

06-26-96 NORMA Oficial Mexicana NOM-035-ZOO-1996, Requisitos mínimos para las vacunas, antígenos y reactivos empleados en la prevención y control de la rabia en las especies domésticas.

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

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-035-ZOO-1996, REQUISITOS MINIMOS PARA LAS VACUNAS, ANTIGENOS Y REACTIVOS EMPLEADOS EN LA PREVENCION Y CONTROL DE LA RABIA EN LAS ESPECIES DOMESTICAS.

ROBERTO ZAVALA ECHAVARRIA, Director General Jurídico de la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, con fundamento en los artículos 35 fracción IV de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; 4o. fracciones I, III, V y XI, 12, 16, 21, 28, 29, 44 y 47 de la Ley Federal de Sanidad Animal; 1o., 38 fracción II, 40 fracciones III y XI, 41 y 47 fracción IV de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 12 fracciones XXIX y XXX del Reglamento Interior 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 como la rabia afectan a la ganadería nacional, tanto en su nivel de producción como en la calidad de sus productos.

Que la rabia es una enfermedad infecto-contagiosa, aguda y mortal que ataca el sistema nervioso central, provocada por un virus del género *Lyssavirus* y de la familia *Rhabdoviridae*, transmitida al hombre o animales por la saliva de algún animal enfermo o por material contaminado.

Que esta enfermedad se controla y previene mediante acciones conjuntas de los sectores público, social y privado ofreciendo información educativa al respecto en función de una vigilancia epidemiológica eficaz, la vacunación y el control de la población canina, el control de la población murciélago hematófago (vampiro) y la vacunación de animales de otras especies domésticas susceptibles particularmente las de interés económico en riesgo, a fin de reducir las considerables pérdidas económicas en la ganadería del país.

Que es necesario garantizar la producción de vacunas de la más alta calidad contra la rabia, para inmunizar a las especies domésticas contra esta enfermedad.

Que es necesario establecer la Norma Oficial Mexicana que regule los requisitos mínimos de las vacunas, antígenos y reactivos empleados en prevención y control de la rabia en las especies domésticas.

Que para alcanzar los objetivos señalados en los párrafos anteriores, con fecha 16 de octubre de 1995, se publicó en el Diario Oficial de la Federación el Proyecto de Norma Oficial Mexicana NOM-039-ZOO-1995, "Requisitos mínimos para las vacunas, antígenos y reactivos empleados en la prevención y control de la rabia en las especies domésticas", iniciando con ello el trámite a que se refieren los artículos 45, 46 y 47 de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, por lo que con fecha 15 de abril de 1996, se publicaron las respuestas a los comentarios recibidos en relación a dicho Proyecto.

Que en virtud del resultado del procedimiento legal antes indicado, se modificó la clave de la Norma, así como en aquellos puntos que resultaron procedentes y por lo cual, se expide la presente Norma Oficial Mexicana, para quedar como NOM-035-ZOO-1996, REQUISITOS MINIMOS PARA LAS VACUNAS, ANTIGENOS Y REACTIVOS EMPLEADOS EN LA PREVENCION Y CONTROL DE LA RABIA EN LAS ESPECIES DOMESTICAS.

INDICE

1. OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACION

2. REFERENCIAS
3. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS
4. REQUISITOS MINIMOS PARA LAS VACUNAS CONTRA LA RABIA, DE VIRUS ACTIVO MODIFICADO Y DE VIRUS INACTIVADO
5. ESPECIFICACIONES PARA EL CONJUGADO ANTIRRABICO PREPARADO CON ANTICUERPOS POLICLONALES
6. ESPECIFICACIONES PARA EL CONJUGADO ANTIRRABICO PREPARADO CON ANTICUERPOS MONOCLONALES
7. ESPECIFICACIONES PARA LA SUSPENSION DE CEREBRO DE RATON INFECTADO CON VIRUS ESTANDAR DE CONFRONTACION (CVS)
8. ESPECIFICACIONES PARA LA SUSPENSION DE CEREBRO DE RATON NORMAL (SCN)
9. DEL PERSONAL TECNICO RESPONSABLE
10. PRODUCTOS IMPORTADOS
11. SANCIONES
12. CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES
13. BIBLIOGRAFIA
14. DISPOSICIONES TRANSITORIAS

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 los requisitos mínimos para las vacunas, antígenos y reactivos empleados en la prevención y control de la rabia en las especies domésticas.

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

1.3. La aplicación de la presente Norma corresponde a la Dirección General de Salud Animal, así como a las delegaciones de la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, en el ámbito de sus respectivas atribuciones y circunscripciones territoriales.

2. Referencias

Para la correcta aplicación de esta Norma se deben consultar las siguientes normas oficiales mexicanas:

NOM-008-SCF1-1993, Sistema General de Unidades de Medida.

NOM-011-SSA2-1993, Para la prevención y control de la rabia.

NOM-003-ZOO-1993, Criterios para la operación de laboratorios para pruebas aprobados en materia zoosanitaria.

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

NOM-030-SCF1-1993ZZ-3-1989, "Información comercial-Declaración de cantidad en la etiqueta-Especificaciones".

NOM-Z-9, "Emblema denominado Hecho en México".

NOM-EE-143, "Envase y embalaje-Terminología básica".

3. Definiciones y abreviaturas

Para efectos de la presente Norma se entiende por:

3.1. Antígeno: Sustancia que por sí misma sea capaz de estimular una respuesta inmune "in vivo", así como también pueda ser utilizada en la evaluación de la respuesta inmune "in vitro".

3.2. Biológico: Todo producto de fabricación nacional o importado con regulación correspondiente otorgada por la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, a través de la Dirección General de Salud Animal, procedente del cultivo del virus de la rabia,

activo modificado o fijo inactivado u otro, que al ser aplicado al animal susceptible confiera inmunidad contra dicha enfermedad, de forma tal que los animales vacunados no enfermen si son expuestos al virus patógeno contra el cual han sido vacunados.

3.3. Brote: Presencia de uno o más focos de rabia en un área geográfica determinada y en un tiempo determinado.

3.4. Cepa aprobada: Virus rábico vacunal o virulento que ha sido autorizado por la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, para ser empleado en la producción de vacunas o para las pruebas de desafío, respectivamente.

3.5. Conjugado: Anticuerpos policlonales o monoclonales, marcados químicamente con un fluorocromo.

3.6. Conjugado antirrábico: Anticuerpos policlonales o monoclonales específicos contra el virus de la rabia y marcados con un fluorocromo, usualmente isotiocianato de fluoresceína.

3.7. Constatación: Procedimiento mediante el cual la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural verifica que el producto cumple con las especificaciones de calidad presentadas por el laboratorio productor y/o las normas oficiales mexicanas aplicables.

3.8. Control: Conjunto de medidas zoonosanitarias que tienen por objeto disminuir la incidencia y prevalencia de la rabia.

3.9. 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.

3.10. CVS: Virus estándar de confrontación; virus fijo de la rabia que se utiliza en las pruebas de desafío.

3.11. Diagnóstico: Identificación de un caso de rabia mediante los datos clínicos y confirmado por las pruebas de laboratorio.

3.12. Dosis: Cantidad de producto recomendada en la etiqueta para ser administrada en el animal.

3.13. Esterilidad: Prueba de control de calidad, para asegurar que un producto está libre de microorganismos viables contaminantes.

3.14. Etiqueta: Conjunto de dibujos, figuras, leyendas e indicaciones específicas, grabadas o impresas en envases y embalajes.

3.15. Fecha de caducidad: Fecha asignada a un producto que designa el término del periodo en que debe aplicarse.

3.16. Fluorocromo: Sustancia que brilla al paso de la luz excitadora, emitiendo una luz con una longitud de onda mayor que la de la luz excitadora; el color de emisión es verde, cuando se trata del isotiocianato de fluoresceína.

3.17. Foco: Presencia de uno o más casos de rabia en un área geográfica determinada y en un tiempo determinado.

3.18. Inmunofluorescencia: Reacción específica en que un conjugado reacciona con un antígeno específico, combinación que brilla con un color verde-manzana cuando se observa utilizando un microscopio de fluorescencia.

3.19. Laboratorio aprobado: Laboratorio reconocido por la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural para realizar servicios de diagnóstico y constatación de la rabia.

3.20. Laboratorio de Control de Calidad: Laboratorio reconocido por la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, que se encarga de la verificación y aprobación del cumplimiento de los requisitos mínimos de los productos biológicos: vacunas, antígenos y reactivos, utilizados en el diagnóstico y control de la rabia.

3.21. Laboratorio de Producción de Biológicos: Laboratorio reconocido por la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural para la fabricación de las vacunas, antígenos y reactivos utilizados en el diagnóstico y control de la rabia.

3.22. Lote: Es una cantidad específica de cualquier materia prima o producto que haya sido elaborado bajo condiciones equivalentes de operación y durante un periodo determinado.

- 3.23. Médico Veterinario Aprobado: Profesional reconocido por la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural.
- 3.24. Murciélago hematófago o vampiro: Quiróptero que se alimenta exclusivamente de sangre de animales domésticos y silvestres, inclusive del hombre.
- 3.25. Número de lote: Cualquier combinación de letras, números o símbolos, que sirven para la identificación de un lote y bajo el cual se amparan todos los documentos referentes a su manufactura y control.
- 3.26. Potencia: Prueba de control de calidad para asegurar que un producto biológico es capaz de producir una respuesta inmune y proteger, lo cual se expresará en Unidades Internacionales o porcentaje de protección, de acuerdo a lo establecido en los requisitos mínimos de calidad del producto.
- 3.27. Producto liberado: Es aquel que aprobó satisfactoriamente las pruebas de control de calidad y que está listo para su comercialización.
- 3.28. Pruebas de Control de Calidad: Es el conjunto de actividades llevadas a cabo en el laboratorio para certificar que las características de un producto cumplen con las especificaciones vigentes.
- 3.29. Pureza: Es la prueba mediante la cual se verifica que existe en el producto, únicamente el microorganismo indicado y que está libre de microorganismos extraños.
- 3.30. Rabia: Enfermedad infecto-contagiosa, aguda y mortal que ataca el sistema nervioso central, provocada por un virus del género *Lyssavirus* y de la familia *Rhabdoviridae*. Transmitida al hombre o animales por la saliva de algún animal enfermo, infectante o por material contaminado.
- 3.31. Secretaría: Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural.
- 3.32. Seguridad e inocuidad: Prueba de control de calidad para asegurar que un producto no cause reacciones desfavorables atribuibles al mismo.
- 3.33. Semilla maestra: Microorganismo identificado, seleccionado y almacenado permanentemente, con un número de pases específicamente determinado a partir del cual se produce un biológico.
- 3.34. Suero hiperinmune antinucleoproteína: Suero sanguíneo con niveles altos de anticuerpos específicos contra la nucleoproteína del virus de la rabia, obtenidos de dos maneras:
Policlonal.- Preparado en animales vacunados repetidamente con vacuna antirrábica, conteniendo niveles altos de anticuerpos.
Monoclonal.- Anticuerpos elaborados in vitro por linfocitos, procedentes de ratones (BALB/c) previamente vacunados con vacuna antirrábica, los cuales fueron fusionados con células del mieloma del ratón.
- 3.35. Suspensión de absorción: Uno de dos tipos de suspensiones que sirven para absorber la fluorescencia típica y mostrar la especificidad de la prueba de inmunofluorescencia:
a) suspensión infectada de cerebro de ratón infectado con virus rábico (usualmente CVS, virus estándar de confrontación) o nucleoproteína recombinante expresado por baculovirus en células de embrión de polilla; b) las suspensiones normales de tejido, sea suspensión normal de ratón (SCN) o baculovirus no infectado.
- 3.36. Titulación: Prueba de control de calidad para asegurar que un producto contiene la cantidad de antígeno de virus rábico o anticuerpos establecidos en los requisitos mínimos.
- 3.37. Técnica Directa de Anticuerpos Fluorescentes: Es la tinción de impresiones o tejidos con un conjugado, para determinar si presentan el antígeno específico.
- 3.38. Vacunación: Administración de antígeno rábico a una persona o animal en la dosis adecuada, con el propósito de inducir la producción de anticuerpos neutralizantes contra la rabia.
4. Requisitos mínimos para las vacunas contra la rabia, de virus activo modificado y de virus inactivado

4.1. Características del producto.- Elaborado con una cepa aprobada de virus de rabia, activo modificado liofilizado o inactivado y presentado en forma líquida o liofilizado.

4.2. Medios de producción.- Cultivos celulares primarios o a partir de líneas celulares o en cerebros de ratones lactantes.

4.3. Requisitos de pruebas.- Por cada lote de producto terminado, antes de que salga al mercado, el elaborador y/o titular del registro debe realizar las siguientes pruebas:

4.3.1. Prueba de pureza.- Esta prueba consiste en demostrar que el producto vacunal está libre de cualquier contaminante y que contiene únicamente el microorganismo que se indica.

4.3.1.1. El análisis bacteriológico, usando medios para gérmenes aerobios y anaerobios, debe comprobar que el producto está exento de cualquier contaminación bacteriana.

4.3.1.2. Se deben realizar las pruebas necesarias, a fin de demostrar que el producto está libre de hongos y levaduras.

4.3.1.3. Se deben realizar las pruebas que se requieran para demostrar que el producto está libre de micoplasmas.

4.3.1.4. Se deben realizar las pruebas necesarias, a fin de demostrar que el producto está libre de virus contaminantes.

4.3.2. Prueba de inactivación viral para vacunas inactivadas.- La suspensión viral inactivada debe someterse a esta prueba, para la cual se debe utilizar:

a) 10 ratones sanos y susceptibles a la rabia, de la misma cepa o estirpe, de 21 días de edad y de 12 a 16 g de peso.

b) Una camada de por lo menos 8 ratones lactantes sanos y susceptibles a la rabia, de 3 a 5 días de edad.

c) Por lo menos 2 conejos sanos y susceptibles a la rabia, de 1.5 a 2.5 Kg de peso.

Estos animales deben ser inoculados con la suspensión viral en estudio, por vía intracerebral: los ratones con 0.03 ml; los lactantes con 0.02 ml y los conejos con 0.25 ml. Todos los animales serán observados diariamente durante 21 días posinoculación. Se deben coleccionar los cerebros de los animales que mueran entre el 4o. y 21o. días posinoculación y se tratará de detectar el virus, inyectando 5 ratones por vía intracerebral con el material procedente de cada cerebro, debiéndose observar durante 30 días. Para confirmar la presencia o ausencia del virus de la rabia, se debe aplicar la prueba de anticuerpos fluorescentes.

Si se confirma la presencia del virus, el lote será insatisfactorio.

4.3.3. Prueba de seguridad o inocuidad para las vacunas inactivadas.- Esta prueba debe realizarse en ratones y en cobayos.

En caso de que la vacuna deba reconstituirse, se hará utilizando el diluyente que la acompaña, de acuerdo a las indicaciones del laboratorio productor.

4.3.3.1. Prueba en ratones adultos.- Se deben utilizar 10 ratones de 21 días de edad de 12 a 16 g de peso, sanos y susceptibles a la rabia, cada uno de los cuales se debe inocular con 0.5 ml de la vacuna en estudio por vía intraperitoneal y serán observados diariamente durante 21 días posinoculación. Para que la prueba se considere satisfactoria, todos los animales deben permanecer sanos, sin signos de enfermedad durante el periodo de prueba.

4.3.3.2. Prueba en cobayos.- Se deben utilizar 2 cobayos de 250 a 300 g de peso, sanos y susceptibles a la rabia, los cuales deben ser inoculados por vía intraperitoneal con 2 ml del producto y deben ser observados diariamente durante 21 días posinoculación.

La prueba se debe considerar satisfactoria cuando los cobayos permanezcan sanos, sin signos ni reacciones indeseables atribuibles al producto durante el periodo de observación.

4.3.4. Prueba de seguridad o inocuidad para las vacunas de virus activo modificado.- Esta prueba debe realizarse en ratones y cobayos.

La vacuna debe ser reconstituída con el diluyente que la acompaña, según indicaciones del laboratorio productor.

4.3.4.1. Prueba en ratones adultos.- Se deben utilizar 10 ratones de 21 días de edad de 12 a 16 g de peso, sanos y susceptibles a la rabia, cada uno se inoculará con 0.5 ml de la vacuna, por vía intraperitoneal y deben ser observados diariamente durante 21 días posinoculación.

La prueba se debe considerar satisfactoria, si en el periodo de observación sobrevive por lo menos el 80% de los ratones, sin presentar reacciones desfavorables atribuibles al producto, siempre y cuando se demuestre que los que murieron (<20%), fueron a causa de la cepa vacunal de rabia y no a causa de otros agentes infecciosos ajenos al producto.

4.3.4.2. Prueba en cobayos.- Se deben utilizar 2 cobayos de 250 a 300 g de peso, sanos y susceptibles a la rabia, los cuales deben ser inoculados por vía intramuscular, en el músculo gastrocnemio, con 2 ml del producto y deben ser observados diariamente durante 21 días posinoculación.

La prueba se debe considerar satisfactoria cuando los cobayos permanezcan sanos, sin signos ni reacciones indeseables atribuibles al producto durante el periodo de observación.

4.3.5. Prueba de seguridad o inocuidad para el trámite de regulación de los productos nuevos y para la semilla de trabajo y/o cuando se requiera.- Esta debe realizarse en cada una de la(s) especie(s) animal(es) para la(s) que se recomiende el producto en la etiqueta.

Se deben utilizar 10 animales sanos y susceptibles a la rabia, de cada especie a ser probada (negativos a anticuerpos antirrábicos a la dilución 1:2 ante la prueba de seroneutralización). Cinco animales deben ser inoculados por vía intramuscular, cada uno con el equivalente a 10 dosis del producto; y cada uno de los otros cinco debe ser inoculado también por vía intramuscular, infiltrando el inóculo en un nervio mayor con el equivalente a 10 dosis del producto.

Todos los animales deben ser observados diariamente durante 90 días, tiempo durante el cual deben permanecer sanos, sin signos de enfermedad.

Si alguno de los animales presenta signos de enfermedad o se demuestra el virus de la rabia en su sistema nervioso central, el producto o la semilla se deben considerar insatisfactorios.

4.4. Prueba de titulación para productos de virus activo modificado.- Para esta prueba se deben utilizar ratones blancos, todos de la misma cepa o estirpe, sanos y susceptibles a la rabia, de 21 días de edad y de 12 a 16 g de peso.

Dos frascos de la vacuna de un mismo lote deben ser reconstituidos con el diluyente que los acompaña; media dosis será extraída de cada frasco para completar la dosis total, que será considerada como la dilución 100.

Se realizarán diluciones decimales, desde 100 a 10^{-6} de la vacuna, con una solución tampón fosfatada (conteniendo 2% de suero de caballo, libre de anticuerpos contra la rabia, o albúmina de bovino al 0.4%), con un pH de 7.2 ± 0.3 , o con el diluyente recomendado por el productor.

Con cada dilución se deben inocular 10 ratones de 21 días de edad de 12 a 16 g de peso, por vía intracerebral, cada uno con 0.03 ml; empezando por la dilución más alta de 10^{-6} , después con 10^{-5} , 10^{-4} y así sucesivamente.

Los ratones se deben observar diariamente durante 21 días posinoculación y se deben registrar las muertes y los signos de parálisis y espasmos que se observen en los ratones, esto a partir del quinto día posinoculación. Los ratones que mueran dentro de los primeros cuatro días posinoculación deben ser descartados.

Para que la prueba sea válida, por lo menos el 80% de los ratones inoculados con cada dilución, deben sobrevivir, por lo menos hasta el cuarto día posinoculación.

Con los ratones que mueran a partir de quinto día, se deben calcular los resultados por el método de Reed and Muench o de Spearman-Kärber, expresados como la dosis letal 50% para el ratón (DLR-50%). Los ratones que mueran o presenten signos atribuibles a rabia, se les debe hacer pruebas de inmunofluorescencia a partir del cerebro; por lo menos un animal por dilución.

La vacuna probada debe tener un título mínimo de 103.3 DLR 50% por cada 0.03 ml al inicio y durante el periodo de vigencia.

4.5. Pruebas de potencia

4.5.1. Prueba de potencia para vacunas de virus activo modificado.- Para esta prueba se deben utilizar 15 cobayos de la misma cepa o estirpe, sanos y susceptibles a la rabia, con un peso mínimo de 350 g, elegidos al azar, 10 cobayos deben constituir el lote de prueba y los otros 5 el lote testigo.

Dos frascos de la vacuna del mismo lote deben ser reconstituidos con el diluyente que los acompaña.

La mitad de la dosis recomendada por el laboratorio productor será extraída de cada frasco, para completar una dosis total. Posteriormente se debe agregar el diluyente antes mencionado, hasta completar una dilución de 1:10.

Cada uno de los cobayos del lote de prueba debe ser inoculado con 0.25 ml de la vacuna previamente diluida, en el músculo gastrocnemio, en la cara interna de la pierna, tan cerca del nervio como sea posible.

Tres semanas después de la inoculación, los cobayos vacunados y los testigos deben ser desafiados con el virus CVS de rabia, con 0.5 ml de la dilución anterior a la que en una titulación previa haya matado al 100% de los cobayos, utilizando diluciones dobles, por vía intramuscular, en la extremidad opuesta a la empleada para la vacunación.

Todos los cobayos deben ser observados diariamente durante 14 días posdesafío, las muertes que ocurran entre el primero o cuarto días posteriores al desafío serán descartadas.

La prueba se debe considerar satisfactoria cuando por lo menos 8 de los 10 cobayos vacunados sobrevivan sin manifestar signos de rabia y cuando por lo menos el 80% de los testigos mueran o presenten signos de rabia en el periodo de observación.

4.5.2. Prueba de potencia para vacunas inactivadas.- Esta debe realizarse por la técnica del N I H (Técnica del Instituto Nacional de Salud de los E.E.U.U.).

4.5.2.1. Prueba de potencia del N I H.- Los lotes comerciales deben probarse mediante la prueba del N I H. Para esta prueba se deben utilizar ratones blancos de la misma cepa o estirpe, sanos y susceptibles a la rabia, del mismo sexo, de 4 semanas de edad, de 15 a 20 g de peso y se requerirá del empleo de una vacuna de referencia aprobada por la Secretaría.

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

Con solución salina tamponada de fosfatos, pH 7.6, se deben realizar diluciones quintuples seriadas de la vacuna (desde 1:10 hasta 1:1250).

Con cada dilución se deben vacunar 16 ratones, cada uno con 0.5 ml por vía intraperitoneal; se comenzará por la dilución mayor y se terminará con la menor; se deben dejar 10 ratones sin vacunar, para titular el virus.

La vacunación se debe repetir una semana después. Todos los ratones vacunados y los 10 testigos deben ser desafiados por vía intracerebral a los 7 días después de la segunda vacunación; cada uno con 5 a 50 DLR 50% de CVS, contenidas en 0.03 ml y se deben observar diariamente durante 21 días posdesafío, registrando la morbilidad y mortalidad.

Se deben registrar aquellos que mueran a partir del quinto día posdesafío, manifestando signos de rabia, tales como parálisis y espasmos; asimismo, se deben registrar aquellos que después de presentar signos de rabia sobrevivan al periodo de prueba. Los muertos antes del quinto día posdesafío serán descartados.

La prueba se debe considerar válida cuando la titulación del virus de confrontación (CVS) tenga una concentración de 5 a 50 dosis letales para el ratón (DLR) 50%, en 0.03 ml.

Se debe calcular el punto final de protección de las vacunas por el método de Reed and Muench o el de Spearman-Kärber y se debe expresar como la DL 50%, tanto de la vacuna de referencia como de la de prueba.

La potencia de la vacuna de prueba debe ser expresada en Unidades Internacionales por mililitro (U.I. por ml) y calculada con la siguiente fórmula:

$$\text{POTENCIA DE LA VACUNA DE PRUEBA} = \frac{\text{POTENCIA DE 50\% de la vacuna de prueba}}{\text{POTENCIA DE 50\% de la vacuna de referencia}} \times \text{DE LA VACUNA DE REFERENCIA EN UI/ml}$$

La prueba se debe considerar satisfactoria cuando la potencia relativa de la vacuna que está siendo probada tenga un valor mínimo de una U I por dosis.

4.5.3. Prueba de potencia para el trámite de regulación de los productos nuevos, para la semilla de trabajo y/o cuando se requiera.- Debe realizarse en la(s) especie(s) animal(es) para la(s) que se recomienda el producto en la etiqueta; el protocolo de prueba que se debe seguir debe estar previamente autorizado por la autoridad competente. En él se debe establecer que se usará como "Cepa" de exposición un virus de rabia de origen murciélago hematófago para las vacunas contra la rabia paralítica bovina o derriengue y de origen canino para las vacunas utilizadas en perros y gatos.

Para que los resultados sean satisfactorios, el producto debe proteger por lo menos al 80% de los vacunados con una sola dosis, al ser desafiados al término del periodo de protección indicado por el laboratorio productor y deben morir por lo menos el 80% de los testigos, después de ser observados durante 90 días.

Para efectos de comprobación, el elaborador y/o titular del registro debe asegurar todos los requisitos señalados durante el periodo de vigencia que ofrezca, por cada lote del producto, a partir de la fecha de elaboración.

Para muestra de retención, en vacunas de virus activo modificado el título mínimo aceptable debe ser de 103 DLR 50% en 0.03 ml, durante 3 meses más a la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.

Para vacunas inactivadas el valor mínimo será de una U.I. por dosis, durante tres meses más a la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.

4.6. Prueba de vacío para vacunas liofilizadas.- Esta prueba se debe realizar en un cuarto oscuro, empleando el aparato de Tessler (generador de alta frecuencia), el cual debe aplicarse a cada frasco de vacuna liofilizada a una distancia de no más de 5 mm de la retapa de aluminio. Existirá vacío si la descarga eléctrica ilumina el interior del frasco de la vacuna. Al término del proceso de liofilización se puede sellar también con gas inerte, para lo cual, en este caso, no se realizará la prueba de vacío.

4.7. Prueba de humedad para vacunas liofilizadas.- Esta prueba consiste en determinar el porcentaje de humedad que tiene la vacuna liofilizada, que debe ser igual o menor del 4%, se podrá determinar por los métodos de Abderhalden, Karl Fischer o Termogravimétrico.

4.8. Prueba de pH.

4.8.1. Para vacunas de virus activo modificado.- La vacuna reconstituida debe mostrar un pH entre 6.9 y 7.4, el cual debe ser comprobado con un potenciómetro previamente calibrado.

4.8.2. Para vacunas de virus inactivado.- Deben mostrar un pH entre 7.2 y 8.2.

5. Especificaciones para el conjugado antirrábico preparado con anticuerpos policlonales

5.1. Características del producto: Anticuerpos policlonales específicos contra el virus rábico, marcados con un fluorocromo.

5.2. Medios de producción: Suero hiperinmune producido en cualquier especie animal adecuada, siempre y cuando tenga un título elevado de anticuerpos, el cual será marcado con un fluorocromo.

5.3. Requisitos de prueba: Con cada lote de producto terminado, antes de que salga al mercado, el elaborador del producto debe realizar las siguientes pruebas:

5.3.1. Titulación: El conjugado debe ser reconstituido con el volumen de diluyente recomendado por el productor. Para la titulación del conjugado antirrábico se debe aplicar la técnica directa de anticuerpos fluorescentes (AF).

5.3.2. Evaluación: Se debe usar un microscopio de fluorescencia equipado con la óptica adecuada e iluminación de luz ultravioleta. La fuente luminosa debe contar con filtros excitadores que dejen pasar solamente la luz ultravioleta y se deben utilizar filtros barrera que impidan que la luz ultravioleta llegue al ojo del observador.

Se deben utilizar 3 criterios para la evaluación del conjugado antirrábico:

- 1.- Intensidad de la tinción específica.
- 2.- Cantidad de inclusiones y polvo antigénico fluorescente.
- 3.- Tinción inespecífica de fondo.

El conjugado policlonal debe tener las características mínimas expresadas en el Cuadro 1.

CUADRO 1

CRITERIOS *DILUCIONES DEL CONJUGADO

DE FLUORESCENCIA

	1:2		1:4		1:8		1:16					
	SCN	CVS	SCN	CVS	SCN	CVS	SCN	CVS	SCN	CVS	SCN	CVS
Intensidad tintorial específica			++++	+	++++	-	++++	-	++	-		
Inclusiones y polvo fluorescente			++++	+	++++	-	++++	-	++++	-		
Tinción inespecífica de fondo				+++	+++	+	+	-	-	-	-	-

(El grado de intensidad tintorial específica y de tinción inespecífica son términos característicos, reconocidos por la O.M.S.)

6. Especificaciones para el conjugado antirrábico preparado con anticuerpos monoclonales

6.1. Características del producto: Anticuerpos monoclonales específicos contra la nucleoproteína del virus rábico, marcados con un fluorocromo.

6.2. Medios de producción: Línea de ratones (BALB/c) inmunizados con vacuna antirrábica, de los cuales se cosechan los linfocitos y éstos se fusionan con células del mieloma del ratón.

6.3. Requisitos de prueba: Con cada lote de producto terminado, antes de que salga al mercado, el elaborador debe realizar las siguientes pruebas:

6.3.1. Titulación: El conjugado debe ser reconstituido con el volumen de diluyente recomendado por el productor. Para la titulación del conjugado se debe aplicar la técnica directa de anticuerpos fluorescentes.

Para ello, con el conjugado se debe hacer una serie de diluciones dobles base 10.

Con cada una de las diluciones se deben teñir improntas positivas y negativas conocidas.

Anotar los resultados obtenidos, según los criterios que se mencionan en el punto 6.3.2. de evaluación, para obtener el título correspondiente. El título mínimo del conjugado debe ser 1:10.

6.3.2. Evaluación: Se debe usar un microscopio de fluorescencia equipado con óptica adecuada e iluminación de luz ultravioleta. La fuente luminosa debe contar con filtros excitadores que dejen pasar solamente la luz ultravioleta y se deben utilizar filtros barrera que impidan que la luz ultravioleta llegue al ojo del observador.

Se deben usar 3 criterios para la evaluación del conjugado antirrábico monoclonal:

- 1.- Intensidad de la tinción específica.
- 2.- Cantidad de inclusiones y polvo.
- 3.- Tinción inespecífica de fondo.

El conjugado monoclonal debe tener las características mínimas expresadas en el Cuadro 2.

CUADRO 2

CRITERIOS *DILUCION DEL CONJUGADO DE FLUORESCENCIA

	1:10	1:20	1:40	1:80
Intensidad tintorial específica	++++	++++	+++	++
Inclusiones y polvo fluorescente	++++	++++	+++	++
Tinción inespecífica de fondo-	-	-	-	-

6.3.3. La caducidad del conjugado debe estar especificada en la etiqueta del mismo.

6.3.4. Para efectos de comprobación, el elaborador debe asegurar que los productos conserven su potencia después del periodo de vigencia que ofrezca para cada uno de los lotes, y que será de seis meses para el CVS y SCN, almacenados de -40 a -70°C.

Para los conjugados en forma líquida o liofilizados, el periodo será de seis meses, almacenados entre -20 y -70°C.

7. Especificaciones para la suspensión de cerebro de ratón infectado con virus estándar de confrontación (CVS)

7.1. Características del producto.- Suspensión de cerebros de ratones infectados con CVS, utilizada para evaluar la fluorescencia específica del conjugado para el diagnóstico de la rabia.

7.2. Medios de producción.- Ratones de 3 a 4 semanas, sanos y susceptibles a la rabia, inoculados por vía intracerebral con una dilución de entre 10⁻² y 10⁻⁴ de la semilla del virus CVS. Los cerebros de los ratones se cosechan cuando éstos presenten signos de rabia como incoordinación y parálisis, entre otros.

La suspensión final debe diluirse 1:5 (20%) con el diluyente apropiado y homogeneizarse.

La suspensión de CVS puede elaborarse también a partir de cultivos de tejidos celulares infectados, cosechados al 7o. u 8o. día posinoculación. Las suspensiones de CVS se deben mantener congeladas entre -40 a -70°C, o en nitrógeno líquido.

7.3. Requisitos de prueba.- Con cada lote de producto terminado el elaborador debe realizar las siguientes pruebas:

7.3.1. Titulación: La suspensión debe tener un título mínimo de 105 DL 50% / 0.03 ml en ratones de tres semanas de edad, sanos y susceptibles a la rabia.

7.3.2. Absorción: Al mezclar un volumen de conjugado con 4 volúmenes de la suspensión de cerebros infectados (CVS), se debe absorber la fluorescencia específica, según se ilustra en el Cuadro 1.

8. Especificaciones para la suspensión de cerebro de ratón normal (SCN)

8.1. Características del producto: Suspensión de cerebros de ratones no infectados, utilizados para absorber la fluorescencia inespecífica del conjugado para el diagnóstico de la rabia.

8.2. Medios de producción: Cerebros de ratones sanos y susceptibles a la rabia, de 3 a 4 semanas de edad. La cosecha de los cerebros debe diluirse a una dilución 1:5 (20%), con solución salina buferada y homogeneizarse.

La suspensión de SCN se debe mantener congelada entre -40 a -70°C, o en nitrógeno líquido.

8.3. Requisitos de prueba: Con cada lote de producto terminado el elaborador debe realizar las siguientes pruebas:

8.3.1. Absorción: Al mezclar un volumen de conjugado con 4 volúmenes de suspensión de cerebro normal (SCN) no se debe absorber la fluorescencia específica, ver Cuadro 1.

9. Del personal técnico responsable

9.1. Los establecimientos dedicados a la elaboración de productos biológicos deben contar con un Médico Veterinario Aprobado, así como con un profesionista calificado en el área de producción y otro en el área de control de calidad.

10. Productos importados

Los productos importados deben cumplir con todos los requisitos establecidos en esta Norma y con las disposiciones correspondientes.

Los productos biológicos importados deben provenir de una empresa elaboradora con registro federal o nacional, de su país de origen.

Sólo pueden importarse productos que se estén comercializando libremente en el país de origen, lo cual debe ser avalado con el certificado de libre venta o su equivalente.

11. Sanciones

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

12. Concordancia con normas internacionales

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

13. Bibliografía

Baer, G M. ed. The Natural History of Rabies. 2nd edition Boca Raton Florida. CRC Press Inc.

Farmacopea Europea II 1986 V.2.1.5.

Instructivo para el rotulado de productos de uso veterinario sujetos a control de acuerdo a la Ley Federal de Sanidad Fitopecuaria de los Estados Unidos Mexicanos.- Dirección General de Sanidad Animal.- Departamento de Control de Productos para uso Animal. Agosto de 1990.

Kaplan, M M y Koprowski H. ed. La Rabia: Técnicas de Laboratorio. Tercera ed. Ginebra, Organización Mundial de la Salud. 1976 (Serie de Monografías No. 23).

Manual de requisitos mínimos para productos biológicos. Dirección General de Sanidad Animal, Dirección de Registros y Servicios Zoonosarios, Subsecretaría de Ganadería, Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural.

Norma Oficial Mexicana NOM-011-SSA2-1993, Para la prevención y control de la rabia. Publicada en el Diario Oficial de la Federación, tomo CDXCVI, No. 18 pp. 29-45; 25 de enero de 1995, México.

Organización Mundial de la Salud: 80. Informe del Comité de Expertos de la OMS sobre Rabia. Serie de Informes Técnicos No. 824, Ginebra, 1992.

Precausata P; Soulebot J.P. Bugand M; Bruna. et Chappuis G.: Modalites de Production et Immunité Conferre par un Vaccin antirabique Inactive Provenant de Culture Cellulaire. Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis. vol 5. Nos. 1-3, pp. 217-226-1982. Pergamon Press Ltd. Great Britain.

Proposed Requirements for Rabies Vaccine for Veterinary Use. Requirements for Biological Substances No. 29. World Health Organization, WHO/BS/79, 1237.

SARH-CANIFARMA-OIRSA. Requisitos Mínimos de Productos Biológicos Veterinarios. 108 p. 1992.

14. Disposiciones transitorias

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

Sufragio Efectivo. No Reelección.

México, D.F., a 24 de mayo de 1996.- El Director General Jurídico, Roberto Zavala Echavarría.- Rúbrica.