
NORMA CUBANA

NC

920: 2012

RODENTICIDA BIOLÓGICO BIORAT – ESPECIFICACIONES

Biological Rodenticide BIORAT– Specifications

ICS: 65.100

**1. Edición Diciembre 2012
REPRODUCCIÓN PROHIBIDA**

**Oficina Nacional de Normalización (NC) Calle E No. 261 El Vedado, La Habana. Cuba.
Teléfono: 830-0835 Fax: (537) 836-8048; Correo electrónico: nc@ncnorma.cu; Sitio
Web: www.nc.cubaindustria.cu**



Cuban National Bureau of Standards

NC 920: 2012

Prefacio

La Oficina Nacional de Normalización (NC) es el Organismo Nacional de Normalización de la República de Cuba y representa al país ante las organizaciones internacionales y regionales de normalización.

La elaboración de las Normas Cubanas y otros documentos normativos relacionados se realiza generalmente a través de los Comités Técnicos de Normalización. Su aprobación es competencia de la Oficina Nacional de Normalización y se basa en las evidencias del consenso.

Esta Norma Cubana:

- Ha sido elaborada por el Comité Técnico de Normalización NC/CTN 97 de Sanidad vegetal integrado por representantes de las siguientes entidades:
 - Grupo Empresarial de Producciones Biofarmacéuticas y Químicas
 - Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal
 - Centro Nacional de Sanidad Vegetal
 - Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical
 - Centro de Ingeniería e Investigaciones Químicas
 - Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria
 - Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal de La Habana
 - Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical
 - Instituto Nacional de Higiene y Epidemiología
 - Oficina Nacional de Normalización
- Esta norma fue elaborada siguiendo todas las consideraciones establecidas por los especialistas que comenzaron su producción en el año 1985 bajo el asesoramiento de investigadores de la Academia de Ciencias de Cuba y personal técnico del Ministerio de Salud Pública de Cuba

© NC, 2012

Todos los derechos reservados. A menos que se especifique, ninguna parte de esta publicación podrá ser reproducida o utilizada en alguna forma o por medios electrónicos o mecánicos, incluyendo las fotocopias, fotografías y microfilmes, sin el permiso escrito previo de:

Oficina Nacional de Normalización (NC)

Calle E No. 261, El Vedado, La Habana, Habana 4, Cuba.

Impreso en Cuba.

0 Introducción

El aumento de poblaciones de roedores plaga es una problemática que cada día preocupa a las autoridades políticas y administrativas en muchos países, dado su impacto creciente en la economía, con peligro para el deterioro de la salud de la población, es necesario el uso de métodos alternativos para su control. En consideración a esta problemática y, teniendo en cuenta la ocurrencia de las enfermedades transmitidas por ellos, como vectores y reservorios, además de las pérdidas de alimentos a nivel mundial, que causan estos dañinos mamíferos, desde la década de los 60, nuestro país comenzó a desarrollar el control sobre los roedores de interés médico-sanitario. En las primeras dos décadas (60-80), en forma de campañas y posteriormente a través de programas de carácter permanente, y de tratamientos periódicos con rodenticidas químicos; inicialmente se usaron dosis múltiple y posteriormente de una sola dosis, en ambos casos de acción lenta, hasta la introducción en 1985 del rodenticida biológico BIORAT[®], de fabricación nacional, de forma masiva. Este biorodenticida ha tenido excelentes resultados durante dos décadas y media a lo largo de toda la isla de Cuba.

El producto utilizado hasta el presente (BIORAT[®]) es un rodenticida Biológico en cuya composición se utiliza una bacteria, *Salmonella enteritidis* var. *Danyzs lisina negativa fagotipo 6^a*, monopatógena específica para ratas y ratones y una sal sódica de warfarina al 0.02 % que actúa como un inmunodepresor.

La eficacia y efectividad del BIORAT[®] también ha sido convincente en diversos países, llevando a cabo ensayos demostrativos, con la finalidad de su registro o actualización, así como aplicación a gran escala. Ejemplo de ello podemos apreciarlo en las Tablas 3y4 como son: Brote de Peste Bubónica en Perú (1994), Leptospirosis en Nicaragua (1995), Fiebre Hemorrágica en Bolivia (1997), Filipinas y Laos (1998), Honduras (1999), China (2000), Angola (2002), Guinea Ecuatorial (2008) entre otros, en los que se han obtenido efectividades superior al 80 %.

Con la introducción de esta nueva alternativa de control biológico (BIORAT[®]), se han llegado a controlar en Cuba y otros países las especies de roedores sinantrópicas como el *Rattus rattus*, *Rattus norvegicus* y el *Mus musculus* además del *Sigmodon hispidus*, *Calomys callosus*. En las Tablas 1, 2, 3, 4 se resumen las experiencias obtenidas a nivel nacional e internacional de la aplicación de BIORAT[®] en objetivos agrícolas, pecuarios y urbanos así como en el control de brotes epidémicos.

RODENTICIDA BIOLÓGICO BIORAT® — ESPECIFICACIONES**1 Objeto**

Esta norma establece los requisitos de producción del Rodenticida Biológico BIORAT® obtenido por proceso fermentativo. Es un biopreparado que tiene como cebo arroz con cáscara, teniendo como principio activo a la enterobacteria *Salmonella enteritidis* var. *Danysz*, lisina negativa, fagotipo 6a, efectiva para el control de poblaciones de ratas y ratones, específicamente de la familia Muridae y alguna especie de la familia Cricetidae.

2 Referencias normativas

Los siguientes documentos de referencia son indispensables para la aplicación de este documento. Para las referencias fechadas, sólo es aplicable la edición citada. Para las referencias no fechadas, se aplica la última edición del documento de referencia (incluyendo cualquier enmienda).

NC 796 Agricultura — Sanidad Vegetal — Términos y definiciones.

NC-ISO 2859-0:2000 Procedimientos de muestreo para la inspección por atributos. Parte 0. Introducción al Sistema de Muestreo por atributos.

NC 528:2009 Medidores de pH. Métodos y Medios de Verificación.

NC 26-121:1993 Medicamentos. Medicamentos no estériles — Determinaciones microbiológicas.

NC 01-04:1987 Ordenamiento y regulaciones generales — Marcación de las cargas — Reglas generales.

NC 91 Envases y embalajes — Bolsas de polietileno — Requisitos generales.

3 Términos y definiciones

A los fines de este documento, se aplican los términos y definiciones establecidos en la Norma Cubana NC 796 y además los siguientes:

3.1**bioplaguicidas**

organismos biológicos (bacterias, virus, hongos) y vertebrados e invertebrados utilizados para el control de plagas.

3.2**cepa**

organismo inicial de una población, obtenida a partir de un ancestro único. Todos sus descendientes poseen las características de la especie.

3.3**contaminación**

especies de microorganismos no deseados que pueden aparecer durante el proceso de reproducción de la bacteria.

3.4

lote

cantidad definida de un determinado producto, elaborado en condiciones que se presumen uniformes.

NOTA. A los efectos de esta norma se considera lote el total de la producción obtenido como resultado de la elaboración de un día.

3.5 Muestra de laboratorio: Muestra destinada al laboratorio para su inspección o ensayo.

3.6 Muestra testigo: Muestra final debidamente sellada que se conserva para comprobación en caso de discrepancias.

4 Símbolos y abreviaturas

UFC – Unidades formadoras de colonias.

mL – mililitros.

M_t (%) – Porcentaje de mortalidad.

pi – Peso bolsa (g).

N – Número de bolsas analizadas.

P – Peso promedio

Σ – suma del i-ésimo valor

5 Requisitos

5.1 Requisitos de higiene

Cumplir con los requisitos de las Buenas Prácticas de Manufactura [5] y de Bioseguridad [6]

5.2 Requisitos de la cepa

Cepa: *Salmonella entérica*, subespecie *entérica*, serovar *Enteritidis*, var. *Danyasz*, lisina negativa, fagotipo 6a (Laboratorio de Patógenos Entéricos de Inglaterra del Public Health Laboratory Service (PHLS) en octubre de 1996). Procedente del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”. Se mantiene conservada en un medio a base de leche descremada en ampulas liofilizadas para un período hasta 5 años.

Los requisitos de calidad de la cepa se establecen en la Tabla 1.

Tabla 1 — Requisitos de calidad de la cepa

Requisito	Norma
Pureza	Puro. Sólo <i>Salmonella enteritidis</i> var. <i>Danysz</i> lisina negativa, fagotito 6a.
Microscopía	Bacilo gramnegativo.
Características macroscópicas	Colonias medianas, bordes regulares, ligeramente elevadas y brillantes (24 h – 48 h)
Tipificación bioquímica	Lact. (-); GLU (+); Salicina (-); Dulcitol (+); Manitol (+); Rafinosa (-); Maltosa (+); Ramnosa (+); Trealosa (+); Inositol (-); Indol (-), citrato (-); Lis lisina descarboxilasa (-). Kliger (Gas (+); H ₂ S (+). Stern (-)
Resistotipo (antibiograma)	Resistente a : Eritromicina, Lincomicina, Clindamicina, Vancomicina, Rimfamocina. Susceptible a : Ampicilina, tetraciclina, Cloranfenicol, Gentamicina.
Pruebas serológicas	Observación de aglutinación franca de la cepa frente a los antisueros somáticos y flagelares específicos. Presenta: Antígenos somáticos (O):9-12, y Antígenos flagelares (H): g, m (HII): NO
Prueba biológica (Virulencia, %)	100 % de mortalidad de los ratones antes de las 72 h de inoculadas (0,25 mL por vía intraperitoneal / ratones BALB/c o F1).

5.3 Requisitos de calidad de la materia prima

5.3.1 Inóculo de Salmonella: Fermentación aerobia de la bacteria *Salmonella enteritidis* var. *Danysz*, lisina (-), fagotito 6a, cumpliendo con los requisitos de calidad, debe estéril y no presentará partículas gruesas, u otros signos que indiquen contaminación.

En la Tabla 2 se describen los requisitos de calidad del inóculo de *salmonella*.

Tabla 2 — Requisitos de calidad del inóculo de *salmonella*

Requisito	Norma
Conteo de viables (UFC/ mL)	$\geq 2 \times 10^9$
Pureza	Sólo <i>Salmonella enteritidis</i> var. <i>Danysz</i> lisina negativa, fagotito 6a. No se admiten presencia de microorganismos tales como otras <i>Salmonellas</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomona aeruginosa</i> , hongos y otros.
pH	6,6 – 7,6
Efectividad (% mortalidad)	100% de mortalidad en 24 h – 48 h. (0,25 mL por vía intraperitoneal / ratones BALB/c o F1).

5.3.2 Arroz con cáscara: Aspecto: Granos secos, libres de materiales extraños. Olor: inodoro. Color: Característico.

5.3.3 Warfarina sódica ver ref. [7]

5.3.4 Agua suavizada: Dentro de los requisitos físico-químicos deben tenerse en cuenta los siguientes. Pureza: menor de 60 mg/mL de sales disueltas. Con pH: 6,0 – 7,0.

5.4 Requisitos de calidad del rodenticida biológico BIORAT®.

En la Tabla 3 se establecen los requisitos de calidad para el rodenticida biológico BIORAT®.

Tabla 3 — Requisitos de calidad del rodenticida biológico BIORAT®

Requisito	Norma
Características organolépticas	Aspecto: Granulado húmedo Color: amarillo oscuro a carmelita Olor: característico a fermentación por <i>Salmonella enteritidis</i> var. <i>Danysz</i> , lisina negativa fagotipo 6a. Sin materiales extraños o impurezas.
Conteo de viable (UFC/ g)	$\geq 10^7$
Pureza	Presencia de <i>Salmonella enteritidis</i> var. <i>Danysz</i> lisina negativa, fagotipo 6a. No se admiten presencia de microorganismos tales como otras <i>Salmonellas</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , hongos y otros.
pH	6,0 – 8,0
Efectividad (% mortalidad)	≥ 80 % de mortalidad de ratones por vía oral en 21 días. (2 g/ ratones BALB/c o F1).

5.5 Requisitos de aplicación

5.5.1 Empleo e instrucciones de uso

El BIORAT® es un rodenticida biológico, de dosis única (correspondiente al 10% de peso corporal), efectivo para el control de poblaciones de ratas y ratones, específicamente de la familia *Muridae* y algunas especies de la familia *Cricetidae*. Se colocan postas de 25 g – 50 g en los alrededores e interiores de los objetivos infestados, directamente en las cuevas y otros lugares por donde transitan los roedores, protegido de la incidencia de los rayos solares en forma de bloqueo circular. Es ingerido por vía oral, originando la muerte a ratas y ratones entre el 6^{to} y 12^{mo} día después de ser ingerido.

Se debe evitar colocar el producto al alcance de personas ajenas. Durante la aplicación y manipulación, se debe usar guantes. Se prohíbe ingerir alimentos y fumar durante el trabajo. Desinfección de los utensilios empleados y las manos del personal al concluir el trabajo. Se debe mantener fuera del alcance de los niños, animales y productos alimenticios.

Hacer una sola aplicación de producto efectiva por no menos de 6 meses (control integrado).

6 Métodos de muestreo

6.1 Inspección de aceptación

6.1.1 Determinación del peso de bolsas promedio

Se toman aleatoriamente la cantidad de bolsas, que de acuerdo al tamaño del lote se indique en la tabla de muestreo, se pesan con auxilio de una balanza técnica anotando los resultados.

El peso promedio se determina mediante la siguiente expresión:

$$P = \frac{\sum_{i=1}^{i=n} pi}{n}$$

donde

pi – Peso de la i -ésima bolsa (g).

N – Número de bolsas analizadas.

P – *Peso promedio*

El contenido promedio del lote debe encontrarse entre 4 kg \pm 0,1 kg.

6.1.2 Plan de muestreo

Inspección por atributos según la norma NC ISO 2859-0

Se inspeccionarán visualmente las estibas, la ubicación y el estado general de las cajas o paquetes retractiles. De acuerdo a la cantidad física del lote se extraen las muestras según la siguiente tabla de muestreo (Tabla 4):

Tabla 4 — Tabla de muestreo

Tamaño del lote	Tamaño de la muestra
2 – 8	2
9 – 15	3
16 – 25	5
26 – 50	8
51 – 90	13
91 – 150	20
151 – 280	32
281 – 500	50
501 – 1900	80
1201 – 3200	125
3201 – 10000	200
10001 – 35000	315
35001 – 150000	500
150001 – 500000	800
\geq 500001	1250

Una vez extraídas las muestras de forma aleatoria, se procede a cuantificar y clasificar los defectos:

Defectos críticos:

Bolsas:

Mal sellado
Rotas
Con hongo u otro contaminante apreciable

Cubos:

Rotos
Sucios por dentro
Sin identificación
Identificación borrosa, equivocada o incompleta

Embalaje:

Sin identificación
Identificación borrosa, equivocada o incompleta

Defectos mayores:

Bolsas:

Abombadas
Logotipo corrido
Impresión borrosa

Cubos:

Manchados con pegamento
Sucios por fuera
Con restos de etiquetas

Embalaje:

Con faltantes

Defectos menores:

Etiquetas:

Jorobadas
Semidespegadas
Invertidas
Con doble folio

Embalaje:

Falta de unidades

Según el plan de muestreo y NCA se rechaza o acepta el lote. Ver Tabla 5.

Tabla 5 — Plan de muestreo simple para inspección normal

Defectos mayores		NCA 2,5	Defectos menores	
A	R		A	R
0	1	2,3	0	1
0	1	5,8	1	2
1	2	13	1	2
1	2	20	2	3
1	2	32	3	4
2	3	50	5	6
3	4	80	8	9
5	6	125	12	13
8	9	200	18	19
12	13	315	18	19
18	19	500	18	19

La aparición de un solo defecto crítico es motivo de rechazo del lote y se inspecciona al 100 %.

6.2 Procedimiento para la toma y preparación de la muestra de laboratorio

Las muestras deben ser tomadas siguiendo las medidas asépticas correspondientes, de forma tal que no se alteren los resultados.

Inspección de muestras de retención:

Se establece para determinar posibles alteraciones en las muestras testigos que se encuentren sometidas a las condiciones de almacenamiento que se requieren.

De cada lote de producto se seleccionan de 3–5 muestras, las que serán conservadas en el muestrario y mensualmente se les realizarán la inspección de testigos, la que consiste en comprobar si el producto mantiene sus características organolépticas (apariencia, olor y color), de no ser así se procederá a realizar las demás determinaciones.

Estas muestras se mantendrán en las condiciones de almacenamiento requeridas y recomendadas para el producto y se eliminarán transcurridos 7 días a temperatura mayor de 30 °C y 7 meses a temperatura de (2 – 8) °C posterior a su vencimiento. Esta prueba es responsabilidad del establecimiento productivo hasta la liberación del producto. Una vez liberado y comercializado será responsabilidad del control de calidad de la Empresa.

7 Métodos de ensayo

Se toman tres muestras del producto final, las cuales corresponden al inicio, medio y final de la producción, para los ensayos microbiológicos, físico-químicos, biológicos y características organolépticas

7.1 Determinación de las características organolépticas: Se analiza color, olor y aspecto del producto.

Interpretación: Aspecto granulado húmedo, color amarillo oscuro, olor característico a fermentación por *Salmonella enteritidis* var. Danysz, lisina negativa fagotipo 6a. Sin materiales extraños o impurezas.

7.2 Determinación de pH

Se realizará según la norma NC 528

Se pesan 10 g en balanza técnica y se maceran en un mortero limpio, al cual se le añaden aproximadamente 80 mL de agua destilada, se trasvasa el contenido a un matraz aforado de 100 mL y se enrasa con agua destilada. Teniendo el pH metro ajustado con las soluciones buffer, sear el electrodo e introducirlo en un beaker o erlenmeyer que contenga la muestra líquida y efectuar la medición.

Interpretación: Satisfactorio si el valor de pH es de 6,0 – 8,0.

7.3 Determinación de las características microbiológicas

Se realizará según lo establecido en la norma NC 26-121.

7.3.1 Microscopía

Procedimiento:

Tinción de Gram: Se toma una asada, se realiza la extensión de la muestra en un portaobjeto se harán tinciones de gram depositando una gota de cultivo en láminas portaobjeto, luego se fijan pasándolas por la llama del mechero, se somete la extensión a varias gotas de violeta cristal, se deja reposar aproximadamente de 30 segundos a 1 minuto, se lava y se somete a varias gotas de lugol esperándose aproximadamente de 30 s a 1 min, se lava con alcohol – acetona, posteriormente se lava con agua destilada y se somete a varias gotas de fuschina o safranina, se deja reposar de 30 s a 1 min, se lava, se seca y se observa bajo lente de inmersión con ayuda del aceite de cedro.

Interpretación: Se expresará las características morfológicas y de tinción del cultivo. Observar si corresponde con la bacteria que contiene el producto, *Salmonella enteritidis* var. Danysz lisina negativa, fagotipo 6a., con las siguientes características microbiológicas: bacilos gram negativo, colonias medianas, bordes regulares, ligeramente elevados y brillantes (24 h – 48 h).

7.3.2 Conteo de salmonellas viables

Pesar 10 g del producto y depositar en un mortero para su posterior maceración. Adicionar 90 mL de solución reguladora de dihidrogenofosfato de potasio (solución de Sorensen pH=7,2- 7,4). Esto representa la dilución 1:10 (10^{-1}). Identificar los tubos de ensayos (18 mm x180 mm) a utilizar para hacer diluciones utilizando números consecutivos hasta la última dilución que se haga. Como la dilución anterior es 1:10, se utiliza para preparar el resto de las diluciones (hasta 10^{-10}). Ver Tabla 6.

Tabla 6 — Diluciones en los tubos de ensayo

TUBO	1	2	3	4
Dilución	1:100	1:1000	1:10000	1:100000
Expresión exponencial	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}

Depositar en cada tubo 9 mL de solución reguladora. Se extrae de la muestra preparada 1 mL en condiciones de esterilidad y se transfiere al primer tubo. Descartar la pipeta. Agitar el tubo anterior tomándose 1 mL y transferirlo al segundo tubo. Descartar la pipeta. Continuar de esta forma hasta obtener la dilución deseada.

De las 4 diluciones finales (10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} y 10^{-10}) se toma 1 mL de cada una de ellas y se depositan en el centro de las placas, se siembran tres réplicas por dilución. En cada placa se reparten de (15–20) mL del medio de cultivo Agar Verde Brillante a temperatura de 45 °C. El medio se homogeniza con el producto depositado en la placa, realizando suaves movimientos rotatorios de vaivén. Las placas solidificadas son invertidas y se incuban de (35–37) °C durante (24–48) h. Pasado el período de incubación se realiza el conteo de colonias y se determinan las UFC/g, se calculará por la siguiente fórmula:

$$C \text{ (UFC/g)} = A \times F$$

donde

C (UFC/g) – Unidades formadoras de colonias por gramo

A - promedio del conteo de unidades formadoras de colonias en la dilución seleccionada

F – Inverso del factor de dilución

Interpretación: El conteo de salmonellas viables debe ser: $\geq 10^{-7}$ UFC/ g. Cuando el producto no cumpla con el parámetro señalado se considera no satisfactorio

7.3.3 Pureza microbiológica

- **Determinación de la pureza microbiológica:** Se tomará una asada de la dilución 10^{-2} de la muestra y se estriará en placas petri (100x20 mm) de Agar Nutriente, Agar Verde Brillante y Mac Conkey N° 3.

- **Determinación de hongos:** Se siembra 1 mL de la dilución 10^{-2} en un tubo que contiene Saboureaud en forma de cuña y se incuban a temperatura ambiente por 14 días, realizándose una lectura a los 7 días y otra a los 14 días del ensayo.

- Determinación de microorganismos patógenos:

Se procede a sembrar 10 mL de la dilución 10^{-1} en 90 mL de Caldo Triptona Soya. Se incuban de (35–37) °C por 24 horas. Posteriormente se pasa con un asa bacteriológica a los medios Agar Vogel Johnson o medio de Agar Manitol Salado y Agar Cetrimide incubándose 48 horas de (35–37) °C. Si las colonias son características en los medios anteriores, se realiza la prueba de coagulasa (*Staphylococcus aureus*) y prueba de oxidasa (*Pseudomona aeruginosa*), se realiza además tinciones de Gram. Se puede utilizar además Caldo Triptona Soya incubando por 24 horas entre (35–37) °C y pasando posteriormente a medio de Agar Sangre y Agar Nutriente. Si se sospecha la presencia de *Staphylococcus* y *Pseudomonas* se realizan las pruebas descritas anteriormente.

Enterobacteriaceae: Sembrar 10 mL de la dilución de 10^{-1} en 90 mL de Caldo Lactosado. Incubar por 24 horas entre (35–37) °C, pasar posteriormente para Agar Mac Conkey N°3 o Agar Verde Brillante, incubar por 24 horas entre (35–37) °C. Realizar las lecturas de las placas, a las colonias características de *Salmonellas enteritidis* var. *Danzysz* lisina negativa fagotito 6a, se les realizarán pruebas de identidad mediante la aglutinación en láminas con suero polivalente de *Salmonellas* y antisuero monovalente grupo D.

Interpretación: El producto debe contener *Salmonella enteritidis* var. *Danzysz* lisina negativa, fagotito 6a. No se admiten presencia microorganismos tales como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa*, hongos, y otros.

Cuando el producto no cumpla con los parámetros señalados se considera no satisfactorio

7.4 Prueba biológica (Bioensayo)**7.4.1 Material biológico**

El ensayo se realizara con ratones albinos (ratones BALB/c o F1), de un solo sexo, sanos, procedentes del CENPALAB, con pesos corporales de (18–20) g. Se mantendrán en condiciones convencionales, con clima y humedad relativa estable [temperatura (22 ± 3)° C; humedad relativa (50 ± 5) %], y un fotoperíodo de 12 h, con agua y comida *ad libitum*.

Se emplearán para esta prueba 10 ratones para los ensayos y un grupo control.

7.4.2 Procedimiento

A los animales se les retirará el alimento la noche anterior y se mantendrán con agua *ad libitum* antes del tratamiento correspondiente.

Para el tratamiento, los animales se ubicarán en cajas de forma individual y se les administrarán, en forma de alimento, 2 g del producto por animal (ratón), durante 24 horas. Concluido este intervalo de tiempo los mismos se agruparán, incorporándole nuevamente el alimento convencional.

Los animales serán observados diariamente durante 21 días, registrando mortalidad y los signos de toxicidad (cambios en el pelo, ojos, membranas mucosas, sistema respiratorio y el comportamiento).

A partir del cuarto día los animales con la sintomatología característica comienzan a morir.

Los animales muertos se irán anotando en el registro correspondiente (Registro A). Al finalizar el período de observación, todos los animales (incluyendo aquellos que mueran durante el ensayo se sacrificarán por presentación de signos clínicos severos) y serán necropsiados. Los órganos y tejidos serán evaluados macroscópicamente de acuerdo a coloración, tamaño y textura. Se observará signos de hemorragia u otros signos visibles.

Se tomarán muestras del corazón, hígado, bazo y riñón; y la sangre procedente de estos órganos se sembrará en medio de enriquecimiento (Caldo Tetrionato o Caldo Selenito). Transcurridas de (18 – 24) h de incubación de (35 – 37) °C se siembra en medio selectivo (Agar Verde Brillante, Agar SS, Agar Mac Conkey N° 3).

A las 24 h se observarán las placas para determinar la presencia de Salmonellas, de ser este resultado positivo verificar mediante antisueros la presencia de las mismas.

Necropsia: Se tomarán aquellos ratones que no están en estado de descomposición. La autopsia se realizará en un lecho de parafina fijándose las cuatro patas por medio de alfileres, se le flameará con un mechero la parte del corte, tratando de no dañar órganos ni intestinos.

7.4.3 Evaluación de los resultados

Al concluir los 21 días de observación se procede a calcular el porcentaje de mortalidad y así concluir la prueba.

Los resultados se expresarán como porcentaje de mortalidad [M_t (%)] y se calcula a través de la fórmula:

$$M_t (\%) = 100 \times (\text{ratones al inicio del ensayo} / \text{ratones muertos al final del ensayo}).$$

No debe haber mortalidad en el grupo control.

Interpretación: Satisfactorio si la mortalidad en 21 días es $\geq 80\%$ de los ratones ensayados. Cuando el producto no cumpla con este parámetro se considera no satisfactorio

8 Marcado, etiquetado, envase y/o embalaje

8.1 Marcado y etiquetado

Las muestras deben estar correctamente identificadas para lo cual deben llevar etiquetas con los siguientes datos:

- Nombre completo del producto: BIORAT®.
- Tipo de formulación: Cebo granulado húmedo, a base de arroz con cáscara.
- Composición: Cultivo de *Salmonella enteritidis* Var. Danysz, Lis (-), fagotipo 6a (1.25 %), sal de hidroxycumarina (0.02 %), ingredientes inertes (98.73 %).
- Condiciones de almacenamiento: El producto mantiene su actividad a temperatura de congelación por un año, 4 a 16°C por 6 meses, sin abrir la bolsa a temperatura no mayor de 30°C, por 21 días.
- Instrucciones y advertencias de uso: Depositar 25–50 g de BIORAT® en cuevas, sendas y lugares protegidos, fuera del alcance de la luz solar, en forma de bloqueo circular, separados de 2–5 metros entre sí, al finalizar la tarde.

- Protección de la salud humana y del ambiente: Inocuo para humanos, animales y plantas. Biodegradable.
- Nombre y dirección del fabricante: Ave. Independencia km 16 ½. Stgo de las Vegas, Boyeros. La Habana. CUBA
- Lote, Fecha de Fabricación y Fecha de vencimiento: 1 año en congelación, 6 meses a temperatura de 4–16°C, sin abrir la bolsa a temperatura no mayor de 30°C, 21 días.
- Debe aparecer el número de registro y el listado de países donde está registrado el BIORAT®.
- Incluir la cláusula de garantía según las regulaciones del país.
- Presentación: Bolsas de polietileno de baja densidad, con capacidad de 50, 250, 1000, 4000 gramos, cada una.

8.2 Envasado

8.2.1 Envase para el BIORAT®

El producto será envasado en bolsas de polietileno de baja densidad de (300 x 450) mm y 100 µm de espesor, conteniendo 4 kg, tubular, pigmentada en blanco, opaca, sellada por un extremo y estériles. Una vez terminado el envase, los bolsas se trasladan a un almacén limpio, seco, fresco, conservándose a temperaturas de (4–16) °C. Estas bolsas, después de selladas, serán envasadas en cajas de cartón. La cantidad de bolsas está en dependencia del tamaño de la caja, y después se sellarán estas cajas con papel precinta, colocándole en cada una su correspondiente etiqueta con el número del lote y fecha de elaboración y deberá cumplir las disposiciones establecidas en la norma NC 01-04.

8.2.1 Descripción de los envases

El plástico será de polietileno de baja densidad. Esta bolsa obedece a las disposiciones que aparecen en la norma NC 91. El producto puede envasarse en bolsas de varias presentaciones: 50 g, 250 g, 1000 g y 4000 g, con cierre hermético.

Envases secundarios: Cubos plásticos de 6 L de capacidad en colores enteros, opacos, las materias primas utilizadas son polietileno de alta y baja densidad, y polipropileno. Los cubos deben estar provistos de una tapa plástica, estos deben cumplir con las especificaciones de calidad según NC 98-12.

Embalajes: Caja de cartón ondulado, solapa regular color blanco o blanco moteado, impresa en tres colores o paquetes retráctiles, con capacidad para dos cubos plásticos de dimensiones: (502 x 250 x 247) mm, para presentación de 4 kg.

9 Transportación, manipulación, almacenamiento y conservación

9.1 Transportación y manipulación

El producto se transportará en cualquier tipo de vehículo, seguro, separado de otros productos que puedan contaminarlo y siempre que el vehículo esté limpio, fresco y protegido de las radiaciones solares.

9.2 Almacenamiento y conservación

Estable bajo condiciones de almacenamiento en cámara fría de 8 a 16 °C durante 6 meses, a temperatura de congelación por un período de un año, a temperatura ambiente(no mayor de 30 °C) y protegido de la luz solar durante 28 días, a temperatura entre 30 y 35 °C y protegido de la luz solar durante 21 días. En ambiente seco.

Bibliografía

- [1] Grupo Empresarial LABIOFAM. Tecnología de producción del Rodenticida BIORAT[®], 2000.
- [2] PNO 4-04-009. Inspección de productos terminados.
- [3] Central Public Health Laboratory. Report on work carried about on *Salmonella enteritidis*. Colindale Avenue, London 1996.
- [4] González Hernández RM. Caracterización de cepas de *Salmonella enteritidis* para el control de roedores [Tesis de Maestría]. La Habana, 2006.
- [5] BMP 001: Norma de Buenas Prácticas de Manufactura. Comité de las Américas de Medicamentos Veterinarios. CAMEVET
- [6] Resolución 8/ 2000.Reglamento General de la Seguridad Biológica para las instalaciones en las que se manipulan agentes biológicos y sus productos, organismos y fragmentos de estos con información genética.
- [7] Farmacopea. USP XXIII. Página: 1633