

Universidad Autónoma de Baja California
Facultad de Medicina y Psicología
Maestría en Salud Pública



Bioensayos para la identificación de residuos de antibióticos en productos cárnicos de venta en la ciudad de Tijuana y su efecto potencial en la salud humana.

Tesis

Que para obtener el grado de
Maestro en Salud Pública

Presenta
Luis Alberto Alcántara Jurado

Directoras
MSP. Lilia Angélica Hurtado Ayala
Dra. Adriana Carolina Vargas Ojeda

Tijuana, Baja California, Noviembre de 2011

Tijuana, Baja California, a 21 de Octubre del 2011.

COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO
MAESTRÍA EN SALUD PÚBLICA
FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGÍA

ASUNTO: Voto Aprobatorio

Habiendo fungido como Sinodal de la tesis denominada **“Bioensayos para la identificación de residuos de antibióticos en productos cárnicos de venta en la ciudad de Tijuana y su efecto potencial en la salud humana”**, elaborada por el **C. Luis Alberto Alcántara Jurado**, manifiesto a ustedes que reúne los requisitos académicos establecidos para ser considerada por el jurado de examen.

ATENTAMENTE



MSP. LILIA ANGÉLICA HURATADO AYALA
/ SINODAL

Tijuana, Baja California, a 21 de Octubre del 2011.

COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO
MAESTRÍA EN SALUD PÚBLICA
FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGÍA

ASUNTO: Voto Aprobatorio

Habiendo fungido como Sinodal de la tesis denominada **“Bioensayos para la identificación de residuos de antibióticos en productos cárnicos de venta en la ciudad de Tijuana y su efecto potencial en la salud humana”**, elaborada por el **C. Luis Alberto Alcántara Jurado**, manifiesto a ustedes que reúne los requisitos académicos establecidos para ser considerada por el jurado de examen.

ATENTAMENTE


DRA. ADRIANA CAROLINA VARGAS OJEDA
SINODAL

Tijuana, Baja California, a 21 de Octubre del 2011.

COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO
MAESTRÍA EN SALUD PÚBLICA
FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGÍA

ASUNTO: Voto Aprobatorio

Habiendo fungido como Presidente de la tesis denominada **“Bioensayos para la identificación de residuos de antibióticos en productos cárnicos de venta en la ciudad de Tijuana y su efecto potencial en la salud humana”**, elaborada por el **C. Luis Alberto Alcántara Jurado**, manifiesto a ustedes que reúne los requisitos académicos establecidos para ser considerada por el jurado de examen.

ATENTAMENTE


DRA. ANA MARIA VALLES MEDINA
PRESIDENTE

C.c.p. Archivo

Resumen

Objetivo

Mediante el uso de bioensayos, detectar e identificar residuos de antibióticos en productos cárnicos, y demostrar su relación con el fenómeno de resistencia bacteriana mediante pruebas de sensibilidad en microorganismos aislados de las muestras.

Material y Métodos

Se analizó 50 establecimientos, con un total de 150 muestras. En la Técnica de Bioensayos con *Bacillus subtilis* BGA (140 esporas/ml) se utilizó cilindros de 8 mm de diámetro por 2 de altura de la carne, se colocados en las placas de Petri con agar nutritivo a pH diferentes, con incubación a 30°C por 20 h, se consideró positivas a residuos de antimicrobianos aquellas muestras de tejido que presentaron un halo de inhibición de 2 mm. ó más. Otro método utilizado fue la prueba rápida de Bio-X-Total Antibiotic BioK 331 de BioX Diagnostic® (Jemelle, Belgique), basado en la inhibición del crecimiento del *Bacillus stearothermophilus* variedad *calidolactis* en agar y con indicador de pH. El cambio de color es negativo para la presencia de antibióticos. Así mismo se aislaron diferentes microorganismos de las muestras, y se realizaron pruebas de susceptibilidad antimicrobiana para la búsqueda de resistencia.

Resultados

Los resultados obtenidos confirmo la presencia de residuos de antimicrobianos en productos cárnicos derivados del ganado bovino, vacuno y porcino.

Además, se observó que más del 45% de las muestras presentó residuos de antimicrobianos, de las que el 9% fueron de carne de bovinos, el 65% fueron de corte vacuno y el 26% fueron de cerdo. La cepas de microorganismos aislados en las muestras, presentaron resistencia a antibióticos (52.10%).

Conclusiones

El uso incorrecto de antibióticos es un factor que puede generar el desarrollo de resistencias bacterianas en los animales tratados.

Estas bacterias resistentes podrían transmitirse al hombre causando dificultades en el momento de tratar infecciones humanas.

Así mismo, los antibióticos consumidos por seres humanos provenientes de residuos presentes en alimentos de origen animal, generan una alteración de la flora intestinal y como consecuencia una disminución de bacterias que compiten con microorganismos patógenos, aumentando así el riesgo de enfermedad.

Índice

Resumen	1
Índice.....	2
Tablas y figuras	3
Antecedentes	4
Planteamiento del problema.....	13
Preguntas de Investigación	14
Objetivos	15
Metodología.....	16
Variables del Estudio.....	17
Resultados	18
Discusión.....	21
Conclusiones.....	22
Bibliografía	23
Anexos	25

Tablas y figuras

Tablas

Tabla 1. Peligros potenciales presentes en los alimentos.....	5
Tabla 2. Fármacos regulados por el Codex Alimentarius, clasificados por grupo farmacológico.	7
Tabla 3. Medicamentos de uso veterinario regulados por el Codex Alimentarius. .	8
Tabla 4. Distribución de muestras positivas con presencia de antibióticos por especie animal.....	18
Tabla 5. Presencia de antibióticos presentes en muestras de carne.	19
Tabla 6. Microorganismos aislados de las muestras de carne que mostraron resistencia a antibióticos (52%).	20

Figuras

Figura 1. Dimensiones de la Seguridad Alimentaria	4
---	---

Antecedentes

Generalmente, los términos seguridad e inocuidad alimentaria se utilizan como sinónimos cuando realmente no lo son. La definición de la Food and Drug Administration (FDA) dice que existe seguridad alimentaria cuando todas las personas tienen permanente acceso físico y económico a suficientes alimentos inocuos y nutritivos para satisfacer sus necesidades nutricionales y sus preferencias alimentarias a fin de llevar una vida activa y sana.

De esta definición se desprende que la seguridad alimentaria tiene cuatro dimensiones, siendo la inocuidad uno de ellos (figura 1). La inocuidad es definida por el Codex Alimentarius como la garantía de que un alimento no causará daño al consumidor cuando el mismo sea preparado e ingerido de acuerdo con el uso a que se destine (Rovira, 2006).

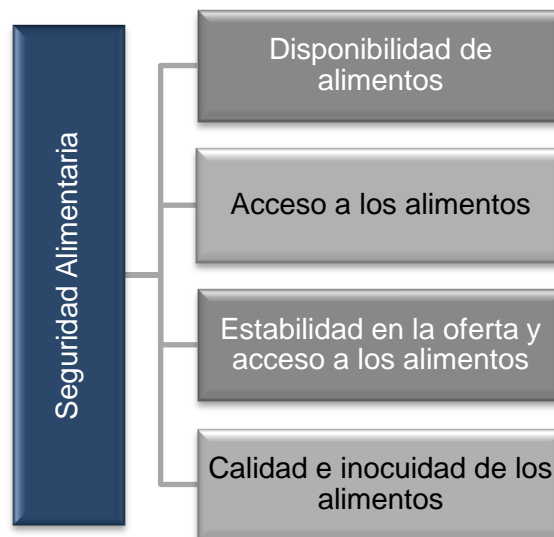


Figura 1. Dimensiones de la Seguridad Alimentaria

En los alimentos pueden existir peligros biológicos, químicos y físicos capaces de causar daño a la salud del consumidor (Tabla 1).

Tabla 1. Peligros potenciales presentes en los alimentos

Tipo de Peligro	Ejemplo
Biológicos	Bacterias, hongos, virus, parásitos
Químicos	Residuos de productos veterinarios, antibióticos, herbicidas, plaguicidas, hormonas, metales pesados, conservadores.
Físicos	Materiales extraños (metales, vidrio, astillas, agujas, etc.)
Otros	Priones

Ref. Rovira P., Programa Nacional de Carne y Lana. Inocuidad de Carnes, INIA 2006

Los productos alimenticios para consumo humano pueden contener residuos químicos de diversos orígenes que pueden provenir de fármacos para uso veterinario, de los componentes de los alimentos para animales o de contaminaciones y de productos de protección para las plantas (Gosme, 2008).

La presencia de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal generan productos de baja calidad y constituyen un riesgo para la salud de los consumidores, inclusive a bajas concentraciones, puede provocar exposiciones de larga duración o exposiciones intermitentes al hombre, pero en ocasiones, accidentalmente, puede resultar en exposiciones de corta duración a muy altas concentraciones produciendo toxicidad aguda o crónica, efectos mutagénicos y carcinogénicos, desórdenes en el desarrollo corporal, reacciones alérgicas y fenómenos de resistencia bacteriana, entre otros(Doyle, 2006).

El uso de estos medicamentos veterinarios es esencial durante la crianza de animales. Estos productos son empleados con fines terapéuticos y preventivos en caso de infecciones o enfermedades no contagiosas y en otros casos se aplican como promotores del crecimiento. El sector agropecuario en el mundo ha enfrentado brotes de enfermedades transmitidas por alimentos en los que intervienen, entre otros agentes, residuos de medicamentos veterinarios; lo anterior pone de manifiesto el manejo indebido de los fármacos durante las prácticas de crianza y el incumplimiento de estos en los tiempos de retiro de medicamentos antes del sacrificio para su comercialización (Kabir, 2004).

Estos efectos adversos han hecho que organizaciones internacionales regulen con fundamento científico los residuos de fármacos de uso veterinario potencialmente peligrosos para la salud (Vaca, 2003).

A pesar de la antigüedad de las regulaciones internacionales existentes (Additives, 1962), sólo hasta hace poco en países latinoamericanos como México, se está prestando atención a esta problemática sanitaria y desde 1996 se ha normalizado la determinación de antibióticos en productos cárnicos derivados de bovinos, ovinos, equinos, porcinos, aves, caprinos y cérvidos (Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, 1996), (Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos, 1994, 1996 y 1999), para reconocer el contenido residual de fármacos y de otras sustancias en los alimentos de origen animal producidos en el país, con lo cual se pretende lograr mayor competitividad de los productos agropecuarios en los mercados internacionales (Consejo Nacional de Política Económica y Social, Departamento Nacional de Planeación, 2006).

El Codex Alimentarius ha elaborado su propia lista de fármacos regulados, esta incluye los límites máximos de residuos (LMR's) para cada principio activo, detallando en que especie animal (avícola, bovina, caprina, ovina o porcina) y tejido o subproducto de esta (leche, huevos, grasa, musculo, hígado o riñón) los fármacos y los LMR. En la Tabla 2 se presenta una lista de los fármacos regulados por el Codex Alimentarius clasificados por grupos farmacológicos (Codex Alimentarius, 2006)(APROVET, 2002).

Tabla 2. Fármacos regulados por el Codex Alimentarius, clasificados por grupo farmacológico.

Grupo Farmacológico	Fármacos
Antimicrobianos	Bencilpenicilinas, Ceptiofur, Clortetraciclina, Dihidroestreptomocina, Espectinomocina, Espiramicina, Estreptomocina, Flumequina, Gentamicina, Lincomocina, Neomicina, Oxitetraciclina, Sarafloxacin, Sulfadimidina, Tetraciclina, Tilmicosin.
Antihelmínticos	Abamectina, Albendazol, Closantel, Doramectin, Eprinomectin, Febantel, Febendazol, Flubendazol, Ivermectina, Levamisol, Moxidectin, Oxfendazole, Thiabendazol, Triclabendazol.
Antiprotozoarios	Diclazuril, Imidocarb, Nicarbacin
Tripanosidas	Diminazina, Isometamidio
Anabólicos hormonales	17 β Estradiol, Progesterona, Somatotropina, Testosterona
Anabólicos no hormonales	Acetato de trenbolona, Zeranol
Anabólico β 2-agonistas	Clenbuterol
Tranquilizante del grupo de las butiroferonas	Azaperona
Bloqueador β -adrenoreceptor	Carazolol

Ref. Codex Alimentarius. (2006). *Límites máximos de residuos para medicamentos veterinarios en los alimentos* EE.UU.

En la Tabla 3 se señalan los medicamentos veterinarios más comunes utilizados en la crianza de animales y que son regulados por el Codex Alimentarius (Codex Alimentarius, 2006). El total de productos regulados por esta comisión es de 981, de los cuales la mayor parte del mercado está distribuida entre los fármacos anti-infecciosos, principalmente antimicrobianos y antihelmínticos (Instituto Colombiano Agropecuario, 2006)(Codex Alimentarius, 2006).

Tabla 3. Medicamentos de uso veterinario regulados por el Codex Alimentarius.

Grupo Farmacológico	Fármaco(s)	Especies en las que se prescribe su uso
Antimicrobianos	Bencilpenicilinas	Bovinos
	Clortetraciclina	Aves y porcinos
	Dihidroestreptomina	Aves, bovinos y porcinos
	Espiramicina	Aves, bovinos y porcinos
	Estreptomina	Aves, bovinos y porcinos
	Flumequina	Aves
	Gentamicina	Bovinos y porcinos
	Lincomicina	Aves, bovinos y porcinos
	Neomicina	Aves, bovinos y porcinos
	Oxitetraciclina	Aves, bovinos y porcinos
	Sulfadimidina	Aves, bovinos y porcinos
Tilmicosin	Aves, bovinos y porcinos	
Antihelmínticos	Albamectina	Bovinos y porcinos
	Albendazol	Bovinos
	Doramectin	Bovinos y porcinos
	Eprinomectin	Bovinos
	Fenbendazol	Bovinos y porcinos
	Flubendazol	Aves y porcinos
	Ivermectina	Bovinos y porcinos
	Levamisol	Aves, bovinos y porcinos
	Moxidectin	Bovinos y porcinos
	Oxfendazole	Bovinos
	Thiabendazol	Aves, bovinos y porcinos
Tricabendazol	Bovinos	
Antiprotozoarios	<i>Diclazuril</i>	Aves
	Imidocab	Bovinos
Anabólicos hormonales	17 β Estradiol	Bovinos
	Progesterona	Bovinos y porcinos

Grupo Farmacológico	Fármaco(s)	Especies en las que se prescribe su uso
	Somatotropina Testosterona	Bovinos Bovinos
Anabólicos no hormonales	Acetato de trenbolona Zeranol	Bovinos Bovinos
B ₂ -agonistas	Clenbuterol	Bovinos
Tranquilizantes del grupo de las Butirofenona	Azaperona	Porcinos

Ref. Codex Alimentarius. (2006). Límites máximos de residuos para medicamentos veterinarios en los alimentos EE.UU.

Se encontró que el uso de antibióticos en alimentos resulta útil para disminuir el peligro de alteraciones de carne roja cruda, pescados crudos, colas de camarones, ave eviscerada entera o en trozos crudas y vegetales. Retarda el desarrollo de bacterias patógenas y de la flora normal resistente al calor con alimentos como flanes, queso y leche, matando células vegetativas y esporas, reduciendo el tiempo en el proceso de conservación por calor, por acción sinérgica al afectar la resistencia térmica.

De lo expuesto se deduce que los antibióticos aplicados a los alimentos en muy pequeñas dosis, inferiores a las profilácticas, pueden prolongar por varios días el buen estado de los alimentos frescos, pero con auxilio de temperatura baja, sin llegar a un refrigerado intenso; no sirven para una preservación permanente.

Ahora bien, ¿Es posible utilizar los antibióticos sin peligro para los consumidores? es un problema semejante al de los conservadores químicos aunque, en este caso, se trata de sustancias menos peligrosas y se emplean en menor proporción. Pero, su acción es principalmente bacteriostática y no universal, es decir, que

existe el peligro de que se encuentren presentes bacterias resistentes a su acción que se desarrollan en el alimento o cuando ésta se mezcla con otros en la cocina doméstica, para el consumo. También existe la posibilidad de que los sensibles, pasado el efecto inhibitor de los antibióticos (cuya acción es relativamente breve) vuelvan a su acción y a tornar peligroso al alimento contaminado. Además hay que tener en cuenta el peligro de la sensibilidad personal a los antibióticos, bastante común para algunos y menor para las tetraciclinas y cloromicetina.

Teniendo en cuenta lo anterior, las autoridades sanitarias se han mostrado reticentes en lo que se vincula con su tolerancia en alimentos y solamente ha sido permitida su adición en algunos casos en los que se han demostrado que no quedan en el alimento cuando éste es ingerido. Los primeros países que aceptaron su empleo para aves crudas evisceradas y siempre que no contengan más de 7 p.p.m. (que es destruida por la cocción) fueron Canadá y los Estados Unidos.

En los Estados Unidos cuando se aprobó la adición de aureomicina a las aves crudas (30 de noviembre de 1955), la Food and Drug Administration expresó sus puntos de vista frente al empleo de antibióticos en la preservación de alimentos, los cuales pueden ser enunciados así:

- 1) Constituye un riesgo para la salud pública, pues se consumo puede provocar la aparición de microorganismos resistentes a los mismos.
- 2) La presencia de antibióticos en los alimentos para uso humano, o su adición directa o indirecta a tales alimentos, pueden considerarse como una

adulteración según el significado de la sección 402 del Food Drug and Cosmetic Act.

- 3) Esto no será obstáculo para el establecimiento de tolerancia para antibióticos, bajo las estipulaciones de la sección 408 del ACT, cuando se pueda tener una adecuada evidencia de la utilidad de los mismos y de la seguridad de los residuos.

Cuando los fármacos son consumidos directamente por los seres humanos, como terapia, pueden producir efectos adversos, estos pueden ser controlados cumpliendo con los protocolos de prescripción a las dosis y el tiempo de tratamiento recomendado. Sin embargo cuando se ingieren como residuos en los alimentos, no es posible vigilar la cantidad ingerida, pudiendo causar problemas directos de salud humana, tales como reacciones alérgicas (betalactámicos, cefalosporinas y otros), alteraciones en el depósito de calcio en los huesos (oxitetraciclina), anemia aplásica (cloranfenicol) y alteraciones en el sistema nervioso central (ivermectina, emamectina), entre otros problemas. El uso de antimicrobianos, tales como quinolonas, oxitetraciclina y sulfonamidas, ha creado alerta mundial, debido a la creciente resistencia bacteriana (Palma, 2006).

El reconocimiento de los riesgos directos e indirectos en la salud humana, debido al consumo tanto activo como pasivo de antimicrobianos, antiparasitarios y otros fármacos ha dado lugar por un lado, a restricciones o prohibiciones en el uso de algunos de estos medicamentos en los animales productores de alimentos y, por otro, al establecimiento de Límites Máximos de Residuos de Medicamentos Veterinarios (MRLMV) y Límites Mínimos de Funcionamiento Exigidos (MPRL). Se

suman a los medicamentos, los contaminantes ambientales como los organoclorados, metil mercurio, dicloros entre otros, la mayoría de ellos producto de las actividades de saneamiento(Correa, 2006).

Los antibióticos de carácter residual utilizados en la producción animal, no se eliminan por su organismo rápidamente y son transferidos a la carne y leche que consume la población.

Esto representa un problema tanto económico como de salud pública. Sin embargo, no existe vigilancia para controlar estos residuos tóxicos. En la actividad pecuaria una cantidad considerable de antibióticos se emplea para la prevención y tratamiento de enfermedades y la promoción del crecimiento de aves y cerdos. La facilidad con que estos se eliminan varía. Algunos son desechados de forma rápida y otros, los residuales, permanecen en el organismo del animal durante días e incluso semanas (Carrillo, 2001).

Planteamiento del problema

La presencia de contaminantes químicos en los alimentos, representan las principales causas de restricción en el comercio de productos cárnicos. Según la Organización Mundial de la Salud, la presencia de residuos químicos en los alimentos representa un riesgo potencial para la salud pública. Los antibióticos de carácter residual utilizados en la producción animal, de aves de corral, ganado porcino y vacuno entre otros, no son rápidamente metabolizados y excretados por su organismo antes de ser sacrificados o utilizar sus subproductos para el consumo inmediato, por lo que estos residuos son transferidos a la carne y leche que consume la población. Esto representa un problema tanto económico como de salud pública. Sin embargo, no existe vigilancia para controlar estos residuos tóxicos. Así mismo, las consecuencias de consumir alimentos que contienen residuos de antibióticos, favorecen la resistencia bacteriana en el ser humano.

Preguntas de Investigación

- 1) ¿En qué proporción se encuentran residuos de antibióticos en los tejidos animales y otros subproductos cárnicos?
- 2) ¿En qué proporción existen microorganismos resistentes a antibióticos en los productos cárnicos y/o subproductos derivados después del sacrificio?

Objetivos

1. Detectar la presencia de residuos de antibióticos, mediante la Técnica de Bioensayos con *Bacillus subtilis* BGA.
2. Identificar el tipo de antibiótico en las muestras positivas, utilizando Bio-X-Total Antibiotic BioK 331 de BioX Diagnostic®.
3. Aislar e identificar el tipo de bacteria mediante la técnica de cultivo puro.
4. Identificar la proporción de microorganismos resistentes a antibióticos, mediante el método de susceptibilidad antimicrobiana en las cepas bacterianas aisladas de productos cárnicos.

Metodología

Esta investigación se realizó de acuerdo a la siguiente metodología, cumpliendo con las condiciones de estudio que permitirán dar una respuesta a las preguntas de investigación planteadas en este proyecto.

Tipo de estudio

Prospectivo, transversal, observacional y experimental

Espacio-temporal

La toma de muestras se realizó durante los meses de febrero a junio de 2010 en expendios de productos cárnicos particulares de la ciudad de Tijuana, Baja California

Tipo de Muestra

Se tomaron muestras de carne en pequeños expendios de venta de productos cárnicos a granel.

Muestras de carne de res cruda.

Se utilizó la 1 gramo de muestra por cada 9 ml. de solución salina isotónica estéril. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas en base a 10.

Análisis estadístico

Para el análisis de datos se utilizó estadística descriptiva mediante el uso de tablas, para la observación de la distribución de microorganismos aislados e identificados, así como, la sensibilidad y resistencia a antibióticos.

Límite de estudio

Solo se analizaron muestras de carne que provienen de pequeños expendios de venta de productos cárnicos a granel de carácter populares, tales como, carnicerías particulares y distribuidores en mercados.

VARIABLES DEL ESTUDIO

- Concentración microbiana
- Resistencia a antibióticos

Materiales y Métodos

Se analizaron muestras de 50 establecimientos, con un total de 150 muestras.

En la Técnica de Bioensayos con *Bacillus subtilis* BGA (140 esporas/ml) se utilizó cilindros de 8 mm de diámetro por 2 de altura de la carne, colocados en las placas de Petri con agar nutritivo a pH diferentes, con incubación a 30°C por 20 h, se consideró positivas a residuos de antimicrobianos aquellas muestras de tejido que presentaban un halo de inhibición de 2 ó más mm.

Otro método utilizado fue la prueba rápida de Bio-X-Total antibiotic Bio K 331 de BioX Diagnostic® (Jemelle, Belgique), que se basa en la inhibición del crecimiento del *Bacillus stearothermophilus* variedad calidolactis en agar y con indicador de pH. El cambio de color es negativo para la presencia de antibióticos.

Así mismo se aisló diferentes microorganismos de las muestras, y se realizó pruebas de susceptibilidad antimicrobiana para la búsqueda de resistencia.

Resultados

Los resultados obtenidos confirman la presencia de residuos de antimicrobianos en productos cárnicos derivados del ganado bovino, vacuno y porcino.

Se analizaron 150 muestras de carne de origen porcino, bovino y vacuno, destacando la presencia de residuos de antibiótico en 68 de ellas, la distribución de muestras positivas se presentan en la Tabla 4, la especie vacuna sobresale por la mayor frecuencia de la detección de residuos antibióticos.

Tabla 4. Distribución de muestras positivas con presencia de antibióticos por especie animal.

Especie animal	Número de muestras positivas	%
Porcino	18	26.47
Bovino	6	8.82
Vacuno	44	64.71
TOTAL	68	100

n= 150, Total positivas = 68

El método utilizado para la identificación de residuos antibióticos fue la prueba rápida de Bio-X-Total antibiotic Bio K 331 de BioX Diagnostic®. La Tabla 5 muestra la distribución de los residuos de antibióticos identificados, destaca la presencia con mayor frecuencia de Sulfamerazina (22.1%) y Novobiocina-penicilina (14.7), para siete muestras, el método utilizado no identificó el residuo con actividad biológica presente en la muestra.

Tabla 5. Presencia de antibióticos presentes en muestras de carne.

Antibiótico	Número de muestras	%
Eritromicina	5	7.3
Tiamulina	2	2.9
Novobiocina-penicilina	10	14.7
Amikacina	5	7.3
Furaltadona	8	11.8
Furazolidona	8	11.8
Nitrofurazona	8	11.8
Sulfamerazina	15	22.1
Otros no identificados	7	10.3
TOTAL	68	100

n= 150, Total positivas = 68

Las consecuencias de consumir alimentos que contienen residuos, favorecen la resistencia bacteriana en el ser humano, la Tabla 6 presenta las bacterias multiresistentes a antibióticos aisladas de las muestras de carne.

Tabla 6. Microorganismos aislados de las muestras de carne que mostraron resistencia a antibióticos (52%).

Bacterias aisladas de muestras de carne	Antibióticos a los que fueron resistentes		
<i>Acinetobacter spp.</i>	Penicilina	Trimetropin con sulfametoxazol	Imipenen
<i>Moraxella bovis</i>	Tetraciclina	Amikacina	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Levofloxacino	Cefoperazona	Imipenen
<i>Escherichia coli</i>	Amoxicilina	Trimetropin con sulfametoxazol	Ciprofloxacino
<i>Salmonella choleraesuis</i>	Amikacina	Sulfamerazina	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gentamicina	Penicilina	
<i>Lactobacillus spp.</i>	Penicilina	Sulfamerazina	

Discusión

En la Tabla 4 se observa que más del 45% de las muestras presentaron residuos de antimicrobianos, de las que aproximadamente el 9% fueron de carne de bovino, el 65% fueron de corte vacuno y el 26% fueron de cerdo.

Las cepas de microorganismos aislados en las muestras presentaron resistencia a antibióticos (52.10%) (Tabla 6). Siendo *Escherichia coli* (enteropatógena) y *Acinetobacter spp.* las de mayor multiresistencia.

De acuerdo a los resultados obtenidos preocupa el alto porcentaje de aquellos animales que han recibido cantidades ya sea subterapéutica o terapéutica de antibióticos y sulfonamidas en los alimentos, debido a que estos pueden ser depósitos de bacterias patógenas y no patógenas resistentes a los antibióticos. Considerando que estos depósitos pueden producir infecciones en el ser humano.

Los depósitos de microorganismos con multiresistencia a antibióticos pueden resistir temperaturas de cocción de los alimentos o de la preparación rápida de los mismos (la muerte de los microorganismos debido a calor depende de la temperatura y tiempo de exposición), convirtiéndose en un factor de riesgo en infecciones por la ingesta de alimentos contaminados (Madigan, 2009).

La prevalencia de bacterias no patógenas y patógenas multiresistentes ha ido incrementando en los animales y ha sido relacionado con el empleo de antibióticos y sulfonamidas y aun no se establecen mecanismos de regulación que permitan el control de usos de fármacos de uso veterinario.

Los resultados muestran que se encontraron organismos resistentes a agentes antibacterianos, en la carne y muy probablemente esta presencia se extienda no solo a los productos cárnicos, también a otros productos de origen animal de distintas especies.

Conclusiones

El uso incorrecto de antibióticos es un factor que puede generar el desarrollo de resistencias bacterianas en los animales tratados.

Estas bacterias resistentes podrían transmitirse al hombre causando dificultades en el momento de tratar infecciones humanas.

Así mismo, los antibióticos consumidos por seres humanos provenientes de residuos presentes en alimentos de origen animal, generan una alteración de la flora intestinal y como consecuencia una disminución de bacterias que compiten con microorganismos patógenos, aumentando así el riesgo de enfermedad.

El riesgo que implica el consumo de contaminantes presentes en alimentos, entre ellos los residuos de fármacos, debe ser valorado y de esta manera evitar, a través de reglamentaciones, el consumo de dosis tóxicas de sustancias adversas a la salud.

La regulación de fármacos de uso veterinario debe orientarse a controlar el uso y periodo de retiro de estas sustancias en las especies en las cuales son administradas; estos aspectos son mundialmente vigilados por diferentes organizaciones, dentro de las cuales se destacan la comisión del Codex Alimentarius y los servicios nacionales de sanidad agraria entre otros.

Los antibióticos antimicrobianos de uso humano, deben ser prohibidos como estimulantes del crecimiento y para uso subterapéutico en los animales.

Aquellos antibióticos específicos contra bacterias multiresistentes a los antibióticos y que son críticos para la terapia del hombre y de los animales, deben ser prohibidos para su uso en los alimentos.

Bibliografía

- Additives, J. J. (1962). *Evaluation of the toxicity of a number of antimicrobials and antioxidants*. WHO Technical Report Series N228 Geneva:JECFA.
- APROVET, N. (2002). *Vademécum veterinario Aprovevet*. Colombia: APROVET.
- Palma, C. G. (2006). Determinación de residuos de abamectina-triclabendazol en tejidos bovinos. *Arch. Med. Vet.*, v. 38 n.3 Valdivia.
- Carrillo, L. E. (2001). BIOTECNOLOGIA. Antibióticos en alimentos de origen animal. *UG. Gaceta Universitaria. Junio 30 de 2001*, 5.
- Codex Alimentarius. (2006). *Límites máximos de residuos para medicamentos veterinarios en los alimentos*. EE.UU.:
http://www.codexalimentarius.net/download/standards/45/MRL2_pdf.
- Consejo Nacional de Política Económica y Social, Departamento Nacional de Planeación. (2006). *Documento CONPES 3376: Política Sanitaria de Inocuidad para las Cadenas de la Carne Bovina y de la Leche*. Colombia:
http://www.dnp.gov.co/archivos/documentos/Subdireccion_Conpes/3376.pdf.
- Correa, R. (2006). *La Comisión del Codex Alimentarius y sus Lineamientos*. ACOVEZ. Colombia: <http://www.encolombia.com7veterinaria/acovez26201-comisión.htm>.
- Gosme, M. E. (2008). Depleción de residuos en leche de bovinos tratados con triclabendazol comercializados en el Perú. *Sirivs*, 1-3.
- Instituto Colombiano Agropecuario. (Agosto 2006). *Registro de Productos Vigentes en Medicamentos Veterinarios*. Colombia:
<http://www.ica.gov.co/servicios/RCMVeterinarios/registros/productos.pdf>.
- Kabir J.(2004). Veterinary drug use in poultry farms and determination of antimicrobial drug residues in comercial eggs and slaughtered chicken in Kaduna State, Nigeria. *Food Control*, 15:99-105.
- Madigan, M. T. (2009). 27.1 Esterilización por calor. In M. T. Madigan, J. M. Martinko, P. V. Dunlap, & D. P. Clarck, *Brock. Biología de los microorganismos* (pp. 866-869). Madrid, España: Pearson Educación, S.A.

- ME., D. (2006). Veterinary drug residues in processed meats - potencial health risk. *Food Research Institute (FRI Briefings)*, URL: http://www.wisc.edu/fri/briefs/FRIBrief_VetDrgRes.pdf.
- Rovira, P. (2006). Inocuidad de carnes: un tema relevante en la agenda del INIA. *Revista INIA*, 13-17.
- Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. (1999). *NOM-008-ZOO-1994, Especificaciones zoonosanitarias para la construcción y equipamiento de establecimientos para el sacrificio de animales y los dedicados a la industrialización de productos cárnicos, en aquellos puntos que resultaron procedentes*. México: Diario Oficial de la Federación.
- Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. (1996). *Norma Oficial Mexicana NOM-004-ZOO-1994, Control de Residuos tóxicos en grasa, hígado, músculo y riñón en aves, bovinos, caprinos, cérvidos, equinos, ovinos y porcinos. Residuos tóxicos. Límites máximos permisibles y procedimientos de muestreo*. México: Diario Oficial de la Federación.
- Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. (1994). *Norma Oficial Mexicana NOM-003-ZOO-1994. Criterios para la operación de laboratorios de pruebas aprobados en materia de zoonosanitaria*. México: Diario Oficial de la Federación.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. (1996). *Norma Oficial Mexicana NOM-032-ZOO-1996, Determinación de antibióticos en hígado, músculo y riñón de bovinos, ovinos, equinos, porcinos, aves, caprinos y cérvidos por la prueba de la torunda y por bioensayo*. México: Diario Oficial de la Federación.
- Vaca, A. (2003). *Aspectos regulatorios de los medicamentos veterinarios registrados en Colombia e incluidos en el Codex Alimentarius*. Bogotá, Colombia: Tesis Médico Veterinario, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia.

Anexos

02-26-96 NORMA Oficial Mexicana NOM-032-ZOO-1996, Determinación de antibióticos en hígado, músculo y riñón de bovinos, ovinos, equinos, porcinos, aves, caprinos y cérvidos por la prueba de la torunda y por bioensayo.

Al margen un sello con el Escudo Nacional, que dice: Estados Unidos Mexicanos.- Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-032-ZOO-1996, DETERMINACION DE ANTIBIOTICOS EN HIGADO, MUSCULO Y RIÑÓN DE BOVINOS, OVINOS, EQUINOS, PORCINOS, AVES, CAPRINOS Y CERVIDOS POR LA PRUEBA DE LA TORUNDA Y POR BIOENSAYO.

La Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, por conducto de la Dirección General Jurídica, con fundamento en los artículos 1o., 3o., 4o. fracción III, 12, 13, 16, 21, 22, 31 y 32 de la Ley Federal de Sanidad Animal; 38 fracción II, 40, 41, 43 y 47 fracción IV de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 35 fracción IV de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; 10 fracción V del Reglamento Interior de la Secretaría de Agricultura, y Recursos Hidráulicos, y

CONSIDERANDO

Que la determinación de antibióticos en hígado, músculo y riñón de bovinos, ovinos, equinos, porcinos, aves, caprinos y cérvidos por la prueba de la torunda y por bioensayo, se establece con el fin de asegurar que el suministro de alimentos a los consumidores, no rebasen los límites máximos permisibles de este tipo de residuos.

Que el consumo de alimentos con residuos de antibióticos implica diversos riesgos para la salud.

Que entre los beneficios que reporta el determinar este tipo de residuos, se encuentra el de participar con mayor confianza en el comercio internacional de alimentos, contando de esta forma con las bases suficientes para certificar la inocuidad de los productos alimenticios cárnicos, tanto importados como exportados.

Que para alcanzar los objetivos señalados en los párrafos anteriores, con fecha 13 de septiembre de 1995, se publicó en el **Diario Oficial de la Federación** el Proyecto de Norma Oficial Mexicana NOM-035-ZOO-1995, Determinación de antibióticos en hígado, músculo y riñón de bovinos, ovinos, equinos, porcinos, aves, caprinos y cérvidos por la prueba de la torunda y por bioensayo.

Que en virtud de que dentro del término de 90 días a que se refiere la fracción I, del artículo 47 de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, no se presentaron comentarios al proyecto, las disposiciones del mismo han resultado procedentes en sus términos.

Que por todo lo anterior y con el objeto de mantener el orden cronológico en la clave de las normas en esta materia, he tenido a bien expedir la NOM-032-ZOO-1996, DETERMINACION DE ANTIBIOTICOS EN HIGADO, MUSCULO Y RIÑÓN DE BOVINOS, OVINOS, EQUINOS, PORCINOS, AVES, CAPRINOS Y CERVIDOS POR LA PRUEBA DE LA TORUNDA Y POR BIOENSAYO.

INDICE

1. OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACION
2. REFERENCIAS
3. DEFINICIONES
4. SIMBOLOS Y ABREVIATURAS
5. FUNDAMENTO
6. MATERIAL Y EQUIPO
7. REACTIVOS Y SOLUCIONES
8. MICROORGANISMOS DE PRUEBA
9. PROCEDIMIENTO

- 10. RESULTADOS
- 11. SANCIONES
- 12. CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES
- 13. BIBLIOGRAFIA
- 14. DISPOSICIONES TRANSITORIAS

"APENDICE A" (NORMATIVO)

"APENDICE B" (NORMATIVO)

1. Objetivo y campo de aplicación

1.1. Objetivo.

Esta Norma Oficial Mexicana establece el método de prueba, para la determinación de antibióticos en hígado, músculo y riñón de bovinos, ovinos, equinos, porcinos, aves, caprinos y cérvidos.

1.2. Campo de aplicación.

Esta Norma se aplica a los laboratorios de análisis de residuos tóxicos en tejidos alimenticios primarios de origen animal, aprobados por la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural.

1.3. La vigilancia de esta Norma corresponde a la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, así como a los gobiernos de los estados en el ámbito de sus respectivas competencias y circunscripciones territoriales, de conformidad con los acuerdos de coordinación respectivos.

1.4. La aplicación de las disposiciones previstas en esta Norma, compete a la Dirección General de Salud Animal, así como a las delegaciones estatales de la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, en el ámbito de su respectiva competencia y circunscripciones territoriales.

2. Referencias

Para la correcta aplicación de esta Norma, deben consultarse las siguientes normas oficiales mexicanas:

NOM-003-ZOO-1994, Criterios para la Operación de Laboratorios de Pruebas Aprobados en Materia Zoonitaria, publicada el 28 de abril de 1994.

NOM-004-ZOO-1994, Control de Residuos Tóxicos en Carne, Grasa, Hígado y Riñón de Bovinos, Equinos, Porcinos y Ovinos, publicada el 11 de agosto de 1994.

NOM-008-SCFI-1993, Norma Oficial Mexicana, Sistema General de Unidades de Medida, publicada el 14 de octubre de 1993.

3. Definiciones

Cilindros o penicilindros: Estructuras tubulares de acero inoxidable con 10 mm de altura, 6 mm de diámetro interno, 8 mm de diámetro externo y 300 µl de capacidad.

Halo de inhibición: Es la zona dentro del medio de cultivo, en que se observa ausencia del crecimiento del microorganismo de prueba.

Microorganismo de prueba: Es una cepa tipificada con ciertas características metabólicas, que al ser inoculado en un medio de cultivo y desafiado contra un antibiótico específico, deriva en susceptibilidad a ese antibiótico.

Nivel de inóculo: Es aquella concentración de la suspensión de esporas en la cual se observa un halo o zona de inhibición uniforme.

Sensidisco: Disco de papel filtro de poro grueso del número 4, de 7 mm de diámetro, impregnado con el antibiótico de prueba.

Solución patrón o de referencia: Es aquella con una concentración conocida de antibiótico.

Suspensión de esporas: Es aquella que contiene una concentración conocida de los microorganismos de prueba en forma latente.

4. Símbolos y abreviaturas

cm	centímetro
°C	grados Celcius o centígrados
GR	grado reactivo
g	gramo
h	hora
M	Molar
m	metro
mg	miligramo
min	minuto
ml	mililitro
mm	milímetro
N	normal
µg	microgramo
µl	microlitro
ppm	partes por millón
%	por ciento
rpm	revoluciones por minuto
Sol	solución
UFC	unidades formadoras de colonias

5. Fundamento

La técnica se basa en la difusión del antibiótico desde una torunda o hisopo (prueba preliminar) o un cilindro vertical (prueba confirmatoria), que contiene un extracto del tejido a analizar, sobre una capa de agar solidificada, con una concentración conocida de una suspensión de esporas de un germen de prueba susceptible, depositada sobre una capa de medio de cultivo específico en una caja de Petri e incubada durante 24 horas a 37 °C, para determinar la presencia de antibióticos por la formación de un halo de inhibición alrededor de la torunda o cilindro.

6. Material y equipo

6.1. Material:

- Algodón
- Botellas Roux
- Cajas de Petri de 25 x 100 mm
- Cilindros o penicilindros de acero inoxidable
- Gasas
- Marcador de tinta indeleble
- Matraces volumétricos clase A de 10, 25, 50, 100 y 1000 ml
- Matraces Erlenmeyer de 50, 250, 500 y 1000 ml
- Micropipeta de 1000 µl
- Papel semilogarítmico de 2 ciclos
- Perlas de vidrio
- Pinzas de disección
- Pipetas graduadas de diferentes volúmenes

- Pipetas volumétricas clase A de 1, 5 y 10 ml
- Pipeteador
- Puntas para micropipeta
- Sensidiscos impregnados con estreptomicina
- Torundas de algodón
- Tubos de centrifuga de polipropileno de 50 ml

6.2. Equipo:

- Agitador mecánico
- Autoclave
- Balanza analítica
- Balanza granataria
- Centrífuga
- Colocador de penicilindros
- Incubadora 35 ± 1 °C
- Medidor de halos
- Platina con agitador
- Potenciómetro o pH metro

7. Reactivos y soluciones

7.1. Reactivos:

- Acido clorhídrico (HCl)
- Agar nutritivo
- Cloruro de sodio (NaCl)
- Estándares certificados de los siguientes antibióticos: estreptomicina, eritromicina, neomicina, penicilina G sódica y tetraciclina.
- Fosfato de potasio dibásico GR
- Fosfato de potasio monobásico GR
- Hidróxido de sodio (NaOH)
- Medio para antibióticos No. 1
- Medio para antibióticos No. 2
- Medio para antibióticos No. 5
- Medio para antibióticos No. 8
- Medio para antibióticos No. 11
- Metanol (MeOH)
- Sulfato de manganeso monohidratado ($MnSO_4 \cdot H_2O$)

7.2. Soluciones:

- Solución amortiguadora de fosfatos al 1% pH 6.0 ± 0.1 :

Disolver 8 g de fosfato de potasio monobásico y 2 g de fosfato de potasio dibásico en agua destilada y diluir a 1000 ml con la misma.

- Solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 8 ± 0.1 :

Disolver 16.73 g de fosfato de potasio dibásico, 0.523 g de fosfato de potasio monobásico en agua destilada y diluir a 1000 ml con la misma.

- Solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 4.5 ± 0.1 :

Disolver 13.6 g de fosfato de potasio monobásico en agua destilada y diluir a 1000 ml con la misma.

- Solución amortiguadora al 10% pH 6.0 ± 0.1 :

Disolver 80 g de fosfato de potasio monobásico y 20 g de dibásico en agua destilada y diluir a 1000 ml con la misma.

- Solución amortiguadora de fosfatos 0.2 M pH 8.0 ± 0.1 :

Disolver 33.46 g de fosfato de potasio dibásico y 1.046 g de fosfato de potasio monobásico en agua destilada y diluir a 1000 ml con la misma.

Nota: Para la preparación de cualquiera de las soluciones amortiguadoras anteriores, ajustar el pH utilizando ácido clorhídrico o hidróxido de sodio, antes de aforar, según sea el caso.

- Acido clorhídrico (HCl) 0.01 N. Disolver 0.85 ml de ácido clorhídrico concentrado en 1000 ml de agua destilada.
- Acido clorhídrico (HCl) 0.1 N. Disolver 8.5 ml de ácido clorhídrico concentrado en 1000 ml de agua destilada.
- Hidróxido de sodio (NaOH) 1.0 N. Disolver 40 g de hidróxido de sodio en 100 ml de agua destilada y aforar con la misma a 1000 ml.
- Solución estéril de cloruro de sodio (NaCl) 0.85%. Disolver 0.85 g de cloruro de sodio en 100 ml de agua destilada.
- Penicilinasa.

8. Microorganismos de prueba

- *Sarcina lutea* ATCC 9341a, susceptible a penicilina y eritromicina y resistente a estreptomina y neomicina.
- *Bacillus cereus* variedad *mycoides* ATCC 11778 susceptible a tetraciclina.
- *Bacillus subtilis* ATCC 6633, susceptible a estreptomina.
- *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, susceptible a neomicina, resistente a tetraciclina.
- *Sarcina lutea* ATCC 15957, resistente a eritromicina.

9. Procedimiento

9.1. Prueba de la torunda (Preliminar)

9.1.1. Preparación de la suspensión bacteriana *Bacillus subtilis* ATCC 6633

Siembras.- A partir de un tubo de cultivo con agar nutritivo en forma inclinada que contenga la cepa de prueba e incubado durante 24 h a 35 ± 1 °C, realizar un lavado con aproximadamente 2-3 ml de solución salina. Inocular una botella Roux conteniendo 250 ml de agar para antibióticos número 1, con 300 mg de sulfato de manganeso monohidratado ($MnSO_4 \cdot H_2O$) por litro de medio, ayudándose con solución salina fisiológica y perlas de vidrio estériles, hasta cubrir totalmente la superficie del medio. Incubar durante 18-24 h a 35 ± 1 °C.

Cosecha.- Resuspender el paquete con solución salina estéril y pasarlo a un tubo de centrifuga. Lavar 3 veces como mínimo el paquete celular con solución salina estéril hasta eliminar el medio de cultivo residual, separándolo por centrifugación y decantación, al final reconstituir el sedimento, resuspenderlo con 50 ml de solución salina estéril y calentar la suspensión durante 30 min en baño maría a 70 °C para favorecer la esporulación.

Ajuste.- Se efectúa por cuenta microbiológica utilizando el método de vaciado en placa; dependiendo de la concentración deben efectuarse las diluciones respectivas para obtener concentraciones finales de 1×10^{-5} , 2×10^{-5} , 3×10^{-5} UFC/ml.

Determinación del nivel de inóculo.- En cajas de Petri estériles de 25 x 100 mm, colocar 20 ml de medio para antibióticos número 5 como capa base. Dejar solidificar la capa a temperatura de 35 °C.

Sobre la capa base distribuir 5 ml de agar para antibióticos número 5 que contenga la suspensión de esporas en concentraciones de 1×10^{-5} , 2×10^{-5} y 3×10^{-5} UFC/ml, como capa semilla y dejar solidificar a temperatura ambiente.

Colocar seis sensidiscos impregnados de tal manera que se asegure contengan estreptomicina a las concentraciones siguientes: tres a la concentración mínima inhibitoria y tres a su valor inmediato superior, sobre la capa de agar (0.25 y 0.50 µg/ml), el volumen utilizado para impregnar los discos dependerá de la concentración de la solución utilizada para tal fin. Los sensidiscos impregnados también pueden ser adquiridos comercialmente.

Para el nivel de inóculo óptimo, tomar aquella concentración de esporas en la cual se observe un halo de inhibición más uniforme.

9.1.2. Método de la torunda.

- En cajas de Petri estériles de 25 x 100 mm, colocar 10 ml de medio para antibióticos número 5 como capa base.

- Dejar solidificar la capa base a una temperatura de aproximadamente 35 °C.

- Sobre la capa base colocar 4 ml de agar para antibióticos número 5, que contenga una suspensión de esporas de concentración conocida como capa semilla determinada por el nivel de inóculo óptimo.

- Dejar solidificar la capa semilla.

- Para la inoculación de placas se deja descongelar totalmente la muestra de tejido de hígado, riñón y/o músculo.

- Impregnar las torundas con la muestra por analizar, haciéndolos penetrar en forma giratoria en el tejido, al que previamente se le ha hecho una incisión.

- Dejar la torunda en la muestra aproximadamente una hora, removiéndola cada 15 min aproximadamente.

- Una vez impregnadas las torundas, colocarlas en una caja de Petri que contenga una concentración apropiada de esporas, previamente preparada y colocar un sensidisco de 5 µg de estreptomicina como control.

- Incubar las cajas inoculadas a 35 ± 1 °C durante 24 h.

9.2. Bioensayo.

9.2.1. Procedimientos y consideraciones generales.

Este es un método confirmatorio, que permite conocer el tipo y concentración de los antibióticos detectados por el método preliminar de la torunda.

9.2.1.1. Estándares o patrones de referencia de trabajo.

Seguir las instrucciones del fabricante para la preparación y almacenamiento de los patrones de referencia. Preparar la solución patrón o madre, pesando cuidadosamente una pequeña cantidad del patrón de referencia y disolver el polvo pesado en el diluyente adecuado, para obtener una solución de una concentración conveniente.

9.2.1.2. Curva estándar o patrón de referencia.

Preparar una curva estándar o patrón de referencia con tejido libre de antibiótico, comparable a aquel bajo prueba. Diluir el tejido de control descrito por el método particular y probar esta dilución sobre placas apropiadas para asegurar que no se presenta ninguna zona de inhibición. Preparar la curva estándar o normalizada simultáneamente con la solución de prueba. Efectuar diluciones de la solución patrón o madre, descrita para cada antibiótico. Utilizar la concentración indicada como la de referencia. Preparar placas con la capa de agar base y la capa semilla apropiada, descrita para cada antibiótico. Permitir que el medio solidifique sobre una superficie nivelada y plana. Colocar las placas para bioensayo sobre cada caja de Petri. Llenar alternadamente tres cilindros con la concentración de referencia como se indica en el ("Apéndice A" Normativo) y los otros tres con cada una de las otras concentraciones del patrón de

referencia. Usar tres placas para cada concentración requerida en la curva estándar, excepto para el de referencia, para un total de 12 placas. Incubar las placas toda la noche a 37 °C y medir los diámetros de las zonas de inhibición.

Para cada serie de tres placas, obtener el promedio de las nueve lecturas de las de referencia y de las de prueba. El promedio de las 36 lecturas de las concentraciones de referencia de las 12 placas es el punto de corrección para la curva. Corregir el valor promedio obtenido para cada concentración, efectuar los cálculos apropiados, si la lectura de la concentración de referencia de la serie de tres placas es la misma que la del punto de corrección, pero si no en la corrección de la segunda concentración de la curva estándar, el promedio de las 36 lecturas de la concentración de referencia fuera de 20 mm y el promedio de las nueve lecturas de la concentración de referencia de esta serie de tres placas fuera de 19.8 mm, la corrección es de + 0.2 mm. Si el promedio de la segunda concentración en las mismas tres placas es de 17.0 mm, el valor corregido es de 17.2 mm. Para el vaciado de datos se recomienda usar un formato similar al del ("Apéndice B" Normativo). Grafique los valores corregidos incluyendo el punto de corrección en papel semilogarítmico de dos ciclos, utilizando la escala logarítmica para la concentración y la escala aritmética para los diámetros de las zonas. Dibujar una línea por medio de la utilización de las siguientes ecuaciones:

$$L = (3a + 2b + c - e) / 5$$

$$H = (3e + 2d + c - a) / 5$$

Donde:

L y H es igual a los diámetros de zona calculados para las concentraciones baja y alta respectivamente, sobre la línea de respuesta del estándar; a, b, c, d y e, es igual al promedio del diámetro de las lecturas corregidas para cada concentración sobre la línea de respuesta donde "a" es igual a la concentración más baja del antibiótico utilizado; y "e" equivale a la más alta.

9.2.1.3. Determinación y cálculos de potencia.

Para calcular el contenido de antibiótico de la muestra, promediar las lecturas de las zonas del estándar y las lecturas de las zonas de la muestra sobre las tres placas; esta última da un tamaño de zona promedio más grande que el promedio del estándar, sumar la diferencia entre ellas al tamaño de la zona de referencia sobre la curva, conforme al anterior punto 9.2.1.2. Si el promedio del valor de la muestra es más pequeño que el valor del estándar, restar la diferencia entre ellas al tamaño de la zona de referencia sobre la curva. De la gráfica leer la concentración correspondiente al tamaño de la zona ajustada de la muestra. Tomar las diluciones en consideración en el cálculo de la potencia final de esta última. En casos donde los estándares son preparados en una forma que difiere de aquella de la muestra, proceda a experimentos de recuperación.

9.2.1.4. Experimentos de recuperación.

Utilizar muestras de control del producto para ser probado, preparar varias muestras a las cuales se les ha adicionado cantidades controladas y variables del antibiótico. Las concentraciones escogidas deberán caer en el rango de la curva estándar. Efectuar el procedimiento de extracción para esas muestras en paralelo con las no conocidas. Determinar la recuperación promedio del antibiótico adicionado y utilizar el factor de corrección en el cálculo de la potencia del antibiótico para las muestras no conocidas.

9.2.1.5. Controles.

Es esencial que cualquier actividad antibiótica detectada, provenga de la muestra y no del medio ambiente. Siempre se deben incluir controles negativos para indicar el grado de precisión y exactitud de las determinaciones a ser reportadas. Los tejidos pueden tener efectos inhibitorios por sí mismos y si es así, la sensibilidad del método es aquella cantidad de antibiótico que produce una respuesta significativamente mayor que la del tejido por sí mismo.

9.2.2. Preparación de las muestras.

Mezclar 10 g del tejido de la muestra con 40 ml de la solución amortiguadora apropiada por un min. Debido a la inhibición natural de algunos tejidos, es quizá necesario usar una dilución más alta. Permitir que la muestra se extraiga por un mínimo de 45 min. Desecar y filtrar la porción clara del extracto. Alternativamente puede molerse el tejido de la muestra, pesar 10 g en tubos de vidrio de 250 x 175 mm

adicionar 40 ml de la solución amortiguadora adecuada. Continuar mezclando, la filtración no es necesaria a menos que el extracto no esté claro.

9.2.3. Método del análisis de penicilina.

Mantener el organismo de prueba *Sarcina lutea* (ATCC 9341a), como un cultivo patrón o madre, sobre agar inclinado de medio número 1, resementar aproximadamente cada dos semanas. Preparar la suspensión como sigue:

Sembrar en forma de estría en un tubo de agar inclinado, el organismo de prueba e incubar por 18-24 horas a 35 ± 1 °C. Lavar el crecimiento con 2-3 ml de solución salina fisiológica estéril y transferir a la superficie seca de una botella Roux que contenga 250 ml de medio número 1. Difundir la suspensión uniformemente sobre la superficie entera con la ayuda de perlas de vidrio estériles. Incubar por 18-24 horas a 35 ± 1 °C.

Lavar el crecimiento de la superficie del agar con 50 ml de solución salina estéril. Si una alícuota de esta suspensión se diluye 1:35 y da una transmitancia del 25%, la suspensión es satisfactoria para su uso. Puede ser necesario ajustar la suspensión por dilución, así que una alícuota de la suspensión ajustada cuando se diluye 1:35 dará la transmitancia deseada del 25%.

Nota: Usar únicamente la suspensión ajustada y no la dilución 1:35 para preparar la capa semilla.

9.2.3.1. Nivel de inóculo.

Antes del análisis, determinar por placas de prueba la cantidad óptima de la suspensión para adicionar a la capa semilla para obtener las mejores zonas de inhibición.

Probar cada suspensión de bacterias para determinar la inoculación óptima. Preparar placas usando varios niveles de suspensión, por ejemplo 0.1, 0.2, 0.5, y 1.0 ml en 100 ml de la capa semilla fundida, la experiencia dictará si todos aquellos niveles son necesarios para verificar cada nueva suspensión. Elija un nivel de inóculo que dé la mejor sensibilidad y una zona clara de inhibición con la dilución de referencia.

9.2.3.2. Preparación de placas.

Distribuir uniformemente 20 ml de medio número 1 en cajas de Petri y dejar solidificar en una superficie plana y nivelada, que es la capa base. Adicionar el nivel de inóculo apropiado en cada 100 ml de medio para antibióticos número 2 a 49 °C. Mezclar completamente y adicionar 4.0 ml de este agar inoculado a cada placa conteniendo medio número 1 solidificado. Distribuir el agar uniformemente inclinando las placas de lado a lado por medio de un movimiento circular. Dejar solidificar la capa semilla y usar las placas el mismo día de su preparación. Perforar y llenar las placas para las preparaciones de la curva estándar y muestra. Usar la solución amortiguadora pH 6.0 en la preparación de la muestra, incubar a 30 ± 1 °C.

9.2.3.3. Solución patrón o madre.

Pesar exactamente cerca de 10 mg de penicilina G sódica USP referencia estándar, pueden pesarse varios al mismo tiempo en viales de vidrio tapados y conservarlos en un desecador. Disolver por descargo de matraz Erlenmeyer de 250 a 300 ml con tapón de vidrio, en suficiente solución amortiguadora pH 6.0 para dar una concentración de exactamente 1000 unidades por ml (U/ml). Almacenar en refrigerador y conservar por no más de 2 días antes de utilizarlo. Calcular la cantidad de solución amortiguadora a adicionar por medio de la siguiente fórmula:

$$\text{La potencia de penicilina x mg} = \text{ml de solución de unidades deseadas amortiguadora añadida}$$

9.2.3.4. Curva estándar o patrón de referencia.

En matraces volumétricos y utilizando solución amortiguadora pH 6.0 preparar soluciones de trabajo a partir de la solución patrón o madre, para dar concentraciones de 0.05, 0.1 y 0.2 U/ml. La concentración de 0.05 U/ml es la concentración de referencia. Se sugiere usar el método de dilución siguiente:

De (U/ml)	Tome (ml)	Diluya en matraz volumétrico	Concentración resultante(U/ml)
1000	2.5	50	50.0
50	2.5	50	2.5

2.5	2.0	25	0.2
2.5	2.0	50	0.1
2.5	1.0	50	0.05
2.5	0.5	50	0.025
2.5	0.5	100	0.0125

9.2.3.5. Preparación de la muestra.

Pesar exactamente 10 g de la muestra y mezclar con la cantidad apropiada de solución amortiguadora, como se indica en el "Apéndice A" (Normativo). Realizar la preparación como se detalla en el punto 9.2.2.

9.2.3.6. Determinación.

Usar tres placas para cada solución de prueba. Colocar los cilindros para bioensayo sobre las placas de incubación, utilizar tres para cada muestra a ser analizada. Llenar tres cilindros alternados en cada uno, con 0.05 U/ml del estándar de penicilina (referencia) y los remanentes con la muestra bajo prueba. Colocar las tapas sobre las placas e incubar a 30 °C de 16 a 18 h.

Después de la incubación, invertir las placas para quitar los cilindros y medir el diámetro de cada zona de inhibición. Para identificar la actividad como penicilina, añadir penicilinasas concentrada a razón de 0.5 ml por cada 10 ml de extracto de la muestra e incubar 30 min a 35 ± 1 °C. Sobre una placa adicional, llenar dos cilindros con estándar 0.5 U/ml, dos cilindros con la muestra no tratada y dos con la tratada con penicilinasas. Incubar la placa de 16-18 h a 30 °C.

Una zona de inhibición con la muestra tratada y ninguna zona o una zona grandemente reducida con la muestra tratada con penicilinasas, es traducida como una prueba positiva para penicilina.

9.2.3.7. Cálculo de potencia.

Proceda como se describe en el punto 9.2.1.3.

9.2.4. Procedimiento del análisis de tetraciclina.

9.2.4.1. Preparación de la suspensión de esporas.

El organismo de prueba es *Bacillus cereus* variedad *mycoides*, ATCC 11778, crece a 30 °C y se mantiene en el refrigerador sobre medio antibiótico número 8. Transferir el crecimiento de un tubo de siembra fresco con 2-3 ml de agua destilada a una botella Roux conteniendo 250 ml de medio número 8 e incubar a 35 °C de 18-24 h y después a temperatura ambiente por 5 días.

9.2.4.2. Preparación de placas.

Añadir 20 ml de medio número 8 a cada caja de Petri, distribuir uniformemente y dejar solidificar (capa base). Añadir 5 ml de medio número 8 el cual ha sido inoculado con una suspensión de *B. cereus* variedad *mycoides* previamente incubada en un baño de agua a 49-50 °C por 45 min (capa semilla). Llenar los cilindros para la determinación de la muestra y curva estándar. Usar la solución amortiguadora pH 4.5 para la preparación de la muestra. Incubar a 30 ± 1 °C.

9.2.4.3. Solución patrón o madre.

Disolver aproximadamente 40 mg de estándar pesado exactamente en suficiente HCl 0.01 N para dar una solución madre de 1000 µg/ml. La ecuación utilizada para determinar el volumen de solución amortiguadora a añadir al estándar de penicilina puede ser utilizada para determinar la cantidad de HCl 0.01 N para ser adicionado en este caso punto 9.2.3.3. Almacenar la solución madre en refrigeración por no más de siete días.

9.2.4.4. Curva estándar o patrón de referencia.

Diluir la solución madre con suficiente solución amortiguadora pH 4.5 para obtener concentraciones de 0.08, 0.16, 0.32, 0.64 y 1.28 µg/ml. La concentración de la referencia es de 0.32 µg/ml. Se sugiere el método de dilución siguiente:

De (µg/ml)	Tome (ml)	Diluya en matraz volumétrico	Concentración resultante (µg/ml)
---------------	--------------	---------------------------------	-------------------------------------

1000	5.0	50	100.00
100	2.0	50	4.00
4.0	8.0	25	1.28
4.0	4.0	25	0.64
4.0	2.0	25	0.32
4.0	1.0	25	0.16
4.0	1.0	50	0.08

9.2.4.5. Preparación de la muestra.

Proceder como se describe en el punto 9.2.2., utilizando la cantidad apropiada de solución amortiguadora indicada en el "Apéndice A" (Normativo), "Detalle de los métodos de valoración".

9.2.4.6. Cálculo de la potencia.

Proceda como se describe en el punto 9.2.1.3.

9.2.4.7. Organismos indicadores resistentes a la tetraciclina.

El mismo organismo es utilizado para tetraciclina, clortetraciclina y oxitetraciclina.

(1) Preparación de suspensión bacteriana.- El organismo de prueba es *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228. Mantener, crecer e inocular el organismo de la misma manera como se describe para *Sarcina lutea* ATCC 9341a, en el punto 9.2.3., excepto que se debe utilizar medio número 8 en las botellas Roux.

(2) Preparación de placas.- Utilizar medio número 8 tanto para capa base como semilla, preparar las placas de la misma manera como se describe en el punto 9.2.3.2., utilizando la cantidad óptima de suspensión bacteriana, usualmente 2-3 ml, para ser añadida a 100 ml de agar. No incubar cultivos en baño de agua como se hace con *B. cereus*. Incubar a 30 ± 1 °C en incubadora.

9.2.5. Procedimiento de análisis de clortetraciclina.

Proceder como para tetraciclina en el punto 9.2.4., usar clortetraciclina como el patrón de referencia.

9.2.6. Procedimiento de análisis de oxitetraciclina.

Proceder como para tetraciclina en el punto 9.2.4., usar oxitetraciclina como el patrón de referencia.

9.2.7. Procedimiento de análisis de estreptomina.

9.2.7.1. Preparación de suspensiones bacterianas.

Utilizar *Bacillus subtilis*, ATCC 6633 como organismo de prueba. Mantener y crecer los organismos a 35 ± 1 °C de la misma manera como se describe para *B. cereus* variedad *mycooides* en el punto 9.2.4.1., utilizando medio número 1 con 300 mg de $MnSO_4 \cdot H_2O$ por litro de medio. Lavar tres veces el crecimiento de la botella de Roux con solución salina por centrifugación y decantación. Reconstituir el sedimento con 50 ml de solución salina y calentar la suspensión de esporas por 30 min a 70 °C. Mantener la suspensión en refrigeración. Determinar la sensibilidad óptima como en el punto 9.2.3.1.

9.2.7.2. Preparación de placas.

Usar medio número 5 para capa base y semilla, preparar las placas como se describe en el punto 9.2.3.2., utilizando la cantidad óptima de suspensión de bacterias para ser añadida a 100 ml de agar e incubar en un baño de agua de 49-50 °C por 75 min. Para análisis de estreptomina y/o penicilina añadir penicilinasas a la capa semilla. Incubar a 30 ± 1 °C.

9.2.7.3. Curva estándar o patrón de referencia.

Secar 30-40 mg de sulfato de estreptomina estándar, por tres horas a 60 °C en una estufa de vacío a una presión de 5 mm de mercurio o menos. Determinar el peso seco exacto y disolver en suficiente agua destilada para dar una solución patrón o madre de 1000 µg/ml. Calcular la cantidad de agua a ser añadida por la fórmula usada en el punto 9.2.1.2. Conservar la solución patrón o madre bajo refrigeración por no más de 30 días. Diluir en solución amortiguadora pH 8.0 para dar concentraciones de 0.125, 0.25, 0.50, 1.0, 2.0 y 4.0 µg/ml. Utilizar únicamente las últimas cinco concentraciones para graficar la línea de

respuesta sobre papel semilogarítmico. Usar la de 0.125 µg/ml para determinar el nivel bajo de detección. La concentración de referencia es 1.0 µg/ml. Se sugiere utilizar el siguiente método de dilución:

De (µg/ml)	Tome (ml)	Diluya en matraz volumétrico	Conc. resultante (µg/ml)
1000	2.5	100	25.000
25	4.0	25	4.000
25	2.0	25	2.000
25	1.0	25	1.000
25	1.0	50	0.500
25	0.5	50	0.250
25	0.5	100	0.125

9.2.7.4. Organismos indicadores resistentes a estreptomina.

Utilizar *Sarcina lutea* ATCC 9341a como organismo de prueba. Tratar de la misma manera como *S. lutea* en la preparación de la suspensión bacteriana para análisis de penicilina indicado en el punto 9.2.3.

(1) Preparación de la muestra. Proceder como se describe en el punto 9.2.2., utilizar la cantidad apropiada de solución amortiguadora indicada en el "Apéndice A" (Normativo), "Detalle de los métodos de valoración".

(2) Cálculo de potencia. No se requiere cálculo de potencia; usar el organismo como un control indicador de resistencia.

9.2.8. Procedimiento de valoración de eritromicina.

9.2.8.1. Preparación de la suspensión de esporas.

Utilizar *Sarcina lutea* (ATCC 9341a) como organismo de prueba.

Preparar una suspensión del organismo en la forma descrita bajo valoración de penicilina en el punto 9.2.3. Antes del análisis, determinar por ensayo en placas la cantidad óptima (usualmente 0.1-0.5 ml) de la suspensión para ser añadida a 100 ml de medio número 11, el cual ha sido fundido y enfriado a 49 °C. Almacenar la suspensión en el refrigerador por no más de dos semanas.

9.2.8.2. Preparación de placas.

Añadir 20 ml de medio número 11 a cada caja de Petri. Distribuir uniformemente y dejar solidificar. Añadir 5 ml de medio número 11, el cual ha sido inoculado con una suspensión de *Sarcina lutea*. Proceder como se describe para la preparación de placas en el punto de penicilina 9.2.3.2. Incubar a 30 °C durante 16-18 h.

9.2.8.3. Curva estándar o patrón de referencia.

Preparar una solución patrón disolviendo de 30-50 mg de eritromicina estándar en 2 ml de metanol. Añadir suficiente solución amortiguadora 0.2 M pH 8.0 para dar una concentración de 1000 µg/ml. Utilizar la fórmula del punto 9.2.1.2. Diluir en la solución amortiguadora para obtener concentraciones de 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 y 0.8 µg/ml. La concentración de referencia es 0.2 µg/ml. Preparar una curva estándar como la descrita en el punto 9.2.1.2., utilizando las concentraciones antes citadas.

9.2.8.4. Preparación de la muestra.

Proceder como se describe en el punto 9.2.2., utilizando la cantidad apropiada de solución amortiguadora indicada en el "Apéndice A" (Normativo), "Detalles de los métodos de valoración".

9.2.8.5. Cálculo de potencia.

Proceder como se describe en el punto 9.2.1.3.

9.2.8.6. Organismos indicadores resistentes a eritromicina.

Tratar el organismo de prueba *Sarcina lutea* ATCC 15957 de la misma manera como *S. lutea* ATCC 9341a en el punto 9.2.3., utilizar medio número 11 en botellas Roux, capas base y semilla.

(1) Preparación de la muestra.- Proceder como se describe en el punto 9.2.2., utilizar la cantidad apropiada de solución amortiguadora indicada en el "Apéndice A" (Normativo).

(2) Cálculo de potencia.- *S. lutea* ATCC 15957 es resistente a eritromicina, no se requiere ningún cálculo de la potencia. Utilizar el organismo como un control indicador de resistencia.

9.2.9. Procedimiento de valoración de neomicina.

9.2.9.1. Preparación de suspensiones bacterianas.

Utilizar *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) como organismo de prueba, manteniéndolo como solución stock sobre agar inclinado de medio número 1. Transferir el crecimiento del agar inclinado fresco con 2 ml de solución salina fisiológica estéril a una botella de Roux conteniendo 250 ml de medio número 1 e incubar de 18 - 24 h a 35 ± 1 °C.

Recolectar el crecimiento de la superficie de agar con 50 ml de solución salina estéril. Determinar la suspensión a utilizarse (usualmente 1:25) que dé 25% de transmitancia. Antes del ensayo determinar por placas de prueba, la cantidad óptima (usualmente 1.0-2.0 ml) de la dilución de la suspensión a ser añadida a 100 ml de medio número 11, el cual ha sido fundido y enfriado a 49 °C. Almacenar la suspensión en el refrigerador por no más de una semana.

9.2.9.2. Preparación de las placas.

Añadir 20 ml de medio número 11 a cada caja de Petri, distribuir uniformemente y dejar solidificar.

Añadir 5 ml de medio número 11 previamente inoculado con una suspensión de *Staphylococcus epidermidis*. Proceder como se describe para la preparación de placas para penicilina en el punto 9.2.3.2. Incubar a 35 ± 1 °C de 16-18 h.

9.2.9.3. Curva estándar o patrón de referencia.

Disolver el peso del estándar de trabajo en solución amortiguadora de fosfato de potasio 0.2 M pH 8.0. Para tener una solución patrón de 1000 µg/ml. Almacenar por no más de 14 días en el refrigerador. Diluir la solución patrón de neomicina en solución amortiguadora pH 8.0 para tener concentraciones finales de 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 µg/ml. La concentración 1.0 µg/ml es la de referencia.

9.2.9.4. Preparación de muestras.

Proceder como se describe en el punto 9.2.2., utilizando la cantidad apropiada de solución amortiguadora indicada en el "Apéndice A" (Normativo).

9.2.9.5. Cálculo de potencia y experimentos de recuperación.

Proceder como se describe en el punto 9.2.1.3.

10. Resultados

10.1. Interpretación de resultados.

Las muestras positivas son aquellas donde el halo de inhibición se forma alrededor de la torunda o hisopo. En caso de desear cuantificar la cantidad y tipo(s) de antibiótico(s) es necesario realizar el bioensayo en donde el resultado será la cantidad encontrada después de medir los halos de inhibición e interpolar el valor en la curva de referencia, multiplicado ese dato por el factor apropiado de dilución, indicado en el "Apéndice A" (Normativo).

10.2. Informe de resultados.

Se reportarán como positivos o negativos en el caso de la prueba de la torunda y para bioensayo en ppm del antibiótico(s) encontrado(s).

11. Sanciones

El incumplimiento a las disposiciones contenidas en la presente Norma, será sancionado conforme a lo establecido en la Ley Federal de Sanidad Animal y la Ley Federal sobre Metrología y Normalización.

12. Concordancia con normas internacionales

Esta Norma Oficial Mexicana no es equivalente con ninguna norma internacional.

13. Bibliografía

Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 5a. Edición. México, 1988.

Manual para la Determinación Cualitativa de Antibióticos en Muestras de Carne (prueba de la torunda). Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal, DGSA, SARH, 1994.

Manual para determinación de Residuos de Antibióticos en Tejido Animal. Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal, DGSA, SARH, 1994.

Microbiology Laboratory Guidebook. United States Department Agriculture. Food Safety and Inspection Service, 1977.

14. Disposiciones transitorias

Esta Norma entrará en vigor al día siguiente de su publicación en el **Diario Oficial de la Federación**.

Sufragio Efectivo. No Reelección.

México, D.F., a 31 de enero de 1996.- El Director General Jurídico, **Roberto Zavala Echavarría**.- Rúbrica.

"APENDICE A" (NORMATIVO) DETALLES DE LOS METODOS DE VALORACION

Antibióticos	Diluciones de la muestra	Diluyente	Factor de dilución	Concentraciones finales para curva estándar
Penicilina	1+4	Solución amortiguadora al 1% pH 6.0	5	0.0063, 0.0125, <u>0.025</u> , 0.05, 0.10, µg/ml
Clortetraciclina	1+4	Solución amortiguadora 0.01 M, pH 4.5	5	0.08, 0.16, <u>0.32</u> , 0.64, 1.28, µg/ml
Tetraciclina o Oxitetraciclina	1+4	Solución amortiguadora 0.1 M, pH 4.5	5	0.08, 0.16, <u>0.32</u> , 0.64, 1.28, µg/ml
Estreptomicina	1+4	Solución amortiguadora 0.1 M, pH 8.0	5	0.125, 0.25, <u>0.5</u> , 1.0 y 2.0, µg/ml
Neomicina	1+4	Solución amortiguadora 0.2 M, pH 8.0	5	0.125, 0.25, <u>0.5</u> , 1.0, 2.0, µg/ml
Eritromicina	1+4	Metanol y Solución amortiguadora 0.2 M, pH 8.0	5	0.025, 0.05, <u>0.1</u> , 0.2, 0.4, µg/ml

(a) La concentración subrayada es la concentración de referencia.

"APENDICE B" (NORMATIVO) PRUEBAS CONTROLADAS DE ANTIBIOTICOS (Curva Estándar)

		FECHA _____	
ANTIBIOTICO _____		TEJIDO _____	
CONCENTRACION	Puntos alto y bajo para la gráfica:		
µg/ml	Punto bajo: $L = (3a + 2b + c - e)/5$		
a = _____	d = _____	Punto alto: $H = (3e + 2d + c - a)/5$	
b = _____	e = _____	c = _____ Ref.	
	(a)	Ref.	(b) Ref. (d) Ref. (e) Ref.
Diámetro de la zona	-1-		
ZONA I	-2-		
	-3-		
Diámetro de la zona	-1-		
ZONA II	-2-		
	-3-		

Diámetro de la zona -1-

ZONA III -2-

-3-

Suma de Placas

Promedio de placas

Factor de corrección

Promedios corregidos

Sumatoria de zonas de referencia _____

Promedio de zonas de referencia _____

Analista(s):



BIO-X TOTAL ANTIBIOTIC BIO K 331

I - INDICATIONS

TOTAL ANTIBIOTIC - kit is designed for the rapid detection of antibiotics in milk and meat samples. Due to its simplicity, short assay time and multiresiduality, the kit is suitable for screening assays both in laboratories and in food industries.
Time required for the assay : 3 h at 65°C.

II - PRINCIPLE OF THE TEST

It is a growth inhibition test of *Bacillus ~~S~~thermophilus* var. *Calidolactis*, included in a suitable agar medium. In the assay conditions, the microbial growth yields a colour change of the medium. The presence of antibiotics in the samples inhibits the bacterial growth and no colour change is observed.

III - KIT COMPONENTS

- 3 microplates with 8-wells strips breakable (288 analyses)
- Extraction buffer concentrate 10x, one bottle of 100 ml.
- Sealing tape

IV - DETECTION LIMITS IN MATRIX

Detection limit is the minimum amount of antibiotic being able to inhibit the bacterial growth completely in the assay conditions (3h at 65°C), so that the medium colour remains unchanged.

Anti-microbial milk, meat

- Penicillin 0.004 U.I./ml 0.020 U.I./gr.
- Ampicillin 0.004 µg/ml 0.020 µg/gr.
- Amoxicillin 0.004 µg/ml 0.020 µg/gr.
- Oxacillin 0.015 µg/ml 0.075 µg/gr.
- Cloxacillin 0.020 µg/ml 0.100 µg/gr.
- Dicloxacillin 0.015 µg/ml 0.075 µg/gr.
- Nafcillin 0.080 µg/ml 0.400 µg/gr.
- Streptomycin 3.500 µg/ml 17.50 µg/gr.
- Dihydrostreptomycin 5.000 µg/ml 25.00 µg/gr.

- Erythromycin 0.500 µg/ml 2.500 µg/gr.
- Tetracycline 0.100 µg/ml 0.500 µg/gr.
- Oxytetracycline 0.100 µg/ml 0.500 µg/gr.
- Chlorotetracycline 0.100 µg/ml 0.500 µg/gr.
- Rifampicin 0.150 µg/ml 0.750 µg/gr.
- Rifamycin 0.025 µg/ml 0.125 µg/gr.
- Spiramycin 5.000 µg/ml 25.000 µg/gr.
- Bacitracin 0.300 U.I./ml 1.500 U.I./gr.
- Kanamycin 10.00 µg/ml 50.00 µg/gr.
- Neomycin 2.500 µg/ml 12.50 µg/gr.
- Chloramphenicol 5.000 µg/ml 25.00 µg/gr.

V - PREPARATION AND STORAGE OF SAMPLE

Milk samples: no preparation is required.

Milk samples should be tested as soon as possible after sampling, and should be stored at 4°C for no longer than 48 h. Spoiled milk samples may yield false negative results.

Meat samples: dilute the provided extraction buffer 1:10 with distilled water (1 part of buffer + 9 parts of distilled water). In a tube weigh 0.75 g of meat, mincing it with a lancet. Add 3 ml of working extraction buffer.

Shake vigorously, then leave at room temperature for 12-16 hours (overnight) or at 37°C for 2 hours. Use the clean supernatant directly in test. Meat samples can be stored at 4°C for 24 h before analysis, and at -20°C for some weeks.

VI - ASSAY IMPLEMENTATION

First of all, predispose a thermostatic water bath (equipped with cover) at the stable temperature of 65°C. According to the number of assays to be run, remove from the microplate the required amount of strips fitted into the frame, taking care not to uncover the unused strips (put the unused strips again in the bag and store turned upside down at 4-8°C).

Predispose one or more negative controls (milk samples or meat extracts without antibiotics) for each test series.

Use a single disposable pipette tip for each sample to avoid cross-contaminations.

Using a precision micropipette.

- place 50 µl of negative control in the relative wells
- place 50 µl of each sample in the relative wells.

Close the microwells with the sealing tape, taking care that all the wells are tightly sealed up. Place the microplate in the water bath pre-warmed at 65°C, leaving it floating on the water surface (cover the bath in order to avoid cooling).

Incubate for 3 hours at 65°C.

Particular care should be taken in checking the incubation temperature, since it is very important for a good performance of the assay. Carefully control that the thermostat is able to keep the temperature accurate and constant (65 ± 2°C).

VII - INTERPRETATION OF THE RESULTS

After the 3 hours incubation take the plate from the thermostatic water bath and allow to cool 1-2 min. Remove the sealing tape and empty the plate knocking it on an absorbent paper. Knocking again the plate, after leaving it for 1-2 minutes upside down. Turn the plate up and read the results by observing the medium color in the wells (best reading is obtained by observation in sunlight or light-bulb).

If during the incubation the sample is fallen on the bottom of the well, a best reading is obtained taking out

the strip from the frame and read the results observing sideways the color of the medium in the wells.

Negative samples and controls: medium colour turns from purple to yellow.

Positive samples: medium colour remains unchanged (purple).

VIII - NOTES

- In case that after the 3 hours the negative controls should not have turned to yellow, check the incubation temperature and prolong the incubation time.
- All the possible colour shades between yellow and purple which may give rise to doubt are due to a decrease in the bacterial growth rate caused by the presence of inhibition factors in the samples (such as antibiotics substances just below the detection limits). These samples should be considered as suspect positive.
- Samples giving positive result in the assay can be further investigated for the presence of penicillins. By treatment of samples with an excess of penicillinase, the penicillins become inactive and the same samples result negative in the repeated analysis. In practice, to 1 ml of positive sample add 50 µl of penicillinase 10 U/ml, incubate 10 minutes at room temperature and repeat the assay.
- Should the medium change colour inside a well before use, discard that well.
- Store the kit at 4-6°C.