

Fuente : Diario Oficial de la Federación

Fecha de Publicación: 2 de Junio de 2003

NOM-063-ZOO-1999

NORMA OFICIAL MEXICANA, ESPECIFICACIONES QUE DEBEN CUMPLIR LOS BIOLÓGICOS EMPLEADOS EN LA PREVENCIÓN Y CONTROL DE ENFERMEDADES QUE AFECTAN A LOS ANIMALES DOMÉSTICOS.

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

LILIA ISABEL OCHOA MUÑOZ, Coordinadora General Jurídica de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, con fundamento en los artículos 35 fracción IV de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; 1o., 3o., 4o. fracción III y XI, 12, 13, 16 fracciones I y II, 21 y 22 de la Ley Federal de Sanidad Animal; 38 fracción II, 40, 41, 43, 47 fracción IV de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 15 fracciones XXX y XXXI del Reglamento Interior vigente de esta dependencia, y

CONSIDERANDO

Que es función de la Secretaría de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural, fomentar la producción pecuaria y consecuentemente prevenir, controlar y erradicar las plagas y enfermedades que afectan a la ganadería nacional y que representan un riesgo para la salud animal.

Que es necesario garantizar la producción estandarizada de los biológicos contra las plagas y enfermedades que afectan a la ganadería nacional y que representan un riesgo para la salud pública.

Que los biológicos utilizados para prevenir, controlar y erradicar las plagas y enfermedades que afectan la ganadería nacional deben reunir características de calidad, seguridad, inocuidad y eficacia, dado que la vacunación representa una estrategia vital que permite reducir la incidencia de las enfermedades que merman la riqueza pecuaria del país.

Que las pruebas de constatación con fines de verificación deben concordar con los requisitos establecidos a nivel nacional e internacional para asegurar la calidad, seguridad, inocuidad y eficacia de los biológicos veterinarios empleados en México, de fabricación nacional o extranjera.

Que el 19 de abril de 2000, se publicó en el **Diario Oficial de la Federación** el Proyecto de Norma Oficial Mexicana NOM-063-ZOO-1999, Especificaciones que deben cumplir los biológicos empleados en la prevención y control de enfermedades que afectan a los animales domésticos, publicándose las respuestas a los comentarios recibidos el 16 de abril de 2003 en el mismo órgano informativo.

Que atendiendo lo establecido por el procedimiento legal antes indicado, se modificaron los diversos puntos que resultaron procedentes de las observaciones que se recibieron al Proyecto de Norma antes citado, se expide la presente:

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-063-ZOO-1999, ESPECIFICACIONES QUE DEBEN CUMPLIR LOS BIOLOGICOS EMPLEADOS EN LA PREVENCIÓN Y CONTROL DE ENFERMEDADES QUE AFECTAN A LOS ANIMALES DOMESTICOS

INDICE

1. Objetivo y campo de aplicación
2. Referencias
3. Definiciones y abreviaturas
4. Documentación requerida
5. Consideraciones generales
6. Pruebas de control físico-químico al producto en proceso y terminado
7. Pruebas de control biológico al producto en proceso y terminado
8. Verificación

9. Sanciones
10. Concordancia con normas internacionales
11. Bibliografía
12. Disposiciones transitorias
13. Apéndices normativos

1. Objetivo y campo de aplicación

1.1. La presente Norma es de observancia obligatoria en todo el territorio nacional y tiene por objeto establecer las especificaciones que deben cumplir los biológicos empleados en la prevención y control de enfermedades que afectan a los animales domésticos.

1.2. Esta Norma es aplicable a las personas físicas o morales dedicadas a la fabricación, importación y comercialización de biológicos empleados en la prevención y control de enfermedades que afectan a los animales.

1.3. La vigilancia de esta Norma corresponde a la Secretaría de Agricultura, Ganadería Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación y a los gobiernos de las entidades federativas y del Distrito Federal, en el ámbito de sus respectivas atribuciones y circunscripciones territoriales, de conformidad con los acuerdos de coordinación respectivos.

1.4. La aplicación de las disposiciones contenidas en la presente Norma compete a la Dirección General de Salud Animal, así como a las delegaciones de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, en el ámbito de sus respectivas atribuciones y circunscripciones territoriales.

2. Referencias

Para la correcta aplicación de la presente Norma se deben consultar las siguientes normas oficiales mexicanas.

NOM-003-ZOO-1994, Criterios para la operación de laboratorios de pruebas aprobados en materia zoosanitaria.

NOM-008-SCFI-1993, Sistema general de unidades de medida.

NOM-012-ZOO-1993, Especificaciones para la regulación de productos químicos, farmacéuticos, biológicos y alimenticios para uso en animales o consumo por éstos.

NOM-029-ZOO-1995, Características y especificaciones para las instalaciones y equipo de laboratorios de prueba y/o análisis en materia zoosanitaria.

NOM-035-ZOO-1996, Requisitos mínimos para las vacunas, antígenos y reactivos empleados en la prevención y control de rabia en las especies domésticas.

NOM-036-ZOO-1996, Requisitos mínimos para las vacunas contra la fiebre porcina clásica.

NOM-038-ZOO-1995, Requisitos mínimos para las bacterinas empleadas en la prevención y control de la leptospirosis bovina.

NOM-047-ZOO-1995, Requisitos mínimos para las vacunas, bacterinas y antígenos empleados en la prevención y control de la salmonelosis aviar.

NOM-048-ZOO-1996, Requisitos mínimos para las vacunas contra la enfermedad de Aujeszky.

NOM-049-ZOO-1995, Requisitos mínimos para las bacterinas empleadas en la prevención y control de la pasteurelisis neumónica bovina producida por *Pasteurella multocida* serotipos A y D.

NOM-052-ZOO-1995, Requisitos mínimos para las vacunas empleadas en la prevención y control de la enfermedad de Newcastle.

NOM-053-ZOO-1995, Requisitos mínimos para las vacunas, antígenos y reactivos empleados en la prevención y control de la brucelosis en los animales.

NOM-055-ZOO-1995, Requisitos mínimos para la elaboración de vacunas empleadas en la prevención, control y erradicación de la influenza aviar.

3. Definiciones y abreviaturas

Para efectos de la presente Norma se entiende por:

3.1. Adyuvante: Cualquier sustancia que al adicionarse a un antígeno permita estimular o potencializar la respuesta inmune.

3.2. Antígeno: Producto biológico que aplicado al animal es capaz de estimular una respuesta inmune.

3.3. Biológico: Producto obtenido a partir de organismos vivos, sus componentes o productos de su metabolismo, que se emplean para el diagnóstico, prevención y/o tratamiento de las enfermedades de los animales.

3.4. Biológico con agentes activos: Aquel que inoculado en las especies susceptibles se puede replicar o reproducir dentro del huésped sin causar la enfermedad.

3.5. Biológico con agentes inactivados: Aquel que al inocularse en las especies susceptibles no se replica dentro del huésped y no causa la enfermedad.

3.6. Cepa de desafío: Microorganismo caracterizado en su capacidad para producir una determinada enfermedad y utilizado para confrontar animales vacunados y controles.

3.7. Control de calidad: Es el conjunto de actividades llevadas a cabo en el laboratorio para certificar que las características del producto cumplen con las especificaciones vigentes.

3.8. Constatación: Procedimiento requerido por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, para verificar que un producto cumple con lo establecido en las normas oficiales mexicanas.

3.9. Dosis: Cantidad del biológico recomendada en la etiqueta para ser administrada en el animal.

3.10. Etiqueta: Conjunto de dibujos, figuras y especificaciones adheridas, grabadas o impresas en envases o embalajes.

3.11. Fecha de caducidad: Fecha asignada al lote de un producto, que designa el término del periodo de vigencia.

3.12. Inmunogenicidad: Prueba cuantitativa de control de calidad para asegurar que la semilla maestra o de trabajo estimula una respuesta inmune, cuando se inocula en un animal.

3.13. Inmunógeno: Antígeno que cuando se inocula en un animal induce una respuesta inmune protectora.

3.14. Laboratorio de constatación: Laboratorio autorizado por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Para verificar el cumplimiento de las normas oficiales mexicanas.

3.15. Lote: Cantidad de producto terminado identificado con el mismo número de fabricación y que fue elaborado en un solo proceso integral.

3.16. Número de lote: Cualquier combinación de letras, números o símbolos que sirven para la identificación de un proceso, bajo el que se amparan todos los documentos referentes a su manufactura, control y comercialización.

3.17. Producto liberado: Es aquel que cumplió satisfactoriamente el total de las pruebas de control de calidad y que está listo para su comercialización.

3.18. Producto terminado: El que está envasado, etiquetado y acondicionado.

3.19. Protocolo de control de calidad: Conjunto de técnicas y procedimientos utilizados en las pruebas para la elaboración de los biológicos.

3.20. Protocolo de manufactura: Descripción de los procedimientos para la elaboración de un biológico.

3.21. Registro: Procedimiento administrativo mediante el cual la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, efectúa el control de un biológico.

3.22. Secretaría: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.

3.23. Semilla maestra: Microorganismo identificado, seleccionado, estandarizado y almacenado permanentemente a nivel de pasaje específico, empleado para la producción de un biológico.

3.24. Semilla de trabajo: Microorganismo obtenido a partir de la semilla maestra, identificado, seleccionado, estandarizado y almacenado permanentemente a un nivel de pasaje específico, empleado para la producción de un inmunógeno.

3.25. Titulación: Prueba de control de calidad para determinar que el biológico contiene la cantidad de antígeno establecido en la orden de producción.

3.26. Vacuna, bacterina o toxoide de referencia: Producto biológico estandarizado en sus características inmunogénicas que sirve para compararse con lotes comerciales. Puede ser elaborado por un centro de referencia o por el laboratorio productor, siempre y cuando esté documentada la información correspondiente.

3.27. Vigencia: Periodo en que un producto mantiene las mismas características de calidad con las que fue liberado.

Abreviaturas

DE = Dosis efectivas.

DERA = Dosis efectiva ratón adulto.

DICC = Dosis infectante cultivo celular.

DIEP 50% = Dosis infectante de embrión de pollo 50%.

DFFF 50% = Dosis formadoras de focos fluorescentes 50%.

DLR = Dosis letal ratón.

DLRA = Dosis letal ratón adulto.

HI= Inhibición de la hemoaglutinación.

ml = Mililitro.

log = Logaritmo.

SPF= Libre de patógenos específicos.

UHA: Unidades hemoaglutinantes.

4. Documentación requerida

Para fines de registro, el titular del biológico debe presentar la siguiente información, de acuerdo con el orden que se indica.

4.1. Nombre/razón social, domicilio, teléfono, fax y/o dirección del correo electrónico de la empresa titular del producto.

4.2. Nombre/razón social, domicilio, teléfono, fax y/o dirección de correo electrónico de la empresa elaboradora del producto.

4.3. Nombre comercial del producto.

4.4. Forma farmacéutica.

4.5. Fórmula o garantía de composición.

4.6. Técnica de elaboración.

4.7. Características del envase y presentaciones.

4.8. Uso, especie de destino y dosificación.

4.9. Características y tipo de biológico.

4.10. Agente inmunizante empleado. Descripción de las cepas, serotipos, variedades y otras características que identifican al agente. En el caso de bacterias se debe hacer referencia a la última versión del Manual Bergey.

4.11. Certificado de origen o documentación que avala la procedencia del agente inmunizante. En el caso de que éste proceda de un laboratorio de diagnóstico oficial, privado o de investigación, se deberán presentar los documentos de las pruebas llevadas a cabo en un laboratorio con reconocimiento oficial, mediante técnicas correspondientes de biología molecular que procedan para validar la identificación del agente inmunizante.

4.12. Protocolo de control de calidad y resultados de las pruebas efectuadas al producto, según aplique de acuerdo con lo señalado en la presente Norma.

a) Prueba de esterilidad o pureza.

b) Prueba de seguridad en animales de laboratorio. Especificar especie(s), cepa(s) y origen de los mismos o destinatarios.

c) Prueba de potencia y/o inmunogenicidad.

d) Prueba de seguridad o inocuidad en la especie a la que se destina el biológico.

4.13. Documentos que acrediten los resultados de las pruebas de campo efectuadas con el producto.

4.14. Documentación científica nacional y/o internacional en español o inglés, que respalde el uso del producto.

5. Consideraciones generales

5.1. Para el registro del biológico, por lo menos una muestra aleatoria de un lote debe someterse a pruebas efectuadas en un laboratorio de constatación, de acuerdo con la presente Norma y con sus apéndices normativos.

5.2. En el caso de que las pruebas aplicables al biológico no se describan en esta Norma o en las normas oficiales mexicanas publicadas previamente, la empresa titular del producto debe presentar para llevar a cabo el registro el protocolo de control de calidad de las pruebas a efectuar.

5.3. Las pruebas de control de calidad deben realizarse por el fabricante o por un laboratorio contratado para tal efecto, si así se requiere.

5.4. La semilla maestra empleada en la producción del biológico debe ser pura, segura e inmunogénica y a partir del primero al quinto pase debe elaborarse la semilla de trabajo. Es factible que exista un mayor número de pases cuando el titular del producto demuestre mediante la prueba de inmunogenicidad que éstos no afectan su calidad.

5.5. La semilla maestra debe probarse en la(s) especie(s) a la(s) que se destina, cada vez que ésta sea renovada.

6. Pruebas de control fisicoquímico al producto en proceso y terminado

De acuerdo con el tipo de biológico del que se trate, se debe cumplir con las siguientes especificaciones.

6.1. pH.

La prueba se realiza empleando un instrumento potenciométrico calibrado, con la sensibilidad para reproducir valores de pH de 0.05 unidades. Las mediciones deben efectuarse a determinadas temperaturas constantes. El potenciómetro debe calibrarse usando soluciones certificadas.

Los productos deben mantenerse dentro de un rango de pH que les permita conservar su estabilidad durante su vigencia, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

6.2. Humedad.

La determinación de humedad se hará a los productos liofilizados. El promedio de las determinaciones de las muestras tomadas al azar no debe exceder los límites establecidos por el fabricante para la humedad del producto.

6.3. Inspección física.

Los productos y sus diluyentes deben estar libres de partículas extrañas. Aquellos que presenten uno o más de los siguientes defectos deben ser separados: mal sellado, mal llenado y partículas extrañas como vidrios, pelusa y otros.

6.4. Vacío.

Los biológicos liofilizados sellados al vacío deben probarse al 100% con auxilio del detector de vacío de alta frecuencia, eliminando aquellos que no presenten vacío. Los biológicos liofilizados de cada lote sellados con gases inertes quedan exentos de esta prueba, lo cual debe especificarse en el protocolo de control de calidad.

6.5. Concentración de inactivante.

En los casos que proceda, se indicará los límites máximos y/o mínimos en los apéndices normativos de la presente Norma.

6.6. Concentración del preservante. Si en la elaboración del producto se utiliza un preservante, esto deberá ser especificado en el proceso de producción del producto.

7. Pruebas de control biológico al producto en proceso y terminado

De acuerdo con el tipo de biológico del que se trate, se debe cumplir con las siguientes especificaciones.

7.1. Esterilidad.

Prueba que se aplica a los biológicos con agentes inactivados y es empleada para determinar que el producto está libre de cualquier bacteria viva aerobia y/o anaerobia, hongos y levaduras.

7.2. Pureza.

Prueba que se aplica a los biológicos con agentes activos, mediante la que se determina que en los productos terminados únicamente se encuentran los microorganismos indicados en la etiqueta y están exentos de contaminantes.

7.3. Seguridad o inocuidad.

Esta prueba es para demostrar que el biológico probado no produce enfermedad o reacciones adversas.

Para efectos de control de calidad, cada lote del biológico debe ser probado en la especie a la cual se destina o la correspondiente en animales de laboratorio susceptibles. Para efectos de registro, el biológico debe ser probado con un mínimo de dos dosis en la especie a la cual se destina.

7.4. Prueba de titulación.

Prueba aplicable a los biológicos con agentes virales activos o previo a la inactivación de los productos biológicos con agentes virales inactivados, para asegurar que su contenido viral es igual o mayor al indicado en el protocolo de manufactura y suficiente para inducir una protección en la especie de destino.

7.5. Cuenta viable.

Prueba aplicable a biológicos bacterianos viables para asegurar que el contenido de bacterias sea igual o mayor al indicado en el protocolo de manufactura.

7.6. Prueba de disociación.

Se emplea para determinar si las bacterias se encuentran en fase lisa o rugosa. El porcentaje de disociación deberá indicarse en el protocolo de manufactura.

7.7. Prueba de inactivación.

Se emplea para determinar que los microorganismos o subproductos utilizados en el biológico no presentan actividad o toxicidad residual.

7.7.1. Prueba de inactivación de un biológico de origen bacteriano.

Cuando se trate de un biológico inactivado, se debe sembrar por lo menos en dos diferentes medios de cultivo enriquecidos y específicos e incubar a la temperatura y periodo óptimo de crecimiento, conforme a los apéndices normativos correspondientes. Para que la prueba se considere satisfactoria, no debe observarse crecimiento en el total de los medios utilizados.

Cuando se observe crecimiento característico en sólo uno de los medios, se debe repetir la prueba, empleando una muestra nueva. En caso de observar crecimiento, el producto debe ser rechazado.

7.7.2. Prueba de inactivación de un biológico de origen viral.

7.7.2.1. La prueba "in vivo" se debe llevar a cabo en animales o embriones susceptibles al virus empleado en la elaboración del producto. Para que la prueba sea satisfactoria, éstos deben permanecer sanos, sin presentar signos atribuibles al biológico, durante el periodo de prueba.

7.7.2.2. La prueba "in vitro" se realiza en cultivos celulares, empleando líneas o cultivos primarios susceptibles y específicos al virus e incubando conforme a las condiciones físico-químicas que favorezcan la multiplicación viral.

7.8. Prueba para determinación de toxina, antitoxina y toxoide.

Se realiza de acuerdo con el protocolo de control de calidad del fabricante o titular del producto y debe cumplir con lo indicado en los apéndices normativos correspondientes.

7.9. Prueba de identidad.

Las pruebas deben realizarse "in vitro y/o in vivo", para demostrar que los antígenos descritos en la etiqueta son los que se encuentran en el biológico. Dentro de estas pruebas se incluyen la identificación bioquímica, tipificación, resistencia a antimicrobianos y otras aplicables al biológico.

7.10. Prueba de inmunogenicidad.

Esta prueba se realiza en la semilla maestra del biológico en prueba para corroborar su efectividad, la cual se debe efectuar en animales susceptibles, de edad y peso establecidos, libres de anticuerpos específicos, los cuales deben inocularse por la vía recomendada en el protocolo de manufactura.

7.11. Prueba de potencia.

Se emplea para medir la protección que confiere un biológico al ser aplicado en animales susceptibles, los que se inoculan con la dosis y/o dilución correspondiente y por la vía recomendada (ver apéndices normativos).

Después de un tiempo determinado, los animales vacunados y controles son expuestos a una cepa de desafío previamente titulada y ajustada a la dosis requerida.

Esta prueba puede realizarse en animales de laboratorio, cuando se demuestre que es compatible con la especie de destino.

Para considerar esta prueba como satisfactoria, se debe proteger como mínimo al 80% de los animales vacunados y afectar como mínimo al 80% de los animales testigo (ver apéndices normativos).

En los productos polivalentes, se debe hacer una prueba de potencia para cada uno de los antígenos que lo componen.

Prueba de estabilidad. Se realiza con el fin de determinar la vigencia del producto biológico. Su demostración puede efectuarse mediante información nacional o internacional que corresponda al tipo de agente empleado.

Para efectos de comprobación, el fabricante y/o titular del producto debe asegurar el grado de protección y los demás requisitos señalados para el producto durante el periodo de vigencia que ofrezca por cada lote y hasta por tres meses posteriores a la caducidad indicada en la etiqueta.

8. Verificación

Son motivos de verificación:

- 1.- La totalidad de la documentación señalada en el punto número cuatro de esta Norma.
- 2.- El documento comprobatorio del registro del producto otorgado por la Secretaría.
- 3.- Los documentos de producción y de control de calidad de los lotes producidos, importados y/o comercializados del biológico en cuestión.

9. Sanciones

El incumplimiento de las disposiciones contenidas en esta Norma se sancionará conforme a lo establecido en la Ley Federal de Sanidad Animal y la Ley Federal sobre Metrología y Normalización.

10. Concordancia con normas internacionales

Esta Norma Oficial Mexicana no es equivalente con alguna norma internacional al momento de su elaboración.

11. Bibliografía

Bergey et al 1974 Bergey's Manual on determinative bacteriology, 8th edition.

OIE Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. 3rd edition, 2000. Published by the Office Internationale des Epizooties, Paris, France.

12. Disposiciones transitorias

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

13. Apéndices normativos

De acuerdo con el tipo de producto biológico de que se trate, se deberá cumplir con los siguientes apéndices:

"APENDICE A" (NORMATIVO)

13.1. Vacuna contra la enfermedad de la bronquitis infecciosa.

13.1.1. Tipo de biológico. Virus activo modificado o inactivado elaborado en embrión de pollo o cultivo celular.

13.1.2. Vacuna con virus activo.

13.1.2.1. Prueba de pureza. Esta prueba se realiza de manera obligatoria en la semilla maestra, en la semilla de trabajo y en cada lote comercial. Deben realizarse las pruebas necesarias para demostrar que el producto está libre de bacterias y hongos patógenos, micoplasmas y virus contaminantes tales como Newcastle, viruela aviar, laringotraqueitis aviar, leucosis, influenza aviar, síndrome de la baja de postura, infección de la bolsa de Fabricio, adenovirus del grupo I y anemia infecciosa de las aves; lo que se hará a través de la neutralización previa del virus de la bronquitis infecciosa aviar.

13.1.2.2. Prueba de titulación.

Se reconstituye el biológico con el diluyente que lo acompaña a razón de 30 ml por cada 1,000 dosis, tomando esta dilución como 10E0. Posteriormente, se realizan diluciones logarítmicas decimales en medio fosfatado con antibióticos.

Por cada dilución, se inoculan un mínimo de cinco embriones SPF de nueve a once días de edad, cada uno con 0.1 ml, siguiendo la técnica de inoculación en la cavidad alantoidea. Los que mueren durante las primeras 24 horas post-inoculación se descartan y deben permanecer vivos por lo menos cuatro de los cinco embriones inoculados por cada dilución. La lectura se efectúa de seis a siete días post-inoculación examinando los embriones y tomando como positivos aquellos que muestren lesiones típicas producidas por el virus de la bronquitis infecciosa aviar en el embrión de pollo.

Para la titulación, los resultados se calculan por el método de Reed & Muench y/o Spermann Karber, expresados como DIEP 50%/ml.

Un título menor de 10E4 DIEP 50%/ml se considera insatisfactorio.

Para efectos de comprobación, el fabricante y/o titular del producto debe asegurar el grado de protección y un título mínimo de 10E4 DIEP 50%/ml durante el periodo de vigencia que ofrezca por cada lote del producto, el cual no será mayor a 18 meses a partir de la fecha de elaboración y hasta tres meses más posteriores a la caducidad indicada en la etiqueta del mismo. En los casos en los que el producto cuente con más de 18 meses de vigencia, el titular del mismo debe demostrar mediante titulaciones o pruebas de potencia que el producto mantiene un título mayor a 10E4 DIEP 50%/ml.

13.1.2.3. Prueba de identidad.

La prueba de virus suero neutralización mediante la utilización del método de virus constante-suero decreciente con antisuero específico y la técnica de inmunodifusión son útiles para los propósitos de identificación. La prueba de inmunofluorescencia directa aplicada sobre cultivo de órganos traqueales también se utiliza para la rápida detección del virus de bronquitis infecciosa aviar. Esta prueba se realiza al granel del virus cosechado, en forma previa a la inactivación del mismo.

13.1.2.4. Prueba de inocuidad.

Se deben utilizar 10 aves sanas, susceptibles, libres de anticuerpos contra el virus de bronquitis infecciosa; el criterio es que en una primera prueba, como máximo podrá haber 2 aves afectadas, y en una segunda prueba un acumulado de 5 aves afectadas.

13.1.2.5. Prueba de potencia.

La prueba se llevará a cabo en unidades de aislamiento, en un grupo de 20 pollos susceptibles de diez días de edad como máximo. Previo a la vacunación se aíslan diez aves y el resto se vacunan de acuerdo con las indicaciones del fabricante.

Después de 21 a 28 días post-vacunación todas las aves serán desafiadas por vía ocular, con una cepa estandarizada de un virus patógeno de la bronquitis aviar.

El virus de desafío debe ser homólogo a la vacuna que se prueba. La dosis de desafío se considera adecuada en 10E3.5 DIE 50% y su efecto se evalúa también con los signos del grupo control.

A los siete días post-inoculación se toman muestras de exudado traqueal de todas las aves. Cada una de las muestras se obtiene por separado y se coloca en un tubo con tres mililitros de caldo triptosa fosfatado con antibióticos.

Con cada muestra se inoculan cinco embriones SPF de nueve a once días de edad por la vía de la cavidad alantoidea con 0.2 ml del inóculo, los cuales se observan diariamente durante seis a siete días. Para que la prueba sea válida deben permanecer vivos cuatro de los cinco embriones durante los primeros tres días post-inoculación.

La lectura se realiza entre los seis y siete días post-inoculación mediante el examen de los embriones y tomando como positivos aquellos que muestran lesiones típicas producidas por el virus de la bronquitis infecciosa aviar en el embrión de pollo. Durante la lectura pueden descartarse de la misma aquellos embriones que hayan muerto entre el cuarto y el séptimo día, siempre y cuando no presenten lesiones típicas de la bronquitis infecciosa aviar y no excedan de 20% del total de embriones observados.

Para que la prueba se considere satisfactoria, no debe recuperarse el virus de desafío de por lo menos el 80% de las muestras de exudados traqueales de las aves vacunadas y sí debe recuperarse de por lo menos el 80% de las muestras de las aves testigos.

Esta prueba se realiza de manera obligatoria en la semilla maestra y en la semilla de trabajo. Para el caso de los lotes comerciales se podrán utilizar otro tipo de pruebas como la virus-seroneutralización en embrión de pollo libre de patógenos específicos, o la prueba de micro-virus-seroneutralización, con una periodicidad mínima de seis meses.

Para efectos de comprobación, el fabricante y/o titular del producto debe asegurar el grado de protección y un título mínimo de 10E4 DIEP 50%/ml durante el periodo de vigencia que ofrezca por cada lote, el cual no será mayor de 18 meses a partir de la fecha de elaboración y hasta tres meses más posteriores a la caducidad indicada en la etiqueta del mismo.

13.1.3. Vacuna con virus inactivado.

13.1.3.1. Prueba de identidad.

La prueba de virus suero neutralización mediante la utilización del método de virus constante-suero decreciente con antisuero específico y la técnica de inmunodifusión son útiles para los propósitos de identificación. La prueba de inmunofluorescencia directa aplicada sobre cultivo de órganos traqueales también se utiliza para la rápida detección del virus de bronquitis infecciosa aviar. Esta prueba se realiza al granel del virus cosechado, en forma previa a la inactivación del mismo.

13.1.3.2. Prueba de inactivación.

La prueba consiste en realizar dos pases en cultivos celulares o en embrión de pollo, en la que se utiliza como inóculo 0.2 ml del granel cosechado e inactivado como inóculo y en la que se efectúan diez réplicas por cada pase.

No deben presentarse lesiones producidas por el virus de la bronquitis infecciosa aviar en ninguno de los medios utilizados, después de siete días de infección post-inoculación y en ninguno de los dos pases.

13.1.3.3. Prueba de inocuidad.

Se deben utilizar 10 aves sanas, susceptibles, libres de anticuerpos contra el virus de bronquitis infecciosa, de la edad mínima indicada en la etiqueta del producto para aplicar la vacunación; a cada uno de los cuales se les administra por la vía recomendada por el elaborador, dos dosis de la vacuna y se observarán diariamente durante 21 días. La prueba se considera satisfactoria si durante el periodo de observación ninguna de las aves muestran signos indeseables atribuibles a la vacuna y ningún pollo muere por causas atribuibles al producto.

13.1.3.4. Prueba de potencia.

Se inoculan 20 pollos susceptibles de la misma parvada, de 2 a 6 semanas de edad: 10 pollos constituirán el lote de prueba y los otros 10 el lote testigo. La inoculación de la vacuna se hará por la vía y la dosis recomendada por el laboratorio productor. El lote testigo deberá aislarse.

Previo a la vacunación todos los animales deberán sangrarse para obtener una muestra de suero de cada uno.

Todos los animales se observarán diariamente durante cuatro semanas post-vacunación, al término de ese periodo, todos los animales de ambos grupos deberán sangrarse para obtener una muestra de suero. Después de este periodo se deberá tener una diferencia mínima de 2 logaritmos base dos entre los títulos promedio de HI del grupo experimental y control.

Para el desarrollo de la prueba de HI, se utilizarán 4 UHI usando el antígeno homólogo.

"APENDICE B" (NORMATIVO)

13.2. Vacuna contra el moquillo canino, virus activo modificado.

13.2.1. Tipo de biológico. Virus activo modificado de moquillo canino, avirulento para el hurón.

13.2.2. Prueba de seguridad o inocuidad.

La vacuna se reconstituye con el diluyente que la acompaña. Con fines de registro y constatación, por cada lote se utilizan dos perros jóvenes susceptibles sin anticuerpos contra el moquillo canino, los cuales se inoculan con el equivalente a diez dosis por la vía recomendada por el fabricante, y se observan durante 18 a 21 días.

Como prueba alterna se puede utilizar la prueba en ratones que se describe a continuación: Por cada lote comercial se utilizan 16 ratones de 21 días de edad. Ocho de ellos se inoculan por vía intracerebral con 0.03 ml y los otros ocho por la vía intraperitoneal con 0.05 ml y se observan diariamente durante siete días.

Para que la prueba se considere satisfactoria, ninguno de los perros y ratones deben presentar signos o lesiones de enfermedad ni lesiones indeseables atribuibles al producto. Si en alguno de los animales existen reacciones desfavorables no atribuibles al producto, la prueba se declara inconclusa y debe repetirse.

13.2.3. Prueba de titulación.

Se puede realizar en cultivos celulares o embriones de pollo SPF. La vacuna se reconstituye con el diluyente que la acompaña, lo que se considera como la dilución 10E0.

Si se trata de una vacuna combinada, se reconstituye el producto con agua destilada o caldo de triptosa fosfatado y se neutralizan con antisueros específicos las demás fracciones correspondientes. En el cálculo final del título de la vacuna se debe considerar el volumen de antisero agregado para la neutralización de las fracciones.

Se realizan diluciones logarítmicas decimales con medio de mantenimiento y se inoculan cuando las monocapas de células tienen un mínimo de confluencia de 70%. Por cada dilución se inoculan cinco tubos o cámaras con portaobjetos, cada uno con 0.2 ml de la dilución correspondiente. Se incuban a 37°C durante siete días.

Al finalizar el periodo de incubación, las laminillas se tiñen mediante la técnica de inmunofluorescencia, utilizando un conjugado previamente titulado, preparado con anticuerpos específicos contra el moquillo canino. La presencia de fluorescencia específica para el virus de moquillo constituye una laminilla positiva. Los resultados deben calcularse por el método de Reed and Muench o Spermann Karber y se expresan como DFFF 50% por dosis.

La vacuna debe tener un título de 10E3 DFFF 50% por dosis.

Cuando se utilicen embriones, éstos deben ser de siete días de edad. Las diluciones decimales se realizan en caldo triptosa fosfatado. Por cada dilución se inoculan cinco embriones, cada uno con 0.1 ml por la vía de la membrana corioalantoidea en falsa cámara y se incuban de 35 a -37°C durante seis días. Se considera que el embrión es positivo cuando la membrana corioalantoidea muestra por lo menos una placa característica producida por el virus de moquillo canino. Los resultados deben calcularse por el método de Reed & Muench o de Spermann Karber.

La vacuna probada debe tener un título mínimo de 10E2.5 DIEP 50% por dosis.

13.2.4. Prueba de potencia para fines de constatación y registro.

Se utilizan 15 perros susceptibles; diez deben constituir el lote de prueba y cinco el lote testigo. La susceptibilidad debe determinarse previamente a la prueba, para lo cual todos los animales se sangran a efecto de obtener la muestra de suero individual que debe someterse a una prueba de sueroneutralización. Para esta última se debe utilizar virus fijo o virus constante; la cantidad de virus constante debe ser de 50 a 300 DICT 50%/ml, así como diluciones dobles del suero. Los animales se consideran susceptibles cuando no se observa neutralización viral en la dilución 1:2.

La dosis vacunal elegida como la media es la obtenida a través de las titulaciones previas y se comprueba por lo menos con cinco titulaciones en el momento de la prueba.

Los animales del lote vacunado se inoculan con la dosis recomendada por el fabricante; los testigos sin vacunar se mantienen separados y todos se observan diariamente. Después de 21 días de la vacunación, todos los animales se desafían por vía intracerebral con el virus de moquillo canino cepa Snyder Hill y se observan diariamente durante 21 días.

Para que la prueba se considere satisfactoria, por lo menos cuatro de los cinco testigos deben morir y si uno sobrevive, éste debe mostrar signos de la enfermedad y aislarse el virus a partir de él. Durante el periodo de observación, por lo menos ocho de los diez perros vacunados deben permanecer sanos sin signos de la enfermedad.

"APENDICE C" (NORMATIVO)

13.3. Vacuna contra la gastroenteritis transmisible del cerdo.

13.3.1. Tipo de biológico. Virus activo modificado de la gastroenteritis transmisible del cerdo, en el que se utiliza una línea celular estable de riñón de cerdo.

13.3.2. Prueba de seguridad o inocuidad.

Para efectos de registro o constatación, se utilizan cinco lechones de cinco a siete días de edad, separados de la madre con 48 horas de anticipación, los cuales se inoculan por vía oral con diez dosis de la vacuna reconstituida.

Para efectuar el control de calidad de cada lote, se utilizan 16 ratones albinos de la misma cepa, con un peso aproximado de 16 a 20 gramos. Estos últimos se dividen en dos grupos de ocho ratones cada uno; el primer grupo se inocula por vía intraperitoneal con 0.5 ml de la vacuna reconstituida y el segundo con 0.03 ml por vía intracerebral.

Se observa diariamente a los animales durante siete días. La prueba se considera satisfactoria si permanecen sanos sin signos y lesiones atribuibles al producto. Resultados contrarios se consideran insatisfactorios.

13.3.3. Prueba de titulación.

Se utilizan cultivos celulares sembrados en microplacas. La vacuna se reconstituye con el diluyente que la acompaña, considerándose como la dilución 10E3. Posteriormente, se realizan diluciones logarítmicas decimales; por cada dilución se inoculan cinco pozos. La lectura se realiza al examinar cada uno de los pozos y se consideran positivos cuando se observa efecto citopatogénico. El título de la vacuna debe calcularse por el método de Reed and Muench, expresado como DICC 50%. Un título menor de 10E6 DICC 50% por ml se considera insatisfactorio.

13.3.4. Prueba de potencia.

Para el registro del producto, la prueba de potencia debe realizarse en cerdos de acuerdo con el protocolo de manufactura del fabricante.

Para efectos de comprobación el fabricante y/o titular del producto debe asegurar por lo menos un 70% de protección y los demás requisitos señalados con anterioridad.

"APENDICE D" (NORMATIVO)

13.4. Bacterina contra la erisipela porcina.

13.4.1. Tipo de biológico. Suspensión pura atóxica, elaborada a partir de cultivos puros de cepas inmunogénicas y estables de *Erysipelothrix rhusiopathie* e inactivada por cualquier agente fisicoquímico adecuado. Puede contener un adyuvante que permita estimular una mejor respuesta inmunológica.

13.4.2. Prueba de seguridad o inocuidad.

Se utilizan dos cuyes sanos susceptibles, de 300 a 360 gramos de peso. En las bacterinas que se utilizan 5 ml por dosis para los cerdos, a cada uno de los cuyes se les inocula por vía subcutánea o intramuscular 2 ml del producto y se observan por siete días. En el caso de las bacterinas concentradas en las que se recomienda la aplicación de 2 ml por dosis para cerdos, se aplica la proporción correspondiente a los cuyes. La prueba se considera satisfactoria cuando los animales permanecen sanos sin signos indeseables atribuibles al producto durante el periodo de observación.

13.4.3. Prueba de potencia.

Se puede realizar en ratones cuando se demuestra que existe correlación con la prueba en cerdos. Si se utilizan ratones, éstos deben ser de cuatro semanas de edad, sanos susceptibles de 16 a 22 gramos de peso.

Para la bacterina de prueba y la de referencia se debe seguir el mismo procedimiento.

Con cada una de las bacterinas de referencia y en prueba se realizan diluciones con solución salina fisiológica 1:0, 1:30, 1:90, 1:270; de la bacterina sin diluir se aplica 0.1 ml a cada ratón y de cada una de las diluciones se aplican 0.5 ml. Los ratones se observan diariamente durante 14 a 21 días y luego se desafían por vía subcutánea con 100 DLR 50% de un cultivo de *Erysipelothrix rhusiopathie*, se observan diariamente durante diez días postdesafío y se lleva un registro de los sobrevivientes.

Los resultados son calculados y expresados como título de la bacterina en DE 50%. Debe utilizarse una bacterina previamente probada, procedente de un lote diferente, elaborada por la misma empresa o por otra, siempre y cuando se cuente con los valores de calidad de la misma para utilizarla como referencia.

Para que la prueba sea válida, en el caso de la bacterina de referencia, la dilución más alta debe proteger al menos el 50% de los ratones vacunados, mientras que la dilución más baja, a más de 50% de los ratones inoculados. Para que la prueba se considere satisfactoria el porcentaje de protección debe ser mayor a 50% en la dilución 1:90 en la bacterina de prueba. Resultados diferentes se consideran insatisfactorios.

Para efectos de constatación y registro del biológico, se deben utilizar ocho cerdos sanos susceptibles, los cuales se dividen en dos grupos iguales para conformar el grupo testigo y el de prueba.

Los animales del lote de prueba se vacunan con una dosis de la bacterina por la vía recomendada por el fabricante. Entre los 14 a 21 días después, ambos grupos se desafían por vía intramuscular con cultivos virulentos de una cepa previamente estandarizada de *Erysipelothrix rhusiopathie*, se observan diariamente por siete días y se registra la temperatura corporal, signos clínicos, morbilidad y mortalidad.

La prueba se considera satisfactoria cuando por lo menos tres de los cuatro cerdos vacunados permanecen sanos, sin signos de enfermedad y la temperatura corporal no excede de 40.3°C por más de un día y cuando por lo menos el 75% de los cerdos testigos mueren y/o enferman, con alza térmica de 41.8°C o más durante por lo menos dos horas, se observan signos y lesiones de erisipela porcina y/o mortalidad.

Para saber si se infectaron los cerdos vacunados o controles que no presenten la elevación de temperatura mencionada, deben sacrificarse e intentar el aislamiento de la *Erisipelothrix rhusiopathie* a partir de su sangre, bazo u otros tejidos. El animal se considera infectado cuando se lleva a cabo el aislamiento del agente.

"APENDICE E" (NORMATIVO)

13.5. Vacuna contra la parvovirus porcina, virus inactivado.

13.5.1. Tipo de biológico. Parvovirus porcino inactivado por agentes físicos y/o químicos. Puede contener un adyuvante.

13.5.2. Prueba de seguridad o inocuidad.

Se utilizan dos cerdos jóvenes susceptibles, los que se inoculan con el doble de la dosis por la vía recomendada por el fabricante y se observan diariamente durante 21 días post-inoculación.

De manera opcional se pueden utilizar dos cuyes sanos susceptibles, del mismo origen. A cada uno se les aplica por vía subcutánea 2 ml de la vacuna y se mantienen en observación durante siete días posinoculación, tiempo en el que deben permanecer sanos y sin signos o lesiones atribuibles al producto. Resultados diferentes son considerados insatisfactorios.

13.5.3. Prueba de inmunogenicidad.

Se utilizan un mínimo de 15 cuyes de 300 a 400 gramos de peso, libres de anticuerpos contra parvovirus porcino, los cuales se dividen en dos lotes, uno con diez que se vacunan y el otro con cinco como testigos.

A los diez cuyes se les aplica por vía subcutánea en la parte posterior del cuello una quinta parte de la dosis descrita para cerdo (0.4 ml). Dos semanas después se les aplica una segunda dosis de 0.4 ml por la misma vía de administración. A los siete y 14 días después de la segunda vacunación se toma una muestra de sangre de todos los cuyes. El suero obtenido se prueba mediante la técnica de inhibición de la hemoaglutinación.

La prueba se considera satisfactoria cuando al menos el 80% de los vacunados tienen un título igual o mayor de 1:320 y los testigos un título promedio de 1:8 o menor.

Para el registro de un producto, la prueba debe realizarse en cerdas gestantes libres de anticuerpos contra parvovirus porcino.

"APENDICE F" (NORMATIVO)

13.6. Bacterina contra el *Clostridium chauvoei*.

13.6.1. Tipo de biológico. Suspensión estéril destoxificada de células, elaborada a partir de cultivos puros de *Clostridium chauvoei* e inactivada por un agente químico específico, adicionada con un adyuvante que potencialice la respuesta inmunológica.

13.6.2. Prueba de potencia.

Se utilizan 15 cobayos del mismo origen con un peso de 300 a 500 gramos; cinco se utilizan como testigos y diez se vacunan con un ml equivalente a una quinta parte o la mitad de la dosis para bovino cuando ésta sea de dos ml, por vía subcutánea en el cuello atrás de la oreja; después de 15 a 20 días, se procede a aplicar una segunda dosis. Después de 14 días de la última vacunación, todos los animales se desafían con una dosis mortal mínima cobayo (DMM) de una cepa de la especie de *Clostridium chauvoei*, previamente titulada y estandarizada, por vía intramuscular y se observan diariamente durante tres días.

La prueba se considera satisfactoria cuando por lo menos el 80% de los testigos mueren y el 80% de los vacunados sobreviven.

"APENDICE G" (NORMATIVO)**13.7. Bacterina contra el *Clostridium sordelli*.**

13.7.1. Tipo de biológico. Suspensión estéril destoxificada de células, elaborada a partir de cultivos puros de *Clostridium sordelli* e inactivada por un agente químico específico, adicionada con un adyuvante que potencialice la respuesta inmunológica.

13.7.2. Prueba de potencia.

Esta se realiza e interpreta como se describe en la bacterina de *Clostridium chauvoei*.

"APENDICE H" (NORMATIVO)**13.8. Bacterina contra el *Clostridium novyi* (diferentes tipos).**

13.8.1. Tipo de biológico. Suspensión estéril destoxificada de células, elaborada a partir de cultivos puros de *Clostridium novyi* e inactivada por un agente químico específico, adicionada con un adyuvante que potencialice la respuesta inmunológica.

13.8.2. Prueba de potencia.

Esta se realiza e interpreta como se describe en la bacterina de *Clostridium chauvoei*.

"APENDICE J" (NORMATIVO)**13.9. Bacterina contra el *Clostridium perfringens* tipos C y D.**

13.9.1. Tipo de biológico. Suspensión estéril destoxificada de células, elaborada a partir de cultivos puros de *Clostridium perfringens* tipos C y D inactivada por un agente químico específico, adicionada con un adyuvante que potencialice la respuesta inmunológica.

13.9.2. Prueba de potencia.

En esta prueba se requiere de la producción de suero contra la toxina de *Clostridium perfringens* tipo D en conejos, así como la realización de pruebas de neutralización en ratones.

13.9.2.1. Producción de suero antitóxico.

Se vacuna un mínimo de ocho conejos con 1 ml de bacterina toxoide contra el *Clostridium perfringens* tipo D, por vía subcutánea en la parte posterior del cuello atrás de la oreja. Se aplica una segunda dosis a los catorce días por la misma vía. 21 días después de la segunda vacunación, se sangra a los conejos por punción cardiaca, se separa el suero, se mezcla el de los ocho animales y se congela a menos 70°C hasta el momento de su uso.

13.9.2.2. Neutralización en ratones.

Se realizan diluciones dobles del suero antitóxico con solución salina amortiguada de fosfatos estéril de acuerdo con las indicaciones del siguiente cuadro:

Tubo No.	1	2	3	4	5	6	7	8
a) SAF/ml	-	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	-	-
b) Antitoxina/ml	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	-	1.5	-
c) toxina/ml	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	-	-	1.5
d) Incubación de los tubos a 37°C durante 60 minutos.								
Dilución final antitoxina.	1: 2	1: 4	1: 8	1:16	1:32			

Se descongela la antitoxina (mezcla de ocho sueros) y se efectúan las diluciones a 4°C:

a) En los tubos 2, 3, 4, 5 y 6 se adicionan 1.5 ml de SAF. El tubo 6 se usa como testigo de la SAF.

- b) Adicionar a los tubos 1 y 2, 1.5 ml de antitoxina. Agitar el contenido del tubo 2 y transferir 1.5 ml de éste al tubo 3, repetir la operación en los tubos 4 y 5, en este último eliminar 1.5 ml. El tubo 7 se usa como testigo de la antitoxina.
- c) Adicionar a los tubos 1, 2, 3, 4, 5 y 8, 1.5 ml de toxina previamente titulada y estandarizada a 5.0 DLRA 50%. El tubo 8 se usa como testigo de la toxina.
- d) Se incuban los 8 tubos a 37°C durante 60 minutos y después se colocan a 4°C.
- e) Por cada dilución se inoculan grupos de por lo menos cinco ratones adultos (16 a 21 g), con 0.2 ml por vía endovenosa en la vena caudal.
- f) A las 24 horas se toma la lectura, se anota la relación de los animales muertos contra el total de inoculados en cada dilución y se calcula la dosis efectiva ratón adulto 50% (DERA 50%) por el método de Spermann-Kärber.

13.9.2.3. Resultados e interpretación.

La Bacterina-toxoide debe presentar un título mínimo de antitoxina de cuando menos cinco dosis efectivas ratón adulto 50% (5.0 DERA 50%) para que sea aprobada satisfactoriamente. Para que el ensayo sea válido los controles de la toxina (tubo 8) deben presentar entre 80% y 100% de mortalidad y los testigos de SAF (tubo 6) y antitoxina (tubo 7) 100% de viabilidad.

Ciudad de México, Distrito Federal, a doce de mayo de dos mil tres.- La Coordinadora General Jurídica de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, **Lilia Isabel Ochoa Muñoz**.- Rúbrica.