

NOM-032-ZOO-1996

NORMA OFICIAL MEXICANA, DETERMINACION DE ANTIBIOTICOS EN HIGADO, MUSCULO Y RIÑON DE BOVINOS, OVINOS, EQUINOS, PORCINOS, AVES, CAPRINOS Y CERVIDOS 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.

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 RIÑON 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 Zoonosanitaria, 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

n 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 (MnSO₄H₂O)

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.
- Penicilinasas.

8. Microorganismos de prueba

- *Sarcina lutea* ATCC 9341a, susceptible a penicilina y eritromicina y resistente a estreptomycin y neomicina.
- *Bacillus cereus* variedad *mycoides* ATCC 11778 susceptible a tetraciclina.
- *Bacillus subtilis* ATCC 6633, susceptible a estreptomycin.
- *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 (MnSO₄H₂O) 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 x 10⁻⁵, 2 x 10⁻⁵, 3 x 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 estreptomycin 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 $\mu\text{g/ml}$), 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 estreptomycin 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, resembrar 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:

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

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 penicilinasa 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 penicilinasa. 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 penicilinasa, 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 estreptomycin.

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 *mycoides* 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 estreptomycin y/o penicilina añadir penicilinas 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 estreptomycin 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 1% pH 6.0	Solución amortiguadora	al 5 0.05, 0.10, µg/ml	0.0063, 0.0125, 0.025,
Clortetraciclina	1+4 0.01 M, pH 4.5	Solución amortiguadora	5 0.64, 1.28, µg/ml	0.08, 0.16, 0.32,
Tetraciclina o Oxitetraciclina	1+4 0.1 M, pH 4.5	Solución amortiguadora	5 0.64, 1.28, µg/ml	0.08, 0.16, 0.32,
Estreptomycin	1+4 0.1 M, pH 8.0	Solución amortiguadora	5 1.0 y 2.0, µg/ml	0.125, 0.25, 0.5,
Neomicina	1+4 0.2 M, pH 8.0	Solución amortiguadora	5 1.0, 2.0, µg/ml	0.125, 0.25, 0.5,
Eritromicina	1+4 0.2 M, pH 8.0	Metanol y Solución amortiguadora	5 0.2, 0.4, µg/ml	0.025, 0.05, 0.1,

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

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

FECHA _____

ANTIBIOTICO _____ TEJIDO _____

CONCENTRACION µg/ml _____ Puntos alto y bajo para la gráfica:

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

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

a = _____ d = _____

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): _____