



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

Facultad de
Ciencias e Ingeniería

Determinación de residuos de sulfonamidas en muestras de huevo de gallina mediante un método microbiológico y cELISA, en un mercado mayorista de Lima Este, 2024

TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO PROFESIONAL DE QUÍMICO
FARMACÉUTICO

AUTOR(ES)

DIEGO RAMCES ALARCON CAMPOS
ANYELA MICHELL CHUMBES RAMIREZ

ASESOR

ELSA CAROLINA PONCE DE LEON DE LAMA

CO-ASESOR

MONICA JEHNNY PAJUELO TRAVEZAÑO

LIMA – PERÚ
2026

Jurado calificador

Presidente: Dr. Cesar Yoshi Lopez Matayoshi

Vocal: MSc. Leon Faustino Villegas Vilchez

Secretario: Mag. Maria Susana Roque Marroquin

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

Los egresados:

N°	APELLIDOS Y NOMBRES
1.	ALARCON CAMPOS DIEGO RAMCES
2.	CHUMBES RAMIREZ ANYELA MICHELL

Pertencientes al programa de la **CARRERA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**, autores del trabajo titulado: **Determinación de residuos de sulfonamidas en muestras de huevo de gallina mediante un método microbiológico y cELISA, en un mercado mayorista de Lima Este, 2024**, el cual ha sido elaborado, sustentado y aprobado, según corresponda, para optar por el **TÍTULO PROFESIONAL DE QUÍMICO FARMACÉUTICO** bajo la modalidad de **TESIS**.

En calidad de docentes asesores de la Universidad Peruana Cayetano Heredia:

N°	APELLIDOS Y NOMBRES DEL DOCENTE	FACULTAD	NIVEL DE ASESORÍA
1.	PONCE DE LEON DE LAMA ELSA CAROLINA	ASESOR	FACI
2.	PAJUELO TRAVEZAÑO MONICA JEHNNY	CO ASESOR	FACI

Declaramos que el contenido del presente documento es original y que las citas y referencias a otros autores cumplen con las normas académicas establecidas. En ese sentido, hacemos constar que:

- El documento presenta un porcentaje de similitud de **19%**, según el reporte emitido por el software **Turnitin®** (identificador de entrega: **3516360756**; fecha de entrega: **24/03/2026**).
- Tras una revisión detallada del reporte y del contenido del trabajo en cuestión, no se han identificado indicios de plagio.
- Se certifica que el documento respeta los principios de integridad académica y cumple con los requisitos institucionales de originalidad.

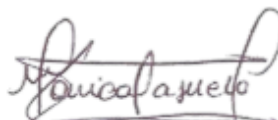
Lugar y fecha: **Lima, 24 de marzo de 2026**



Firma del asesor

N° DNI: 41040862

ORCID: 0000-0003-3662-2250



Firma del Co-asesor

N° DNI: 10518111

ORCID: 0000-0003-2086-8600

DEDICATORIA

DIEGO:

A mis padres y a mi hermana, por ser el pilar fundamental de mi desarrollo personal y profesional, por su apoyo incondicional y por acompañarme en cada paso de este camino.

A mis abuelos, que me cuidan desde el cielo; esta meta también es para ustedes, porque sé que estarían orgullosos de verme alcanzar este sueño.

A mis abuelas, que me brindaron su amor y cuidado como una segunda madre, gracias por ser refugio y ejemplo.

Y a mi enamorada, por su aliento constante, por creer en mí incluso en los momentos más difíciles y motivarme a seguir creciendo.

A cada miembro de mi familia, gracias por ser parte esencial de este logro que hoy se convierte en uno de los más grandes triunfos de mi vida.

ANYELA:

A mi amada familia: a mis abuelos, mamá, tíos y hermanos, por ser mi raíz y mi fuerza en cada paso de este camino. Gracias por su amor incondicional, por creer en mí y por enseñarme el valor de la perseverancia.

A Motta y Nena, por acompañarme en cada desvelada, por su compañía silenciosa pero reconfortante, que hizo más llevadero cada momento de estudio y dedicación.

A Waldir, mi compañero de vida, por estar siempre presente, por su apoyo constante, por sus palabras de aliento y caminar a mi lado con paciencia y amor. Tu presencia ha sido fundamental en este logro.

Y a todas las personas que me acompañaron en el camino, gracias por ser parte de esta etapa tan importante en mi vida.

AGRADECIMIENTO

Agradecemos profundamente a la Universidad Peruana Cayetano Heredia, a nuestra asesora MSc. Q.F. Elsa Carolina Ponce de León De Lama y a nuestra co-asesora el Ph.D. Q.F. Monica Jehnny Pajuelo Travezaño por su valiosa orientación, constante guía y sus conocimientos compartidos en cada etapa de la investigación.

Expresamos también nuestro sincero agradecimiento a las investigadoras del laboratorio “Microbiología Molecular” por su apoyo en el desarrollo experimental de esta tesis, por su paciencia, disposición, conocimientos técnicos y colaboración que fueron fundamentales para llevar a cabo este trabajo.

A los laboratorios de investigación de “Enfermedades Infecciosas” y “Control de calidad” por facilitarnos el uso de sus instalaciones y equipos durante la fase experimental, les extendemos nuestro reconocimiento y gratitud.

Asimismo, agradecemos al proyecto “Training in parasitic diseases and central nervous system infections” por el financiamiento parcial que hizo posible esta investigación.

ÍNDICE:

Resumen	1
Abstract.....	2
I. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 Antecedentes	3
1.2 Planteamiento del problema	12
II. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	15
III. OBJETIVOS	15
3.1 Objetivo general.....	15
3.2 Objetivos específicos.....	16
IV. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN:	16
4.1 Diseño:.....	16
4.2 Aspectos éticos:	16
4.3 Lugar de muestreo:	17
4.4 Lugar de Trabajo	17
4.5 Tamaño de muestra	17
4.5.1. Recolección de muestras.....	18
4.5.2. Procedimiento de muestreo	18
4.6 Materiales, reactivos y equipos	20
4.6.1. Material de laboratorio	20
4.6.2. Medios de cultivos, cepas y muestra	21
4.6.3. Reactivos	21
4.6.4. Elisa Kit SAs (Sulfonamidas):.....	21
4.6.5. Equipos	22
4.7 Procedimiento para la determinación de residuos de sulfonamidas:	22
4.7.1. Método microbiológico de cinco placas.....	22
4.7.2. Método Inmunoensayo enzimático competitivo (cELISA)	26
4.8 Análisis de datos	28
V. RESULTADOS	30
5.1 Verificación de la Técnica del método microbiológico:.....	30
5.2 Método Inmunoensayo enzimático competitivo (cELISA)	38
VI. DISCUSIÓN	42
VII. CONCLUSIÓN.....	48
VIII. RECOMENDACIÓN	49
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
ANEXOS.....	59

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Recolección de muestras por tienda.....	19
Tabla 2: Resultados de verificación de la Técnica del análisis microbiológico.....	31
Tabla 3A: Resultados de la verificación de la técnica de ensayo microbiológico.....	33
Tabla 3B: Resultados de la verificación de la técnica de ensayo microbiológico.....	34
Tabla 4: Densidades ópticas obtenidas por lector de microplaca para cada pocillo a 450 nm.....	37
Tabla 5: Absorbancias promedio transformadas a concentraciones finales en $\mu\text{g}/\text{kg}$...	40
Tabla 6: Producción pecuaria por año, según producto, 2007-2023.....	59
Tabla 7: Concentración promedio en $\mu\text{g}/\text{g}$ de sulfonamida en varios tejidos de gallina siete días después de la administración de cada una de las sulfonamidas listadas a dosis de 100 mg/kg de alimento.....	60
Tabla 8: Perú. Producción de huevo de Gallina por mes, según región 2023.....	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Nucleo p-amino bencenosulfonamida.....	5
Figura 2: Frecuencia de marcas de huevos en las tiendas del mercado mayorista.	19
Figura 3:Placas con 15 mL agar Mueller Hinton II y trimetoprim (0,05 ug/mL) sembradas por triple estiramiento de B. subtilis a escala 0,5 Mc Farland a las cuales se sembraron discos con sulfametazina a una cantidad de 0,5ug ; 1ug ; 1,5ug (placas A y B) 2ug; 2,5ug; 3ug (placas C y D) y 5ug; 7,5ug ; 10ug (placas E y F).....	31
Figura 4: Relación entre el halo de inhibición obtenido por análisis microbiológico vs la cantidad de sulfametazina (sulfadimidina).....	32
Figura 5A: Relación de halo de inhibición obtenido por análisis microbiológico mediante solución de extracción a pH 11,2 a determinada cantidad de sulfametazina (sulfadimidina) y concentración de trimetoprim en medio de cultivo a 0,1 µg/mL.....	34
Figura 5B: Relación de halo de inhibición obtenido por análisis microbiológico mediante solución de extracción a pH 8,5 a determinada cantidad de sulfametazina (sulfadimidina) y concentración de trimetoprim en medio de cultivo a 0,1 µg/mL.....	35
Figura 6: Relación entre concentración de residuo antimicrobiano (sulfametoxazol, sulfamonometoxina y sulfadiazina) y Absorbancia %.....	39
Figura 7: Límites máximos de residuos (LMR) de medicamentos veterinarios en alimentos de consumo humano - SULFONAMIDAS.....	63
Figura 8: Límites Máximos Residuales (LMRs) y Recomendaciones de Gestión de Riesgos (RGRs) para residuos de medicamentos veterinarios en alimentos	64
Figura 9: Comisión Regulatoria (EU) No 37/2010 “of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin”,	65
Figura 10: Code of Federal Regulations. Title 21—Food and Drugs. Part 556— Tolerances for Residues of New Animal Drugs in Food	66
Figura 11: Certificado de Análisis SAs (Sulfonamides of 3-in-1) ELISA Kit	67
Figura 12: Parámetros del ensayo inmunoenzimático (Límite de detección, repetibilidad CV, rango lineal, estabilidad de la solución muestra) por matriz alimentaria	68
Figura 13: Parámetros del ensayo inmunoenzimático (tasa de recuperación).....	69

Resumen

La industria avícola desempeña un rol fundamental en la producción pecuaria en el Perú, empleando antibióticos con fines profilácticos, terapéuticos y como promotores del crecimiento en aves de fin comercial. Entre estos, las sulfonamidas son compuestos sintéticos de amplio espectro, eficaces contra la coccidiosis y ciertas enfermedades respiratorias. Sin embargo, su uso inadecuado y el incumplimiento de los tiempos de retiro previos a la comercialización, puede conllevar a la presencia de residuos en diferentes tejidos del ave, incluyendo los huevos. Esto representa un riesgo para la salud pública, dado que los residuos pueden inducir reacciones de hipersensibilidad, alterar el equilibrio de la microbiota intestinal y contribuir al desarrollo de resistencia antimicrobiana.

En este contexto, el objetivo de la presente tesis fue determinar la presencia de sulfonamidas en muestras de huevo de gallina recolectadas en un mercado mayorista de Lima Este, en 2024. Se realizó un muestreo sistemático y se aplicaron dos métodos analíticos: el método microbiológico de “cinco placas”, adaptado a una placa para evaluar exclusivamente sulfonamidas, el cual no resultó aplicable por su elevado límite de detección de 15,4 g/kg, y un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas de tipo competitivo (cELISA) del cual se identificó un 14,3% de muestras positivas con residuos antimicrobianos en el rango de 0,434 µg/kg y 0,662 µg/kg. Estos hallazgos evidencian la necesidad de un monitoreo constante de la inocuidad alimentaria en huevos de gallina, debido a su alto consumo representa un riesgo sobre todo en escenarios de exposición prolongada.

Palabras clave: Sulfonamidas, huevos de gallina, método microbiológico, cELISA, Límite Máximo Residual (LMR).

Abstract

The poultry industry plays a fundamental role in livestock production in Peru, using antibiotics for prophylactic, therapeutic purposes and as growth promoters in commercial poultry. Among these, sulfonamides are synthetic broad-spectrum compounds effective against coccidiosis and certain respiratory diseases. However, their improper use and failure to comply with withdrawal periods prior to commercialization can lead to the presence of residues in different bird tissues, including eggs. This poses a risk to public health, as residues may induce hypersensitivity reactions, alter the balance of intestinal microbiota, and contribute to the development of antimicrobial resistance.

In this context, the objective of this thesis was to determine the presence of sulfonamides in hen egg samples collected from a wholesale market in East Lima in 2024. A systematic sampling was carried out, and two analytical methods were applied: the microbiological “five-plate” method, adapted to a single plate to exclusively evaluate sulfonamides, which proved inapplicable due to its high detection limit of 15,4 g/kg, and a competitive enzyme-linked immunosorbent assay (cELISA), through which 14,3% of samples tested positive for antimicrobial residues in the range of 0.434 µg/kg to 0.662 µg/kg. These findings highlight the need for constant monitoring of food safety in hen eggs, as their high consumption represents a risk, especially in scenarios of prolonged exposure.

Keywords: Sulfonamides, hen eggs, microbiological method, cELISA, Maximum Residue Limit (MRL).

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

Desde una perspectiva global, los fármacos antimicrobianos no son solo de uso exclusivo en el campo de la medicina humana, también son ampliamente utilizados en la medicina veterinaria. Los antibióticos veterinarios cumplen con múltiples propósitos [1], ya sea como promotores del crecimiento, o con un fin profiláctico o preventivo, así como un fin terapéutico [2]. Y el sector pecuario, de importante producción de alimentos de origen animal, no es la excepción.

A nivel mundial, el sector avícola es uno de los más importantes de la industria pecuaria y en los últimos años ha tenido un gran crecimiento debido al aumento del consumo de sus productos [3]. En el Perú, la industria avícola que tiene una representación del 2% del Producto Interno Bruto (PIB) nacional y posee una participación del 26,2% del Valor Bruto de la producción Agropecuaria, siendo la carne de ave y huevo de gallina las principales fuentes de proteína de origen animal más consumidas a nivel nacional [4,5].

Este sector ha mostrado un crecimiento sostenido entre 2007 y 2023, como se observa en el Anexo 1. La producción de aves aumentó de 939,6 mil toneladas en 2007 a 2.197,3 mil toneladas en 2022. De manera similar, la producción de pollo mostró un incremento significativo, de 870 mil toneladas en 2007 a 2.057,1 mil toneladas en 2022. En cuanto a la producción de huevos de gallina, esta ha crecido de manera más estable, desde 257,6 mil toneladas en 2007 hasta alcanzar 511 mil toneladas en 2022. Sin embargo, los datos preliminares a 2023 muestran una leve disminución en la producción de estos productos, lo que sugiere una posible desaceleración en el crecimiento del sector. A pesar de esta ligera baja, la tendencia general muestra un incremento en la demanda de productos avícolas en el país, lo que resalta la relevancia de este subsector dentro de la economía nacional [6].

En este contexto, la gestión sanitaria en la producción avícola es fundamental para asegurar la salud y bienestar de las aves, así como la calidad de sus productos. Un aspecto clave, es la bioseguridad, que comprende un conjunto de medidas orientadas

para prevenir la entrada y la propagación de agentes patógenos, lo que incluye el control de accesos a las instalaciones, limitando el ingreso a personal autorizado, la desinfección de ambientes y el manejo de aves enfermas [7]. Es importante señalar que estas prácticas están reguladas por normativas nacionales e internacionales que establecen estándares para la sanidad avícola. En muchos países, organismos como el Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA) son responsables de supervisar y hacer cumplir estas regulaciones, asegurando que todos los actores en la cadena productiva cumplan con las medidas sanitarias necesarias [8,9].

Las gallinas son susceptibles a diversas enfermedades, lo que refuerza la importancia de una adecuada gestión sanitaria en la industria avícola. Entre las enfermedades bacterianas más comunes se encuentra el cólera aviar, causado por *Pasteurella multocida*, puede presentarse de forma aguda o crónica. Los síntomas incluyen goteo nasal, pérdida de apetito y cojera, siendo común la muerte súbita en casos agudos. Otra enfermedad relevante es la colibacilosis, provocada por *Escherichia coli*, afecta varios órganos internos y puede causar diarrea y deshidratación. Asimismo, la coriza infecciosa, causada por *Haemophilus gallinarum*. Esta enfermedad se manifiesta con secreciones nasales y oculares, estornudos y dificultad para respirar [10].

Además, las enfermedades parasitarias también representan un riesgo significativo para la salud de las gallinas. La Coccidiosis es una enfermedad parasitaria provocada por protozoos del género *Eimeria*, que afecta el tracto intestinal y causa diarrea, pérdida de apetito y debilidad. Además, los piojos y ácaros son parásitos externos que causan irritación en la piel, picazón y pérdida de plumas, lo que puede llevar a una disminución en la producción de huevos [10].

A la par con el aumento de la producción avícola, también se ha intensificado el uso de antibióticos que en su mayoría se utilizan como suplementos en alimentos para la profilaxis, así como para la promoción de crecimiento, esto ocasiona la administración de dosis subterapéuticas sin tomar en cuenta el estado de salud del animal [11]. La vía más frecuente utilizada para la administración de antibióticos es la oral y se da a través

de soluciones preconstituidas que se colocan en la bebida del animal, pero también se pueden encontrar en polvo o como premezcla para administrarse en su alimento [12].

Las sulfonamidas son un tipo de antibióticos que juegan un rol importante como medicamentos eficaces para tratar enfermedades bacterianas y protozoarias. Se derivan de la sulfanilamida, una sustancia con una estructura similar al ácido paraaminobenzoico (PABA). La variabilidad en las sustituciones del grupo amina en su estructura determina la potencia, el espectro antibacteriano y el índice terapéutico de las sulfonamidas. En la figura 1, se muestra el núcleo básico de todas las sulfonamidas: la p-amino-bencenosulfonamida [13].

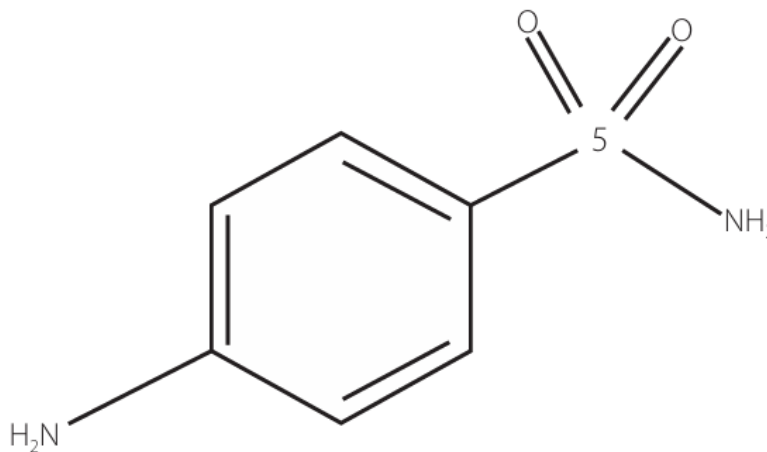


Figura 1: Núcleo p-amino bencenosulfonamida

Las sulfonamidas son sustancias cristalinas de color blanco o amarillo, que actúan como ácidos orgánicos débiles. Al reaccionar con bases fuertes, estas forman sales, lo que las clasifica como compuestos anfóteros. Su solubilidad mejora al formularse con sales de sodio; por ello, algunos de estos preparados solo mantienen su estabilidad en un pH alto, lo que dificulta la administración de manera intramuscular (IM) o subcutánea (SC)[13].

Estos antibióticos, en concentraciones terapéuticas tienen un efecto bacteriostático y en altas concentraciones tiene efectos bactericidas. Son antagonistas competitivos del ácido p-aminobenzoico (PABA) que interfieren en la biosíntesis de ácido fólico, en

consecuencia, obstruyen la síntesis de timina y purina. Esta acción se lleva a cabo mediante la competencia con la enzima bacteriana encargada de incorporar el PABA en la síntesis del ácido dihidrofólico. La disminución en la producción de dihidrofolato provoca una reducción en los niveles de tetrahidrofolato (ácido folínico), que es la forma activa y reducida. El tetrahidrofolato es crucial para las coenzimas involucradas en el metabolismo celular, ya que participa en la síntesis de bases púricas [13].

En cuanto a la farmacocinética en aves, algunas sulfonamidas se absorben bien por vía digestiva en el intestino delgado. Se distribuyen fácilmente en el cuerpo, incluidos tejidos de baja penetración como el Sistema Nervioso Central (SNC) y articulaciones. La unión a proteínas varía entre 15 y 90%, lo que afecta la vida media del fármaco, siendo más prolongada cuando hay mayor unión a proteínas, esto explicaría el hallazgo del estudio de Enomoto *et. al.* (2021) que cuantificó la acumulación de sulfametoxazol tanto en albúmina como en yema de huevos de gallina y determinó que principalmente se acumulan en la albúmina, en donde se concentran en su mayoría todas las proteínas del huevo. Estas sustancias se metabolizan en el hígado y pulmones mediante acetilación que ocurre en el grupo p-amino de la estructura sulfonamídica. Su excreción puede producirse a través de las heces, y en este proceso intervienen factores como el nivel de absorción intestinal, el estado de hidratación del organismo, la solubilidad de la sulfonamida y la dosis administrada. [13].

Las sulfonamidas más utilizadas en el sector avícola son la sulfadimidina, sulfaquinoxalina, sulfamonometoxina, sulfametazina, sulfatiazol, sulfamerazina, sulfadiazina y sulfametoxazol. Sin embargo, un inadecuado uso de sulfonamidas en la avicultura puede tener como resultado la presencia de residuos en diversos tejidos como el hígado, músculo, ovario, oviducto y, consecuentemente, en el huevo de gallina destinado al consumo humano, lo cual constituye un riesgo para la salud pública. Por ejemplo, como se muestra en el Anexo 2, los residuos de sulfonamidas, como la sulfadimidina, alcanzan niveles de 0,34 µg/g en el tejido ovárico. Asimismo, la sulfaquinoxalina, otra de las sulfonamidas más utilizadas, se detectó en concentraciones de hasta 12,12 µg/g en plasma y 2,20 µg/g en los ovarios. La presencia de estos residuos

también varía en otros tejidos como el oviducto y el istmo, donde los niveles de sulfonamidas pueden superar los 2,0 µg/g en algunos casos [13].

La contaminación del huevo con antibióticos, como las sulfonamidas está asociada a la administración de estos fármacos a las gallinas ponedoras, ya sea a través del alimento o del agua. Los antibióticos son absorbidos a nivel gastrointestinal y distribuidos a diversos tejidos, incluyendo los ovarios, lo que facilita su incorporación tanto en la yema como la clara durante la ovogénesis [14].

Otra posible fuente de contaminación de huevos de gallina con antimicrobianos, es el hecho de no cumplir con el periodo o tiempo de retiro adecuado ya que supondría una pérdida económica para los productores. El periodo de retiro se refiere al tiempo requerido que debe transcurrir desde la última dosis del antibiótico aplicado al animal, para que los niveles de residuos alcanzados en productos obtenidos de este sean considerados seguros para el consumo humano [13]. El periodo de retiro depende del principio activo y la formulación del preparado; el tiempo de retiro adecuado para las sulfonamidas en general es de 12 días, aunque puede variar dependiendo del tipo de sulfonamidas (7 - 21 días) [13].

El huevo al ser un alimento muy consumido por las personas, reflejándose en su elevada ingesta per cápita reportada por el boletín del Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego (MIDAGRI) [6], la presencia de trazas antimicrobianas en este producto podría generar una exposición continua, la cual podría promover el desarrollo de resistencia antimicrobiana (RAM) en bacterias, al generar presión selectiva y favorecer la supervivencia de cepas resistentes [15]. Este tema en cuestión no es de menor importancia pues en el año 2019, se realizó un estudio sobre la carga mundial de RAM en el que se atribuye que la resistencia a sulfametoxazol con trimetoprim causó más de 110.000 muertes a nivel mundial [16].

Es importante mencionar que estos residuos de antibióticos en huevos también pueden provocar reacciones adversas en individuos sensibles, los cuales pueden presentarse como erupciones cutáneas, dificultad para respirar, hinchazón, náuseas y vómitos [17]. Además, los residuos de antibióticos, incluyendo las sulfonamidas, pueden tener un

efecto negativo mediante la alteración del equilibrio de la microbiota intestinal; en consecuencia, puede repercutir en la salud digestiva de las personas [15].

Dada la relevancia de estos posibles efectos adversos en la salud de los consumidores, se han desarrollado métodos analíticos para detectar y/o cuantificar estos residuos en matrices alimentarias, se han desarrollados distintas estrategias que permiten su detección y evaluación. A grandes rasgos, los métodos analíticos para el control de los residuos de antibióticos se agrupan en dos categorías: métodos de cribado (screening) y confirmatorios. Los métodos de screening desarrollados para determinar los antibióticos se basan principalmente en ensayos microbiológicos, inmunoquímicos y biosensores, estos presentan la ventaja de ser más accesibles, económicos y de alto rendimiento, permitiendo evaluar un alto número de muestras en un menor tiempo. No obstante, su limitación radica en que solo proporciona información de ausencia o presencia de residuos antimicrobianos, en caso de las técnicas inmunoquímicas si presentan la ventaja de ofrecer resultados cuantitativos, sin embargo, no son técnicas de cuantificación confirmatoria [18].

Por otro lado, los métodos confirmatorios se basan en determinar la concentración del analito, para ello se utilizan técnicas analíticas como la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, la cromatografía líquida con detección UV y electroforesis capilar, las que permiten la cuantificación precisa de los residuos detectados. Sin embargo, estos métodos suelen ser más costosos, requieren mayor tiempo, equipamiento especializado y personal capacitado para su manejo. Además, la preparación de muestras es más compleja, implicando técnicas como la extracción en fase sólida, extracción en fase normal y múltiples pasos de purificación [18,19].

Entre los métodos de cribado, el ensayo microbiológico de cinco placas es ampliamente utilizado para la detección de residuos de antibióticos en alimentos como huevos, carne y leche.

En esta técnica las placas se preparan con medios específicos y se incuban entre 18 y 24 horas, interpretando como positivo la presencia de zonas de inhibición iguales o superiores a 2 mm. La primera placa, con *Bacillus subtilis* a pH 6, está orientada a la detección de tetraciclinas y algunos β -lactámicos. La segunda placa, también con *Bacillus subtilis* pero suplementada con trimetoprim, se utiliza para la detección de sulfonamidas. La tercera placa, sembrada con *Bacillus subtilis* a pH 8, es sensible a aminoglucósidos. La cuarta placa, sembrada con *Escherichia coli* a pH 8, se emplea para la detección de quinolonas. Finalmente, la quinta placa, sembrada con *Kocuria rhizophila* a pH 8, permite identificar β -lactámicos y macrólidos. Aunque no es un método confirmatorio, se ha utilizado para detectar residuos de antibióticos diversas matrices alimentarias [20].

Del mismo modo, existen los métodos inmunoquímicos, como el método de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) que también es ampliamente utilizado para detectar residuos de antibióticos ya que ofrece una alta sensibilidad y especificidad y eficiencia. Aunque no se considera una técnica confirmatoria, su rendimiento lo hace una opción viable [21]. Además, que a través de la medición de densidad óptica (OD) es posible realizar una cuantificación dichos residuos.

Por otra parte, está el método por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), que es ampliamente reconocido como el método por excelencia para la detección y cuantificación de residuos de antibióticos en muestras biológicas. Aunque es altamente preciso y específico, se caracteriza por tener un proceso más lento y laborioso en comparación con otras técnicas como los inmunoquímicos o los microbiológicos. Mientras que la prueba ELISA permite analizar rápidamente una gran cantidad de muestras para realizar un screening general y es muy útil cuando se desea analizar muestras de un mercado mayorista en busca de contaminantes, la técnica por HPLC se enfoca en la cuantificación precisa de los residuos detectados y a pesar de su eficacia, la técnica mediante HPLC puede resultar más tardado en su ejecución, lo que lo hace más adecuado para análisis detallados, siendo así un método confirmatorio y no se encuentra alineado a nuestro objetivo [22].

Las diversas técnicas analíticas descritas, tales como los métodos microbiológicos, espectrofotométricos, inmunoensayos tipo ELISA, o cromatográficos como Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) o Cromatografía Gaseosa (GC) han sido ampliamente utilizados en estudios científicos a nivel internacional para la detección y cuantificación de residuos antimicrobianos [22].

Por otra parte, la evidencia científica reflejó problemas asociados con el uso de sulfonamidas en la producción de gallinas ponedoras, incluyendo la presencia de residuos en huevos. Por ejemplo, el estudio realizado por Sasanya J. et al., 2005, se enfocó en la relación del uso de sulfonamidas en gallinas ponedoras de Kampala, Uganda y la presencia de residuos de sulfonamidas en huevos, el análisis se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa con detector de matriz de fotodiodos. Estos antibióticos son comúnmente utilizados en la industria avícola de la región, pero su uso sin la debida regulación y de manera excesiva conlleva a obtener presencia de residuos en los huevos. El artículo concluye, que los consumidores de huevos del distrito de Kampala están expuestos a residuos de sulfonamidas debido a malas y deficientes prácticas agrícolas y regulatorias [23].

Una investigación del año 2021, realizada en Estados Unidos por Enomoto H. et al, se enfocaron en determinar la cantidad, duración y acumulación de residuos de sulfonamidas, en específico residuos de sulfametoxazol y trimetoprim (SMZ-TMP) en huevos de gallina Rhode Island Red. En este estudio se administró SMZ-TMP oralmente durante 7 días a una dosificación determinada (régimen de 46 mg/kg.día para sulfametoxazol y 25 mg/kg.día para trimetoprim) y se encontró que el sulfametoxazol se distribuyó mayoritariamente en la albúmina (91,53 - 96,74%) mientras que trimetoprim se distribuyó más en la yema (63,92 - 77,36%) durante el tratamiento con antibióticos. Posterior a dicho tratamiento, los niveles de residuos en huevo de gallina descendieron por debajo o alcanzaron el límite de cuantificación hasta los 13 días. El análisis de las muestras se realizó mediante cromatografía líquida y espectrometría de masas [1].

Asimismo, existen estudios que demuestran la acumulación de residuos de antibióticos no solo en el huevo, sino también en múltiples tejidos de aves que están destinadas al consumo humano; lo cual se detalla en un artículo del año 2022 que se centró en la detección de residuos de tetraciclinas y sulfonamidas en tejidos hepáticos de pollo de engorde obtenidas de dos mercados de la ciudad de Dar es Salaam, Tanzania, mediante el método de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (Elisa). En este estudio transversal realizado por Ulomi WJ. et al encontraron residuos de sulfonamidas en el 21,4% de muestras analizadas; también, se halló tetraciclinas en todas las muestras de hígado y además se encontró en niveles elevados. El estudio subraya la necesidad de una vigilancia más estricta y de hacer cumplir la normativa para garantizar la seguridad alimentaria [24].

En particular, un artículo de investigación del año 2022 realizado en el distrito de Kunming, China por Wang, R et al , destacó la presencia y concentración de residuos de antibióticos, en específico de tipo sulfonamidas y fluoroquinolonas en 513 muestras de huevos de aves [25]. Los residuos antimicrobianos de mayor concentración hallados en este estudio fueron de antibióticos tipo sulfonamidas como la sulfamonometoxina y sulfametoxazol encontradas en huevo de gallina y codorniz en un rango de concentraciones de 0,06 - 1,00 $\mu\text{g/g}$ y 0,07 - 2,48 $\mu\text{g/g}$ respectivamente.

En un artículo más reciente del año 2023 realizado por Sarkar S. et al, en el estado de Tennessee, EE. UU., se evaluó y midió la presencia de residuos de tetraciclina en muestras de carne de res, huevos y miel además de evaluarse residuos de eritromicina en muestras de carne de res y miel vendidos como productos “libre de antibióticos” en mercados de agricultores. Esta investigación se realizó mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima competitivo (cELISA) y encontraron que todos los productos alimenticios analizados contenían niveles variables de residuos de tetraciclina en el que las concentraciones medianas fueron de 51,75 $\mu\text{g/kg}$ - 30,25 $\mu\text{g/kg}$ - 77,86 $\mu\text{g/kg}$ además de encontrar residuos de eritromicina con concentraciones medias de 3,67 $\mu\text{g/kg}$ y 0,68 $\mu\text{g/kg}$ [26]. Y aunque las concentraciones medianas de estos residuos estuvieron por debajo de los LMR establecidos en los EE. UU para tetraciclinas y eritromicina, el artículo enfatiza en que se debería investigar la posible fuente de la

causa de residuos antimicrobianos en estos alimentos debido a los posibles daños al consumidor que se pueden generar.

Estos estudios no solo constituyen antecedentes relevantes para la presente investigación, sino que también refuerzan la importancia de continuar evaluando la inocuidad alimentaria en huevos de gallina mediante herramientas analíticas validadas y adaptadas a la situación nacional.

Por último, cabe resaltar que en Perú no se han encontrado estudios que aborden la determinación de la presencia de estos antibióticos en huevos de gallina. Sin embargo, un reciente estudio realizado en 2024 por Rufasto S. evidenció residuos de sulfonamidas en huevos de codorniz. En dicho estudio, se detectó sulfadiazina en el total de las muestras y sulfametoxazol en el 95,8%, todas provenientes de productores locales. La concentración promedio de sulfonamidas determinada mediante HPLC-DAD, fue de 2,8 $\mu\text{g}/\text{Kg} \pm 4,7$, siendo la más elevada la de sulfadiazina, con un valor de 57,0 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, registrada en el distrito de San Juan de Lurigancho" [27].

1.2 Planteamiento del problema

El huevo es un alimento que está incluido como parte de la dieta diaria según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación (FAO) ya que es un alimento económicamente accesible y ampliamente consumido debido al gran aporte de nutrientes como proteínas, diversas vitaminas (A, B12, D, E y folato) y minerales biodisponibles (Fe, Zn) [28,29]. En este contexto, la Asociación Peruana de Avicultura ha promovido campañas para incrementar el consumo per cápita, teniendo como objetivo el consumo de 300 huevos por habitante al año [30].

Según el MIDAGRI, el consumo per cápita, en el año 2021, de huevo fue de 19 kg (304 unidades) en Lima. En ese sentido, el Boletín Avícola Mensual de la Producción y Comercialización de Productos Avícolas, indica que en el mes de enero de 2023 se tuvo una producción nacional de 41,9 miles de toneladas de huevo de gallina para consumo [6]. La producción de huevo está concentrada principalmente en las regiones costeras del país. Las principales áreas productoras incluyen Ica (41,3%), Lima (27,7%), y La

Libertad (16,9%), lo que subraya la importancia geográfica en la producción avícola nacional (ANEXO 3) [31].

Respecto a la regulación de antibióticos, de manera internacional, el Codex Alimentarius, es reconocido por contener normativas y directrices que garantiza que los alimentos sean saludables, además que debido a su carácter técnico-científico y su reconocimiento global ha hecho que numerosos países adopten o adapten sus normativas nacionales y reglamentos técnicos, utilizándolo como base para la formulación de políticas regulatorias. En este contexto, la normativa CXM 2-2024 "*Límites Máximos de Residuos (LMR) y recomendaciones sobre la Gestión de Riesgos (RGR) para Residuos de Medicamentos Veterinarios en los Alimentos*" establece que el LMR fijado para antibióticos tipo sulfonamidas es de 100 µg/kg para el caso de grasa, músculo, hígado y riñón de todas las especies productoras de alimentos [32]

Por su parte, la normativa estadounidense, establecida por la *Food and Drug Administration* (FDA) en el Título 21 del *Code of Federal Regulations (CFR)*, específicamente en la Parte 556 "*Tolerances for Residues of New Animal Drugs in Food*", define los límites máximos permitidos para residuos de medicamentos veterinarios en alimentos destinados al consumo humano. Esta regulación establece tolerancias específicas para cada sustancia activa y tejido animal, con el objetivo de garantizar la inocuidad alimentaria y proteger la salud pública. Por ejemplo, para sulfonamidas como la sulfadimethoxina, se fija un límite de 100 µg/kg en tejidos comestibles de bovinos, aves y peces, y 10 µg/kg en leche; mientras que para sulfamethazine y sulfaquinoxaline, el LMR es de 100 µg/kg en tejidos de bovinos, porcinos y aves. En contraste, otras sulfonamidas como sulfachloropyrazine y sulfomyxin tienen tolerancia cero en tejidos de aves. Cabe destacar que en la mayoría de los casos la normativa indica "excluding eggs", lo que significa que no se establece un LMR para huevos [33].

En cuanto a la regulación nacional de residuos antibióticos, existen normativas peruanas como la NTS N° 120-MINSA/ DIGESA-V.01 "Norma Sanitaria que establece los Límites Máximos de Residuos (LMR) de medicamentos veterinarios en alimentos de consumo humano" aprobada por la Resolución Ministerial 372-2016-MINSA, que establece los límites máximos residuales (LMR) de medicamentos veterinarios en alimentos de origen

animal destinados al consumo humano, estos límites se aplican a diversos tipos medicamentos veterinarios, entre ellos antibióticos tipo sulfonamidas (ANEXO 4) [34].

Específicamente para las sulfonamidas, se establecen límites máximos residuales de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en músculo, grasa, hígado, riñón de todas las especies productoras de alimentos y 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en leche bovina, sin haberse establecido un LMR para huevos [32,33,34].

Sin embargo, la ausencia del límite para este tipo de antibióticos en huevos de ave en la lista de los LMR implica un vacío normativo en cuanto al control del uso de este antibiótico en esta matriz alimentaria. Esta situación facilita el uso inadecuado del antibiótico puesto que la falta de un LMR específico impide establecer criterios claros de seguridad y evaluación del riesgo para los consumidores.

Por otro lado, como normativa internacional se tiene la de la Comisión Regulatoria de la Unión Europea (EU) No 37/2010 “of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin” [35].

En esta normativa se establece explícitamente que las sulfonamidas están prohibidas en aves ponedoras cuyos huevos se destinan al consumo humano, por lo tanto, tienen un LMR de 0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ [35].

En ese sentido, es importante que se realice una evaluación en alimentos de origen avícola, ya que la inocuidad es un aspecto de calidad básico, lo cual evita que contengan residuos o sustancias nocivas para el consumidor. Para esto, hay múltiples metodologías que permiten evaluar residuos antimicrobianos con exactitud y precisión, hay algunos que se encuentran en constante desarrollo [36]. Como se ha descrito previamente, el uso de antibióticos en la crianza de aves es habitual para fines terapéuticos, profilácticos o para el control de infecciones. Sin embargo, la NTS N° 120-MINSA/ DIGESA-V.01 no especifica un valor límite máximo para residuos de sulfonamidas en huevos de gallina. En contraste, la normativa europea, a través del Reglamento (CE) N° 37/2010, establece que no deben detectarse residuos de sulfonamidas en este tipo de matriz alimentaria. Esta discrepancia normativa refuerza la necesidad de realizar estudios orientados a la

evaluación de la presencia de dichos residuos en matrices alimentarias destinadas al consumo humano en el mercado peruano [34,35].

Por ello, en el presente estudio se investigó la presencia de residuos de antibióticos tipo sulfonamidas en muestras de huevo de gallina que fueron recolectadas en un mercado mayorista, principal centro de comercialización de huevo en Lima Este, utilizando dos métodos, un método microbiológico, ampliamente utilizado y mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) de Elab Science, el cual es más sensible y específico.

II. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Qué presencia y proporción de residuos antimicrobianos tipo sulfonamida se detectan en muestras de huevo de gallina recolectadas en un mercado mayorista de Lima Este?

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Determinar la presencia de residuos antimicrobianos tipo sulfonamida en muestras de huevo de gallina recolectadas en un mercado mayorista de Lima Este, utilizando el método microbiológico de “cinco placas”, empleando únicamente la placa destinada a sulfonamidas y el método inmunoenzimático competitivo (cELISA).

3.2 Objetivos específicos

- Verificar la capacidad de detección del método microbiológico de “cinco placas” para residuos antimicrobianos en huevos de gallina, a través de ensayos de recuperación y determinación de su límite de detección.
- Evaluar la presencia de residuos de sulfonamidas en las muestras de huevo de gallina mediante el método microbiológico previamente verificado
- Evaluar la presencia de residuos de sulfonamidas en las muestras de huevo de gallina mediante un ensayo inmunoenzimático competitivo (cELISA), como técnica analítica más sensible y específica.

IV. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN:

4.1 Diseño:

Este estudio es cuantitativo y observacional primario. Se colectaron muestras de huevos de manera sistemática provenientes de diferentes locales avícolas de un mercado mayorista de Lima Este, con el objetivo de obtener una muestra representativa de la población de huevos disponible en dicho mercado.

4.2 Aspectos éticos:

El registro de este procedimiento se llevó a cabo en el Sistema Descentralizado de Información y Seguimiento a la Investigación (SIDISI) - Dirección Universitaria de Asuntos Regulatorios de la Investigación (DUARI), y su valoración ética fue realizado por el Comité de Ética - Oficina de Regulación y Valoración Ética de la Investigación de UPCH (ORVEI - UPCH) previo a su ejecución.

Debido a la naturaleza de las muestras, según la FAO, al huevo se denomina alimento altamente nutritivo [28]. Por lo cual se trata de un proyecto que no involucra humanos ni animales como sujeto de estudio.

4.3 Lugar de muestreo:

Las muestras se recolectaron en el Mercado de Productores en el distrito de Santa Anita, ya que es un importante punto de comercio de una amplia variedad de productos frescos y de abarrotes [37]. El mercado abastece “al 70% de comerciantes minoristas que tienen bodegas y consumidores finales (amas de casa) de los distritos de San Juan de Lurigancho, Ate, Santa Anita, La Victoria, Comas, Lima, Callao, provincias, etc.” [37] Este mercado se ha posicionado como el principal punto de referencia para los productores avícolas, por ello, la Dirección General de Estadística, Seguimiento y Evaluación de Políticas del MIDAGRI realiza un seguimiento diario de los precios mayoristas de gallina y huevo [38].

Además, en este mercado mayorista se ofrece una amplia gama de huevos provenientes de granjas locales de Lima y regionales de Ica. Se puede encontrar una variedad de opciones del producto (huevos blancos, pardos, rosados de diferentes tamaños y fuentes) [39].

4.4 Lugar de Trabajo

La presente investigación fue ejecutada en el laboratorio de Microbiología Molecular en la sede de los Laboratorios de Investigación y Desarrollo de la Facultad de Ciencias e Ingeniería de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

4.5 Tamaño de muestra

El tamaño de muestra se determinó mediante la fórmula para calcular el tamaño de muestra de una proporción de muestras con restos de sulfonamidas del 50% con una precisión del 6%.

$$n = \frac{Z^2 (1-\alpha/2) \times p \times q}{d^2} \qquad n = \frac{(1,96)^2 \times 0,5 \times (1-0,5)}{0,06^2} = 267 \text{ unidades}$$

Siendo:

n: tamaño muestral

d: precisión o error permitido

p: proporción esperada

q: 1-p

$Z_{(1-\alpha/2)}$: Valor Z correspondiente al nivel de confianza

4.5.1. Recolección de muestras

Con el objetivo de tener una muestra representativa de los huevos disponibles en el mercado así como garantizar la mayor cobertura posible de los establecimientos de venta junto con la mayor cantidad de muestras posibles en el lugar de estudio. La recolección de muestras se ejecutó por duplicado, con un tiempo de una semana de diferencia, una vez por cada tesista, asegurando que se recolectarán muestras provenientes de puntos distintos dentro de cada establecimiento de venta. Este enfoque permitió evaluar la diversidad de los huevos ofrecidos y garantizar que la muestra refleje adecuadamente las variaciones en la producción de huevos que se ofrece al público en dicho mercado.

4.5.2. Procedimiento de muestreo

Se llevó a cabo un estudio de mercado a fin de determinar la cantidad y ubicación de los principales puestos dedicados a la venta exclusiva de huevos al por mayor.

Así también el propósito del censo fue el de recopilar datos relacionados con las distintas marcas disponibles, calidad de los huevos y los precios correspondientes a fin de establecer el procedimiento de muestreo.

Por lo tanto, al momento de realizar la recolección de datos, la relación de tiendas en el mercado fue de 14, las cuales venden diferentes marcas (Figura 2). Este gráfico refleja que más de la mitad de las muestras analizadas corresponden a huevos sin marca identificable (S/M: 57%). El resto estuvo constituido por marcas comerciales, entre las cuales la Marca A alcanzó el 19%, la C el 10%, la B el 9% y la D el 5%.

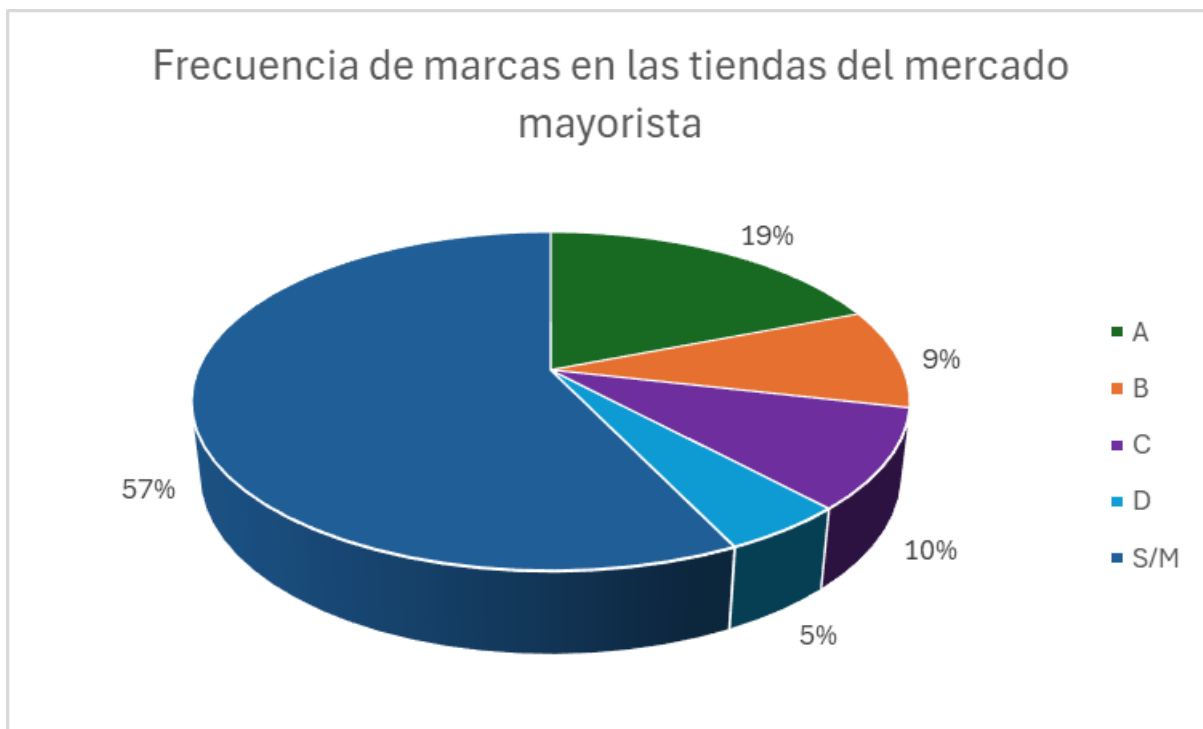


Figura 2: Frecuencia de marcas de huevos en las tiendas del mercado mayorista.

Fuente: Elaboración propia

A, B, C, D: Marcas comerciales de venta al público

S/M: Sin marca identificable

Así mismo a fin de obtener una muestra representativa de la totalidad de tiendas se redondeó el tamaño de muestra a 290, recolectando por lo menos 10 muestras por cada tienda por cada tesista como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1: Recolección de muestras por tienda

Tienda	Recolección	
	R1	R2
1	10	10
2	10	10
3	10	10

4	15	15
5	10	10
6	10	10
7	10	10
8	10	10
9	10	10
10	10	10
11	10	10
12	10	10
13	10	10
14	10	10
TOTAL	290	

n: 290 unidades de huevos de gallina

R1: Tesista 1

R2: Tesista 2

4.6 Materiales, reactivos y equipos

4.6.1. Material de laboratorio

- Matracas aforados de 50 mL, 100 mL, 500 mL, 1000 mL
- Micropipetas 100 uL, 1000 uL
- Frasco de pirex de 500 mL, 1000 mL con tapas.
- Papel filtro Whatman #42
- Placa petri 90 mm
- Pipetas de 2mL, 5 mL, 10 mL.
- Probetas 25 mL

- Soporte de tubos de ensayo
- Tubos de ensayo de 10 mL

4.6.2. Medios de cultivos, cepas y muestra

- Agar Mueller Hinton II (HiMedia, USA)
- Caldo Trypticase de soya (HiMedia, USA)
- Cepa de Bacillus subtilis (ATCC 6633)
- Huevo de gallina

4.6.3. Reactivos

- Acetonitrilo grado HPLC (Mercantil S.A., China)
- Ácido acético glacial (CDH, India)
- Ácido clorhídrico (J.T. Baker, USA)
- Agua destilada y desionizada
- Alcohol 70% (AKF, Peru)
- Clorhidrato de tris (Sigma Aldrich, USA)
- Hidróxido de sodio (J.T. Baker, USA)
- N-hexano $\geq 98.5\%$ (Mercantil laboratorio SAC, USA)
- Sulfametazina (Sigma Aldrich, USA)
- Trimetoprim (ANDHRA ORGANICS LT, India)

4.6.4. Elisa Kit SAs (Sulfonamidas):

- Placa de microtitulación ELISA, marca ElabScience
- Estándares (0 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 0,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 0,9 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 2,7 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 8,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$)
- Soluciones de anticuerpo y conjugados propios del kit

4.6.5. Equipos

- Lector de microplaca SpectraMax 190 (Molecular Devices, USA)
- Baño maría WTB (Mettler GmbH, Alemania)
- Centrífuga universal PLC-12E (Gemmy Industrial Corp, Taiwán)
- Agitador vortex digital (Thermo Scientific)
- Pipetas graduadas de 1 canal y multicanal (Thermo Scientific, USA)
- Balanza (OHAUS, USA)
- Autoclave Vertical Steam Sterilizer LDZX-50B (Shenan, China)
- Densitómetro (Biosan DEN-1, Letonia)
- Estufa de incubación 37 +/- 1°C
- Congeladora 20°C +/- 1°C (ARCTIKO, Dinamarca)
- Potenciómetro digital (OHAUS, USA)

4.7 Procedimiento para la determinación de residuos de sulfonamidas:

4.7.1. Método microbiológico de cinco placas

La determinación de sulfonamidas se realizó utilizando un método microbiológico con el objetivo de determinar si existen o no inhibidores bacterianos pertenecientes al grupo de las sulfonamidas. Por lo cual se utilizó el método de “cinco placas” para muestras de huevo [40], aplicando únicamente la placa correspondiente a sulfonamidas, dado que el estudio se enfocó en este tipo de antimicrobianos.

La metodología de cinco placas fue validada por la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición de la Unión Europea con el Reglamento N° 470/2009, el cual establece los límites máximos residuales de sustancias farmacológicas en alimentos de origen animal [41].

Se llevó a cabo el ensayo de detección de residuos antibióticos a fin de poder verificar la factibilidad de la metodología propuesta, adaptando aspectos técnicos como la reactivación del cultivo del microorganismo *Bacillus subtilis* ATCC6633, estandarización

de la turbidez de la suspensión bacteriana según la escala McFarland y la preparación del medio de cultivo.

Para esta técnica también se usaron muestras de huevo de gallina provenientes de un productor con certificación internacional de bienestar animal. Se emplearon muestras conceptualmente libres de antibióticos las cuales sirvieron como control negativo, a las que también se les agregaron diferentes concentraciones de estándar de sulfametazina con el propósito de elaborar una curva de calibración, a fin de determinar el límite de detección de la técnica y así como otros parámetros [42].

Verificación de la Técnica

Se siguió el protocolo detallado a continuación, se utilizaron discos controles con solución estándar de sulfadimidina (sulfametazina) de concentraciones conocidas.

El objetivo de esta fase fue verificar los parámetros de la técnica, como el límite de detección de la técnica, mediante la adición de estándar de sulfametazina a muestras de huevo libres de residuos antimicrobianos en diferentes proporciones de $\mu\text{g}/\text{kg}$ de muestra. Estas muestras libres de residuos antimicrobianos también sirvieron como control negativo y provenían de un productor con certificado de bienestar animal que produce huevos de gallina a las que se le brinda alimentos libres de antibióticos [42].

Preparación de la solución de trimetoprima

La trimetoprim genera un efecto sinérgico de potenciación con las sulfonamidas, aumentando así la sensibilidad para la detección de sulfonamidas [43].

Se hizo uso de una solución estándar de trimetoprim con una potencia de 98,5%.

Se pesó 50 mg de trimetoprim, la cual se debe disolver con 5 mL de ácido acético 5% v/v y se enrasó con agua en un matraz aforado de 500 mL. Posteriormente, al momento de utilizar esta solución se realizó una dilución 1:20 obteniéndose una solución de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, la cual se esterilizó por filtración.

Esta solución se conservó a temperatura refrigerada (entre 2 a 8°C) un tiempo máximo de 2 semanas [19,44].

Así también se utilizaron discos de papel filtro de 6 mm de diámetro que se utilizó para la inoculación de muestras y controles en placa.

Preparación de placa Agar Mueller Hinton a pH 7,2 - trimetoprim 0,05 ug/mL

Se prepararon medios de cultivo agar Mueller Hinton (Merck 15787) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (disolver y llevar a volumen establecido). Luego se esterilizó a 121 +/- 1°C durante 15 minutos. El pH se corrigió mediante un potenciómetro (45°C) y la adición de ácido clorhídrico e hidróxido de sodio. Después de enfriar a 30°C se agregó la solución de trimetoprim estéril a una concentración final de 1% v/v.

El pH a 30°C fue 7,2 +/- 0,1.

Luego se distribuyó 15 mL del medio preparado con trimetoprim en placas Petri de 90 mm de manera que se obtenga 2 mm de espesor [19,44].

Disco control de sulfametazina 0,5 ug/disco

Se pesó 50 mg de sulfametazina en un matraz aforado de 50 mL y se solubilizó con 2 mL de NaOH 0,2N enrasando con agua destilada, posteriormente se realizó una dilución 1/20 v/v. Esta última solución tuvo una concentración de 0,05 mg/mL el cual se usó para poder elaborar los discos control. Por lo cual se le colocó 10 uL de esta solución sobre el disco control.

La solución inicial de sulfametazina se conservó en refrigeración (2 - 8°C) hasta un máximo de 2 semanas [45].

Los discos de papel filtro estériles se sumergieron en la solución diluida de sulfametazina mediante el uso de pinzas estériles, se drenó el exceso de solución y se presionó levemente sobre el centro del agar MH para que se adhieran [44].

Preparación de microorganismo (0,5 escala Mc Farland) y sembrado de placas

Se hizo uso del microorganismo *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) a partir de ampollas comerciales.

Estas se sembraron en agar sangre, y se tomaron colonias aisladas del microorganismo mediante un asa de siembra.

Posteriormente se transfirió en tubos de ensayo con 4 a 5 mL de caldo Tripticasa de Soya (TSA) y se incubó a una temperatura de 35-37°C mediante una estufa hasta alcanzar por

lo menos una turbidez de 0,5 escala de Mc Farland. Y de ser necesario, se puede ajustar la turbidez mediante el uso de solución salina o caldo TSA.

Para la estimación de turbidez en escala Mc Farland, se utilizó un equipo densitómetro que mide la turbidez de suspensiones bacterianas en escala Mc Farland.

Tiempo después de la turbidez ajustada se sumergió hisopos estériles en los tubos de ensayo con microorganismos *B. subtilis*.

La siembra se realizó en placas de agar Muller Hinton a pH 7,2 - trimetoprim 0,05 ug/mL mediante estrías en 3 direcciones diferentes cubriendo toda la superficie del agar. Luego se dejó reposar por 3 a 5 minutos [40].

Tratamiento y preparación de muestras

Los huevos recolectados se limpiaron con alcohol 70% mediante algodón estéril. Se rompió y vertió el contenido a un frasco de vidrio estéril. Se pesó y se homogeneizó añadiendo 10 mL de solución tampón fosfato (pH 7) [39]. La muestra fue homogeneizada mediante un agitador de alta velocidad durante 30-60 segundos y se calentó en baño maría a 85°C durante 5 minutos y centrifugar a 4000 rpm durante 5 minutos[19].

Luego se vertió 100 µL de la solución de muestra en pocillos de 6 mm de diámetro realizados en la placa de cultivo mediante sacabocados estériles.

Inoculación de las muestras

Se colocó un disco de sulfametazina de 0,5ug/disco control en el centro, usando una pinza estéril.

Se vertieron 2 pocillos contrapuestos (duplicados), cada uno con 100 uL de la misma muestra. Analizando 3 muestras diferentes por duplicado por cada placa sembrada, estas muestras se dejaron difundir durante 30-45 minutos antes de incubarse.

Se sacó con una pinza estéril los discos controles y se colocó en las placas sembradas con *Bacillus subtilis*, se presionó levemente para que se adhiriera al agar e incubó a 37°C por 18 - 24 horas.

Las muestras se colocaron por duplicado en posiciones opuestas en cada una de las placas [45].

Lectura de resultados

Se debe verificar la existencia de halos de inhibición alrededor de las muestras y los discos control [46].

Resultados de discos control

Posterior a la incubación de los discos, se debe presentar un halo de inhibición de al menos 6 mm.

Lectura de muestras

Verificar la existencia de un halo de inhibición alrededor de las muestras sembradas de al menos 2 mm para poder considerarse un resultado positivo.

Si el resultado fue ambiguo, se repitió el ensayo. Si en la repetición no se observa un resultado claramente positivo, la muestra se considera negativa.

Los resultados provenientes de las mismas muestras deben presentar el mismo resultado.

4.7.2. Método Inmunoensayo enzimático competitivo (cELISA)

Pretratamiento de la muestra de huevo:

Se tomó en un beaker, la cantidad correspondiente de huevos recolectados según la tabla 1 para posteriormente ser homogenizados.

Luego se pesó $2 \pm 0,05$ g de muestra de huevo homogeneizada en un tubo de centrífuga de 50 ml. Luego se agregó 8 ml de acetonitrilo, se agitó de manera inmediata durante 10 minutos y se centrifugó a 4000 r/min durante 5 min a temperatura ambiente.

Se llevó 2 mL del del sobrenadante a un tubo de vidrio de 10 mL (limpio y seco) y se secó a 50-60°C con el evaporador de nitrógeno.

Se disolvió el residuo con 1 mL de N- hexano y se agitó durante 30s. Se agregó 1mL de tampón de reconstitución (solución 5) y se agitó durante 1 min y posterior a ello, se centrifugó a 4000 r/min durante 5 min.

Se desechó la fase orgánica superior, se tomó 50 µL de la capa inferior para su análisis.

Los extractos de muestra fueron usados al día siguiente de haber concluido con su pretratamiento. De acuerdo con los estudios de estabilidad proporcionados por el fabricante, los extractos de las muestras de huevos se pueden conservar hasta 1 semana a una temperatura de 2- 8 °C.

Procedimiento de ensayo:

Límite de detección: 0,1 µg/Kg

Todos las muestras y reactivos se encontraron a temperatura ambiente (25 °C) previo a su utilización y se mezclaron bien antes de pipetear. También se evitó la formación de espuma.

En el primer paso se enumeró la muestra y el estándar en orden (múltiples pocillos) y se mantuvo un registro de los pocillos del estándar y de cada muestra (por duplicado).

Luego, se agregó 50 µL de estándar o muestra por pocillo con 50 µL de conjugado HRP (antígeno marcado con la enzima peroxidasa de rábano picante), consecutivamente se agregó 50 µL de solución de trabajo de anticuerpos y se cubrió la placa con el sellador de placas incluido en el kit.

En el siguiente paso, se osciló suavemente durante 5 s para mezclar bien y se incubó a 25 ° C durante 45 minutos en ausencia de luz.

Finalizado el paso anterior, se destapó el sellador con cuidado y se retiró el líquido de cada pocillo. Se agregó inmediatamente 300 µL de tampón de lavado (Solución 6) a cada pocillo y se repitió el procedimiento de lavado 5 veces, a intervalos de 30 s/tiempo y se invirtió la placa, se golpeó contra papel absorbente.

Luego se agregó 50 µL de Reactivo Sustrato A a cada pocillo y posteriormente se agregó 50 µL de Reactivo Sustrato B. Y se agitó suavemente durante 5 s para mezclar bien.

El paso siguiente fue incubar a 25°C durante 15 minutos en ausencia de luz. Posteriormente se agregó 50 µL de solución STOP a cada pocillo, y se agitó suavemente para mezclar bien.

Lectura de resultados

Finalmente, se realizó la medición de Densidad Óptica (OD) de cada pocillo a 450 nm con un lector de microplacas. Este paso debe realizarse en un lapso máximo 10 minutos tras finalizar la reacción. Es importante completarlo dentro de este periodo de tiempo para garantizar la precisión de los resultados

4.8 Análisis de datos

Para determinar el límite de detección se desarrolló una regresión lineal en hojas Excel, utilizando como variable independiente (eje X) la concentración conocida del disco control impregnado del antibiótico patrón, en este caso sulfametazina o sulfadimidina y como variable dependiente (eje Y) el diámetro del halo de inhibición medido en milímetros.

Los datos fueron ingresados y graficados aplicando la función de regresión lineal de Excel para obtener la ecuación de la recta:

$$y = mx + b$$

Siendo:

y: Halo de inhibición

x: Concentración de sulfametazina (sulfadimidina)

m: pendiente de la recta

b: ordenada

Se utilizó el criterio estadístico convencional según lineamientos establecidos en la guía internacional ICH Q2, en la cual se puede estimar como [47]:

$$LOD = \frac{3,3 \times \sigma + |b|}{m}$$

Siendo:

σ : desviación estándar de muestras control (sin adición de analito)

m: pendiente de la recta

b: intercepto

En cuanto al procedimiento de determinación de residuos mediante el ensayo inmunoenzimático ELISA de tipo competitivo, se utilizó el programa provisto por el fabricante y siguiendo sus instrucciones.

El principio del ensayo ELISA competitivo establece que la respuesta obtenida como Densidad Óptica (DO) es inversamente proporcional a la correspondiente concentración del analito. Por lo que, debido a esta relación no lineal, es necesario transformar los datos a fin de elaborar una curva de calibración linealizable que permita un ajuste más preciso.

Para ello se aplicó la función matemática logit/log, por lo que inicialmente se halló el porcentaje de absorbancia para cada estándar mediante la siguiente fórmula.

$$\% \text{ Absorbancia} = \left(\frac{DO \text{ de estándar/muestra}}{DO \text{ de blanco (0 ppm)}} \right) \times 100$$

Y posteriormente se aplicó la función logit como:

$$\text{Logit} (\% \text{ Absorbancia}) = \ln \left(\frac{\% \text{ Absorbancia}}{100 - \% \text{ Absorbancia}} \right)$$

La función logit permite transformar la curva de naturaleza sigmoideal proveniente de ensayos ELISA en una relación lineal [48], a ello se relaciona con una función logaritmo (log) de la concentración del analito obteniendo así una curva calibrada sobre la cual se puede ajustar una recta y por ende permite interpolar de forma confiable concentraciones desconocidas de las muestras analizadas.

Finalmente, se estimó la proporción de muestras con presencia de residuos de sulfonamidas con respecto al total de las muestras evaluadas. Se calculó el intervalo de confianza al 95% según la fórmula: [49].

$$\text{Intervalo de confianza 95\%} = \hat{p} \pm Z \text{ crítico} \sqrt{\frac{\hat{p} * (1 - \hat{p})}{n}}$$

Siendo:

\hat{p} : Proporción muestral

$Z_{crítico}$: Valor crítico de la distribución normal estándar (1,96 para un 95% de confianza)

n: Tamaño de la muestra total

Se utilizó una hoja de Excel al cual se le digitalizaron los datos y resultados obtenidos, por duplicado, a fin de asegurar la correcta digitalización.

V. RESULTADOS

5.1 Verificación de la Técnica del método microbiológico:

En las pruebas realizadas en la verificación de la técnica, se sembró una suspensión de microorganismos a una escala McFarland de 0,5 en placas con 15 mL de agar Mueller Hinton II con una concentración de trimetoprim de 0,05 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

El disco control se evaluó a 8 niveles de concentraciones conocidas: 0,5 $\mu\text{g}/\text{disco}$; 1 $\mu\text{g}/\text{disco}$; 1,5 $\mu\text{g}/\text{disco}$; 2 $\mu\text{g}/\text{disco}$; 2,5 $\mu\text{g}/\text{disco}$; 5 $\mu\text{g}/\text{disco}$; 7,5 $\mu\text{g}/\text{disco}$ y 10 $\mu\text{g}/\text{disco}$ (Figura 3).

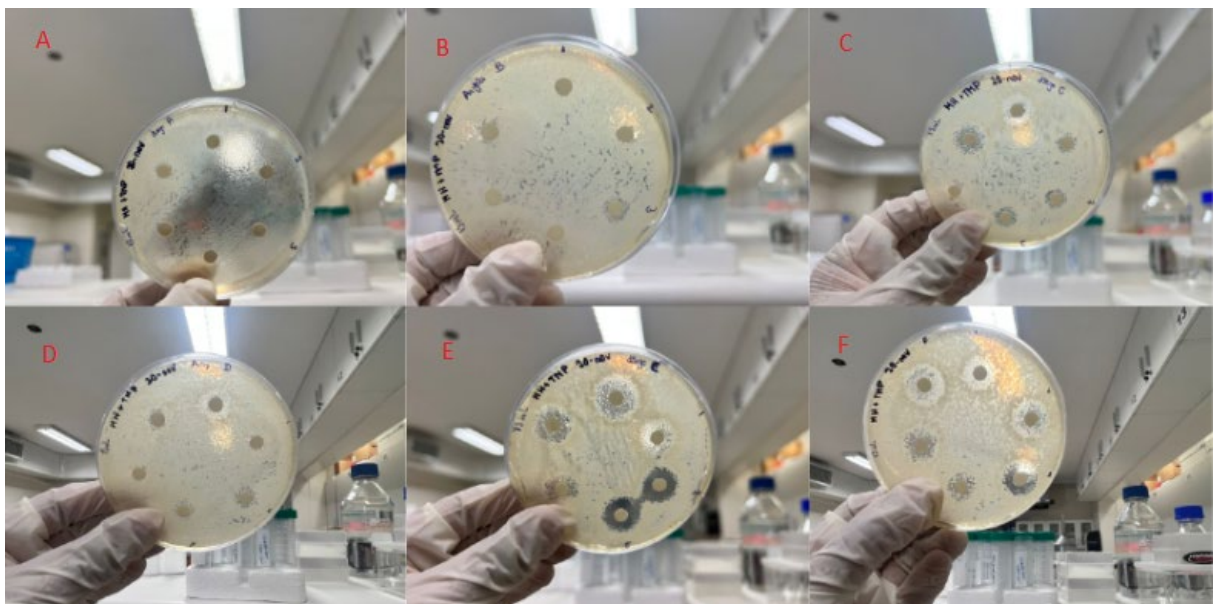


Figura 3: Placas con 15 mL agar Mueller Hinton II y trimetoprim (0,05 ug/mL) sembradas por triple estiramiento de *B. subtilis* a escala 0,5 Mc Farland a las cuales se sembraron discos con sulfametazina a una cantidad de 0,5ug ; 1ug ; 1,5ug (placas A y B) 2ug; 2,5ug; 3ug (placas C y D) y 5ug; 7,5ug ; 10ug (placas E y F).

Estas pruebas se realizaron por duplicado por cada tesista, y en cada una de las concentraciones del disco control, se observaron halos de inhibición que fueron registrados y se presentan en la tabla 2. No se detectaron halos de inhibición para las concentraciones de 0,5 µg y 1 µg. A partir de 1,5 µg se observaron halos de inhibición, con diámetros que fueron incrementándose conforme aumentaba la concentración del antibiótico, alcanzando un máximo de 9,625 mm con discos de 10 µg de antibiótico. Los resultados detallados se encuentran a continuación:

Tabla 2: Resultados de verificación de la Técnica del análisis microbiológico

Placa	Disco antibiótico	Halo de inhibición promedio
A - B	0,5 ug	ND
	1 ug	ND
	1,5 ug	2,375 mm
C - D	2 ug	1,5 mm
	2,5 ug	5,5 mm
	3 ug	3,625 mm
E - F	5 ug	5,625 mm
	7,5 ug	7,625 mm
	10 ug	9,625 mm

ND: No detectado

En la figura 4, se muestra la gráfica de dispersión realizada con los datos de la tabla 2, con una ecuación de la recta obtenida de $y = 0,9784x + 0,3986$, y un coeficiente de determinación (R^2) de 0,876, lo que indica una correlación positiva considerable entre ambas variables y la pendiente resultó estadísticamente significativa ($p < 0.001$).

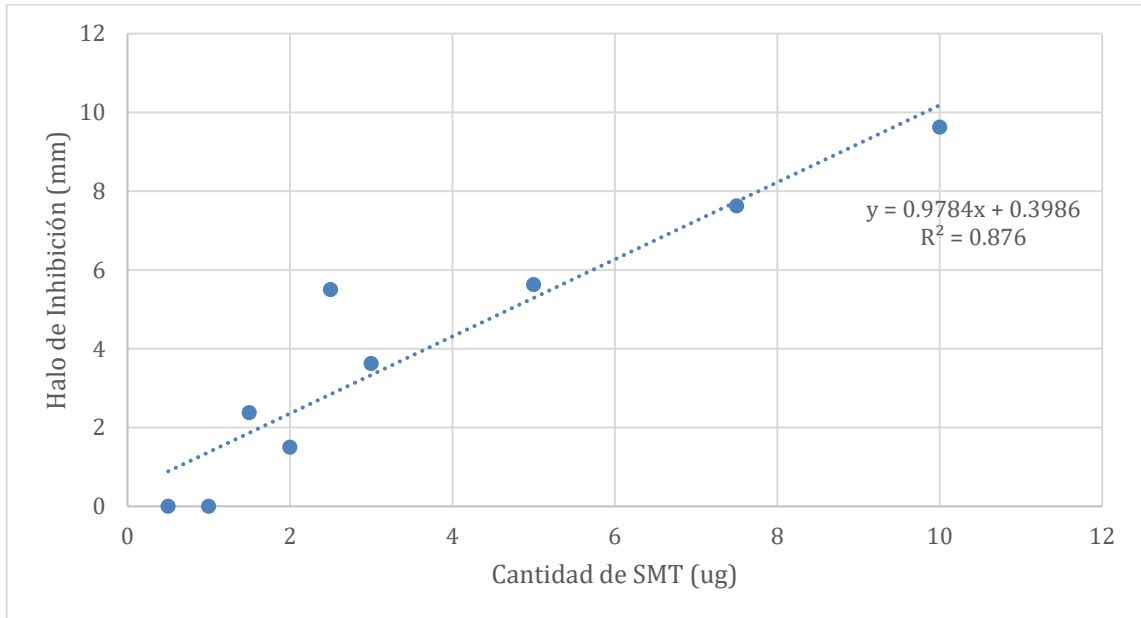


Figura 4: Relación entre el halo de inhibición obtenido por análisis microbiológico vs la cantidad de sulfametazina (sulfadimidina).

Posteriormente se ejecutó el ensayo utilizando muestras fortificadas con diferentes concentraciones del estándar por cada 5 gramos de muestra. Además, se modificó el pH de las soluciones de extracción y se utilizó una concentración de trimetoprim (TMP) constante de 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en el medio.

En la tabla 3A, donde se empleó un pH de 11,2, se observaron halos de inhibición detectables con concentraciones de SMT desde 200 hasta 80 μg por cada 5 gramos de muestra, con valores de halo de inhibición que disminuyeron de 5,9 mm a 2,3 mm conforme a la concentración de SMT disminuyó. A partir de concentraciones menores de 80 $\mu\text{g}/5\text{ g}$, es decir 16 partes por millón ($\mu\text{g}/\text{g}$), el halo de inhibición no fue detectable.

En la tabla 3B muestra los resultados donde se empleó un pH de 8,5. En este caso, el tamaño de los halos de inhibición tiende a ser menor en comparación con los resultados

obtenidos con un pH más alto (Tabla 3A). A partir de concentraciones menores de 100 µg de SMT en adelante, el halo de inhibición no es detectado (ND).

Tabla 3A: Resultados de la verificación de la técnica de ensayo microbiológico

Reporte	Concentración (µg) del Estándar añadido/ 5 g de muestra	pH de solución para extracción	Concentración TMP (µg/mL)	Lectura de halo de inhibición (mm)
1	200	11,2	0,1	5,9
2	150	11,2	0,1	4,6
3	100	11,2	0,1	3,2
4	80	11,2	0,1	2,3
5	60	11,2	0,1	ND
6	50	11,2	0,1	ND
7	40	11,2	0,1	ND
8	20	11,2	0,1	ND
9	0	11,2	0,1	ND

ND: No detectado

La gráfica de regresión (Figura 5A) correspondiente a la tabla 3A ilustra la relación de la cantidad de sulfametazina (SMT) agregada a muestras negativas y los halos de inhibición obtenidos utilizando un tampón buffer como solución para extracción con un pH de 11,2 con una ecuación de la recta de $y = 0,0377x - 1,2525$ y un coeficiente de determinación $R^2=0,9034$, lo que indica un ajuste entre cantidad de SMT y el halo de inhibición

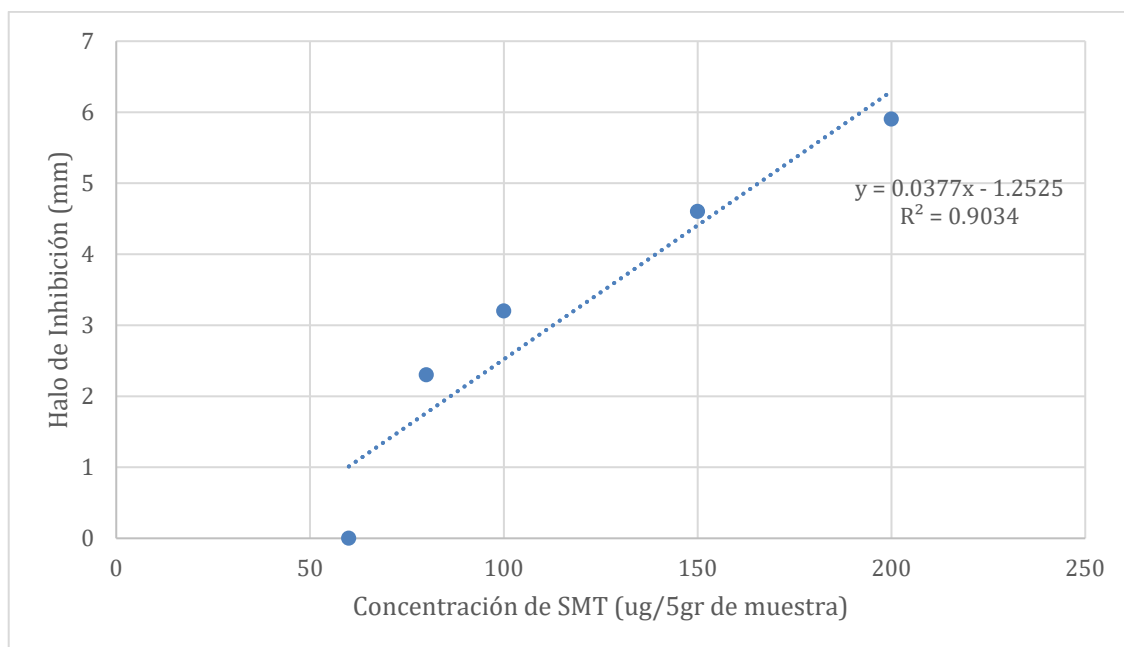


Figura 5A: Relación de halo de inhibición obtenido por análisis microbiológico mediante solución de extracción a pH 11,2 a determinada cantidad de sulfametazina (sulfadimidina) y concentración de trimetoprim en medio de cultivo a 0,1 µg/mL.

Tabla 4B: Resultados de la verificación de la técnica de ensayo microbiológico

Reporte	Concentración (µg) del Estándar añadido/ 5g	pH de solución para extracción	Concentración TMP (µg/mL)	Lectura de halo de inhibición (mm)
1	200	8,5	0,1	4,6
2	150	8,5	0,1	3,5
3	100	8,5	0,1	2,2
4	80	8,5	0,1	ND
5	60	8,5	0,1	ND
6	50	8,5	0,1	ND

7	40	8,5	0,1	ND
8	20	8,5	0,1	ND
9	0	8,5	0,1	ND

ND: No detectado

La figura 5B correspondiente a la gráfica de regresión lineal de la tabla 3B muestra la relación entre la cantidad de sulfametazina (SMT) agregada a muestras negativas y halos de inhibición obtenidos utilizando un tampón buffer como solución para extracción con un pH de 8,5. Para lo cual se obtuvo una ecuación de la recta: $y=0,0346x - 2,011$ y un coeficiente de determinación $R^2=0,8861$.

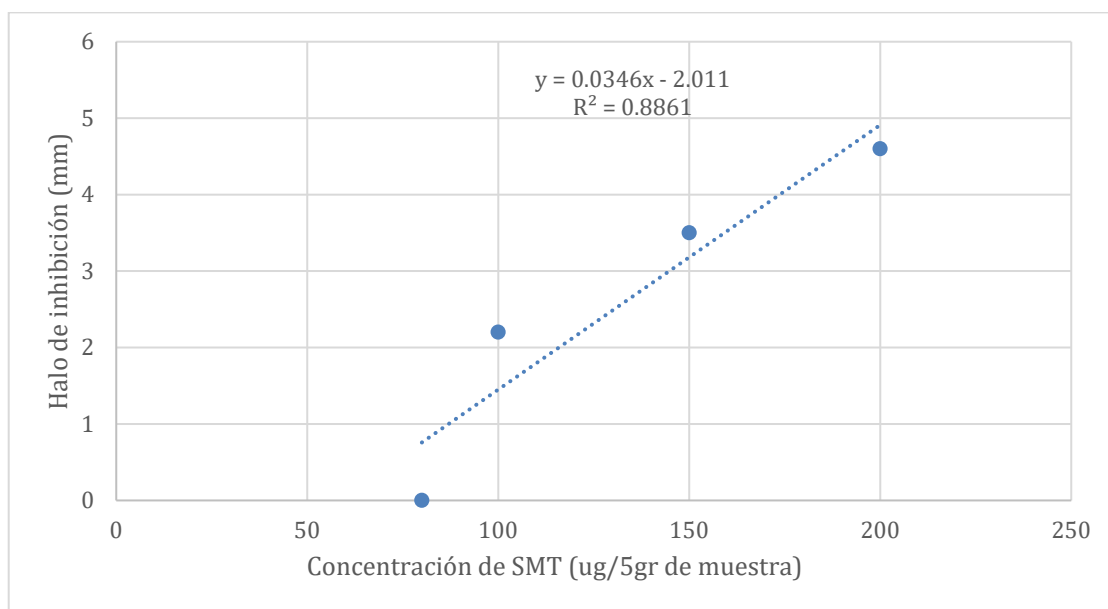


Figura 5B: Relación de halo de inhibición obtenido por análisis microbiológico mediante solución de extracción a pH 8,5 a determinada cantidad de sulfametazina (sulfadimidina) y concentración de trimetoprim en medio de cultivo a 0,1 µg/mL.

En el análisis de regresión lineal se demostró que el ensayo con pH 11,2 presentó un mejor ajuste del modelo ($R^2 = 0,9034$) en comparación con el ensayo a pH 8,5 ($R^2= 0,8861$) indicando así una correlación más robusta entre la concentración de antibiótico

patrón y halo de inhibición en condiciones alcalinas. Además, ambos modelos producidos resultaron en intercepto negativos (ensayo a pH 11,2 con valor de -1,2525 mm y ensayo a pH 8,5 con valor de -2,011 mm), que, si bien no se ajusta idealmente a un modelo biológico, debido a su valor negativo, se trató las muestras de forma matemáticamente ideal a fin de poder determinar el LOD sin necesidad de forzar el intercepto a cero.

Así también, se obtuvo que la significancia estadística de las pendientes es válida para los ensayos realizados ($p < 0.001$).

Además, se determinó el LOD teórico a 15,4 μg derivado de la curva de calibración y considerando una desviación estándar del blanco de 0,5 mm, aplicando la siguiente fórmula.

$$LOD = \frac{3,3 \times 0,5 + |-1,2525 \text{ mm}|}{0,0377 \text{ mm (}\mu\text{g/5g)}} = 76,98 \mu\text{g/5g} = 15,4 \mu\text{g/g}$$

Considerando como límite de detección práctico 15,4 $\mu\text{g/g}$ para la técnica microbiológica de cinco placas, se evidenció una sensibilidad insuficiente para su aplicación en la matriz de huevos de gallina, donde los residuos de sulfonamida suelen encontrarse en niveles traza ($\mu\text{g/kg}$). En consecuencia, se optó por no continuar con la evaluación de las muestras.

Resultados utilizando el kit de inmunoensayo enzimático competitivo:

Los extractos obtenidos en el pretratamiento de las muestras de huevo fueron refrigerados por no más de 24 horas para posteriormente ser usados para el análisis mediante el kit de inmunoensayo enzimático competitivo.

Se agregó por duplicado las muestras pretratadas y estándares provistos por el kit.

Las muestras están numeradas según el número de recolección consecutivo presentadas en la Tabla 1.

Resultados de lectura:

Tabla 5: Densidades ópticas obtenidas por lector de microplaca para cada pocillo a 450 nm

Estándar / Muestra	Absorbancia	
std1	1,500	1,521
std2	1,110	1,108
std3	0,725	0,632
std4	0,460	0,464
std5	0,229	0,227
std6	0,133	0,117
m1	1,469	1,453
m2	1,440	1,399
m3	1,370	1,365
m4	1,462	1,368
m5	1,253	1,379
m6	1,404	1,378
m7	0,775	0,694
m8	1,296	1,369
m9	1,406	1,356

Estándar / Muestra	Absorbancia	
m19	1,643	1,693
m20	1,422	1,447
m21	1,480	1,423
m22	1,496	1,469
m23	1,362	1,434
m24	1,454	1,519
m25	1,646	1,480
m26	1,524	1,469
m27	1,292	1,432
m28	1,446	1,390
m29	0,885	0,805
m30	0,896	0,817
m31	0,806	0,829
m32	0,823	0,802
m33	1,350	1,418

m10	1,453	1,391
m11	1,554	1,366
m12	1,502	1,494
m13	1,455	1,412
m14	1,594	1,398
m15	1,546	1,424
m16	1,453	1,405
m17	1,372	1,425
m18	1,496	1,344

std: estándar

m34	0,826	0,882
m35	1,407	1,551
m36	1,432	1,482
m37	1,350	1,460
m38	1,458	1,494
m39	1,297	1,460
m40	1,267	1,412
m41	1,362	1,542
m42	1,519	1,499

m: muestra

5.2 Método Inmunoensayo enzimático competitivo (cELISA)

El procesamiento de datos se realizó mediante el software provisto por el fabricante del kit, en el que se trabajó sobre los valores de absorbancia porcentual a las cuales se le aplicaron la función matemática logit/log especificada anteriormente en el apartado de análisis de datos 4.9.

Los resultados expresados en valores de absorbancia porcentual se hallaron mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Absorbancia \%} = \frac{A}{A_0} \times 100\%$$

Siendo:

A: Absorbancia promedio del estándar o muestra

A₀: Absorbancia promedio del estándar 1 (std1) de 0 por billón (ppb).

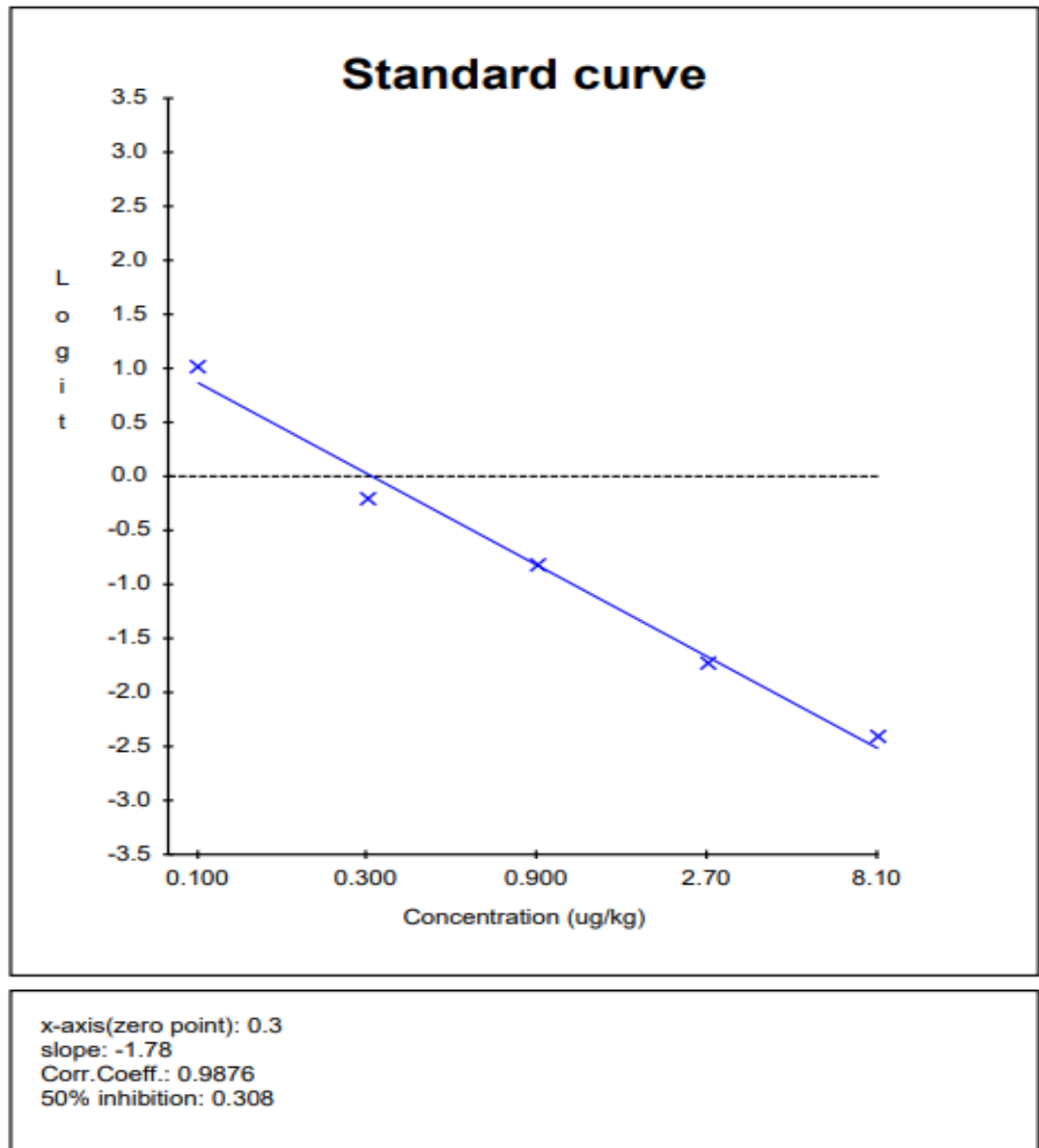


Figura 6: Relación entre concentración de residuo antimicrobiano (sulfametoxazol, sulfamonometoxina y sulfadiazina) y Absorbancia %

Los resultados de la curva de estándares mostraron un coeficiente de correlación lineal (r): 0,9938 y un coeficiente de determinación (R²): 0,9876 (Figura 6).

Tabla 6: Absorbancias promedio transformadas a concentraciones finales en µg/kg

Tienda - Recolección	Muestra	Absorbancia			Concentración (ug/kg)	Factor de dilución de muestra	Concentración Final (ug/kg)
		Promedio	(CV%)	(%)			
T1 - R1	1	1,461	0,8	96,72	< 0,100 ug/kg	2,0	-
T1 - R2	2	1,420	2	93,98	< 0,100 ug/kg	2,0	-
T1 - R1	3	1,368	0,3	90,53	< 0,100 ug/kg	2,0	-
T1 - R2	4	1,415	4,7	93,68	< 0,100 ug/kg	2,0	-
T2 - R1	5	1,316	6,8	87,12	< 0,100 ug/kg	2,0	-
T2 - R2	6	1,391	1,3	92,09	< 0,100 ug/kg	2,0	-
T3 - R1	7	0,735	7,8	48,63	0,331	2,0	0,662
T3 - R2	8	1,333	3,9	88,22	< 0,100 ug/kg	2,0	-
T4 - R1	9	1,381	2,6	91,43	< 0,100 ug/kg	2,0	-
T4 - R2	10	1,422	3,1	94,14	< 0,100 ug/kg	2,0	-
T4 - R1	11	1,460	9,1	96,66	< 0,100 ug/kg	2,0	-
T4 - R2	12	1,498	0,4	99,14	< 0,100 ug/kg	2,0	-
T4 - R1	13	1,434	2,1	94,90	< 0,100 ug/kg	2,0	-
T4 - R2	14	1,496	9,3	99,04	< 0,100 ug/kg	2,0	-
T5 - R1	15	1,485	5,8	98,31	< 0,100 ug/kg	2,0	-
T5 - R2	16	1,429	2,4	94,60	< 0,100 ug/kg	2,0	-
T6 - R1	17	1,399	2,7	92,59	< 0,100 ug/kg	2,0	-
T6 - R2	18	1,420	7,6	94,01	< 0,100 ug/kg	2,0	-
T7 - R1	19	1,668	2,1	110,43	N.C.	2,0	-
T7 - R2	20	1,435	1,2	94,97	< 0,100 ug/kg	2,0	-
T8 - R1	21	1,452	2,8	96,09	< 0,100 ug/kg	2,0	-
T8 - R2	22	1,483	1,3	98,15	< 0,100 ug/kg	2,0	-
T8 - R1	23	1,398	3,6	92,55	< 0,100 ug/kg	2,0	-
T8 - R2	24	1,487	3,1	98,41	< 0,100 ug/kg	2,0	-

T9 - R1	25	1,563	7,5	103,48	N.C.	2,0	-
T9 - R2	26	1,497	2,6	99,07	< 0,100 ug/kg	2,0	-
T10 - R1	27	1,362	7,3	90,17	< 0,100 ug/kg	2,0	-
T10 - R2	28	1,418	2,8	93,88	< 0,100 ug/kg	2,0	-
T11 - R1	29	0,845	6,7	55,94	0,226	2,0	0,452
T11 - R2	30	0,857	6,5	56,70	0,217	2,0	0,434
T11 - R1	31	0,818	2	54,12	0,248	2,0	0,496
T11 - R2	32	0,813	1,8	53,79	0,252	2,0	0,504
T12 - R1	33	1,384	3,5	91,63	< 0,100 ug/kg	2,0	-
T12 - R2	34	0,854	4,6	56,54	0,219	2,0	0,438
T13 - R1	35	1,479	6,9	97,91	< 0,100 ug/kg	2,0	-
T13 - R2	36	1,457	2,4	96,46	< 0,100 ug/kg	2,0	-
T13 - R1	37	1,405	5,5	89,71	< 0,100 ug/kg	2,0	-
T13 - R2	38	1,476	1,7	87,79	< 0,100 ug/kg	2,0	-
T14 - R1	39	1,379	8,4	91,26	< 0,100 ug/kg	2,0	-
T14 - R2	40	1,340	7,7	88,68	< 0,100 ug/kg	2,0	-
T14 - R1	41	1,452	8,8	96,13	< 0,100 ug/kg	2,0	-
T14 - R2	42	1,509	0,9	99,90	< 0,100 ug/kg	2,0	-

NC: No Cuantificable

T1-T14: Tienda 1 - Tienda 14

R1,R2: Recolección 1, Recolección 2

Los resultados de la técnica inmunoquímica mostraron que un 14,30% de las muestras analizadas (6/42) contienen residuos de sulfonamidas (sulfametoxazol, sulfamonometoxina o sulfadiazina) encontrándose dentro en un rango de concentración de 0,434 µg/kg - 0,662 µg/kg con un coeficiente de variación promedio de 4,15% (0,3% - 9,3%).

En un análisis más detallado de los resultados, se encontró que 2 muestras positivas (T11-R1 y T11-R2) pertenecían a un mismo proveedor dentro del lugar de estudio y al

ser evaluadas por duplicado, se obtuvo valores similares de 0,452 ug/kg - 0,434 ug/kg y 0,496 ug/kg - 0,504 ug/kg; además se obtuvo un valor de coeficiente de variación de 6,6% y 1,9% indicando así una baja variabilidad en las mediciones realizadas. En términos estadísticos, un coeficiente de variación (CV) menor al 15% es considerado aceptable en ensayos bioquímicos [50], lo que refuerza la confiabilidad de la técnica utilizada en consecuencia de una baja dispersión de los datos.

De esta forma se utilizó la proporción real obtenida de 14,30 % de muestras positivas que contenían residuos de sulfonamidas, aplicando la fórmula de intervalo de confianza al 95% se tiene:

$$\text{Intervalo de confianza 95\%} = 0,143 \begin{matrix} + \\ - \end{matrix} 1,96 \sqrt{\frac{0,143 * 0,857}{42}}$$

Por lo tanto, con una confianza del 95% se puede determinar que el promedio de muestras de huevos de gallina que contienen residuos de sulfonamida, específicamente sulfametoxazol, sulfamonometoxina o sulfadiazina comercializados en un mercado mayorista de Lima Este, estará entre 3,71% y 24,89%.

VI. DISCUSIÓN

El presente estudio tuvo como objetivo determinar la presencia de residuos antimicrobianos tipo sulfonamida (sulfametoxazol, sulfamonometoxina o sulfadiazina) en muestras de huevo de gallina recolectadas en un mercado mayorista de Lima Este en junio del 2024 empleando dos metodologías: el método microbiológico de “cinco placas” y el ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas de tipo competitivo (cELISA). En un contexto nacional, el estudio realizado por Alvarado Mamani [51] en la ciudad de Puno en 2024, reportó la presencia de residuos antibióticos en huevos de gallina comercializados en mercados locales, utilizando un método microbiológico de cribado. Aunque la técnica empleada no permitió identificar el tipo de antibiótico detectado debido a su naturaleza inespecífica, este hallazgo constituye una evidencia relevante del potencial de esta matriz como vehículo de exposición para los consumidores. Es por ello que, se refuerza la necesidad de aplicar métodos analíticos más sensibles y específicos que permitan caracterizar con mayor precisión dichos residuos antimicrobianos y

garantizar la inocuidad de un alimento de consumo masivo como el huevo de gallina. El método microbiológico de cinco placas se encuentra validado como una técnica tipo screening para múltiples matrices alimentarias según conformidad de la Decisión 2002/657/CE por Comisión de la Unión Europea [46]. Sin embargo, en esta investigación se utilizó únicamente la placa correspondiente al grupo de sulfonamidas, dado que el objetivo fue evaluar exclusivamente este tipo de antimicrobiano. Durante la aplicación de esta técnica, se utilizaron muestras provenientes de un productor con certificación internacional de bienestar animal, estas muestras fueron consideradas como control negativo debido a que al someterse al método microbiológico no se observó respuesta inhibitoria. Adicionalmente, esta técnica presentó limitaciones significativas para el tipo de matriz trabajada. Pues se observó un coeficiente de determinación inicial de $R^2=0,876$. Posteriormente se optimizó el pH de la solución de extracción a 11,2 que permitió incrementar el coeficiente de determinación de $R^2=0,903$, lo que refleja una relación más precisa y lineal entre la concentración del antibiótico patrón y el diámetro del halo de inhibición medido. Esta mejora es consistente con las propiedades fisicoquímicas de las sulfonamidas, las cuales presentan mayor solubilidad en medios alcalinos debido a su carácter ácido débil, puesto que, en medio alcalino, el grupo sulfonamida ($-SO_2NH-$) queda ionizado, aumentando así la solubilidad en fase acuosa y favoreciendo la extracción desde la matriz lipídica del huevo de gallina [52].

Adicionalmente, se evaluaron distintas concentraciones de trimetoprim en el medio (0,03; 0,05; 0,10 y 0,15 $\mu\text{g/mL}$) con el objetivo de potenciar la sensibilidad del ensayo sin comprometer el crecimiento del microorganismo. Esta estrategia se basa en estudios como el de Varenina *et al.* quienes demostraron que la adición de trimetoprim en concentraciones entre 0,07 y 0,30 $\mu\text{g/mL}$ mejora significativamente la sensibilidad del método frente a sulfonamidas, al reducir el límite de detección en matrices como músculo, riñón, suero y leche [53].

Sin embargo, en la verificación de la técnica no arrojaron mejoras significativas ya que el límite de detección del método fue de 15,4 $\mu\text{g/g}$, valor que supera ampliamente las concentraciones esperadas de residuos en muestras de huevo, y que representa 154 veces el Límite Máximo de Residuos (LMR) permitido para sulfonamidas (100 $\mu\text{g/kg}$) en otras matrices alimentarias. Estos hallazgos coinciden con lo reportado por Vercelli *et*

al. en 2022, quienes destacaron que los métodos microbiológicos, pese a su utilidad como pruebas rápidas de cribado, presentan baja especificidad, lo que genera datos incorrectos y además son susceptibles a interferencias, lo que puede ocasionar resultados erróneos o falsos negativos, especialmente en matrices complejas como el huevo de gallina, que contienen una elevada proporción de proteínas y lípidos [54].

Uno de los factores que podría explicar la baja sensibilidad del método microbiológico aplicado a la matriz de huevo de gallina es la posible degradación térmica de las sulfonamidas durante la preparación de las muestras. En la técnica fue necesario calentar la muestra a 85 °C por 5 minutos en baño maría, con el objetivo de desnaturalizar la lisozima, una enzima antimicrobiana naturalmente presente en la albúmina, cuya actividad podría interferir en el crecimiento del microorganismo indicador del ensayo. No obstante, este tratamiento térmico podría afectar la estabilidad de los residuos de sulfonamidas, disminuyendo así la detectabilidad del método [55]. Este aspecto metodológico representa un vacío importante en la literatura, y su documentación contribuye como reporte de referencia sobre las limitaciones del método microbiológico en matrices avícolas.

Debido a lo anteriormente mencionado, se optó por un ensayo inmunoenzimático tipo ELISA, el cual ofreció una alternativa eficaz, accesible y alineada con los recursos disponibles, sin comprometer la confiabilidad de los resultados.

Al aplicar el ensayo inmunoenzimático se encontró que un 14,3% de muestras (pool) analizadas (6/42) dieron positivo a residuos de sulfonamidas pudiendo tratarse de sulfametoxazol, sulfamonometoxina o sulfadiazina con concentraciones que oscilan entre 0,434 - 0,662 ug/kg. Estos resultados son comparables con los reportados por Sarkar *et. al.*, el cual evaluó residuos antimicrobianos en alimentos “*libres de antibióticos*” en los mercados agrícolas del este de Tennessee (EE. UU.) entre julio y septiembre de 2020, incluyendo huevos de gallina, el cual halló un número alto de muestras positiva (11/18)[25], posiblemente atribuida a un número reducido de muestras y al origen local de los productos, hallando concentraciones medias de 1,22 ug/kg de sulfonamidas, las cuales son similares a las obtenidas por el presente estudio. Los valores obtenidos en las muestras positivas presentaron una baja variabilidad entre réplicas de medición, lo que respalda la precisión del método utilizado. Debido a que el

coeficiente de variación obtenido (CV) fue menor a 15% y se encuentra dentro de los criterios de aceptación para ensayos bioquímicos, se demuestra que los resultados son consistentes y reproducibles. En concordancia con lo reportado por Gaudin *et al.* (2009) [20], este tipo de métodos de cribado han demostrado ser eficaz para un número elevado de muestras en menor tiempo, en comparación con métodos confirmatorios más complejos. Estos hallazgos refuerzan la utilidad del ensayo ELISA como herramienta de vigilancia inicial en programas de inocuidad alimentaria.

Respecto a los parámetros correspondientes al método inmunoquímico, se tiene información proporcionada por el proveedor (ANEXO 5) en la que se determina el límite de detección (LOD) como 0,1 ug/kg. Obteniéndose una correlación lineal en cuanto a la determinación de residuos antimicrobianos tipo sulfonamida en el rango de 0,1 µg/kg a 8,1 µg/kg. Además, se indica una repetibilidad expresada como coeficiente de variación (CV) menor a 15% y una tasa de recuperación para la matriz evaluada de 74,4%, que según guías internacionales, como el Codex Alimentarius (CAC/GL 71-2009) [57] y la Guía SANCO/12571/2013 [56] de la Comisión Europea establecen como aceptables las recuperaciones entre 70% - 120% para métodos aplicados a matrices alimentarias. Por lo que todos los resultados obtenidos en el análisis de huevos de gallina, cumplen y están dentro de los rangos previamente definidos en cuanto a los parámetros de desempeño establecidos, lo que garantiza la validez del ensayo como método de screen para la detección presuntiva de residuos de sulfonamida. La elección de ELISA sobre HPLC se justificó por la naturaleza exploratoria de la investigación, la necesidad de analizar múltiples muestras y las limitaciones de recursos, dado que la técnica de HPLC, si bien es confirmatorio, requiere equipamiento especializado, mayor tiempo y costos elevados.

En este sentido, resulta oportuno comparar nuestros hallazgos con los resultados obtenidos por Rufasto, S. [26], es importante considerar la diferencia metodológica entre ambos estudios. Mientras nuestro análisis se realizó mediante un kit de ELISA cualitativo, que permite identificar la presencia o ausencia de sulfonamidas, el estudio de Rufasto Santillán empleó HPLC-DAD, un método cuantitativo validado que posibilitó

determinar las concentraciones específicas de los residuos. En el caso del presente estudio, se evidenció la presencia de sulfonamidas en el 14,3% de las muestras de huevos de gallina comercializados en un mercado mayorista, lo que confirma la existencia de exposición aunque en menor proporción. En contraste, en huevos de codorniz provenientes de productores pequeños, se reportó que el 100% de las muestras analizadas (n=24) resultaron positivas para sulfadiazina y que el 95,83% (n=23) dieron positivo a sulfametoxazol, con una concentración promedio de 2,8 µg/kg y un valor máximo de 57,09 µg/kg. Estos resultados sugieren que, aunque la prevalencia en gallinas es más baja, la contaminación en codornices es prácticamente generalizada y en algunos casos con niveles elevados. En conjunto, ambos estudios resaltan la necesidad de un control sanitario más estricto y de regulaciones específicas para evitar la presencia de sulfonamidas en huevos, independientemente de la especie aviar de origen.

Del mismo modo, al comparar los resultados obtenidos con los reportados por Galarini *et al.* (2014), se identificaron coincidencias en la capacidad de los métodos ELISA para detectar residuos de sulfonamidas en matrices de huevo. En dicho estudio [58], los autores desarrollaron y validaron un ensayo competitivo indirecto de amplio espectro, con capacidad de identificar hasta 11 sulfonamidas en distintas matrices, incluido huevo, alcanzando límites de detección (LOD) cercanos a 10 µg/kg y capacidades de detección confirmadas (CCβ) alrededor de 20 µg/kg. En el presente estudio, el kit empleado mostró un LOD de 0,1 µg/kg, lo que representa una sensibilidad 100 veces mayor, permitiendo así evaluar residuos en concentraciones trazas. Sin embargo, su capacidad de detección se restringe sólo a tres sulfonamidas: sulfametoxazol, sulfadiazina y sulfamonometoxina. De este modo, mientras el ensayo de Galarini ofrece mayor cobertura de compuestos con menor sensibilidad, el kit utilizado en este trabajo prioriza la detección sensible de un grupo reducido de analitos. Esta relación inversa entre amplitud de detección y sensibilidad debe considerarse cuidadosamente al seleccionar la herramienta analítica más adecuada según los objetivos del estudio.

Según lo dispuesto en el Comisión Regulatoria (EU) No 37/2010 “of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum

residue limits in foodstuffs of animal origin”, se establece un límite máximo residual (LMR) de 100 µg/kg para la suma de sulfonamidas presentes en tejidos comestibles de diversas especies animales. Sin embargo, este mismo reglamento especifica de forma expresa que está prohibido el uso de sulfonamidas en animales que producen huevos o leche destinados al consumo humano, razón por la cual no corresponde un LMR para esta matriz. Por tanto, la detección de residuos de sulfonamidas en las muestras analizadas en este estudio constituye una situación de incumplimiento regulatorio, aun cuando las concentraciones detectadas se encuentren por debajo de los límites establecidos para otras matrices alimentarias.

A pesar de que las concentraciones obtenidas durante el análisis ELISA competitivo se encontraron en un rango bajo, la proporción de más del 14% en las muestras analizadas representa una fuente potencial de exposición continua. En un artículo reportado por Arséne *et al.* (2022), la ingesta continua de antibióticos tipo sulfonamida, incluso a niveles traza, han tenido asociación con alteraciones en la microbiota intestinal, lo cual puede llegar a comprometer el equilibrio bacteriano y la integridad de la respuesta inmune del individuo. Además, que se evidenció que estas sustancias pueden inducir reacciones de hipersensibilidad o alergias, especialmente en personas sensibilizadas, así como efectos tóxicos acumulativos a largo plazo incluyendo hepatotoxicidad, disfunción reproductiva y potencial actividad mutagénica. En este contexto, según informe del MIDAGRI, el consumo per cápita de huevo en Lima Metropolitana fue de 19,4 kg en el año 2023, con 308 unidades por persona y en el año 2024 con 312 unidades por persona [58]. Esta clase de exposición repetitiva adquiere una relevancia desde una perspectiva de salud pública, lo que refuerza la importancia de fortalecer la vigilancia sanitaria, así como promover investigaciones que evalúen los riesgos asociados a la ingesta crónica de residuos de sulfonamidas en alimentos de origen animal.

Finalmente, los hallazgos del presente estudio confirman la presencia de residuos de antibióticos tipo sulfonamida, específicamente sulfametoxazol, sulfamonometoxina y sulfadiazina en huevos de gallina destinados al consumo humano y comercializados en un mercado mayorista de Lima Este. Esta situación representa un potencial riesgo para

la salud pública, dado que la exposición repetida a niveles subterapéuticos de antibióticos en alimentos puede favorecer de forma progresiva el desarrollo de resistencia antimicrobiana (RAM). Tal como advierten Arsène *et al.* (2022), incluso residuos en concentraciones traza pueden ejercer presión selectiva sobre la microbiota intestinal y patógena, promoviendo la supervivencia y propagación de cepas resistentes, comprometiendo los esquemas terapéuticos y aumentando la carga de enfermedades infecciosas. Este fenómeno, al acumularse a nivel poblacional, contribuye al aumento sostenido de la resistencia bacteriana, afectando la eficacia de los tratamientos antimicrobianos disponibles [60].

En este contexto, la detección de sulfonamidas en un alimento de consumo masivo como el huevo de gallina refuerza la necesidad de implementar medidas de control, trazabilidad y capacitación técnica en el sector pecuario, como parte de una estrategia integral de salud pública.

VII. CONCLUSIÓN

- Se verificó que la capacidad de detección del método microbiológico de “cinco placas”, empleando únicamente la placa específica para sulfonamidas, presentó un límite de detección (LOD) de 15,4 mg/kg, valor que evidencia una baja sensibilidad para detectar residuos de sulfonamidas.
- La evaluación de las muestras mediante la técnica microbiológica resultó inviable para los fines analíticos de este estudio. Debido al elevado LOD reportado, el método no posee la capacidad necesaria para detectar residuos de sulfonamidas en concentraciones traza ($\mu\text{g}/\text{kg}$).
- Los resultados obtenidos utilizando el método cELISA confirman la presencia de residuos de sulfonamidas en huevos de gallina comercializados en Lima Este, con una prevalencia del 14,3% y concentraciones cuantificadas entre 0,434 y 0,662 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

VIII. RECOMENDACIÓN

Se resalta la importancia de implementar programas de monitoreo sistemático en matrices avícolas y de emplear técnicas analíticas más específicas, con el fin de prevenir efectos adversos y contribuir a la mitigación del desarrollo de resistencia antimicrobiana.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Enomoto H, Petritz Oa, Thomson Ae, Flammer K, Ferdous F, Meyer E, Et Al. Egg Residue And Depletion In Rhode Island Red Hens (Gallus Gallus Domesticus) Following Multiple Oral Doses Of Trimethoprim-Sulfamethoxazole. Regulatory Toxicology And Pharmacology [Internet]. 1 De Julio De 2021 [Citado 7 De Abril 2023];123:104941. Disponible En: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0273230021000817>
2. Cota-Rubio, E., Hurtado-Ayala, L., Pérez-Morales, E., & Alcántara-Jurado, L. (2014). Resistencia A Antibióticos De Cepas Bacterianas Aisladas De Animales Destinados Al Consumo Humano. Reibci, 1(1), 75-85. Disponible En: https://scielo.lsciii.es/scielo.php?pid=S0213-91112002000200002&script=sci_arttext&tlng=pt
3. Bezerra, W. G. A., Horn, R. H., Silva, I. N. G., Teixeira, R. S. C., Lopes, E. S., Albuquerque, Á. H., & Cardoso, W. C. (2017). Antibióticos No Setor Avícola: Uma Revisão Sobre A Resistência Microbiana. Archivos De Zootecnia, 66(254), 301-307. Disponible En: <https://doi.org/10.21071/az.v66i254.2335>
4. Revisión Del Desarrollo Avícola. Food And Agriculture Organization (Fao); 2013 [Citado 7 Abril 2023]. Disponible En: <https://www.fao.org/3/l3531s/l3531s01.pdf>
5. Gutiérrez Mde Los A. Avicultura Principal Fuente De Proteína Animal De Perú: Afectada Por Covid-19 [Internet]. Avinews, La Revista Global De Avicultura. 2020 [Citado 7 Abril 2023]. Disponible En: <https://avinews.com/avicultura-principal-fuente-proteina-animal-peru-afetada-covid-19/>
6. Ministerio De Desarrollo Agrario Y Riego. Anuario Estadísticoestadístico De Producción Ganadera Y Avícola 2023 [Internet]. 2024. Disponible En: <https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/6837096/2730346-anuario-produccion-ganadera-y-avicola-2023.pdf?v=1724689518>
7. Veterinaria Digital - Avicultura, Porcicultura, Rumiantes Y Acuicultura [Internet]. [Citado 20 De Febrero 2025]. Bioseguridad En La Granja Avícola - Avicultura - Producción Avícola. Disponible En:

[Http://Https%253a%252f%252fwww.Veterinariadigital.Com%252farticulos%252fbioseguridad-En-La-Granja-Avicola%252f](http://https%253a%252f%252fwww.Veterinariadigital.Com%252farticulos%252fbioseguridad-En-La-Granja-Avicola%252f)

8. Decreto Supremo N.° 029-2007-Ag; 020-2009-Ag [Internet]. [20 De Febrero 2025]. Disponible En: [Https://Www.Gob.Pe/Institucion/Senasa/Normas-Legales/1050290-029-2007-Ag-020-2009-Ag](https://Www.Gob.Pe/Institucion/Senasa/Normas-Legales/1050290-029-2007-Ag-020-2009-Ag)
9. Guía De Buenas Prácticas Pecuarias En Producción De Aves [Internet]. [Citado 20 De Febrero De 2025]. Disponible En: [Https://Www.Gob.Pe/Institucion/Senasa/Informes-Publicaciones/994196-Guia-De-Buenas-Practicas-Pecuarias-En-Produccion-De-Aves](https://Www.Gob.Pe/Institucion/Senasa/Informes-Publicaciones/994196-Guia-De-Buenas-Practicas-Pecuarias-En-Produccion-De-Aves)
10. Houriet J. Sitio Argentino De Producción Animal. 2007. Guía Práctica De Enfermedades Más Comunes En Aves De Corral(Ponedoras Y Pollos). Disponible En: [Https://Www.Produccion-Animal.Com.Ar/Produccion_aves/Enfermedades_aves/90-Enfermedades.Pdf](https://Www.Produccion-Animal.Com.Ar/Produccion_aves/Enfermedades_aves/90-Enfermedades.Pdf)
11. Boletín Estadístico Mensual De La Producción Y Comercialización De Productos Avícolas (Enero 2023) [Internet]. Midagri. 2023 Mar [Citado 8 Abril 2023]. Disponible En: [Https://Cdn.Www.Gob.Pe/Uploads/Document/File/4309054/Bolet%3%Adn%20sobre%20producci%C3%B3n%20y%20comercializaci%C3%B3n-Av%C3%Adcola-%20enero%202023.Pdf?V=1679522477](https://Cdn.Www.Gob.Pe/Uploads/Document/File/4309054/Bolet%3%Adn%20sobre%20producci%C3%B3n%20y%20comercializaci%C3%B3n-Av%C3%Adcola-%20enero%202023.Pdf?V=1679522477)
12. Rocha M. Uso De Antimicrobianos En La Avicultura: Sus Implicaciones En La Salud Pública [Internet]. 2012 [Citado 8 Abril 2023]. Disponible En: [Https://Repositorio.Unal.Edu.Co/Bitstream/Handle/Unal/20773/05598590.2012.Pdf?Sequence=1](https://Repositorio.Unal.Edu.Co/Bitstream/Handle/Unal/20773/05598590.2012.Pdf?Sequence=1)
13. López H, Olvera Lg, De Lfj. Sulfonamidas Y Diaminopirimidinas. In: Farmacología Clínica En Aves Comerciales. 4ta Ed. México: Mcgraw-Hill Interamericana Editores, S.A. De C.V.; 2010. P. 179–93.
14. Kan Ca, Petz M. Residuos De Medicamentos Veterinarios En Huevos Y Su Distribución Entre La Yema Y La Clara. J Agric Food Chem [Internet]. 1 De Diciembre De 2000 [Citado 10 De Marzo De 2025];48(12):6397-403. Disponible En: [Https://Pubs.Acs.Org/Doi/10.1021/Jf000145p](https://Pubs.Acs.Org/Doi/10.1021/Jf000145p)
15. Martínez M. Informe Del Comité Científico De La Agencia Española De Consumo,

- Seguridad Alimentaria Y Nutrición (Aecosan) En Relación Al Riesgo De La Presencia De Residuos De Sulfonamidas En Huevos Como Resultado De Una Contaminación Cruzada En La Producción De Piensos.[Internet]. 2017 [Citado 8 Abril 2023]. Disponible En : https://www.aesan.gob.es/Aecosan/Docs/Documentos/Seguridad_alimentaria/Evaluacion_riesgos/Informes_comite/Sulfonamidas.Pdf
16. David B. Determinantes Para El Uso De Antibióticos Según Las Actitudes Y Percepciones De Médicos Veterinarios En La Producción Avícola De Ecuador [Internet]. Repositorio Digital Uce. Quito: Uce; 2019 [Citado 8 De Abril 2023]. Disponible En: <https://www.dspace.uce.edu.ec/entities/publication/C7ca6186-D103-433b-B4b2-73e3704c3536>
 17. murray Cjl, Ikuta Ks, Fablina Sharara, Swetschinski L, Aguilar Gr, Gray A, Et Al. Global Burden Of Bacterial Antimicrobial Resistance In 2019: A Systematic Analysis. The Lancet [Internet]. 2022 Jan 19 [Citado 15 Mayo 2023];399(10325):629–55.Disponible En: [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/pii/S0140-6736\(21\)02724-0/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/pii/S0140-6736(21)02724-0/fulltext)
 18. owusu-Doubreh B, Appaw Wo, Abe-Inge V. Antibiotic Residues In Poultry Eggs And Its Implications On Public Health: A Review. Scientific African [Internet]. Marzo De 2023 [Citado 10 De Marzo De 2025];19:E01456. Disponible En: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2468227622003611>
 19. Pérez, Tolosa. Universidad De Belgrano Ensayos De Familiarización En La Técnica De Detección De Residuos De Antibióticos Y Sulfamidas En Músculo Esquelético Animal Por El Método De Las Cuatro Placas. [Internet]. 221.29.250. [Citado El 11 De Abril 2023]. Disponible En: http://190.221.29.250/bitstream/handle/123456789/117/146_perez.pdf?sequence=2&isallowed=Y
 20. Díez P ,Martín M. Validation of the five-plate screening test for the detection of antibiotic residues in food. Estimation of the limit of detection. Rev Comité Científico AESAN. 2012;16:109-130.

21. Gaudin, V., Hedou, C., Rault, A., Sanders, P., & Verdon, E. (2009). Comparative Study Of Three Screening Tests, Two Microbiological Tube Tests, And A Multi-Sulphonamide Elisa Kit For The Detection Of Antimicrobial And Sulphonamide Residues In Eggs. *Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 26(4), 427–440. Disponible En: <https://doi.org/10.1080/02652030802527626>
22. Wang S, Zhang Hy, Wang L, Duan Zj, Kennedy I. Analysis Of Sulphonamide Residues In Edible Animal Products: A Review. *Food Addit Contam.* 2006;23(4):362–84. Disponible En: <http://dx.doi.org/10.1080/02652030500499359>
23. Sasanya, J. J., Okeng, J. W., Ejobi, F., & Muganwa, M. (2005). Use Of Sulfonamides In Layers In Kampala District, Uganda And Sulfonamide Residues In Commercial Eggs. *African Health Sciences*, 5(1), 33–39. Disponible En: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15843129/>
24. Ulomi Wj, Mgaya Fx, Kimera Z, Matee Mi. Determinación De Residuos De Sulfonamidas Y Tetraciclinas En Tejidos Hepáticos De Pollos De Engorde Vendidos En Los Municipios De Kinondoni E Ilala, Dar Es Salaam, Tanzania. *Antibióticos* – 2022; 11(9):1222. Disponible En: <https://doi.org/10.3390/antibioticos11091222>
25. Wang, R., Zhang, C. X., Li, Z. Y., Zheng, Z. Y., Xiang, Y., Liu, Y., Zhao, R. F., & Fang, J. (2022b). Detection Of Fluoroquinolone And Sulfonamide Residues In Poultry Eggs In Kunming City, Southwest China. *Poultry Science*, 101(6), 101892. Disponible En: <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.101892>
26. Sarkar S, Souza Mj, Martin-Jimenez T, Abouelkhair Ma, Kania Sa, Okafor Cc. Tetracycline, Sulfonamide, And Erythromycin Residues In Beef, Eggs, And Honey Sold As "Antibiotic-Free" Products In East Tennessee (Usa) Farmers' Markets. *Vet Sci.* 2023 Mar 24;10(4):243. Disponible En: [Doi: 10.3390/vetsci10040243](https://doi.org/10.3390/vetsci10040243). Pmid: 37104399; Pmcid: Pmc10143955.
27. Rufasto Santillan. Presencia De Residuos De Sulfonamidas En Huevos De Codorniz Provenientes De Pequeños Productores De Cuatro Distritos De Lima Metropolitana. [Tesis De Pregrado]. Lima: Universidad Peruana Cayetano

- Heredia; 2024. Recuperado A Partir De:
<https://Repositorio.Upch.Edu.Pe/Handle/20.500.12866/15951>
28. El Nuevo Informe De Nutrición De La Onu Destaca La Importancia De Los Huevos En La Salud Y El Desarrollo Humanos [Internet]. International Egg Commission. 2021 [Citado 8 Abril 2023]. Disponible En: <https://Www.Internationalegg.Com/Es/Resource/New-Un-Nutrition-Report-Highlights-The-Importance-Of-Eggs-In-Human-Health-And-Development/>
 29. Morris S. Huevos: Aprovechar Su Potencial Para Luchar Contra El Hambre Y La Malnutrición [Internet]. Organización De Las Naciones Unidas Para La Alimentación Y La Agricultura.Fao. 2018 [Citado 8 Abril 2023]. Disponible En: <https://Www.Fao.Org/Fsnforum/Es/Consultation/Eggs-Nutrition>
 30. Ministerio De Desarrollo Agrario Y Riego. Panorama Y Mercado Del Huevo De Gallina[Internet]. 2024. Disponible En:https://Cdn.Www.Gob.Pe/Uploads/Document/File/438987/Panorama__mercado_huevo_de_gallina.Pdf
 31. Ministerio De Desarrollo Agrario Y Riego. Valor De La Producción (Vbp) Agropecuaria - Regional [Internet]. [Citado 10 De Marzo De 2025]. Disponible En:<https://App.Powerbi.Com/View?R=Eyjrijoiy2nlotfkotmtmjgxyy00nthjlwe0mjutngqwmda0yty1nzc1iiwidci6ijdmmdg0nji3ltdmndatndg3os04ote3ltk0yjpg2zmqznwyzzij9&PageName=Reportsectioncdcb240117bc1370448b>
 32. Codex Alimentarius. Maximum Residue Limits (Mrls) [Internet]. Rome: Food And Agriculture Organization Of The United Nations (Fao); [Citado El 18 De Abril 2025]. Disponible En: <https://Www.Fao.Org/Fao-Who-Codexalimentarius/Codex-Texts/Maximum-Residue-Limits/Es/>
 33. Ministerio De Salud Del Perú. Resolución Ministerial N.º 372-2016-Minsa: Aprueban La Nts N.º 120-Minsa/Digesa-V.01 “Norma Sanitaria Que Establece Los Límites Máximos De Residuos (Lmr) De Medicamentos Veterinarios En Alimentos De Consumo Humano” [Internet]. Lima: Minsa; 2016 [Citado 2025 Abr 18]. Disponible En: <https://Www.Gob.Pe/Institucion/Minsa/Normas-Legales/192288-372-2016-Minsa>
 34. Comisión Europea. Reglamento (Ue) N° 37/2010 De La Comisión De 22 De

- Diciembre De 2009 Relativo A Las Sustancias Farmacológicamente Activas Y Su Clasificación Por Lo Que Se Refiere A Los Límites Máximos De Residuos En Los Productos Alimenticios De Origen Animal. Doue L 15 De 20.1.2010, P. 1–72. Disponible En: [https://Agriculturaganaderia.Jcyl.Es/Web/Jcyl/Agriculturaganaderia/Es/Plantilla100detalle/1284789872883/Normativa/1284789877371/Redaccion#:~:Text=D e%20origen%20animal- ,Reglamento%20\(Ue\)%20n%C3%Bamero%2037%2f2010%20de%20la%20comisi %C3%B3n%20de,Productos%20alimenticios%20de%20origen%20animal](https://Agriculturaganaderia.Jcyl.Es/Web/Jcyl/Agriculturaganaderia/Es/Plantilla100detalle/1284789872883/Normativa/1284789877371/Redaccion#:~:Text=D e%20origen%20animal- ,Reglamento%20(Ue)%20n%C3%Bamero%2037%2f2010%20de%20la%20comisi %C3%B3n%20de,Productos%20alimenticios%20de%20origen%20animal)
35. El.Peruano. 2016. Norma Sanitaria Que Establece Los Límites Máximos De Residuos (Lmr) De Medicamentos Veterinarios En Alimentos De Consumo Humano. [Internet]. Disponible En: <https://Www.Senasa.Gob.Pe/Senasa/Descargasarchivos/2014/11/Rm-372-2016-Minsaaprueba-Nts-120-Minsa-Digesa-V01-Lmr-Medicamentos.Pdf>
36. Aerts, M. M. L., Hogenboom, A. C. And Brinkman, U. A. Th. 1995. Analytical Strategies For The Screening Of Veterinary Drugs And Their Residues In Edible Products. J. Chromatogr. 667, 1-20.
37. Mercado De Productores Santa Anita. Grupo Scout Federico Gallese ; 2009 [Citado 15 De Junio 2023]. Disponible En: <https://Mercadoproductoressantaanita.Blogspot.Com/>
38. Alsemo N, Huarcaya C. [Internet] [Tesis]. “Control De Inventarios En Las Empresas De Abarrotes Del Mercado De Productores, Santa Anita, 2021.” 2021 [Citado 14 De Junio 2023]. Disponible En: <https://Repositorio.Upn.Edu.Pe/Bitstream/Handle/11537/26945/Tesis.Pdf?Sequence=1&Isallowed=Y>
39. Gamarra C. Mercado Productores De Santa Anita: De Iniciar Con Menos De 10 Ambulantes Y Ahora Tener Más De 7 Hectáreas De Comercio [Internet]. Elpopular; 2023 Jan 11 [Citado 15 De Junio 2023];Disponible En: <https://Elpopular.Pe/Actualidad/2023/01/10/Mercado-Productores-Santa-Anita-Historia-Como-Iniciaron-Menos-10-Ambulantes-Ahora-Tienen-7-Hectareas-Comercio-174054>

40. Agencia Española De Seguridad Alimentaria Y Nutrición. Five-Plate Screening Test For The Detection Of Antibiotic Residues [Internet]. Madrid, 2012. Disponible En: https://www.aesan.gob.es/Aecosan/Docs/Documentos/Publicaciones/Revistas_comite_cientifico/Comite_cientifico_16.Pdf
41. Reglamento (Ce) No 470/2009 Del Parlamento Europeo Y Del Consejo Por El Que Se Establecen Procedimientos Comunitarios Para La Fijación De Los Límites De Residuos De Las Sustancias Farmacológicamente Activas En Los Alimentos De Origen Animal, Se Deroga El Reglamento (Cee) No 2377/90 Del Consejo Y Se Modifican La Directiva 2001/82/Ce Del Parlamento Europeo Y Del Consejo Y El Reglamento (Ce). Disponible En: <https://www.boe.es/Doce/2009/152/L00011-00022.Pdf>
42. Huevos Pampamayo. Certified Humane Latino | Bienestar Animal. 2022. Disponible En: <https://certifiedhumanelatino.org/Productoscertificado/Huevos-Pampamayo/>
43. Gudding R. An Improved Bacteriological Method For The Detection Of Sulfonamide Residues In Food. *Acta Vet Scand.* 1976;17:458–464. Doi: 10.1186/Bf03547901.
44. Maekawa Maeda, D. A. Detección De Residuos De Oxitetraciclina En Huevos De Gallinas Medicadas Bajo Vía Oral Y En Diferentes Dosis; 2008.
45. Anderson, M. D. R. P., & Calderón, V. *Microbiología Alimentaria: Metodología Analítica Para Alimentos Y Bebidas.* Ediciones Diaz De Santos; 1999. P. 210-213.
46. Decisión 2002/657/Ce De La Comisión En Cuanto Al Funcionamiento De Los Métodos Analíticos Y La Interpretación De Los Resultados.
47. International Council For Harmonisation Of Technical Requirements For Pharmaceuticals For Human Use (Ich). *Validation Of Analytical Procedures: Ich Harmonised Guideline Q2(R2).* Final Version. Geneva: Ich; 2023 Nov 1. Disponible en: https://database.ich.org/sites/default/files/ich_q2%28r2%29_guideline_2023_1130.Pdf.
48. Findlay, J. W., & Dillard, R. F. (2007). Appropriate Calibration Curve Fitting In

- Ligand Binding Assays. *The Aaps Journal*, 9(2), E260–E267.
<https://doi.org/10.1208/Aapsj0902029>
49. Triola Mf. *Estadística*. 12.ª Ed. México: Pearson; 2018. Capítulo: Estimación De La Proporción De Una Población. P. 320.
 50. Aydın S, Emre E, Ugur K, Aydın Ma, Sahin İ, Cinar V, Akbulut T. An Overview Of Elisa: A Review And Update On Best Laboratory Practices For Quantifying Peptides And Proteins In Biological Fluids. *J Int Med Res*. 2025;53(2):1-18. Doi:10.1177/03000605251315913
 51. Alvarado Mamani Ab. Residuos De Antibióticos En Huevos De Gallina Expendidos En Los Mercados De La Ciudad De Puno 2023 [Tesis Profesional]. Puno (Pe): Universidad Nacional Del Altiplano; 2024. Disponible En: <https://tesis.unap.edu.pe/handle/20.500.14082/22135>
 52. Akili S, Ben Hadda D, Bitar Y, Balash A, Fawaz Chehna M. Design, Synthesis And Characterization Of Novel Sulfonamides Derivatives As Anticancer Agent Targeting Egrf Tk, And Development Of New Methods Of Synthesis By Microwave Irradiation. *Int J Org Chem (Irvine)* [Internet]. 2021 ;11(04):199–223. Disponible En: <https://www.scirp.org/journal/paperinformation?paperid=113716>
 53. Varenina I, Bilandžić N, Božić Luburić Đ, Solomun Kolanović B, Varga I, Sedak M, Đokić M. Determination Of Quinolones, Macrolides, Sulfonamides And Tetracyclines In Honey Using Quechers Sample Preparation And UHPLC-MS/MS Analysis. *Food Control*. 2023;153:109676. Doi: 10.1016/j.foodcont.2023.109676
 54. Vercelli C, Amadori M, Gambino G, Re G. A Review On The Most Frequently Used Methods To Detect Antibiotic Residues In Bovine Raw Milk. *Int Dairy J*. 2023;145:105695. Doi: 10.1016/j.idairyj.2023.105695
 55. Roca M, Althaus RI, Molina Mp. Thermodynamic Analysis Of The Thermal Stability Of Sulphonamides In Milk Using Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Detection. *Food Chem*. 2013 Jan 15;136(2):376-83. Doi: 10.1016/j.foodchem.2012.08.055. Epub 2012 Aug 31. Pmid: 23122073.
 56. Fao/Who Codex Alimentarius Commission. Guidelines For The Design And Implementation Of National Regulatory Food Safety Assurance Programmes Associated With The Use Of Veterinary Drugs In Food-Producing Animals (Cac/Gl

- 71-2009). Rome: Fao/Who; 2009. Disponible En: https://www.fao.org/input/download/standards/11252/Cxg_071e_2014.pdf
57. Comisión Europea. Guidance Document On Analytical Quality Control And Validation Procedures For Pesticide Residues Analysis In Food And Feed (Sanco/12571/2013). Brussels: European Commission; 2013. Disponible En: https://www.eurl-pesticides.eu/library/docs/allcrl/aqcguidance_sanco_2013_12571.pdf
58. Galarini R, Diana F, Moretti S, Puppini B, Saluti G, Persic L. Development And Validation Of A New Qualitative Elisa Screening For Multiresidue Detection Of Sulfonamides In Food And Feed. *Food Control*. 2014;35(1):132–139. Doi: 10.1016/j.foodcont.2013.07.014
59. Ministerio De Desarrollo Agrario Y Riego (Midagri). Perú Produce Más De 500 Mil Toneladas De Huevo Al Año Y Su Consumo Va En Aumento [Internet]. Lima: Midagri; 23 De Setiembre De 2024 [Citado El 21 De Setiembre De 2025]. Disponible En: <https://www.gob.pe/institucion/midagri/noticias/1037793-midagri-peru-produce-mas-de-500-mil-toneladas-de-huevo-al-ano-y-su-consumo-va-en-aumento>
60. Arsène Mmj, Davares Akl, Viktorovna Pi, Andreevna Sl, Sarra S, Khelifi I, Das Ms. The Public Health Issue Of Antibiotic Residues In Food And Feed: Causes, Consequences, And Potential Solutions. *Veterinary World*. 2022;15(3):662-671. Doi:10.14202/vetworld.2022.662-671

ANEXOS

Anexo 1:

Tabla 7: Producción pecuaria por año, según producto, 2007-2023

Producto	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023P
Ave 1	939.6	1,069.7	1,176.1	1,243.8	1,358.7	1,477.0	1,529.7	1,606.6	1,736.1	1,846.3	1,913.8	2,058.1	2,149.8	2,101.8	2,136.1	2,197.3	2,172.5
'Pollo 1	870.0	990.9	1,095.6	1,159.6	1,218.2	1,381.1	1,433.8	1,503.9	1,621.8	1,714.0	1,786.0	1,929.0	2,014.6	1,971.2	1,999.0	2,057.1	2,035.3
Huevo gallina	257.6	266.5	268.7	285.1	317.7	314.0	349.8	358.6	386.3	401.0	415.3	452.2	488.5	497.5	504.1	511.0	503.1

P Preliminar

1 Peso de animal vivo

Fuente: Direcciones Regionales de Agricultura

Elaborado por: Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego - DGESEP - DEIA. <https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/6837096/2730346-anuario-produccion-ganadera-y-avicola-2023.pdf?v=1724689518>

Anexo 2: Información de la concentración promedio en mg/g de sulfonamidas en varios tejidos de gallina

Tabla 8: Concentración promedio en $\mu\text{g/g}$ de sulfonamida en varios tejidos de gallina siete días después de la administración de cada una de las sulfonamidas listadas a dosis de 100 mg/kg de alimento

Tejido	Sulfonamida				
	Sulfadimidina ($\mu\text{g/g}$)	Sulfadiazina ($\mu\text{g/g}$)	Sulfamonometoxina ($\mu\text{g/g}$)	Sulfametoxasol ($\mu\text{g/g}$)	Sulfaquinoxalina ($\mu\text{g/g}$)
Plasma	1,72	0,25	3,25	1,66	12,12
Hola	0,33	0,29	0,85	0,77	2,43
Músculo	0,28	0,16	0,94	0,51	1,14
Ovario	0,34	0,11	1,02	0,85	2,2
Oviducto	0,29	0,08	0,74	0,33	2,17
Istmo	0,33	0,18	1,21	0,94	2,41

Fuente: Farmacología Clínica en aves comerciales (2010)

Anexo 3: Información de producción de huevos por región

Tabla 9: Perú. Producción de huevo de Gallina por mes, según región 2023 (Toneladas)

Región	Ene-Dic	Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Set	Oct	Nov	Dic
Nacional	503,080	41,934	40,597	40,958	41,257	41,449	41,728	41,960	42,590	42,455	42,513	42,756	42,883
Tumbes	93	7	6	7	7	7	10	8	8	9	8	8	8
Piura	4,657	435	417	368	331	326	326	350	525	369	391	425	395
Lambayeque	7,016	605	607	594	552	563	606	582	542	561	575	562	665
La Libertad	85,697	7,051	7,107	7,007	6,547	6,919	6,853	6,797	7,277	6,989	7,281	7,962	7,906
Cajamarca	2,087	169	163	172	176	189	189	179	172	176	171	164	170
Cajamarca	1,155	92	90	90	96	106	106	92	86	101	97	97	101
Chota	568	36	40	46	50	55	55	57	56	48	46	40	40
Jaén	364	40	33	35	30	29	28	29	30	28	27	26	28
Amazonas	1,297	139	140	138	131	131	130	129	96	68	67	67	59
Ancash	1,225	109	108	100	102	101	100	95	92	102	102	104	109
Lima	139,296	12,101	11,216	11,170	11,668	11,573	11,576	11,429	11,529	11,641	11,740	11,651	12,001
Ica	207,306	16,737	16,377	16,806	17,110	17,147	17,489	17,935	17,785	17,997	17,657	17,231	17,037
Huánuco	1,160	91	87	91	91	90	89	94	96	110	108	106	109
Pasco	143	10	10	11	11	12	12	13	13	13	13	12	13
Junín	978	87	82	96	84	86	90	87	81	76	74	65	70
Huancavelica	555	49	48	47	46	47	47	47	46	43	45	44	46

Arequipa	17,770	1,497	1,469	1,406	1,438	1,446	1,500	1,457	1,451	1,451	1,480	1,630	1,544
Moquegua	309	27	24	29	25	26	22	23	24	28	32	27	24
Tacna	4,952	409	417	419	448	410	414	425	435	410	419	372	373
Ayacucho	726	42	40	62	71	77	75	74	74	51	52	54	53
Apurímac	440	37	37	40	43	44	42	37	34	21	32	36	36
Abancay	228	20	21	21	23	25	24	20	18	6	16	17	18
Andahuaylas	213	17	17	19	20	19	19	17	16	15	16	19	18
Cusco	749	45	46	65	73	81	85	80	69	52	50	52	52
Puno	1,526	110	113	125	135	136	145	142	136	127	122	121	113
San Martín	13,976	1,201	1,107	1,256	1,230	1,109	998	1,061	1,151	1,209	1,202	1,210	1,242
Loreto	4,644	418	417	390	370	379	345	353	386	391	402	391	403
Ucayali	3,327	300	293	282	285	270	265	275	283	306	270	246	250
Madre de Dios	3,151	259	264	277	283	282	320	285	284	254	221	216	206

Recuperado de: <https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/6837096/2730346-anuario-produccion-ganadera-y-avicola-2023.pdf?v=1724689518>

ANEXO 4:

PROYECTO DE NTS N° 120 -MINSA/DIGESA-V.01
NORMA SANITARIA QUE ESTABLECE LOS LÍMITES MÁXIMOS DE RESIDUOS (LMR) DE MEDICAMENTOS VETERINARIOS
EN ALIMENTOS DE CONSUMO HUMANO

PRINCIPIO ACTIVO	RESIDUO MARCADOR	ESPECIE ANIMAL	MATRIZ	LMR (µg/kg)
TILMICOSIN	TILMICOSIN	Porcino	Hígado	1500
			Riñón	1000
			Músculo	100
			Grasa	100
		Ovino	Músculo	50
			Hígado	1000
			Grasa	100
		Peces	Riñón	300
			Músculo/Piel(*)	50
AVILAMYCIN	AVILAMYCIN	Porcinos Aves	Músculo	200
			Hígado	300
			Grasa/Piel	200
			Riñón	200
SULFONAMIDAS				
SULFADIMIDINE	SULFADIMIDINE	todas las especies productoras de alimentos	Músculo	100
			Grasa	100
			Hígado	100
			Riñón	100
		Bovinos	Leche (L)	25
SULFONAMIDES (todas las sustancias que pertenecen al grupo de las Sulfonamidas)	SULFONAMIDES	Peces	Músculo/Piel(*)	100
TETRACICLINAS				
CHLORTETRACYCLINE/ OXYTETRACYCLINE/ TETRACYCLINE	CHLORTETRACYCLINE/ OXYTETRACYCLINE/ TETRACYCLINE	Bovino	Leche (L)	100
			Músculo	200
			Hígado	600
			Riñón	1200
		Cerdo	Hígado	600
			Riñón	1200
			Músculo	200
		Oveja	Músculo	200
			Leche (L)	100
			Hígado	600
			Riñón	1200



15

Figura 7: Límites máximos de residuos (LMR) de medicamentos veterinarios en alimentos de consumo humano - SULFONAMIDAS

Fuente: http://www.digesa.minsa.gob.pe/NormasLegales/Normas/RM_372-2016-MINSA.pdf

SPIRAMYCIN (antimicrobial agent)				
JECFA evaluation		38 (1991); 43 (1994); 47 (1996); 48 (1997)		
Acceptable daily intake		0–50 µg/kg bw (JECFA43)		
Residue definition		Cattle and chickens, the sum of spiramycin and neospiramycin; pigs, spiramycin equivalents (antimicrobially active residues).		
Species	Tissue	MRL (µg/kg)	Notes	CAC
Cattle	Muscle	200		22 (1997)
Cattle	Liver	600		22 (1997)
Cattle	Kidney	300		22 (1997)
Cattle	Fat	300		22 (1997)
Cattle	Milk (µg/l)	200		22 (1997)
Chicken	Muscle	200		22 (1997)
Chicken	Liver	600		22 (1997)
Chicken	Kidney	800		22 (1997)
Chicken	Fat	300		22 (1997)
Pig	Muscle	200		22 (1997)
Pig	Liver	600		22 (1997)
Pig	Kidney	300		22 (1997)
Pig	Fat	300		22 (1997)

SULFADIMIDINE (antimicrobial agent)				
JECFA evaluation		34 (1989); 38 (1991); 42 (1994)		
Acceptable daily intake		0–50 µg/kg bw (JECFA42)		
Residue definition		Sulfadimidine		
Species	Tissue	MRL (µg/kg)	Notes	CAC
Cattle	Milk (µg/l)	25		21 (1995)
Not specified	Muscle	100		21 (1995)
Not specified	Liver	100		21 (1995)
Not specified	Kidney	100		21 (1995)
Not specified	Fat	100		21 (1995)

Figura 8: Límites Máximos Residuales (LMRs) y Recomendaciones de Gestión de Riesgos (RGRs) para residuos de medicamentos veterinarios en alimentos

Fuente:<https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/maximum-residue-limits/es/>

Sustancia farmacológicamente activa	Residuo marcador	Especie animal	LMR	Tejidos diana	Otras disposiciones (con arreglo al artículo 14.7 del Reglamento (CE) nº 470/2009)	Clasificación terapéutica
Sulfonamidas (todas las sustancias que pertenecen al grupo de las sulfonamidas)	Medicamento base	Todas las especies destinadas a la producción de alimentos	100 µg/kg 100 µg/kg 100 µg/kg 100 µg/kg	Músculo Grasa Hígado Riñón	Los residuos combinados totales de todas las sustancias del grupo de las sulfonamidas no deben sobrepasar los 100 µg/kg. Para los peces, el LMR en el músculo se refiere a «músculo y piel en proporciones naturales». Los LMR en la grasa, el hígado y el riñón no se aplican a los peces. No debe utilizarse en animales que producen huevos para consumo humano.	Antiinfecciosos/ Quimioterapéuticos
		Bovinos, ovinos y caprinos	100 µg/kg	Leche		
Sustancias utilizadas en medicamentos veterinarios homeopáticos	No procede.	Todas las especies destinadas a la producción de alimentos	No se exige LMR.	No procede.	Toda sustancia utilizada en medicamentos veterinarios homeopáticos, siempre que su concentración en el producto no sea superior a una parte por diez mil.	Nada
<i>Symphyti radix</i>	No procede.	Todas las especies destinadas a la producción de alimentos	No se exige LMR.	No procede.	Únicamente para uso tópico en piel intacta.	Nada
<i>Syzygium cumini</i>	No procede.	Todas las especies destinadas a la producción de alimentos	No se exige LMR.	No procede.	Únicamente para uso en medicamentos veterinarios homeopáticos preparados de conformidad con la farmacopea homeopática, en concentraciones correspondientes a la tintura madre y a sus diluciones.	Nada
Tanninum	No procede.	Todas las especies destinadas a la producción de alimentos	No se exige LMR.	No procede.	Nada	Nada
Tartrato de butorfanol	No procede.	Équidos	No se exige LMR.	No procede.	Únicamente por vía intravenosa.	Nada
Tau fluvalinato	No procede.	Abejas	No se exige LMR.	No procede.	Nada	Nada
Teflubenzurón	Teflubenzurón	Salmónidos	500 µg/kg	Músculo y piel en proporciones normales	Nada	Antiparasitarios/Agentes activos frente a los ectoparásitos

Figura 9: Comisión Regulatoria (EU) No 37/2010 “of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin”,

Fuente: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/ALL/?uri=celex%3A32010R0037>

Table of Contents
Details
Print/PDF
Display Options
Subscribe
Timeline
Go to Date
Compare Dates
Published Edition
Developer Tools

44

§ 556.625 Sulfachloropyrazine.

(a) [Reserved]

(b) Tolerances. The tolerance for sulfachloropyrazine is:

(1) Chickens. Edible tissues (excluding eggs): Zero.

(2) [Reserved]

(c) Related conditions of use. See § 520.2184 of this chapter.

§ 556.630 Sulfachloropyridazine.

(a) [Reserved]

(b) Tolerances. The tolerances for sulfachloropyridazine are:

(1) Cattle and swine. Edible tissues (excluding milk): 0.1 ppm.

(2) [Reserved]

(c) Related conditions of use. See §§ 520.2200 and 522.2200 of this chapter.

§ 556.640 Sulfadimethoxine.

(a) [Reserved]

(b) Tolerances. The tolerances for sulfadimethoxine are:

(1) Catfish and salmonids. Edible tissues: 0.1 ppm.

(2) Cattle.

(i) Edible tissues (excluding milk): 0.1 ppm.

(ii) Milk: 0.01 ppm.

(3) Chickens, turkeys, ducks, and chukar partridges. Edible tissues (excluding eggs): 0.1 ppm.

(c) Related conditions of use. See §§ 520.2220a, 520.2220d, 520.2220e, 522.2220, and 558.575 of this chapter.

§ 556.650 Sulfaethoxyypyridazine.

(a) [Reserved]

(b) Tolerances. The tolerances for sulfaethoxyypyridazine are:

(1) Cattle.

(i) Edible tissues (excluding milk): 0.1 ppm.

(ii) Milk: Zero.

(2) Swine. Edible tissues: Zero.

(c) Related conditions of use. See §§ 520.2240a, 520.2240b, and 522.2240 of this chapter.

§ 556.660 Sulfamerazine.

(a) [Reserved]

(b) Tolerances. The tolerance for sulfamerazine is:

(1) Trout. Edible tissues: Zero.

(2) [Reserved]

(c) Related conditions of use. See §§ 520.2218 and 558.582 of this chapter.

[84 FR 32993, July 11, 2019, as amended at 85 FR 18121, Apr. 1, 2020]

§ 556.670 Sulfamethazine.

(a) [Reserved]

(b) Tolerances. The tolerances for sulfamethazine are:

(1) Cattle. Edible tissues (excluding milk): 0.1 ppm.

(2) Chickens and turkeys. Edible tissues (excluding eggs): 0.1 ppm.

(3) Swine. Edible tissues: 0.1 ppm.

(c) Related conditions of use. See §§ 520.445, 520.2218, 520.2260a, 520.2260b, 520.2260c, 520.2261a, 520.2261b, 522.2260, 558.140, and 558.630 of this chapter.

[84 FR 32993, July 11, 2019, as amended at 85 FR 18121, Apr. 1, 2020; 86 FR 13188, Mar. 8, 2021]

Figura 10: Code of Federal Regulations. Title 21—Food and Drugs. Part 556—Tolerances for Residues of New Animal Drugs in Food

Fuente: <https://www.ecfr.gov/current/title-21/chapter-I/subchapter-E/part-556>

ANEXO 5:

Certificate of Analysis

SAs (Sulfonamides of 3-in-1) ELISA Kit

Catalog No: E-FS-E040

Size: 96T

Lot: CV0226489608

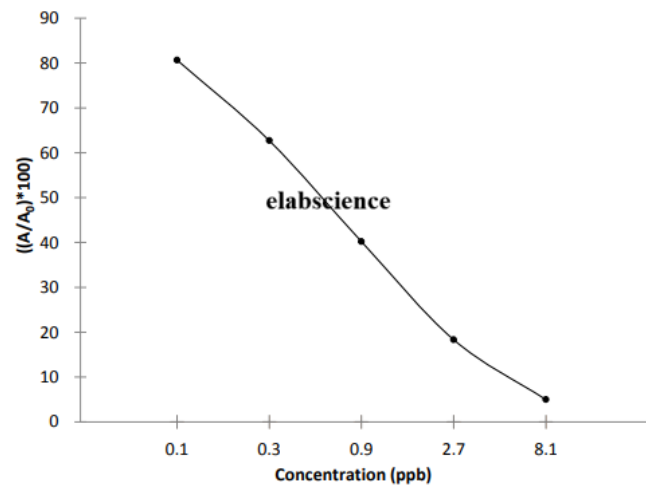
Exp: 2024-03-23

Principle: This ELISA kit uses Competitive-ELISA as the method.

Product Performance Date: 2023-03-24

The product has been tested by Quality Control Department and meets performance specifications mentioned in the manual.

Concentration of standard (ppb)	OD-1	OD-2	Average OD	(A/A ₀)*100
0.00	2.758	2.693	2.726	100.0
0.10	2.176	2.221	2.199	80.7
0.30	1.687	1.732	1.710	62.7
0.90	1.089	1.103	1.096	40.2
2.70	0.496	0.504	0.500	18.3
8.10	0.134	0.138	0.136	5.0



Operator *Mengjie Zhao* Checker *Shiming Hou* Auditor *feiYang*

Figura 11: Certificado de Análisis SAs (Sulfonamides of 3-in-1) ELISA Kit

LOD of Kit 0.1ppb

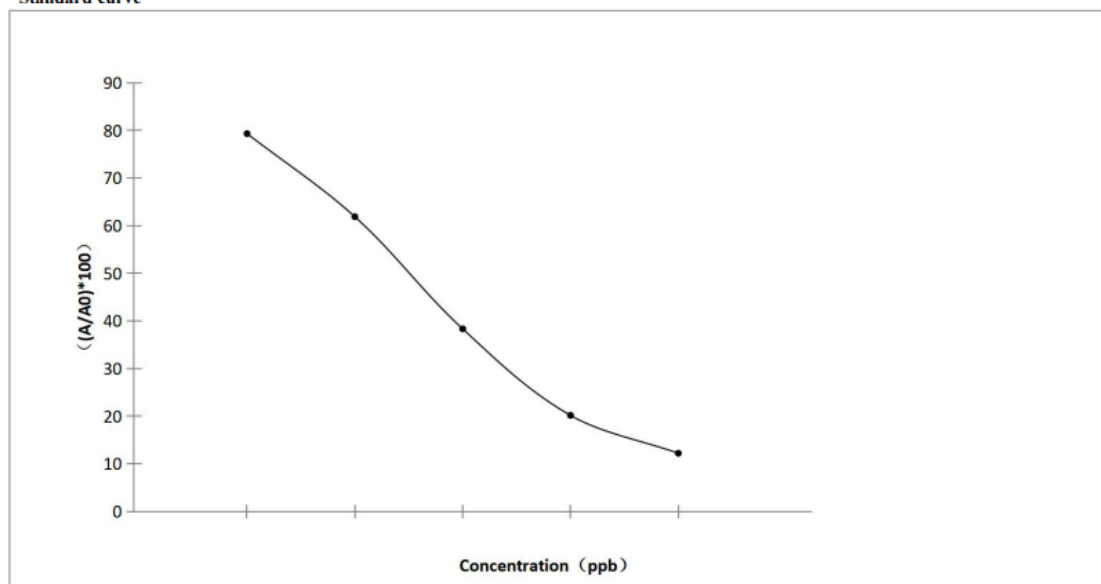
Sample	LOD	Sample dilution factor	Linear range	Repeatability CV
Muscle (method 1)	0.1ppb	1	0.1-8.1	<15%
Muscle (method 2)	1ppb	10	1-81	<15%
Milk	2ppb	20	2-162	<15%
Serum, Urine	0.4ppb	4	0.4-32.4	<15%
Honey	0.1ppb	1	0.1-8.1	<15%
Feed	4ppb	4	0.4-32.4	<15%
Egg	0.2ppb	2	0.2-16.2	<15%

Sample stability: Processed egg samples are recommended to be tested on the same day.
Store at 2-8°C for no more than one week.

Figura 12: Parámetros del ensayo inmunoenzimático (Límite de detección, repetibilidad CV, rango lineal, estabilidad de la solución muestra) por matriz alimentaria

Concentration of standard	OD-1	OD-2	Average OD	CV%	Concentration (ppb)	LogC	(A/A0)*100
Standard 1	2.6536	2.6085	2.631	1.2	0		100.0
Standard 2	2.0327	2.1423	2.088	3.7	0.1	-1.0000	79.3
Standard 3	1.6067	1.6498	1.628	1.9	0.3	-0.5229	61.9
Standard 4	0.9746	1.0433	1.009	4.8	0.9	-0.0458	38.3
Standard 5	0.5385	0.5236	0.531	2.0	2.7	0.4314	20.2
Standard 6	0.3268	0.3164	0.322	2.3	8.1	0.9085	12.2

Standard curve


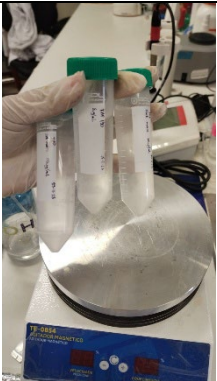
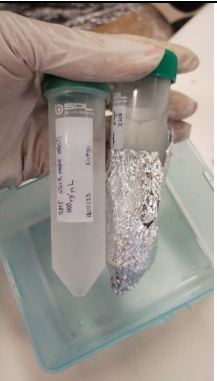





Sample	OD-1	OD-2	CV	Sample dilution factor	Detect concentration ppb	Added concentration ppb	Recovery rate
Pork	1.3504	1.2505	5.4	1	0.54	0.6	89.4%
Chicken	1.6522	1.5492	4.6	1	0.32	0.5	63.0%
Fish	1.3795	1.375	0.2	1	0.47	0.6	78.0%
Pork	1.2878	1.2387	2.7	10	5.73	6	95.5%
Chicken	1.285	1.2945	0.5	10	5.47	6	91.2%
Fish	1.3695	1.3981	1.5	10	4.63	5	92.6%
Egg	1.2642	1.2933	1.6	4	2.23	3	74.4%
Serum	1.5152	1.5113	0.2	4	1.47	1.5	98.1%
Honey	1.3492	1.2637	4.6	1	0.53	0.6	88.5%
Urine	1.413	1.4189	0.3	4	1.75	2	87.4%
Milk	1.2211	1.2191	0.1	20	12.38	15	82.5%
Feed	1.5865	1.5911	0.2	40	12.87	15	85.8%

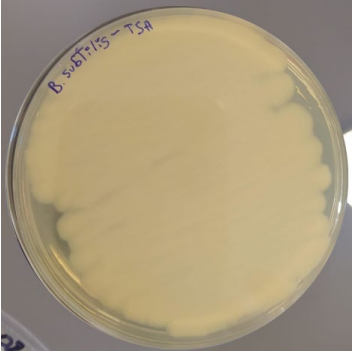
Figura 6: Parámetros del ensayo inmunoenzimático (tasa de recuperación)

ANEXO 6:

Método Microbiológico

		
<p>Ácido acético al 5%</p>	<p>Solución de Trimetoprim</p>	<p>Solución de Stock madre</p>

		
<p>Huevos libres de antibióticos</p>	<p>Peso del contenido del huevo libre de antibióticos</p>	<p>Comprobación de los huevos libres de antibióticos mediante técnica microbiológica : Sin halo de inhibición</p>


<p>Bacillus Subtilis</p>

Kit de Elisa:



Elisa Kit (E-FS-E040)



Muestras recolectadas de un mercado Mayorista de Lima Este



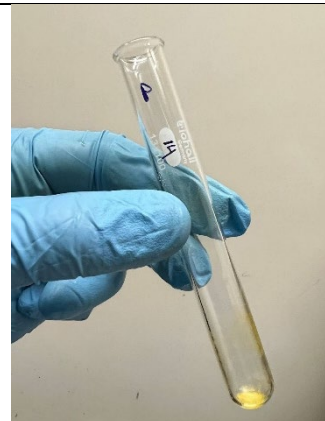
Pool de muestra



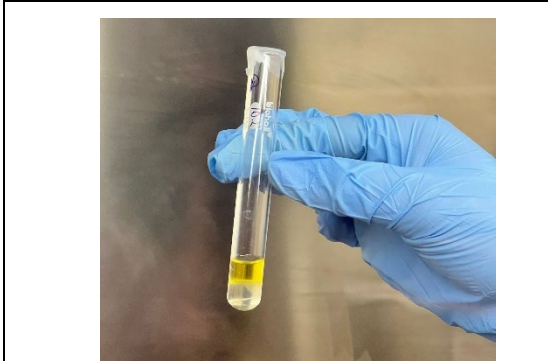
Pesaje de la muestra (pool)



Secado de muestra en baño maria con flujo de nitrógeno



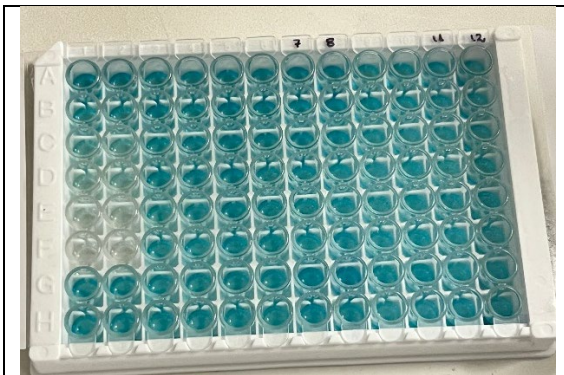
Resultado del secado



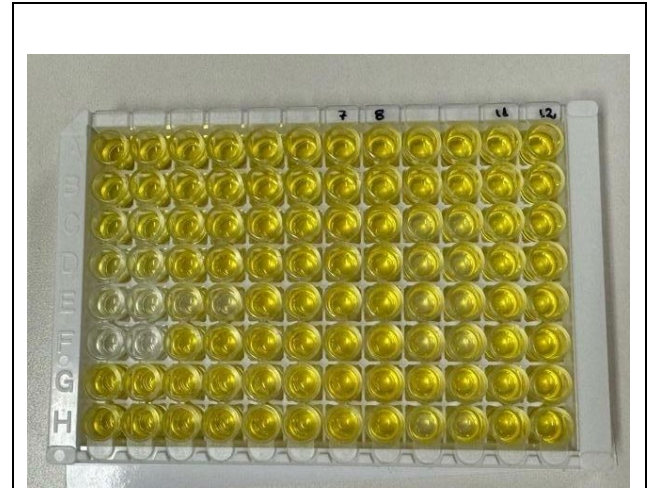
Adición de buffer de reconstitución

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	B	M3	M3	M11	M11	M19	M19	M27	M27	M35	M35
B	ST1	ST1	M4	M4	M12	M12	M20	M20	M28	M28	M36	M36
C	ST2	ST2	M5	M5	M13	M13	M21	M21	M29	M29	M37	M37
D	ST3	ST3	M6	M6	M14	M14	M22	M22	M30	M30	M38	M38
E	ST4	ST4	M7	M7	M15	M15	M23	M23	M31	M31	M39	M39
F	ST5	ST5	M8	M8	M16	M16	M24	M24	M32	M32	M40	M40
G	M1	M1	M9	M9	M17	M17	M25	M25	M33	M33	M41	M41
H	M2	M2	M10	M10	M18	M18	M26	M26	M34	M34	M42	M42

Plantilla para el kit



Microplaca posterior a reacción inmunienzimatica con solución stop



Microplaca a la cual se le agregó el sustrato y la solución de anticuerpos para comenzar la reacción