OMS, 2015c).

Desde hace más de 60 años, los antibióticos han sido usados en animales producidos para consumo, como tratamientos para controlar o prevenir enfermedades infecciosas, además de utilizarlos como aditivos con función de promotores de crecimiento (Álvarez Fernández, 2013).

El mayor uso de antimicrobianos en todo el mundo se produce en la producción de animales para consumo humano de carne, leche y huevos. Estos agentes se utilizan como aditivos en los piensos, lo cual da lugar a la exposición humana a patógenos resistentes a los antimicrobianos a través de los alimentos (Silbergeld et al., 2008).

A causa de estos factores, es que, en los últimos años se le ha dado mucha importancia a la determinación de residuos de antibióticos en alimentos, ya que el consumo de bajas concentraciones de estas moléculas podría dar lugar a la aparición de bacterias resistentes que afecten a los humanos que consumen dichos productos contaminados (Jimenez et al., 2014).

Por otro lado, la investigación llamada Uso de quinolonas y resistencia (Oteo & Campos, 2004) indican que:

*“el uso de enrofloxacin en pollos y otros animales de granja puede explicar el hecho de que se encuentren cepas de E. coli resistentes a fluoroquinolonas en niños que no consumen este grupo de antibióticos, como lo señaló un estudio realizado en España donde, el 11% de las cepas españolas de E. coli aisladas de sangre de niños menores de 14 años fueron resistentes a ciprofloxacina.”*

### 4.3 Las fluoroquinolonas (FQ)

Existe gran cantidad de agentes antimicrobianos, los cuales son usados tanto en la medicina humana como en la veterinaria. Sin embargo, sólo algunos de estos están aprobados para utilizarlos en los procesos de producción de especies animales con fines alimenticios (Codex Alimentarius, 2004). Son muchos los factores que intervienen en esta situación, y uno de los más relevantes es el que se relaciona con la transferencia de la resistencia antimicrobiana a estos medicamentos, desde los animales a los humanos (Wang *et al.*, 2012)

La primera quinolona utilizada clínicamente fue el ácido nalidíxico en 1962, el cual es parte de la primera generación de estos medicamentos. Años después se utilizaron las quinolonas de tercera generación, conocidas como fluoroquinolonas (FQ) porque contienen en sus moléculas un grupo fluoruro en el anillo de la quinolona, típicamente en el carbono seis (Wang *et al.*, 2012), lo cual ayuda a mejorar la absorción oral y la actividad antimicrobiana de estas moléculas (Barrientos, 2006).

Las FQ son una familia de antibióticos sintéticos de amplio espectro antimicrobiano, de las cuales algunas pertenecen al grupo de compuestos prohibidos para su uso en veterinaria (Wang *et al.*, 2012). En las figuras 2, 3 y 4 se muestran las estructuras químicas de las FQ en estudio, en las cuales se observa que la diferencia principal de estas moléculas en relación con las quinolonas, es la presencia de un átomo de flúor en el carbono seis y de un grupo piperazina o metil-piperazina como sustituyente en la posición siete (Junza, 2016a). Se advierte, además, en las posiciones tres y cuatro de estas moléculas un grupo carboxilo y un oxígeno, respectivamente, los cuales son esenciales

para el transporte al interior de la bacteria y para su unión con la enzima topoisomerasa (Barrientos, 2006).

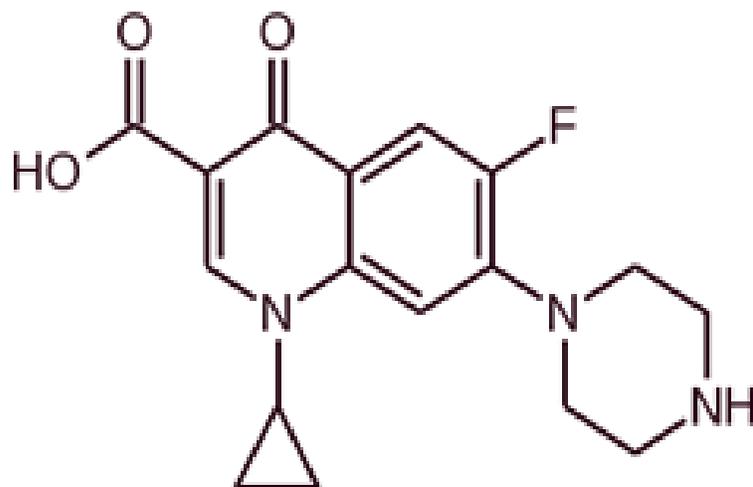


Figura 2. Estructura química de la ciprofloxacin. (Fuente: Talero, Medina, & Rozo, 2014).

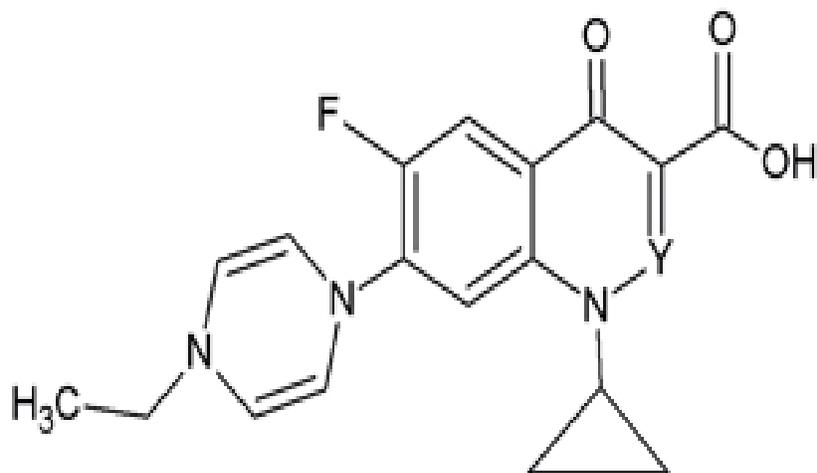
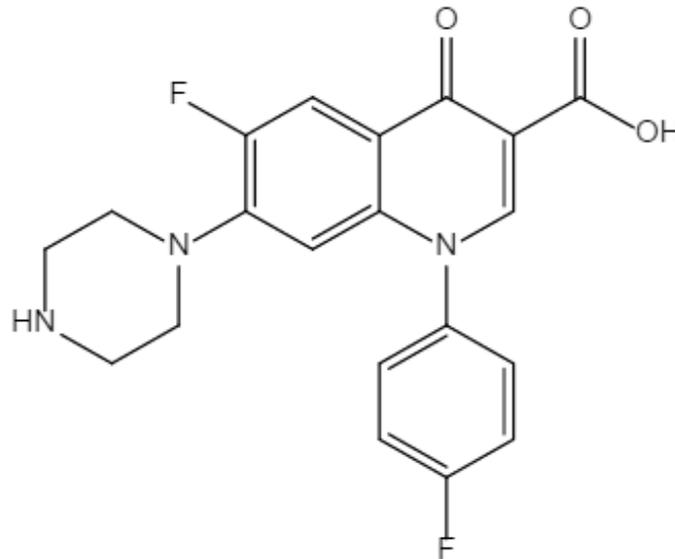


Figura 3. Estructura química de la enrofloxacin. (Fuente: Talero et al., 2014).



**Figura 4. Estructura química de la sarafloxacin. (Fuente: Junza, 2016).**

La sarafloxacin, la enrofloxacin y su metabolito la ciprofloxacina, antibióticos a estudiar en este proyecto de investigación, tienen uso en animales y en humanos respectivamente; y pueden simbolizar una enfermedad de transmisión alimentaria (ETA), las cuales constituyen un problema de salud pública creciente en todo el mundo, que se producen por la ingesta de alimentos contaminados con microorganismos o sustancias químicas (OMS, 2014). Dicha contaminación puede producirse en cualquier etapa del proceso de producción de alimentos.

El uso de estas FQ, contribuye a mejorar el control de enfermedades infecciosas y también a optimizar la producción, ya que promueven el crecimiento de los animales (Talero et al., 2014). Es por esa razón que son utilizadas en los procesos de producción de alimentos, algunas veces no de la manera más adecuada, aunque su uso esté reglamentado por normativas internacionales.

### **4.3.1 Resistencia a las Fluoroquinolonas**

Las FQ utilizan como mecanismo de acción para acabar con las bacterias la inhibición de la síntesis del DNA, con lo que causan la muerte de la célula y eliminan su efecto. La

forma en la que las FQ logran matar la bacteria es impidiendo su replicación y transcripción mediante la formación de un complejo estable con las enzimas ADN girasa y topoisomerasa IV de la bacteria, lo cual promueve la muerte celular (García, 2015).

Sin embargo, las bacterias son capaces de desarrollar diferentes mecanismos de defensa ante cualquier tipo de amenaza que atente contra su vida, sobrevivencia y reproducción, razón por la que, para combatir los efectos de los antibióticos, estos microorganismos han ido presentando diferentes tipos de modificaciones y/o adaptaciones, tanto genéticas como en su estructura, que los han ido haciendo resistentes a los mismos (Calderón & Aguilar, 2016).

La resistencia que desarrollan las bacterias para las FQ se debe principalmente, a una mutación, que consiste en una sustitución de aminoácidos en la enzima girasa para las bacterias gram negativas, y la topoisomerasa IV en bacterias grampositivas. (Álvarez et al., 2015).

Sin embargo, esta resistencia se puede presentar también por la reducción de la concentración intracelular de quinolonas en el citoplasma, lo cual proporciona tiempo suficiente para que la bacteria se adapte y adquiera resistencia y, por último, por genes de resistencia a quinolonas mediados por plásmidos y genes codificadores de bombas de eflujo (Álvarez et al., 2015).

#### **4.4 Normativas nacionales e internacionales para residuos de medicamentos**

Debido a la frecuente utilización de antibióticos en la producción animal, existe el riesgo de que puedan haber residuos de estas moléculas en los tejidos utilizados como alimento (Talero et al., 2014). El CODEX por su parte, define residuos como “los compuestos de origen y/o sus metabolitos presentes en cualquier porción comestible de un producto animal” (Codex Alimentarius, 2003).

Esta problemática ha generado que las organizaciones internacionales realicen grandes esfuerzos para lograr la armonización de criterios relacionados a la seguridad de los residuos de medicamentos veterinarios, y poder definir LMR para los compuestos de

medicamentos veterinarios que se consideren riesgosos para la salud pública (Wang et al., 2012).

Se denomina LMR a la concentración aceptable de una sustancia presente en los tejidos comestibles de un animal, (expresado en mg/kg o en  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) sobre la base del peso en fresco); entiéndase músculos, hígado, riñones, grasa, leche, miel o huevos; que es permitido legalmente, y que no constituye ningún riesgo para la salud del ser humano al ser consumida (SENASA, 2015).

En el caso específico de Costa Rica, la normativa vigente a cumplir, y en la cual se establece un orden de prioridad a seguir en el cumplimiento de los LMR, es el Reglamento Técnico Centroamericano, mismo que señala, que “se reconocerán los LMR de medicamentos veterinarios en su orden de prioridad establecidos por Codex, FDA, EMA y FAO”, respectivamente (MINECO, CONACYT, MIFIT, SIC, & MEIC, 2010).

Cada una de estas organizaciones ha elaborado su propia lista de LMR, en la que incluye los LMR de sarafloxacin y enrofloxacin + ciprofloxacina (que se reportan como la sumatoria de ambas, por ser éste último un metabolito del otro), para cada especie animal, tejido o subproducto se establece dicho límite. Esta información se encuentra en Cuadro 3, mismo que presenta una lista de los LMR regulados, por organización para los residuos de estos compuestos según la matriz, los cuales están clasificados por principio activo para cada tipo de especie y también separados específicamente por tejidos, a los cuales se le asigna un valor de LMR que se establece en unidades de  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de matriz.

**Cuadro 3. Límites Máximos de Residuos legislados en Costa Rica, para medicamentos veterinarios que contienen enrofloxacin y sarafloxacin (Fuente: “Medidas de Control ante resultados No conformes” (SENASA, 2016a) y adaptada para fines de esta investigación).**

Principio Activo	Especie	Tejido	LMR (ug/kg o ppb)	Referencia
Enrofloxacin (suma de enrofloxacin y ciprofloxacina) Sarafloxacin	Aves	Hígado	200	EMEA
		Riñón	300	EMEA
		Grasa y piel	100	EMEA
		Músculo	100	EMEA
	Bovino	Hígado	100	FDA
		Riñón	200	EMEA
		Grasa	100	EMEA
		Músculo	100	EMEA
		Leche (ug/L)	100	EMEA
	Caprino	Hígado	100	FDA
		Riñón	200	EMEA
		Grasa	100	EMEA
		Músculo	100	EMEA
		Leche (ug/L)	100	EMEA
	Conejo	Hígado	500	FDA
		Riñón	300	EMEA
		Grasa	100	EMEA
		Músculo	100	EMEA
	Ovino	Hígado	100	FDA
		Riñón	200	EMEA
Grasa		100	EMEA	
Músculo		100	EMEA	
Leche (ug/L)		100	EMEA	
Porcino	Hígado	500	FDA	
	Riñón	300	EMEA	
	Grasa	100	EMEA	
	Músculo	100	EMEA	
Resto de especies destinadas a producción de alimentos	Hígado	200	EMEA	
	Riñón	200	EMEA	
	Grasa	100	EMEA	
	Músculo	100	EMEA	

## 4.5 Proyecciones

El uso mundial de antimicrobianos para la producción animal aumentará en un 67% para el año 2030 (Van Boeckel et al., 2015b). Este aumento se dará principalmente en los países de ingresos bajos y medianos que tienen que satisfacer una creciente demanda de proteínas animales.

La RAM es un problema que está aumentando a un ritmo mayor que al que ha podido lograr avanzar la investigación y desarrollo de nuevos tipos de antibióticos. La búsqueda de nuevos antibióticos se está convirtiendo cada vez en algo más difícil y costoso para las empresas farmacéuticas. Desde 1987, no se han descubierto nuevas clases de antibióticos que estén disponibles para el tratar actualmente infecciones de tipo bacterianas, lo cual demuestra el grave problema que vamos a tener que afrontar en un futuro cercano para curar las infecciones (Morrison, 2015).

Los aspectos sociales, económicos y humanos son los que se ven más afectados con esta complicación, ya que la mortalidad en los pacientes va en aumento por la falta de medicamentos para contrarrestar a las bacterias resistentes (Álvarez-Fernández, 2013). Además, los pacientes que llegan a sufrir este problema deben permanecer más tiempo internados en salas especiales de los hospitales, lo cual representa un gasto mucho mayor para los sistemas de salud públicos o bien para el paciente que lo padece y que debe pagar un sistema privado para tratarlo.

Se espera que para el año 2050 las muertes atribuibles a la resistencia a los antibióticos sean de aproximadamente 10 millones por año, representando la tercera causa de muertes a nivel mundial, y provocando, por otro lado, reducciones en la productividad mundial que, al final de cuentas, se convierten en mayores desafíos económicos, sociales y ambientales para el planeta (Morrison, 2015).

## **5. Marco metodológico**

Este apartado describe los métodos utilizados para la recolección de la información y su análisis, el cual representa una monografía innovadora que incluye componentes cuantitativos que se logran mediante la toma de muestras en campo y su consiguiente análisis utilizando una metodología analítica validada y acreditada bajo la norma INTE-ISO/IEC 17025:2005. Misma que se basa en un método de HPLC/MS-MS; así como la recolección de datos a través de una encuesta, que se aplicó a consumidores nacionales de huevo con el propósito de indagar si estos actores están interesados en saber sobre el tema de análisis de esta investigación.

### **5.1 Línea de investigación**

El proyecto corresponde a una investigación de tipo monografía, lo que implica un trabajo de investigación de carácter teórico práctico realizado a través de un proceso de reflexión y análisis caracterizado por enriquecimiento del mismo, con un planteamiento práctico. Tiene como objetivo analizar y generar información sobre la presencia o no de residuos de FQ en los huevos producidos en Costa Rica, lo cual es un tema nunca antes desarrollado en el país, y un asunto que podría estar contribuyendo a incrementar la RAM hacia estos antibióticos, según Hassouan (2006).

La investigación intentó conocer la situación nacional, con el fin de concientizar a productores de huevos, a las instituciones del estado y a los consumidores, a tratar de cambiar el escenario hacia un adecuado y prudente uso de antibióticos en la producción de huevos, a partir de información confiable.

### **5.2 Tipo de estudio**

La investigación propone una relación entre conocimiento científico y política, donde existe un vínculo total, y se estudia lo que es y lo que debería ser (Erazo, 2011). Se pretende, además, que este estudio sirva como base para la realización de investigaciones posteriores más elaboradas y rigurosas en este campo.

Esta monografía se complementa con técnicas e instrumentos experimentales cuantitativas y basa en estudios realizados previamente en un laboratorio, al igual que la recolección y tratamiento de los datos que son también cuantitativos; específicamente tratamiento estadístico de los datos obtenidos.

Además, como complemento a estas técnicas, se aplicó un cuestionario (Anexo 2), dirigido a los consumidores, el cual pretende evaluar la percepción de éstos, respecto a la importancia de conocer si los huevos para consumo humano que se producen en Costa Rica podrían contener residuos de antibióticos.

### 5.3 Descripción de población y muestra de estudio

- *Población estudio:* La población a estudiar en este proyecto, fueron los huevos para consumo humano producidos en 63 de las 1562 granjas avícolas que hay en Costa Rica, según el último censo avícola realizado en el año 2014 por el Programa Nacional de Salud Aviar. Las muestras fueron recolectadas mediante un tipo de muestreo aleatorio, que se realizó entre los meses de agosto a noviembre del año 2016.

Es importante destacar que en el país existen 6 principales empresas expendedoras de huevos para consumo, conocidas como centros de acopio, las cuales se ubican, en su gran mayoría, en la provincia de Alajuela, en el centro del país. Estas empresas grandes compran los huevos a los medianos productores y los comercializan con su firma. También existen granjas pequeñas, generalmente en las zonas más alejadas del país que se dedican a la producción de huevos.

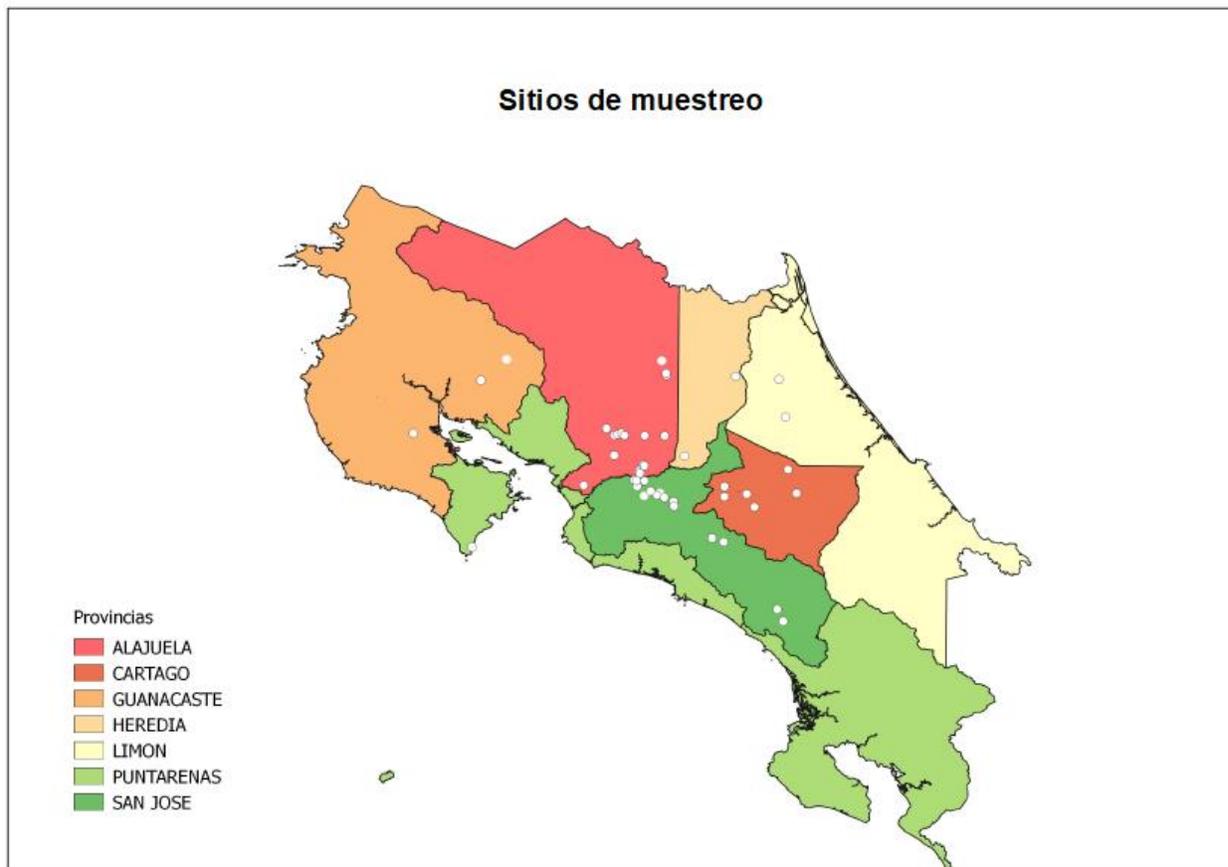
- *Muestra:* Para realizar el estudio diagnóstico se efectuó un muestreo en 63 granjas avícolas. La cantidad de muestras analizadas se determinó en base a una tabla que se encuentra en el Anexo 2, tomada de la normativa CAC/GL 71-2009 del CODEX (Codex Alimentarius et al., 2015), en la que se establece el número mínimo de muestras requerido para detectar por lo menos un resultado fuera de cumplimiento con probabilidades predefinidas (90, 95 y 99 por ciento), en una población que tiene una frecuencia de incumplimiento conocida. En este caso específico dicha tabla establece que se requieren al menos 59 muestras para encontrar al menos un

resultado fuera de lo establecido; el SENASA logró muestrear 63 granjas avícolas, en cada una de las cuales se tomó una muestra para el estudio.

Dicha metodología no se validó a nivel del SENASA, debido a que, al tratarse de una directriz CODEX específica para el diseño y la implementación de programas nacionales reglamentarios de aseguramiento de inocuidad alimentaria relacionados con el uso de medicamentos veterinarios en los animales destinados a la producción de alimentos (Codex Alimentarius et al., 2015), la que se siguió para realizar el muestreo, las autoridades pertinentes consideraron que tomar el número de muestras establecido en dicha directriz, la cual como todas las directrices CODEX está basada en evidencia científica, este número de muestras era adecuado para cumplir el objetivo del estudio diagnóstico piloto planteado por esta institución.

Además, aunado a esta razón, debe considerarse también la falta de recursos económicos para este tipo de evaluaciones y también el alto costo que representa para las instituciones públicas realizar este tipo de análisis de muestras, que les representan grandes inversiones en temas de reactivos, consumibles y personal.

La Figura 5 identifica la ubicación geográfica de las muestras que se analizaron en el LANASEVE utilizando una metodología analítica validada y acreditada bajo la norma ISO/IEC/2005, para la determinación de antibióticos en matrices de origen animal.



**Figura 5. Sitios de muestreo de huevos en Costa Rica, año 2016. (Fuente: Elaboración propia).**

Las granjas muestreadas incluyeron tanto de los centros de acopio, que se abastecen de los huevos producidos por los grandes y medianos productores, como los huevos tomados directamente de las pequeñas granjas de las regiones más alejadas del país mediante un muestreo al azar aleatorio o probabilístico.

La cantidad de muestras tomadas se determinó con base a una tabla, tomada de la normativa CAC/GL 71-2009 del CODEX (Codex Alimentarius et al., 2015) que se muestra en el Anexo 2, en la que se establece el número de muestras requerido para detectar por lo menos un resultado fuera de cumplimiento con probabilidades predefinidas (90, 95 y 99 %), en una población que tiene una frecuencia de incumplimiento conocida. Dicha tabla establece que se deben tomar al menos 59 muestras si se quiere encontrar 5% de la población fuera de cumplimiento, esto con un 95% de confianza en el muestreo.

El SENASA, como ente encargado de monitorear la inocuidad de los alimentos de origen animal cuenta con procedimientos normativos para la de toma de muestras con el objeto de asegurar que, las muestras que llegaron al laboratorio oficial son representativas de los lotes muestreados.

El procedimiento indica que para la toma de las muestras el personal oficial tomó la muestra en el área de almacenamiento de huevo (centro de acopio) designado en la granja y evitó el contacto directo con las aves.

El establecimiento o granja de producción proveyó al personal la indumentaria para asegurar las condiciones idóneas de ejecución del muestreo, y éste siguió los procedimientos de Buenas Prácticas de Higiene y de Bioseguridad establecidos por la granja.

Este procedimiento incluyó la identificación de la muestra con la información necesaria para describir la misma (nombre del establecimiento, fecha, lote, matriz y tipo de análisis) para su debida trazabilidad.

Para realizar la toma de muestras y el envío al laboratorio la persona responsable dispuso de los materiales requeridos que fueron cartón de huevos de primer uso y marcador. Esta persona identificó el cartón con el lote, el tipo de análisis a realizar y el nombre de la granja. Antes de tomar la muestra se aseguró de que el huevo seleccionado estuviera en buen estado y por ende no presentara lesiones que interfirieran con el análisis de la muestra, luego de esto, se tomó una muestra aleatoria de 15 huevos y se hizo el trámite de entrega de la muestra en el Laboratorio Nacional de Servicios Veterinarios (LANASEVE) debidamente identificado, donde además se llenó el formulario de Recepción de Muestras para Análisis de Residuos y Contaminantes en Alimentos (SEG-PE-001-RE-014), el cual contiene toda la información referente a la granja, ubicación y fecha de muestreo, lo cual sirvió para brindar un protocolo único a esta muestra para la realización del ensayo solicitado.

## 5.4 Instrumentos y técnicas para la recolección de los datos

Este estudio de tipo cuantitativo se basó en una investigación de campo, que utiliza técnicas e instrumentos de recolección y tratamiento de los datos también cuantitativos (Hernández et al., 2010). Específicamente se realizaron experimentos de laboratorio, tratamiento estadístico de los datos obtenidos, y, además, como complemento a estas técnicas, un cuestionario para los consumidores de huevos.

Se desarrolló una encuesta cerrada, que se encuentra como Anexo 3; misma que tuvo como objetivo indagar si existe o no, interés por parte de los Costarricenses en conocer si los huevos producidos en este país contienen residuos de antibióticos.

Además de esto, se analizaron 63 muestras de huevo, mediante HPLC-MS/MS, por ser la metodología analítica aceptada a nivel internacional para la cuantificación de estos analitos en metodologías confirmatorias (Codex Alimentarius et al., 2015). La metodología analítica que se utiliza para la cuantificación de residuos de estos antibióticos en huevos se describe a continuación.

### 5.4.1 Metodología analítica para la cuantificación de los analitos

#### **Materiales**

- Tubos para centrífuga de 50 mL.
- Balones de vidrio aforados clase A.
- Micropipetas de 10  $\mu$ L a 100  $\mu$ L, 50  $\mu$ L a 200  $\mu$ L, de 100  $\mu$ L a 1000  $\mu$ L y de 500  $\mu$ L a 5000  $\mu$ L.
- Tubos de centrífuga de 15 mL.
- Filtros de jeringa de 0,22  $\mu$ m o equivalente.

#### **Equipo y reactivos**

- Cromatógrafo líquido con detector de masas de triple cuadrupolo, LC-MS/MS-1 o equivalente.
- Agitador mecánico.
- Centrífuga: Rotanta 460 R o equivalente.

- Balanza Analítica Sartorius BM 110 S o equivalente.
- Balanza electrónica KERN 440-33, máximo 200 g o equivalente.
- Refrigeradora y congelador.
- Procesador de muestras Retsh GM200 o equivalente.
- Acetonitrilo grado masas o equivalente.
- Agua desionizada. Se filtra utilizando un filtro de membrana de Nylon de 0.45  $\mu\text{m}$  o equivalente, previo a su uso en el LC-MS/MS
- Hexano

### **Estándares**

Se utilizaron estándares analíticos de alta pureza equivalentes a los indicados en el Cuadro 4:

**Cuadro 4. Estándares analíticos de fluoroquinolonas, marca SIGMA-ALDRICH, para la preparación de las soluciones de trabajo del método (Fuente: Elaboración propia).**

Analito	Catálogo
Enrofloxacin	szba336xv
Ciprofloxacina	P500044
Sarafloxacin	SZBA014XV

### **Preparación de Estándares y Reactivos**

- Disoluciones madre (1000 mg/L)

Se midió una masa de aproximadamente 10.0 mg de analito o estándar interno y se llevó a 10.0 mL con metanol en un matraz balón aforado. Para la expresión de la concentración exacta se tomó en cuenta la pureza del estándar analítico. Estas disoluciones se almacenan en congelación y tienen una vida útil de un año.

- Disolución mezcla de trabajo

Se tomaron aproximadamente la cantidad indicada en el Cuadro 5 de cada disolución madre de los analitos, de tal forma que la concentración final de la mezcla de trabajo fue

de 2000 µg/L y se llevó a volumen con ACN en un mismo balón aforado de 50.0 mL.

**Cuadro 5. Volúmenes de las disoluciones madre de fluoroquinolonas utilizados para preparar la mezcla de trabajo de FQ a una concentración final de 2000 µg/L para fortificar los controles y las curvas de calibración (Fuente: Elaboración propia).**

Familia y/o analito	Volumen alícuota (µL)
Enrofloxacina	96
Ciprofloxacina	93
Sarafloxacina	99

La disolución se almacenó en congelación y tiene una vida útil de doce meses.

- Fase móvil

**Disolvente A:** En balón aforado se depositó la cantidad correspondiente de ácido fórmico y se aforó con metanol grado masas o superior para obtener una concentración de 0.10% de ácido fórmico.

**Disolvente B:** En el matraz aforado se depositó la cantidad correspondiente de ácido fórmico y se aforó con agua desionizada o superior para obtener una concentración de 0.10% de ácido fórmico.

### **Procedimiento analítico**

#### **Preparación de la muestra**

1. De los 15 huevos que ingresaron al laboratorio se tomaron 5, se fracturaron y el contenido de los huevos se depositó en una bolsa plástica estéril y se agitó.

La bolsa que contiene los huevos estaba debidamente rotulada con el número de protocolo que se le asignó a la muestra y la fecha de procesamiento.

#### **Extracción de los analitos**

1. Se midió 2.0 g de muestra, curva de calibración y muestras control.
2. Se fortificó la curva de calibración, las muestras y los controles de acuerdo al Cuadro 6, con los cual se obtuvo las concentraciones indicadas en el Cuadro 7 para cada uno

de los puntos de la curva de calibración.

**Cuadro 6. Volúmenes de mezcla de trabajo (MT) y de mezcla de estándares internos (ISTD) a adicionar a cada punto de la curva de calibración y a la muestra control (Fuente: Elaboración propia).**

Estándar	MT ( $\mu\text{L}$ )	ISTD ( $\mu\text{L}$ )
STD 0	0	50
STD 1	10	50
STD 2	20	50
STD 3	50	50
STD 4	100	50
STD 5	150	50
Muestra control	0	50

**Cuadro 7. Concentraciones finales de los puntos de la curva de calibración (Fuente: Elaboración propia).**

Analito	Concentraciones ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )				
	STD 1	STD 2	STD 3	STD 4	STD 5
Fluoroquinolonas	10	20	50	100	150

3. Se agregó 2 mL de Agua, 12 mL ACN y se agitó en vortex por 15 min
4. Se centrifugó por 5 min a 4600 rpm.
5. Se trasvasó todo el sobrenadante a un tubo de 15 mL por decantación.
6. Se evaporó el contenido de los tubos en Baño María a 40~ °C, con corriente de nitrógeno, hasta alcanzar un volumen de aproximadamente 2 mL.
7. Se aforó a 2 mL con agua desionizada.
8. Se realizaron 2 lavados con hexano. Se agregó Hexano, se agitó 10 min en vortex, y se centrifugó 10 min a 4600 rpm. Con ayuda de un kitasato y vacío se extrajo con pipeta Pasteur la capa superior del extracto.
9. Se repitió esa extracción 2 veces.

10. Se filtró el líquido utilizando filtros de jeringa de 0,22  $\mu\text{m}$  y se colocaron en un vial.
11. Se inyectó la muestra en el LC-MS/MS realizando la lectura con el método apropiado.

### **Condiciones y parámetros instrumentales**

En los Cuadros 8 y 9 se identifica respectivamente las condiciones del inyector del instrumento HPLC-MS/MS y como el volumen de muestra inyectado, además se indica el gradiente que se definió para obtener la mejor separación de los analitos en el menor tiempo posible.

**Cuadro 8. Condiciones del inyector. Temperatura de la columna 35 °C. (Fuente: Elaboración propia).**

<b>Tipo de inyección</b>	Estándar	<b>Volumen</b>	20 $\mu\text{L}$
<b>Velocidad de succión</b>	200	<b>Velocidad de vaciado</b>	200

**Cuadro 9. Condiciones de la bomba del HPLC. (Fuente: Elaboración propia).**

Tiempo	Flujo (mL/min)	Disolvente A: Metanol- Ácido Fórmico (0.1%) (%)	Disolvente B: Agua - Ácido Fórmico (0.1%) (%)
0.000	0.300	10.0	90.0
1.000	0.300	10.0	90.0
5.000	0.300	50.0	50.0
7.000	0.300	50.0	50.0
7.100	0.400	10.0	90.0
12.900	0.400	10.0	90.0
13.000	0.300	10.0	90.0
13.500	Stop		

Los valores de optimización obtenidos para cada uno de los compuestos en cuestión se definieron según lo que se muestra en el Cuadro 10, luego de realizar una inyección por difusión directa en el detector MS/MS. Este cuadro indica los valores de iones precursores

y productos con sus respectivas energías de colisión definidos en el método instrumental en la polaridad positiva.

**Cuadro 10. Parámetros del espectrómetro de masas QQQ. Modo MRM (Fuente: Elaboración propia).**

Analito	Ion prec	Ion prod	CE (V)	Polaridad
Enrofloxacin	360.18	203.04	36	Positivo
	360.18	245.111	25	Positivo
	360.18	316.151	18	Positivo
Enrofloxacin D5	365.208	245.11	25	Positivo
Ciprofloxacina	332.148	203.054	34.8	Positivo
	332.148	245.111	22.6	Positivo
	332.148	288.111	16.3	Positivo
Ciprofloxacina D8	340.213	249.11	23.7	Positivo
Sarafloxacina	386.159	285.11	29.7	Positivo
	386.159	299.11	26.5	Positivo
	386.159	342.11	17.5	Positivo
Sarafloxacina D8	394.152	303.111	27.6	Positivo

### **Criterios de aceptación**

Los resultados se reportaron si los porcentajes de recuperación calculados para los estándares o muestras fortificadas de la curva de calibración se encontraron en un ámbito de 60-120, según se observa en el Cuadro 11 donde se muestran los porcentajes de aceptación, según CODEX (2009), dependientes de la concentración a la cual se fortificaron estas muestras en matriz.

La linealidad por su parte, se refiere al intervalo de concentración para el cual se obtiene una respuesta lineal y se determina promediando el valor de  $R^2$  de las curvas de calibración, las cuales deben cumplir con un valor de este parámetro mayor a 0.99 (CODEX, 2009).

**Cuadro 11. Criterios de aceptación según concentración para las muestras control. (Fuente: Elaboración propia).**

Concentración	Intervalo de recuperación (%)
$\leq 1 \mu\text{g/Kg}$	50 – 120
$>1 \mu\text{g/Kg} \leq 10 \mu\text{g/Kg}$	60 – 120
$> 10 \mu\text{g/Kg} \leq 100 \mu\text{g/Kg}$	70 – 120
$> 0,1 \text{ mg/kg} \leq 1 \text{ mg/kg}$	70 – 110

**Equipo de Protección**

- Gabacha
- Anteojos
- Guantes
- Capilla de extracción de gases

**Procedimientos de Cálculos**

Las concentraciones de la curva de calibración están expresadas en términos matriciales por lo que la interpolación realizada por el equipo de análisis empleado, arrojó el resultado de la concentración en la muestra directamente en unidades expresadas como  $\mu\text{g/kg}$ .

Para el cálculo el software del equipo HPLC-MS/MS realizó una regresión lineal de la curva de calibración por medio del método del estándar interno, lo cual implica que cada señal del analito obtenida estaba dividida por la señal del estándar interno y correlacionada con la concentración de la muestra, como se aprecia en la siguiente ecuación (LANASEVE, 2014), donde la Concentración (x) representa la variable independiente la cual deseamos calcular a partir de la ecuación de recta y S/SSTDI (y) constituye la variable dependiente.

$$\frac{S}{SSTDI} = m * \text{Conc} + b$$

Donde:

Conc = Concentración en muestra ( $\mu\text{g/kg}$ )

m = pendiente

S = Señal

SSTDI = Señal del estándar interno

b = intercepto en el eje y”

## **5.5 Tabulación, presentación y análisis de datos**

Los resultados que se obtuvieron se reportaron en concentraciones de  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de las moléculas en el huevo, las cuales se relacionan matemáticamente con una curva de calibración. Los porcentajes de recuperación obtenidos de las muestras y curvas de calibración, se mostraron en forma de figuras.

Los datos recolectados en la encuesta, que fue respondida mediante la aplicación formularios de Google Drive, que permite compartirlas en redes sociales, correos electrónicos y aplicaciones de mensajería, se tabularon mediante el uso de Excel y se presentaron por medio de gráficas.

## **5. Análisis y resultados**

Esta sección muestra los resultados obtenidos del muestreo, de curvas de calibración, las concentraciones de analitos cuantificadas y detectadas, así como de la encuesta aplicada a los consumidores. Se observan de manera gráfica la mayoría de estos resultados, con la finalidad de facilitar la comprensión de estos datos.

### **6.1 Ubicación y sitios de muestreo**

Se realizó un tipo de muestreo aleatorio entre las 1562 granjas ponedoras del censo avícola realizado por el Programa Nacional de Salud Aviar en el año 2016. El SENASA logró muestrear 63 granjas avícolas, en cada una de las cuales se tomó una muestra para el estudio (SENASA, 2016b), logrando así superar el número establecido por CODEX (Codex Alimentarius et al., 2015), en el que se indica que se deben tomar al menos 59 muestras si se quiere encontrar 5% de la población fuera de cumplimiento, esto con un 95% de confianza en el muestreo. Se definió toda la producción nacional de huevos como problemática, ya que no se contaba con ningún dato referente sobre la presencia o no de estos analitos en los huevos producidos en Costa Rica, destinados para consumo humano.

En la Figura 5 se pueden observar cada uno de los 63 puntos dónde se tomaron las muestras incluidas en esta investigación, con lo cual se demuestra el cumplimiento del primer objetivo específico planteado para este estudio.

La mayoría de muestras se tomaron en la región central occidental de país, lo cual se debe a que es allí donde se encuentran la mayor cantidad de granjas de producción de huevos del país, según el último censo agrícola (INEC, 2014). Sin embargo, es relevante también distinguir que el muestreo abarcó todas las provincias, lo cual generó un muestreo con suficiente representatividad y confiabilidad para un estudio exploratorio.

### **6.2 Curvas de calibración**

Las curvas de calibración se elaboraron a partir de la lectura muestras fortificadas a concentraciones conocidas de los analitos, estas muestras fueron preparadas sobre

matriz (huevo). Una vez leídas en el equipo, la curva se construyó automáticamente. Para el cálculo de las concentraciones, el equipo realizó una regresión lineal de la curva de calibración, por medio del método de estándar interno, por lo que cada señal obtenida fue dividida por la señal del estándar interno y correlacionada con la concentración en la muestra, para calcular así la concentración del analito presente en la misma.

Se ilustra, a continuación, individualmente una curva de calibración promedio para cada analito, creada a partir de la lectura de tres curvas de calibración en matriz huevo. El cálculo de la concentración de cada punto de la curva de calibración muestra la relación señal del analito entre la señal del SSTDI v/s la concentración en  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de cada punto de la curva. El ámbito de trabajo de cada curva está compuesto por 5 estándares de concentraciones de 1, 2, 5, 10 y 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Cada gráfica muestra también la ecuación de la recta y su coeficiente de correlación ( $R^2$ ), junto con las áreas obtenidas para cada analito.

### **Curva de calibración para la enrofloxacin**

La Figura 6 muestra la línea recta representando la curva de calibración obtenida del promedio de la lectura de tres curvas de calibración para enrofloxacin y las concentraciones de cada uno de sus puntos marcadas en color azul. Asimismo, se observan en color anaranjado las 13 muestras con concentraciones cuantificables de este compuesto encontradas, además de la ecuación de la recta y el coeficiente de correlación de la misma.

Se observa en dicha curva el valor de coeficiente de correlación ( $R^2$ ) superior a 0.99, lo cual significa una muy buena correlación entre las variables "x" y "y" y por tanto una predicción óptima en sus valores. Además, se refleja el cumplimiento de lo establecido por Codex en su normativa referente a validación de métodos analíticos (Codex, 2009) y se percibe una linealidad constante en todo el ámbito de trabajo establecido.

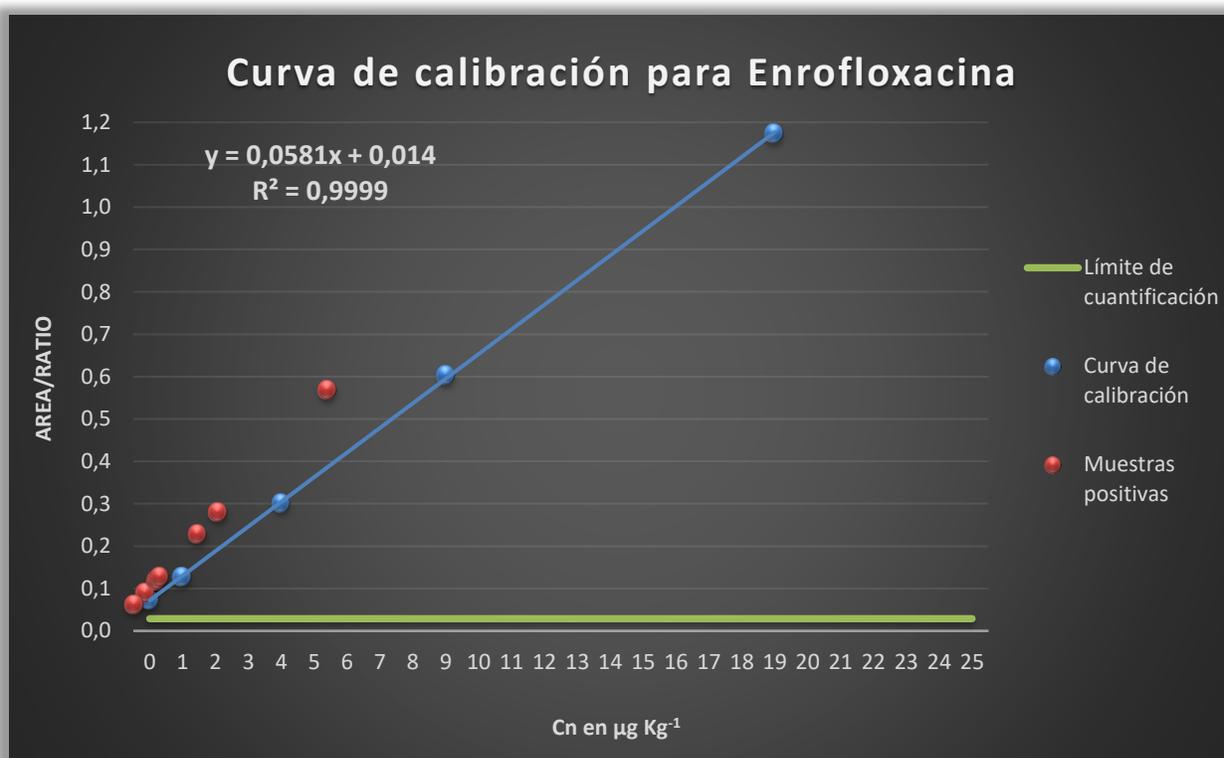


Figura 6. Curva de calibración para enrofloxacin. (Fuente: Elaboración propia).

### Curva de calibración para ciprofloxacina

En la Figura 7, se puede ver la línea recta que representa la curva de concentración y las concentraciones marcadas, las cuales están en el ámbito de trabajo de 1 a 20  $\mu\text{g/Kg}$  y se denotan de color azul. Además, se puede observar la ecuación de la recta y el coeficiente de correlación de la misma, mismo que tiene un  $R^2$  cercano a 1, lo cual indica que existe una muy buena correlación de las variables y que se cumple con lo establecido en los criterios de aceptación de Codex (Codex, 2009).

Para este compuesto se encontraron 2 muestras positivas que se pueden observar en el gráfico de color anaranjado, de las cuales una muestra presenta concentración muy alta, por lo cual fue necesario realizar un proceso de dilución (1/5) de la misma para reportar su concentración dentro del ámbito de trabajo de la curva de calibración.

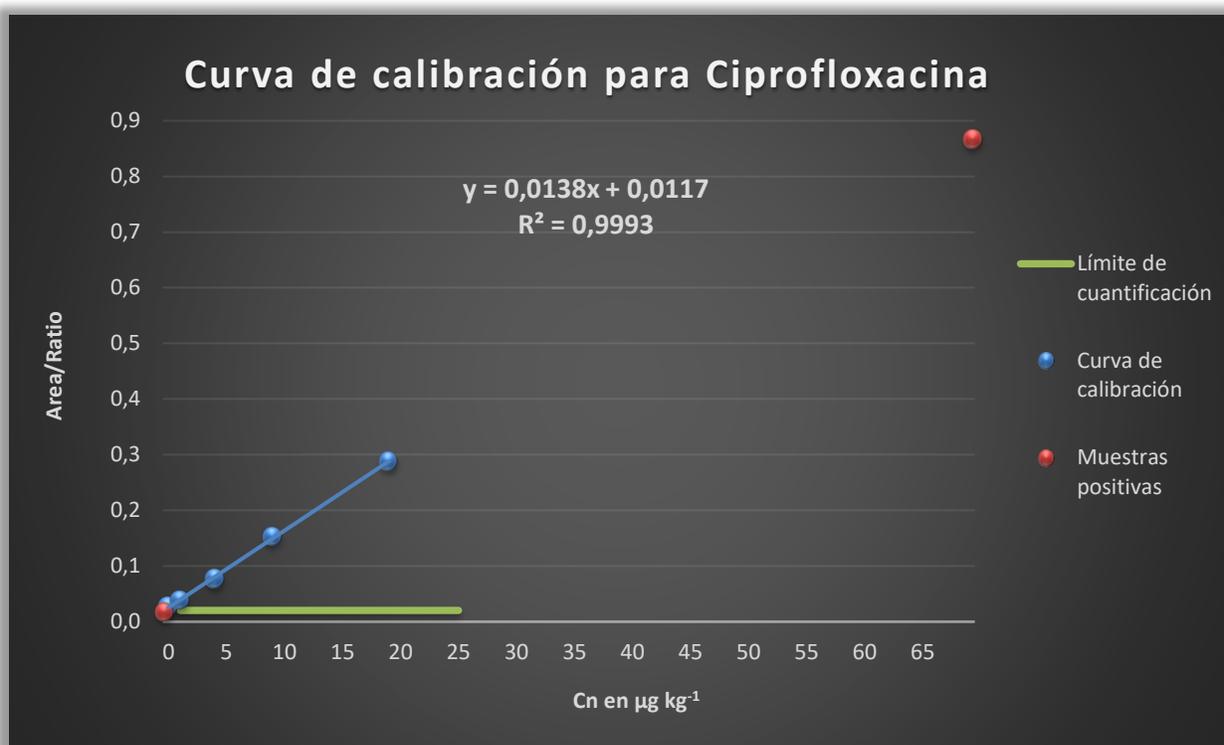


Figura 7. Curva de calibración para ciprofloxacina. (Fuente: Elaboración propia).

### Curva de calibración para la sarafloxacin

Se observa en la Figura 8, la línea recta que representa la curva de concentración y las concentraciones marcadas en color azul para la sarafloxacin, además se puede observar la ecuación de la recta y el coeficiente de correlación mayor a 0.99, lo cual implica que es significativa y cumple con los criterios de aceptación establecidos (Codex, 2009).

Para este compuesto no encontré ninguna muestra con concentraciones detectables.

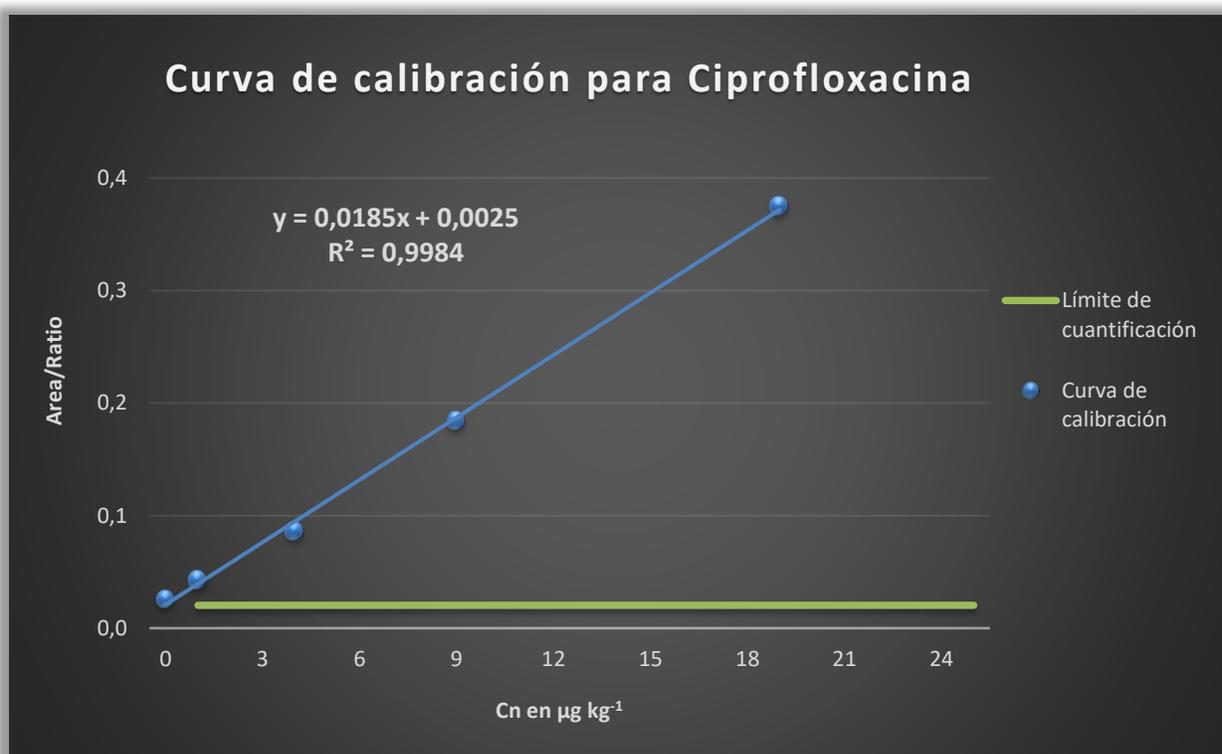


Figura 8. Curva de calibración para sarafloxacina. (Fuente: Elaboración propia).

### 6.3 Límites de detección y cuantificación

Utilizando los valores obtenidos, de relación señal /señal del SSTDI y de concentración, para las curvas de concentración mostradas en las Figuras 6, 7 y 8, se puede, por medio de una interpolación del valor obtenido de señal /señal del SSTDI para cada muestra, calcular la concentración del analito presente en la misma.

La mínima concentración que puede ser determinada del analito en un método es conocida como el Límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LC) es la menor concentración de analito que puede ser cuantificada con la precisión y exactitud adecuadas según *Codex Alimentarius* (CAC/GL 71-2009).

La estimación de los límites de detección y cuantificación se realizó utilizando las mismas curvas de calibración del punto anterior, los datos de las ordenadas en el origen de las curvas de calibración y su desviación estándar, valores que se calcularon en una matriz de estimación lineal.

Es conveniente recordar que los métodos analíticos cuantitativos, como el utilizado para el análisis de estas muestras, permiten la designación de los LD y LC para el mismo. Estos límites van de la mano con los LMR, ya que este valor va a ser lo que determine si el método es o no adecuado para este ensayo. Las normativas internacionales como (Codex Alimentarius, 2009) y (UE, 2005) señalan que para que el ensayo sea apropiado para esta cuantificación se debe obtener un método que logre cuantificar la mitad del LMR para la molécula en estudio. Sin embargo, en el caso específico de los compuestos analizados en la matriz huevo, no existen LMR establecidos, debido a que es prohibido el uso de estos antibióticos en las aves ponedoras.

La metodología analítica utilizada y los buenos resultados de linealidad en las curvas de calibración evidencian que las concentraciones cuantificadas en las muestras son exactas y precisas, lo cual permitió cumplir satisfactoriamente con el objetivo planteado vinculado a la evaluación del contenido de FQ en lotes de huevos producidos en Costa Rica.

#### **6.4 Concentraciones cuantificadas de fluoroquinolonas en las muestras analizadas**

En el Cuadro 12, se observan los valores correspondientes de concentración, para cada una de las muestras en las que se logró cuantificar y detectar el analito. Los valores obtenidos en las curvas de calibración cumplen con los criterios de aceptación de porcentaje de recuperación en el ámbito de trabajo de 1 a 10 µg/Kg, así como en la linealidad (coeficiente de correlación  $R^2$ ) al estar todos por encima de 0.99, lo que permite confiar en las concentraciones detectadas cuantificadas en las muestras analizadas.

El cuadro presenta diez muestras con concentraciones cuantificables de enrofloxacin o ciprofloxacina, y en dos casos de ambas moléculas. Es importante señalar que las normativas dictan que estas concentraciones, aunque sólo se detecte uno de los analitos deben reportarse como la suma de ambos, ya que uno es el metabolito del otro.

La concentración mayor cuantificada de enrofloxacin y ciprofloxacina fue en la muestra 49, donde se reporta 70,40 µg/kg y en el otro extremo encontramos que la menor

concentración cuantificada fue 0.55 ug/kg en la muestra número 29. Así mismo, en otras ocho muestras se logró detectar una concentración de estos analitos que, aunque estaban presentes en la muestra, no son posibles de cuantificar debido a que mostraban concentraciones menores al LC. Estas muestras fueron las 1, 3, 14, 55, 58, 59, 61 y 62 que se muestran el Cuadro.

**Cuadro 12. Concentraciones de analito cuantificadas y detectadas en las muestras. (Fuente: Elaboración propia).**

Muestra	Conc (ug/kg) Detectada y cuantificada como la sumatoria de enro y ciprofloxacina
1	0,42
3	0,38
14	0,50
23	0,86
28	1,20
29	0,55
32	6,40 + 0,67
33	2,46
42	3,08
49	70,40
50	0,59
54	1,25
55	0,45
57	1,31+ 0,96
58	0,34
59	0,47
61	0,45
62	0,41

Estos datos generados mediante el muestreo y análisis por HPLC-MS/MS de lotes de huevos producidos en Costa Rica ratifican el cumplimiento del objetivo general de esta investigación, mismo que radica en diagnosticar la prevalencia de residuos de FQ en este alimento; ya que se encontró que el 28,6% de las muestras analizadas contenía residuos de estos antibióticos, los cuales están catalogados como prohibidos para uso en la producción de huevos.

Así mismo, se deduce de estos datos que la hipótesis planteada: los huevos producidos en Costa Rica para consumo humano contienen residuos de sarafloxacina, enrofloxacina y ciprofloxacina, antibióticos de uso prohibido en este proceso y los cuales eventualmente podrán contribuir a aumentar la resistencia antimicrobiana y causar pérdidas tanto humanas como económicas, se confirma con estos resultados.

## **6.5 Ubicación geográfica de las muestras positivas**

En la Figura 9 se puede observar el mapa de Costa Rica y la localización geográfica de los puntos de cada una de las 63 granjas donde fueron tomadas las muestras incluidas en este estudio los cuales se representan con puntos. Así mismo, se observan en dicha figura en color rojo, los puntos que representan las 10 muestras positivas para enrofloxacina y ciprofloxacina.

Es interesante destacar que a pesar de que la mayoría de muestras fueron tomadas en la región central occidental del país, las muestras positivas están en cinco de las siete provincias del país, lo cual sugiere que el antibiótico se utiliza a nivel nacional por los productores.

Otra posible causa de la presencia de estos residuos en los huevos es que el alimento que se le da a las aves ponedoras esté contaminados con trazas de estos compuestos, lo cual ocurre en ocasiones por una contaminación cruzada en este proceso de producción, el cual debe regirse por las buenas prácticas de manufactura según (Codex Alimentarius, 2004).

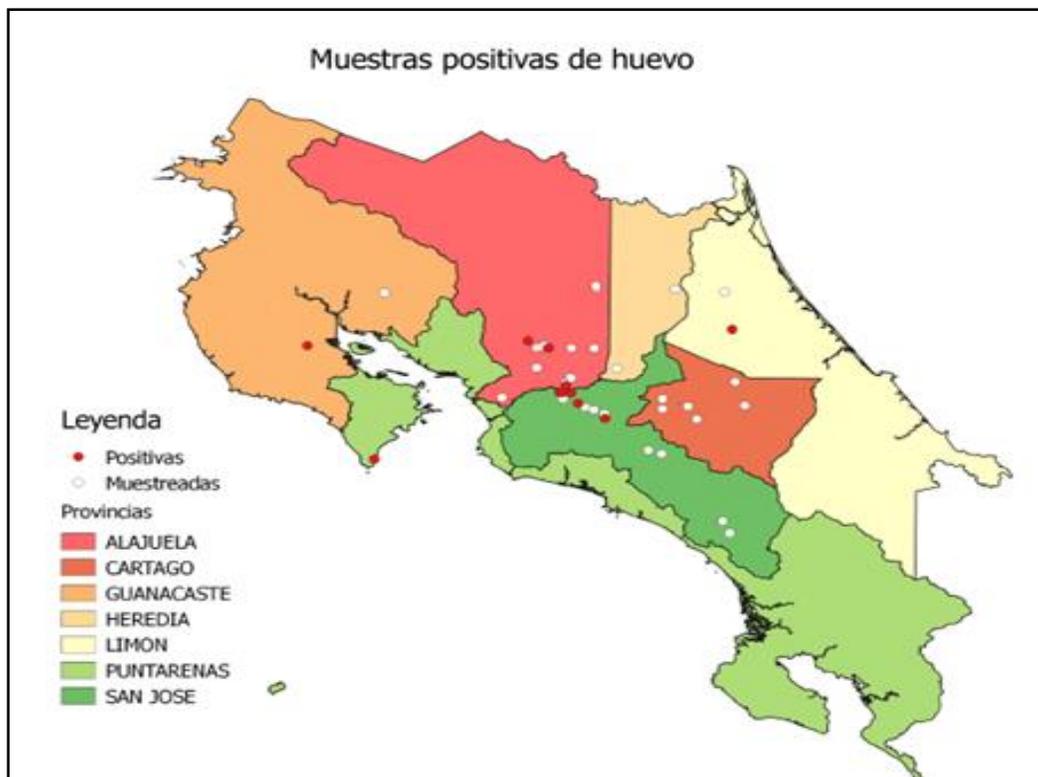


Figura 9. Ubicación geográfica de las muestras positivas de huevo. (Fuente: Elaboración propia).

## 6.6 Muestras detectadas con residuos

En color amarillo la Figura 10 presenta las muestras en las que se logró detectar una concentración de residuos, que, aunque el método analítico no permite cuantificar, si permite asegurar que hay una cantidad de estas sustancias. Además, se observan en color rojo las muestras positivas que sí se lograron cuantificar con esta metodología analítica, que es la aceptada a nivel mundial como método confirmatorio para residuos de medicamentos veterinarios en alimentos (Wang et al., 2012).



estos datos no es validable, se logra a través de estos entender la percepción del consumidor respecto al tema en estudio.

Las respuestas recolectadas revelan que solamente el 3% de los encuestados no consumen huevos. Del restante 97% que sí lo consume en su dieta habitual, 46% consume de 3 a 6 huevos por semana, 36% consume entre 1 y 3 y 18% consume de 7 a 10; lo cual deja entrever que es un alimento bastante consumido por la población.

La clase de huevos que más consumen los participantes en la encuesta, son los regulares, estos corresponden a los que se analizaron en este estudio y son los adquiridos por el 74% de la población. Sólo un 14% de los consumidores acostumbran consumir huevos orgánicos o producidos en casa, y el restante 12% consume tanto los regulares como los orgánicos y los producidos en casa.

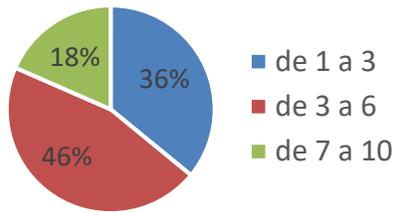
El 96% de los encuestados consideran importante que en Costa Rica se realice un monitoreo de residuos de antibiótico en este alimento, mismo porcentaje que considera importante tener acceso a esa información. Sólo a un 4% de la población consultada no le interesa conocer la temática.

Un resultado sobresaliente es que el 82% de los participantes contestaron que, de conocer que los huevos que consumen contienen residuos de antibióticos, disminuirían el consumo de este alimento.

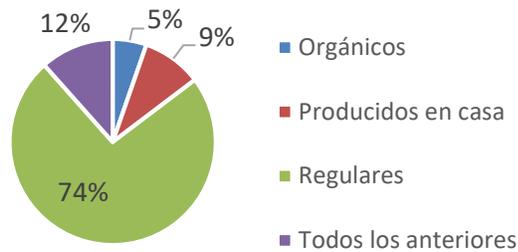
Las respuestas tabuladas de manera gráfica se pueden observar en las Figura 11.



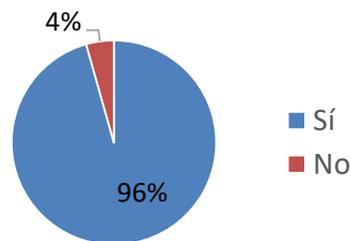
¿Cuántos huevos por semana consume habitualmente?



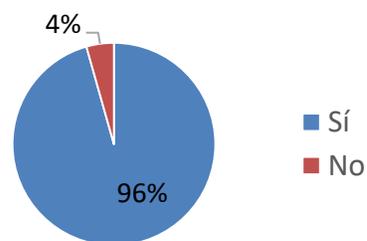
¿Qué tipo de huevos consume con mayor frecuencia?



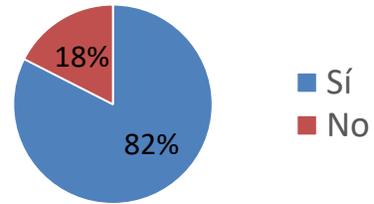
¿Considera usted importante que en Costa Rica se realice el monitoreo de residuos de antibiótico en este alimento?



¿Usted como consumidor considera importante tener acceso a esa información?



De determinarse que los huevos contienen residuos de estas sustancias, ¿disminuiría usted el consumo de este alimento?



**Figura 11. Resultados de la encuesta a consumidores de huevo en Costa Rica (Fuente: Elaboración propia).**

## 7. Conclusiones y recomendaciones

### 7.1 Conclusiones

- 7.1.1 Se logró cuantificar, en algunos de los huevos producidos en Costa Rica para consumo humano, según los resultados de la página 45, concentraciones de enrofloxacin y ciprofloxacina mayores a 0,55 µg/Kg, lo que implica, además de un riesgo para la salud de los consumidores y para el incremento de la RAM, un uso indebido de estos antibióticos y una necesidad de concientizar sobre buenas prácticas veterinarias y buenas prácticas de manufactura a los productores nacionales.
- 7.1.2 De acuerdo a los resultados reportados en la página 45, Cuadro 12, se comprobó que los productores de huevo en Costa Rica, están utilizando, medicamentos que están contraindicados para tal fin lo que permite aceptar la hipótesis planteada en este trabajo; siendo una posibilidad asimismo que estos residuos puedan provenir de contaminación cruzada del proceso de fabricación de piensos, lo cual abre puertas para futuras investigaciones en este campo.
- 7.1.3 Las curvas de calibración obtenidas bajo esta metodología analítica que se encuentra validada y certificada bajo la norma ISO/IEC 17025:2005, muestran valores de R<sup>2</sup> muy cercanos a 1 para cada analito como se muestra en las Figuras 6, 7 y 8 de las páginas 41, 42 y 43 respectivamente. Estos valores indican que son aptas para interpolar concentraciones confiables de estas moléculas y cumplen con este parámetro de aceptación establecido en las normativas del Codex Alimentarius y UE para validación de métodos confirmatorios por HPLC-MS/MS para residuos de medicamentos veterinarios (Comunidades Europeas, 2002).
- 7.1.4 El método analítico utilizado para el análisis de FQ en huevo permitió la identificación y cuantificación de enrofloxacin, ciprofloxacina y sarafloxacina, lo cual habilita el monitoreo rutinario de estos antibióticos y contribuye a la vez al diagnóstico de la situación actual de la presencia de residuos de medicamentos veterinarios utilizados en la producción de huevos. Conjuntamente apoya la implementación de las directrices Codex Alimentarius relacionadas con la

Resistencia Antimicrobiana (RAM) y la vigilancia del uso correcto y prudente de los antibióticos en la producción de alimentos.

- 7.1.5 En ocho de las 63 muestras recolectadas al azar en las granjas productoras de huevo para consumo humano de todo el país (12,7%), se cuantificaron residuos de los antibióticos estudiados, mientras que en otras diez muestras (15,9%) se pudo detectar la presencia de estas moléculas, lo cual representa un diagnóstico de la prevalencia de residuos de estos antibióticos, en los huevos de gallina producidos en Costa Rica para consumo humano, propuesto como objetivo general de esta investigación, además de evidenciar que ambas situaciones representan un riesgo para la salud pública y para el incremento del problema de la RAM.
- 7.1.6 El estudio evidencia que se está dando un uso inadecuado de los medicamentos veterinarios que contienen enrofloxacin como principio activo, en algunas granjas productoras de huevo para consumo humano de Costa Rica.
- 7.1.7 Los resultados permiten evidenciar la necesidad de crear políticas regulatorias, que reglamenten la producción de huevo y de mejorar la educación y comunicación con los productores y consumidores nacionales, lo cual se planteó como objetivo de este estudio que se da por cumplido.
- 7.1.8 Los resultados generados pueden servir de base para que las autoridades responsables tomen las acciones pertinentes para con los productores de huevos, en pro de procurar el correcto uso de los medicamentos veterinarios, específicamente los antibióticos, mediante la generación de normativas estrictas que establezcan lineamientos para el uso adecuado y prudente de los antibióticos; según lo estipula la OIE en su Código sanitario para animales terrestres (OIE, 2015) y el Codex Alimentarius en su documento Límites máximos de residuos (LMR) y recomendaciones sobre la gestión de riesgos (RGR) para residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos (Codex Alimentarius, 2018).
- 7.1.9 Un 96% de los encuestados concuerdan en que es importante que en Costa Rica se lleve a cabo un monitoreo de los huevos, y que ésta información debe ser conocida por los consumidores.

7.1.10 La información generada en este muestreo nacional y en la encuesta realizada a los consumidores, puede ser utilizada como base en las mesas de discusión para su análisis y para iniciar un diálogo entre los actores involucrados que permita sentar las bases para crear políticas regulatorias sobre el uso adecuado de medicamentos antimicrobianos en animales. Estas políticas contribuirán a que el país progrese en el tema de análisis de riesgos de la RAM, ya que es un requisito mundial aplicar el concepto *Una Salud* para gestionar el riesgo que este problema puede representar en los sistemas de salud (OMS, 2017).

## 7.2 Recomendaciones

- 7.2.1 Se recomienda el establecimiento de un programa de monitoreo para el análisis de estas enrofloxacin y ciprofloxacina en los huevos producidos en el país.
- 7.2.2 Establecer programas nacionales de vigilancia y de seguimiento de la resistencia a los agentes antimicrobianos, seguimiento de las cantidades y patrones de utilización de agentes antimicrobianos en los animales destinados a la alimentación; uso responsable y prudente de agentes antimicrobianos en medicina veterinaria y análisis del riesgo asociado a la resistencia a los agentes antimicrobianos.
- 7.2.3 Para contrarrestar y evitar las malas prácticas de uso de medicamentos antibacterianos en animales, se recomienda es establecer disposiciones de registro sanitario y control de los medicamentos para uso veterinario, productos afines y establecimientos.
- 7.2.4 Establecer las normativas necesarias para regular los medicamentos veterinarios que contengan antibióticos que sólo puedan ser comercializados bajo receta extendida por un médico veterinario.
- 7.2.5 Se recomienda que, el SENASA como institución responsable de la salud pública veterinaria, establezca un programa de educación para los productores, que sea específicamente sobre la RAM, uso adecuado de antimicrobianos y efectos negativos que el mal uso de estos medicamentos puede generar.
- 7.2.6 Dar a conocer al consumidor los resultados de los estudios realizados en materia de seguridad alimentaria por parte de las autoridades competentes en este campo.

## 8. Fuentes de consulta

- Álvarez, M. (2013). *Prevalencia de bacterias resistentes a antibióticos en productos avícolas: influencia de diferentes factores y consecuencias para la seguridad alimentaria* (tesis doctoral). Universidad de León.
- Álvarez, D., Garza, S., & Vázquez, R. (2015). Quinolonas. Perspectivas actuales y mecanismos de resistencia. *Rev Chilena Infectol*, 32(5), 499–504. Recuperado de: [https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0716-10182015000600002](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182015000600002)
- Barquero, M. (2014, November 6). Baja en producción de huevo provoca escasez en comercio. *La Nación*. Recuperado de: [http://www.nacion.com/economia/consumidor/Baja-produccion-provoca-escasez-comercio\\_0\\_1449655043.html](http://www.nacion.com/economia/consumidor/Baja-produccion-provoca-escasez-comercio_0_1449655043.html)
- Barrientos, M. (2006). *Estudio cualitativo de las quinilonas y fluoroquinolonas importadas y autorizadas para su uso y disposición en medicina y en veterinaria en Chile, en el período 2002-2005*. Universidad Austral de Chile.
- Calderón, G., & Aguilar, L. (2016). Resistencia antimicrobiana: microorganismos más resistentes y antibioticos con menor actividad. *Revista Médica de Costa Rica Y Centroamérica* LXXIII, 757–763. Recuperado de: <http://www.binasss.sa.cr/revistas/rmcc/621/art03.pdf>
- Carbajal, Á. (2014). *Nutricional Y Relación Con La Salud*. Madrid. Recuperado de: <https://www.ucm.es/data/cont/docs/458-2014-09-06-ConsumoHuevosCalidadNutricionalCARBAJAL-2014.pdf>
- Codex Alimentarius. (2003). Glosario de términos y definiciones para Residuos de Medicamentos Veterinarios en los Alimentos. In *CODEX MISC* (p. 4). Recuperado de: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/vetdrugs/glossary/es/>
- Codex Alimentarius. Código de prácticas sobre buena alimentación animal, Cac/Rcp § (2004).

Codex Alimentarius. (2018). Límites máximos de residuos (LMR) y recomendaciones sobre la gestión de riesgos (RGR) para residuos de medicamentos veterinarios. Recuperado de: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/es/?Ink=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCAC%2BMRL%2B2%252FMRL2s.pdf>

Codex Alimentarius. (2009). *Directrices para el diseño y la implementación de programas nacionales reglamentarios de aseguramiento de inocuidad alimentaria relacionados con el uso de medicamentos veterinarios en los animales destinados a la producción de alimentos CAC/GL 71-2009*. Recuperado de:

[http://www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/livestockgov/documents/CXG\\_071s.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/livestockgov/documents/CXG_071s.pdf)

Comunidades Europeas, C. (2002). Decisión de la Comisión 2002/657/CE de 12 de agosto de 2002 por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*, 221, 8-36.

Erazo, S. (2011). Rigor científico en las prácticas de investigación cualitativa. *Ciencia, Docencia y Tecnología*, (42), 107–136. Recuperado de: [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1851-17162011000100004&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-17162011000100004&lng=es&nrm=iso&tlng=es)

European Food Safety Authority & European Centre for Disease Prevention and Control. (2016). The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in Antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in the European Union in 2014. *EFSA Journal*, 14(2), 4380. Recuperado de: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4380>

FAO. (2016). FAO - Noticias\_ La FAO pide una acción internacional frente a la resistencia a los antimicrobianos. Recuperado de: <http://www.fao.org/news/story/es/item/382676/icode/>

FAO/OMS/OIE. (2011). *Reunión conjunta FAO/OMS/OIE de expertos sobre los antimicrobianos de importancia crítica*.

- Farrell, D. (2013). Función de las aves de corral en la nutrición humana. *FAO*, 1–2. Recuperado de: [http://guzlop-editoras.com/web\\_des/agri01/avicola/pld1406.pdf#page=54](http://guzlop-editoras.com/web_des/agri01/avicola/pld1406.pdf#page=54)
- García, N. (2015). *Campylobacter. Control microbiológico y Mecanismos de resistencia bacteriana a antibióticos* (tesis de grado). Universidad de Alcalá.
- González, G., Cordero, N., García, P., & Figueroa, G. (2013). Análisis molecular de la resistencia a fluoroquinolonas y macrólidos en aislados de *Campylobacter jejuni* de humanos, bovinos y carne de ave. *Rev Chilena Infectol.* 30(2), 135–139.
- González, R., Moreno, L., Bolaños, P., Garrido, A., & Martínez, L. (2007). Empleo De La Espectrometría De Masas Como Herramienta Para La Determinación De Tóxicos En Alimentos: Hacia La Seguridad Alimentaria. *Rev Esp Salud Pública*, N°5 Setiem, 461–474. Recuperado de: <https://doi.org/10.1590/S1135-57272007000500004>
- Hao, H., Ren, N., Han, J., Foley, S. L., Iqbal, Z., Cheng, G., ... Yuan, Z. (2016). Virulence and genomic feature of multidrug resistant *Campylobacter jejuni* isolated from broiler chicken. *Frontiers in Microbiology*, 7(OCT), 1–14. Recuperado de: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01605>
- Hassouan, M. K. (2006). *Desarrollo de nueva metodología analítica para la determinación de quinolonas en alimentos de origen animal* (tesis doctoral). Universidad de Granada, España. Recuperado de: <https://hera.ugr.es/tesisugr/16473991.pdf>
- Hernández, C., Angarita, M., & Prada, F. (2017). Impacto del uso de antimicrobianos en medicina veterinaria The antimicrobials use impact on veterinary medicine. *Revista Ciencia Y Agricultura (Rev. Cien. Agri.) Tunja*, 14(2), 27–38. Recuperado de: <https://doi.org/10.19053/01228420.v14.n2.2017.7146>
- Hernández Sampieri, R., Collado, Fernández, C., & Baptista Lucio, M. del P. (2010). *Metodología de la investigación*. (I. Editores, Ed.) (Quinta). Hill, Mc Graw.
- INCIENSA. (2014). *Informe de vigilancia basada en laboratorio: Salmonella, Costa Rica, 2013*. Recuperado de

[https://www.inciensa.sa.cr/vigilancia\\_epidemiologica/informes\\_vigilancia/2014/Bacterias/Vigilancia%20basada%20en%20laboratorio%20de%20Salmonella,%20Costa%20Rica,%202013.pdf](https://www.inciensa.sa.cr/vigilancia_epidemiologica/informes_vigilancia/2014/Bacterias/Vigilancia%20basada%20en%20laboratorio%20de%20Salmonella,%20Costa%20Rica,%202013.pdf) [Consulta 15 feb. 2018]

INEC. (2014). *VI Censo Nacional Agropecuario 2014*. (I. N. de Estadísticas, Ed. VI). Costa Rica.

Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. (2010). *La Agricultura de Costa Rica: Situación al 2010, su evolución y prospectiva*. San José, Costa Rica. Recuperado de: <http://orton.catie.ac.cr/repdoc/A7612E/A7612E.PDF>

Jimenez Díaz, I., Zafra Gómez, A., Ballesteros, O., & Navalón, A. (2014). Determinación de residuos de quinolonas en alimentos de origen animal. Tendencias actuales. *Boletín Graseqa*, N°7, 32–40. Recuperado de: [http://seqa.es/graseqa2012/boletin\\_graseqa\\_7\\_2014.pdf](http://seqa.es/graseqa2012/boletin_graseqa_7_2014.pdf)

Junza, A. (2016). *Desarrollo de métodos de determinación e identificación de antibióticos y sus metabolitos en alimentos de origen animal por LC-MS y LC-MS/MS* (tesis doctoral). Universidad de Barcelona.

Junza, A. (2016b, September 9). *Desarrollo de métodos de determinación e identificación de antibióticos y sus metabolitos en alimentos de origen animal por LC-MS y LC-MS/MS*. Universitat de Barcelona. Recuperado de: <http://www.tdx.cat/handle/10803/308127>

López, M. (2007). *Tratamientos antimicrobianos en medicina veterinaria: efectos sobre la microbiota intestinal de pollos y su repercusión en carnes de producción convencional y ecológica*. (Tesis de doutoramento da Universidade de Santiago de Compostela). Universidade de Santiago de Compostela, Servizo de Publicacións e Intercambio Científico. Recuperado de: [https://books.google.co.cr/books?id=8hg3IK-q7MgC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](https://books.google.co.cr/books?id=8hg3IK-q7MgC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)

Lozano, M., & Arias, D. (2008). Residuos de fármacos en alimentos de origen animal: panorama actual en Colombia. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 21,

121–135. Recuperado de: <file:///C:/Users/wbarrantes/Downloads/324262-110335-1-PB.pdf>

MAG-MEIC-COMEX. (2010). Política Nacional de Inocuidad de los Alimentos, N° 35960 § (2010). Costa Rica. Recuperado de: <http://reventazon.meic.go.cr/informacion/legislacion/codex/35960.pdf>

MARAN. (2015). *Monitoring of Antimicrobial Resistance and Antibiotic Usage in Animals in the Netherlands in 2014*. Amsterdam. Recuperado de: [http://www.swab.nl/swab/cms3.nsf/uploads/4F5A0D8E6F0DD139C1257E6E0051833A/\\$FILE/NethmapMaran2015\\_webversie.pdf](http://www.swab.nl/swab/cms3.nsf/uploads/4F5A0D8E6F0DD139C1257E6E0051833A/$FILE/NethmapMaran2015_webversie.pdf)

Mardones, G., & López, J. (2017, May). Revisión IMPLICANCIAS DE *Campylobacter* spp. COMO PATÓGENO ALIMENTARIO. *Chilean J. Agric. Anim. Sci., Ex Agro-Ciencia*, 33(1), 73–83. Recuperado de: <http://www.scielo.cl/pdf/chjaasc/v33n1/0719-3890-chjaasc-02005.pdf>

Máttar, S., Calderón, A., Sotelo, D., Sierra, M., & Tordecilla, G. (2009). Detección de Antibióticos en Leches: Un Problema de Salud Pública. *Revista de Salud Pública*, 11(4), 579–590. Recuperado de: <https://doi.org/10.1590/S0124-00642009000400009>

McCrackin, M. A., Helke, K. L., Galloway, A. M., Poole, A. Z., Salgado, C. D., & Marriott, B. p. (2016). Effect of Antimicrobial Use in Agricultural Animals on Drug-resistant Foodborne *Campylobacteriosis* in Humans: A Systematic Literature Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(13), 2115–2132. Recuperado de: <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1119798>

MINECO, CONACYT, MIFIT, SIC, & MEIC. (2010). Reglamento Técnico Centroamericano, Medicamentos veterinarios y productos afines. Recuperado de: [https://members.wto.org/crnattachments/2008/sps/CRI/08\\_3901\\_00\\_s.pdf](https://members.wto.org/crnattachments/2008/sps/CRI/08_3901_00_s.pdf)

Morrison, F. (2015). Antimicrobial resistance. *Longevity Bulletin From the Institute and Faculty of Actuaries*, 3(7), 51–180. Recuperado de: <file:///C:/Users/wbarrantes/Downloads/Longevity%2520Bulletin%2520Issue%25208%2520FINAL%2520FOR%2520ONLINE.pdf>

- Moudgil, P., Bedi, J. S., Moudgil, A. D., Gill, J. P. S., & Aulakh, R. S. (2017). Emerging issue of antibiotic resistance from food producing animals in India: Perspective and legal framework. *Food Reviews International*, 9129(May), 1–16. Recuperado de: <https://doi.org/10.1080/87559129.2017.1326934>
- Nelson, J. M., Chiller, T. M., Powers, J. H., & Angulo, F. J. (2007). Fluoroquinolone-Resistant *Campylobacter* Species and the Withdrawal of Fluoroquinolones from Use in Poultry: A Public Health Success Story. *Clinical Infectious Diseases*, 44, 977–80. Recuperado de: <https://doi.org/10.1086/512369>
- OECD/FAO. (2015). OECD-FAO Agricultural Outlook 2015 (Summary in Spanish) / OECD-FAO Perspectivas Agrícolas 2015 | OECD READ edition. Retrieved July 31, 2015, Recuperado de: [http://www.keepeek.com/Digital-Asset-Management/oecd/agriculture-and-food/oecd-fao-agricultural-outlook-2015/summary/spanish\\_eafacee1-es#page1](http://www.keepeek.com/Digital-Asset-Management/oecd/agriculture-and-food/oecd-fao-agricultural-outlook-2015/summary/spanish_eafacee1-es#page1)
- OIE. (2012). Código sanitario para los animales terrestres. París, Francia. Recuperado de: [www.oie.int](http://www.oie.int)
- OIE. (2015) Código Sanitario para los Animales Terrestres.
- Olaya, J. A., Gómez, A. P., Álvarez, D. C. M., Soler, D., Romero, J. R., & Villamil, L. C. (2010). Las enfermedades infecciosas y su importancia en el sector avícola. *Revista de Medicina Veterinaria*, 20, 49–61.
- OMS. (2014). Enfermedades de transmisión alimentaria. Recuperado de: [http://www.who.int/topics/foodborne\\_diseases/es/](http://www.who.int/topics/foodborne_diseases/es/)
- OMS. (2015a). *Estimaciones de la oms sobre la carga mundial de enfermedades de transmisión alimentaria*. Recuperado de: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/200047/1/WHO\\_FOS\\_15.02\\_spa.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/200047/1/WHO_FOS_15.02_spa.pdf)
- OMS. (2015b). OMS | Inocuidad de los alimentos. Retrieved June 15, 2017, Recuperado de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs399/es/>
- OMS. (2015c). Resistencia a los antimicrobianos. World Health Organization. Recuperado de: <https://www.who.int/es/news-room/factsheets/detail/resistencia-a-los-antibi%C3%B3ticos>

- Otero, J. L., Mestorino, N., & Errecalde, J. O. (2000). *Enrofloxacin: una fluorquinolona de uso exclusivo en veterinaria parte i: química, mecanismo de acción, actividad antimicrobiana y resistencia bacteriana*. Recuperado de [http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/11128/Documento\\_completo\\_.pdf?sequence=1](http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/11128/Documento_completo_.pdf?sequence=1)
- Pikkemaat, M., Yassin, H., van der Fels-Klerx, H., & Berendsen, B. (2016). Antibiotic Residues and Resistance in the Environment. *RIKILT Report 2016.009*, 32. Recuperado de: Antibiotic Residues and Resistance in the Environment. *RIKILT Report 2016.009*
- Redgrave, L. S., Sutton, S. B., Webber, M. A., & Piddock, L. J. V. (2014). Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends in Microbiology*, 22(8), 438–445. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.04.007>
- Rocha, D. G., Santos, F. A., da Silva, J. C. C., Augusti, R., & Faria, A. F. (2015). Multiresidue determination of fluoroquinolones in poultry muscle and kidney according to the regulation 2002/657/EC. A systematic comparison of two different approaches: Liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry or tandem mass spe. *Journal of Chromatography A*, A(1379), 83–91. Recuperado de: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v32n1/a20v32n1.pdf>
- Saénz, M. V. (2001). *Diagnóstico general sobre la situación de inocuidad de alimentos en Costa Rica*. (F. Rocabado & S. Murillo, Eds.). San José, Costa Rica.
- SAGARPA. (2007). Producción y manejo de aves de traspatio. *Programa Especial Para La Seguridad Alimentaria*, 32. Recuperado de: [http://www.sagarpa.gob.mx/desarrolloRural/AsistenciaCapacitacion/Documents/red del conocimiento/manuales pesa/manejo\\_aves.pdf](http://www.sagarpa.gob.mx/desarrolloRural/AsistenciaCapacitacion/Documents/red%20del%20conocimiento/manuales%20pesa/manejo_aves.pdf)
- Santander, A. F. (2015). *Evaluación de la actividad de enfermedades virales en explotaciones de ponedoras comerciales de fómeneque, cundinamarca* (tesis de maestría). Universidad de La Salle.
- Secretaría Ejecutiva de Planificación Sectorial Agropecuaria. (2014). *Boletín*

*Estadístico Agropecuario 2010-2013*. (Vol. 24). San José, Costa Rica.

SENASA. (2014). *Resultados Plan Nacional de Residuos 2014*. Heredia, Costa Rica.

SENASA. (2015). Plan Nacional de Residuos 2015 en productos acuícolas. Heredia, Costa Rica.

SENASA. (2016a). Medidas de Control ante resultados No conformes. Heredia, Costa Rica.

SENASA. (2016b). *Muestreo exploratorio de huevos*. Heredia, Costa Rica.

Silbergeld, E. K., Graham, J., & Price, L. B. (2008). Industrial Food Animal Production, Antimicrobial Resistance, and Human Health. *Annu. Rev. Public Health, 29*, 151–69. Recuperado de: <https://doi.org/10.1146/annurev.publhealth.29.020907.090904>

Šupraha, P., & Balen, M. (2017). Increase of resistance to fluoroquinolone and retained susceptibility to macrolides of *Campylobacter* isolates in Croatia. *Infectious Diseases, 4235*(May), 1–4. Recuperado de: <https://doi.org/10.1080/23744235.2017.1325513>

Szczepanska, B., Andrzejewska, M., Spica, D., & Klawe, J. J. (2017). Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from children and environmental sources in urban and suburban areas. *BMC Microbiology, 17*. Recuperado de: <https://doi.org/10.1186/s12866-017-0991-9>

Talero, V., Medina, O., & Rozo, W. (2014). Técnicas analíticas contemporáneas para la identificación de residuos de sulfonamidas, quinolonas y cloranfenicol. *Universitas Scientiarum, 19*(1), 11–28. Recuperado de: <file:///C:/Users/Dell/Downloads/6618-Article%20Text-28300-1-10-20140206.pdf>

Unión Europea. (2015). Reglamento (UE) 37/210 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 la Unión Europea, 15* 1-72.

Van Boeckel, T. P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B. T., Levin, S. A., Robinson, T.

- P., Laxminarayan, R. (2015a). Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(18), 5649–5654. Recuperado de: <https://doi.org/10.1073/pnas.1503141112>
- Van Boeckel, T. P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B. T., Levin, S. A., Robinson, T. P., Laxminarayan, R. (2015b). Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(18), 5649–5654. Recuperado de: <https://doi.org/10.1073/pnas.1503141112>
- Wang, J., MacNeil, J. D., & Kay, J. F. (2012). *Chemical analysis of antibiotic residues in food*. New Jersey: Wiley.
- Weiler, N., Orrego, M., Alvarez, M., Huber, C., Ortiz, F., & Perez, J. (2017). Primeros resultados de la vigilancia integrada de la resistencia antimicrobiana de patógenos transmitidos por alimentos , *Campylobacter spp . y Salmonella spp . en tres poblaciones distintas. Paraguay. 2011-2012. Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud*, 15(2), 64–72.
- WHO. (2014). *Antimicrobial resistance. Fact Sheet 194*. World Health Organization. Recuperado de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>
- Wieczorek, K., & Osek, J. (2013). Antimicrobial Resistance Mechanisms among *Campylobacter*. *BioMed Research International*, 2013, 1–12. Recuperado de: <https://doi.org/10.1155/2013/340605>
- Yan, L., Hongyu, Z., Liu, Y., Xuping, Z., Wang, J., Tiantian, L., ... Xiaolin, H. (2015). Characterization of quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Indiana from chickens in China. *Poultry Science*, 94(3), 454–460. Recuperado de: <https://doi.org/10.3382/ps/peu133>

## 9. ANEXOS

### Anexo 1: Límites máximos de residuos para Costa Rica



Anexo 1. LMR Costa  
Rica.pdf

## Anexo 2: Apéndice A del documento “Directrices para el diseño y la implementación de programas nacionales reglamentarios de aseguramiento de inocuidad alimentaria relacionados con el uso de medicamentos veterinarios en los animales destinados a la producción CAC/GL 71-2009/adaptado en 2015.

### Apéndice A

#### APÉNDICE A. ESTRATEGIAS DE MUESTREO

##### A1. MUESTREO INSESGADO

###### A1.1 Propósito

El muestreo incesgado está diseñado para proporcionar información sobre el perfil, especialmente con respecto al grado de aplicación o funcionamiento de un control o sistema de aseguramiento para una población específica de animales o alimentos a lo largo de un periodo definido.

###### A1.2 Consideraciones estadísticas sobre el tamaño de la población de muestreo

El número de muestras para los protocolos de muestreo incesgado debería basarse en la estadística y podría ser influenciado por el tamaño de la población (cuando ésta sea menor a 5000), la frecuencia del incumplimiento determinada a ser significativa, el nivel de confianza a ser otorgado a los resultados, así como también por las consideraciones económicas.

El número de muestras basado en la distribución binomial será siempre igual o mayor que el número de muestras requerido basado en la distribución hipergeométrica<sup>16</sup>.

Si el tamaño de la población es pequeño, el efecto del muestreo sin reemplazo es significativo y la distribución del muestreo debería basarse en la distribución hipergeométrica.

En poblaciones con más de 5000 unidades, el efecto del muestreo sin reemplazo es insignificante. Por lo tanto, la distribución binomial puede utilizarse para determinar un número de muestras adecuado.

El número de muestras para un nivel de confianza definido será, de hecho, constante para las poblaciones con más de 5000 unidades.

###### A1.3 Informe del nivel de confianza del muestreo

Cuando se detectan resultados fuera de cumplimiento, es posible derivar una estimación no refinada de la posible frecuencia en la población en general.

Sin embargo, cuando no se encuentran resultados fuera de cumplimiento, entonces cualquier declaración acerca de la frecuencia necesita expresarse con un nivel de confianza específico de que la frecuencia de los resultados fuera de cumplimiento no sobrepasa un porcentaje específico.

El número de muestras requerido para dar un nivel requerido de aseguramiento estadístico puede obtenerse de la Tabla 4. También pueden utilizarse otros protocolos estadísticos con bases científicas.

**Tabla 4:** Número de muestras requerido para detectar por lo menos un resultado fuera de cumplimiento con probabilidades predefinidas (90, 95 y 99 por ciento) en una población que tiene una frecuencia de incumplimiento conocida.

Frecuencia de casos fuera de cumplimiento (% en una población)	Mínimo número de muestras requeridas para detectar un resultado fuera de cumplimiento con un nivel de confianza del:		
	90%	95%	99%
35	6	7	11
30	7	9	13
25	9	11	17
20	11	14	21
15	15	19	29
10	22	29	44
5	45	59	90
1	230	299	459
0.5	460	598	919
0.1	2302	2995	4603

### Anexo 3: Encuesta para consumidores de huevo

Esta es una encuesta rápida, que pretende evaluar la percepción del consumidor respecto a la importancia de conocer si los huevos para consumo humano que se producen en Costa Rica podrían contener residuos de antibióticos. Esto en el marco de una investigación en Seguridad Alimentaria que se está llevando a cabo.

Gracias por su colaboración.

**Instrucciones: Seleccione con una X la respuesta adecuada, según su caso, en cada una de las preguntas citadas a continuación.**

1. ¿Consume huevos en su dieta habitual?

Sí

No

2. ¿Cuántos huevos por semana consume habitualmente?

De 1 a 3

De 3 a 6

De 7 a 10

3. ¿Qué tipo de huevos consume con mayor frecuencia?

Producidos en casa

Orgánicos

Regulares

Todos los anteriores

4. ¿Considera usted importante que en Costa Rica se realice el monitoreo de residuos de antibiótico en este alimento?

Sí

No

5. ¿Usted como consumidor considera importante tener acceso a esa información?

Sí

No

6. De determinarse que los huevos contienen residuos de estas sustancias, ¿disminuiría usted el consumo de este alimento?

Sí

No

## 10. Abreviaturas

RAM: Resistencia Antimicrobiana

LANASEVE: Laboratorio Nacional de Servicios Veterinarios

HPLC/MS-MS: Cromatografía Líquida de Alta Eficacia acoplada a un detector de Masas – Masas (por sus siglas en inglés)

SENASA: Servicio Nacional de Salud Animal

CBA: Canasta Básica Alimentaria

CODEX: Comisión Conjunta FAO/OMS sobre Normas Alimentarias

EMA: Administración Europea de Medicamentos (por sus siglas en inglés)

FDA: Administración de Medicamentos y Alimentos (por sus siglas en inglés)

INCIENSA: Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud

MAG: Ministerio de Agricultura y Ganadería

PNR: Plan Nacional de Residuos

LMR: Límites Máximos de Residuos

OMS: Organización Mundial de la Salud

ORAs: Organismos Resistentes a los Antibióticos

ETA: Enfermedades de Transmisión Alimentaria

mg/kg: partes por millón

ug/kg: partes por billón

LD: Límite de Detección

LC: Límite de Cuantificación

kg: kilogramo