

10-28-97 NORMA Oficial Mexicana NOM-053-ZOO-1995, Requisitos mínimos para las vacunas, antígenos y reactivos empleados en la prevención y control de la brucelosis en los animales.

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

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-053-ZOO-1995, REQUISITOS MINIMOS PARA LAS VACUNAS, ANTIGENOS Y REACTIVOS EMPLEADOS EN LA PREVENCION Y CONTROL DE LA BRUCELOSIS EN LOS ANIMALES

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 cuidar la prevención, control y erradicación de las plagas y enfermedades que, como la brucelosis, afectan a la ganadería nacional tanto en su nivel de producción como en la calidad de sus productos.

Que la brucelosis es una enfermedad infecto-contagiosa de origen bacteriano, que afecta a las diferentes especies, principalmente bovinos, caprinos, ovinos y porcinos, y que además es de las zoonosis más importantes de nuestro país.

Que ésta se transmite a través de la ingestión de leche o sus derivados procedentes de animales enfermos, cuando la leche no ha sido pasteurizada en forma adecuada, pudiendo también transmitirse a través del contacto con animales infectados en las prácticas rutinarias del campo.

Que la prevención y control de esta enfermedad se basa en el establecimiento de adecuadas medidas de bioseguridad, como es el caso de la inmunización de los animales mediante vacunas contra la brucelosis, que permita a la ganadería nacional desarrollarse en mejores condiciones sanitarias.

Que para proteger a la ganadería nacional contra esta enfermedad, es necesario estandarizar los requisitos mínimos para la producción de vacunas, antígenos y reactivos empleados en la prevención y control de la brucelosis, a fin de garantizar que su producción sea de la más alta calidad.

Que en razón de los motivos señalados en los párrafos anteriores, con fecha 9 de octubre de 1996, se publicó en el Diario Oficial de la Federación el Proyecto de Norma Oficial Mexicana NOM-053-ZOO-1995, Requisitos mínimos para las vacunas, antígenos y reactivos empleados en la prevención y control de la brucelosis en los animales, 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 11 de agosto de 1997, se publicaron las respuestas a los comentarios recibidos en relación a dicho proyecto, a través del mismo órgano informativo.

Que en virtud del resultado del procedimiento legal antes indicado, se modificaron los diversos puntos que resultaron procedentes, y por lo cual se expiden las presentes disposiciones para quedar como Norma Oficial Mexicana NOM-053-ZOO-1995, Requisitos mínimos para las vacunas, antígenos y reactivos empleados en la prevención y control de la brucelosis en los animales.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-053-ZOO-1995, REQUISITOS MINIMOS PARA LAS VACUNAS, ANTIGENOS Y REACTIVOS EMPLEADOS EN LA PREVENCION Y CONTROL DE LA BRUCELOSIS EN LOS ANIMALES

INDICE

1. OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACION
2. REFERENCIAS
3. DEFINICIONES
4. REQUISITOS MINIMOS DE LOS ANTIGENOS PARA EL DIAGNOSTICO DE BRUCELOSIS
5. REQUISITOS MINIMOS DE LAS VACUNAS PARA LA PREVENCION DE LA BRUCELOSIS
6. PRODUCTOS IMPORTADOS
7. SANCIONES
8. CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES
9. BIBLIOGRAFIA
10. DISPOSICIONES TRANSITORIAS

1. Objetivo y campo de aplicación

1.1. Esta 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 brucelosis en los animales.

1.2. Esta Norma es aplicable a todas las vacunas, antígenos y reactivos, de origen nacional o extranjero, empleados en la prevención y control de la brucelosis en los animales.

1.3. 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.

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

2. Referencias

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

NOM-003-ZOO-1993, 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-041-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Brucelosis en los animales.

3. Definiciones

Para efectos de la presente Norma, se entiende por:

3.1. Aglutinación: Proceso de unión entre un antígeno y un anticuerpo, que se manifiesta en pruebas serológicas como la formación de grumos.

3.2. Antígeno: Sustancia que al ponerse en contacto con líquidos corporales pone de manifiesto la presencia de anticuerpos uniéndose con ellos.

3.3. Antígeno de referencia: Antígeno estandarizado y reconocido por un laboratorio internacional de referencia de la OIE, la OPS, la OMS o la FAO, que exprese su potencia en UI del PiSAb.

3.4. Cepa: Estirpe bacteriana con propiedades fisicoquímicas e inmunogénicas estables y conocidas.

- 3.5. Cepa de referencia: Cepa bacteriana reconocida por un Centro Internacional de Referencia para su utilización en la constatación de productos con cepas análogas.
- 3.6. Clarificación: Manifestación de transparencia en un líquido corporal.
- 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. Dosis: Cantidad de producto recomendada para ser aplicada en el animal y se obtenga la respuesta deseada.
- 3.9. Lote: Cantidad específica de materia prima o producto terminado que haya sido elaborado bajo condiciones equivalentes.
- 3.10. Negativo: Resultado de un suero probado en ausencia de reacción de respuesta esperada.
- 3.11. PiSAb: Patrón internacional de suero anti-Brucella abortus. Consistente en suero de bovino infectado con B. abortus cepa 544. La unidad internacional se define como la actividad contenida de inmunoglobulina IgG, en 0.09552 mg de PiSAb.
- 3.12. Positivo: Resultado de un suero probado en presencia de reacción de respuesta esperada, pudiendo clasificarse, en reacciones de aglutinación, de acuerdo a su intensidad en:
- 3.12.1. Fuertemente positivo: Cuando la aglutinación es franca y se notan amplias zonas de clarificación.
- 3.12.2. Medianamente positivo: Cuando existen zonas de aglutinación y zonas de clarificación en igual proporción.
- 3.12.3. Levemente positivo: Cuando existen amplias zonas de turbidez y algunas zonas de aglutinación.
- 3.13. Reactivo: Sustancia empleada para producir una reacción o descubrir la presencia de otra sustancia o clase de inmunoglobulina.
- 3.14. Secretaría: La Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural.
- 3.15. Semilla: Cepa bacteriana, constatada contra una cepa de referencia, que se utiliza como cepa de producción.
- 3.16. Turbidez: Disminución de la transparencia de un líquido corporal.
- 3.17. Uniformidad celular: Es la característica de correspondencia de morfología y propiedades fisicoquímicas de una bacteria, con respecto a una cepa de referencia.
- 3.18. Vacuna: Preparación de Brucella spp. o derivados de ésta que, introducida en el organismo animal, produce en éste la inmunización activa contra brucelosis.
- 3.19. Valor predictivo: La probabilidad de que los resultados de una prueba realmente correspondan al estado de salud de la población que se está probando.
4. Requisitos mínimos de los antígenos para el diagnóstico de brucelosis
- 4.1. Requisitos mínimos para el antígeno de Brucella abortus "Cepa 1119-3" para el diagnóstico mediante la prueba de aglutinación rápida en tarjeta (rosa de bengala).
- 4.1.1. Características del producto. Suspensión de células de B. abortus cepa 1119-3, coloreada con el colorante rosa de bengala, inactivada por calor y concentrada por centrifugación, para obtener un paquete celular al 3% o al 8%, para ser usada en el diagnóstico de la brucelosis caprina o bovina, respectivamente, mediante la prueba de tarjeta.
- 4.1.2. Medios de producción. Medios de cultivo artificiales que permitan el crecimiento de la bacteria, concentrándose por centrifugación para obtener el paquete celular, que se estandarizará a una concentración del 3% o del 8% como producto terminado, dependiendo de su uso en caprinos o en bovinos, respectivamente.
- 4.1.3. Requisitos de prueba. Por cada lote de producto terminado antes de que salga al mercado, el elaborador y/o el titular del registro deberá realizar las siguientes pruebas:
- 4.1.3.1. Prueba de esterilidad. Esta prueba consiste en determinar que el producto está libre de cualquier contaminante y demostrar la inactivación del microorganismo empleado.
- a) El análisis bacteriológico utilizando medios para crecimiento aerobio y anaerobio, deberá mostrar que el producto está exento de cualquier bacteria viva.

b) Deberán realizarse las pruebas necesarias a fin de demostrar que el producto está libre de hongos y levaduras.

4.1.3.2. Prueba de concentración de iones de hidrógeno. Deberá tener un pH no menor de 3.6 y no mayor de 3.7.

4.1.3.3. Prueba de determinación de fenol residual. Se utilizará una prueba colorimétrica. El resultado para considerarse satisfactorio deberá ser entre 0.3% a 0.5%

4.1.3.4. Prueba de concentración celular. Por el método de Fitch Hoopkins deberá obtenerse una concentración celular del 3% cuando se destine a diagnóstico en caprinos, y del 8% cuando se trate de bovinos.

4.1.3.5. Prueba de homogeneidad. Se realizará por el examen microscópico del antígeno para demostrar la pureza de la bacteria empleada, uniformidad celular y ausencia de autoaglutinación y de cuerpos extraños; éstas se efectuarán además de las pruebas bacteriológicas que se requieran a fin de comprobar que los microorganismos cumplen con las características señaladas en los manuales de referencia de la OPS y de la OIE.

4.1.3.6. Prueba de sensibilidad o avidez. La reactividad del antígeno deberá ser probada comparando la reacción de aglutinación con un antígeno de referencia de acuerdo al siguiente procedimiento:

Para el antígeno al 3%:

- Se utilizarán 22 sueros de caprinos previamente identificados, que incluyan positivos en diferentes gradaciones (4 fuertemente positivos, 4 medianamente positivos y 4 débilmente positivos) y 10 negativos.

Para la lectura se utilizará el siguiente criterio:

Positivo (+): Cualquier grado de aglutinación. Valor 1 punto.

Negativo (-): Ausencia de aglutinación. Valor cero puntos.

Para el antígeno al 8%:

- Se utilizarán 22 sueros de bovinos previamente identificados, que incluyan positivos en diferentes gradaciones (4 fuertemente positivos, 4 medianamente positivos y 4 débilmente positivos) y 10 negativos.

Para la lectura se utilizará el siguiente criterio:

Positivo (+): Cualquier grado de aglutinación. Valor 1 punto.

Negativo (-): Ausencia de aglutinación. Valor cero puntos.

Los puntos obtenidos del antígeno serán comparados con los obtenidos del antígeno de referencia.

Para que la prueba sea considerada satisfactoria no deberá existir ninguna diferencia entre los antígenos.

Para efectos de constatación el elaborador y/o titular del registro, deberá asegurar las características arriba señaladas, durante todo el periodo de vigencia que ofrezca, por cada lote de producto que no será menor a 10 meses ni mayor a 22, y para muestras de retención, será hasta tres meses más posteriores a la caducidad indicada en la etiqueta del mismo.

4.2. Requisitos mínimos para el antígeno de *Brucella abortus* "Cepa 1119-3" para el diagnóstico mediante la prueba de aglutinación rápida en placa con rivanol.

4.2.1. Características del producto. Suspensión de células de *B. abortus* cepa 1119-3, coloreada con los colorantes verde brillante y cristal violeta, inactivada por calor y concentrada por centrifugación, para obtener un paquete celular al 4%.

4.2.2. Medios de producción. Medios de cultivo artificiales que permitan el crecimiento de la bacteria, concentrándose por centrifugación para obtener el paquete celular, que se estandarizará a una concentración del 4%.

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

4.2.3.1. Prueba de esterilidad. Esta prueba consiste en determinar que el producto está libre de cualquier contaminante y demostrar la inactivación del microorganismo empleado.

a) El análisis bacteriológico usando medios para crecimiento aerobio y anaerobio, deberá mostrar que el producto está exento de cualquier bacteria viva.

b) Deberán realizarse las pruebas necesarias a fin de demostrar que el producto está libre de hongos y levaduras.

4.2.3.2. Prueba de concentración de iones de hidrógeno. Deberá tener un pH no menor de 5.8 y no mayor de 6.2.

4.2.3.3. Prueba de determinación de fenol residual. Se utilizará una prueba colorimétrica. El resultado para considerarse satisfactorio deberá estar entre 0.3% a 0.5%.

4.2.3.4. Prueba de concentración celular. Por el método de Fitch Hoopkins deberá obtenerse una concentración celular del 4%.

4.2.3.5. Prueba de homogeneidad. Se realizará por el examen microscópico del antígeno para demostrar la pureza de la bacteria empleada, uniformidad celular y ausencia de autoaglutinación y de cuerpos extraños; éstas se efectuarán además de las pruebas bacteriológicas que se requieran a fin de comprobar que los microorganismos cumplen con las características señaladas en los manuales de referencia de la OPS y de la OIE.

4.2.3.6. Prueba de sensibilidad o avidez. La reactividad del antígeno deberá ser probada comparando la reacción de aglutinación con un antígeno de referencia de acuerdo al siguiente procedimiento:

- Se utilizarán 20 sueros de bovinos previamente identificados, que incluyan positivos a diferentes títulos (10) y negativos (10). Los sueros deberán ser sometidos a la acción de la solución de rivanol descrita en el punto 4.2.4., antes de utilizar el antígeno.

Para la lectura se utilizará el siguiente criterio:

Reacción completa (+): La mayor parte de las células de la mezcla suero antígeno son aglutinados, con presencia de grumos bien definidos. Valor 1 punto.

Reacción incompleta (I): Existe un grado intermedio de reacción de aglutinación, la presencia de grumos es incompleta. Valor ½ punto.

Reacción negativa (-): Una mezcla homogénea de suero antígeno, sin ninguna evidencia de aglutinación y sin grumos. Valor 0 puntos.

Los puntos obtenidos del antígeno serán comparados con los obtenidos del antígeno de referencia.

Para que la prueba sea considerada satisfactoria no deberá mostrar una diferencia mayor de tres (3) puntos, entre los antígenos, y no deberá existir una diferencia de un (1) punto (+) en alguno de los sueros.

Para efectos de constatación el elaborador y/o titular del registro, deberá asegurar las características arriba señaladas, durante todo el periodo de vigencia que ofrezca, por cada lote de producto que no será menor a 10 meses ni mayor a 22 y para muestras de retención, será hasta tres meses más posteriores a la caducidad indicada en la etiqueta del mismo.

4.2.4. Solución de rivanol. El antígeno descrito en el punto 4.2.3. deberá comercializarse simultáneamente con la solución de rivanol (lactato de 2-etoxi-6, 9-diamino acridina); pues este compuesto es indispensable para la realización de la prueba de aglutinación con rivanol.

4.3. Requisitos mínimos para el antígeno de *Brucella abortus* "Cepa 1119-3" para el diagnóstico mediante la prueba de anillo en leche.

4.3.1. Características del producto. Suspensión de células de *B. abortus* cepa 1119-3, coloreada con hematoxilina, inactivada por calor y concentrada por centrifugación, para obtener un paquete celular al 4%, para ser usada en el diagnóstico de la brucelosis mediante la prueba de anillo en leche.

4.3.2. Medios de producción. Medios de cultivo artificiales que permitan el crecimiento de la bacteria, concentrándose por centrifugación para obtener el paquete celular, que se estandarizará a una concentración del 4% como producto terminado.

4.3.3. Requisitos de prueba por cada lote de producto terminado, antes de que salga al mercado, el elaborador y/o el titular del registro deberá realizar las siguientes pruebas:

4.3.3.1. Prueba de esterilidad. Esta prueba consiste en determinar que el producto está libre de cualquier contaminante y demostrar la inactivación del microorganismo empleado.

a) El análisis bacteriológico, usando medios para crecimiento aerobio y anaerobio, deberá mostrar que el producto está exento de cualquier bacteria viva.

b) Deberán realizarse las pruebas necesarias a fin de demostrar que el producto está libre de hongos y levaduras.

4.3.3.2. Prueba de concentración de iones de hidrógeno. Deberá tener un pH no menor de 4.0 y no mayor de 4.3.

4.3.3.3. Prueba de determinación de fenol residual. Se utilizará una prueba colorimétrica. El resultado para considerarse satisfactorio deberá estar entre 0.3% a 0.5%

4.3.3.4. Prueba de concentración celular. Por el método de Fitch Hoopkins deberá obtenerse una concentración celular del 4%.

4.3.3.5. Prueba de homogeneidad. Se realizará por el examen microscópico del antígeno para demostrar la pureza de la bacteria empleada, uniformidad celular y ausencia de autoaglutinación y de cuerpos extraños; éstas serán efectuadas además de las pruebas bacteriológicas que se requieran, con el objeto de comprobar que los microorganismos cumplen con las características señaladas en los manuales de referencia de la OPS y de la OIE.

4.3.3.6. Prueba de sensibilidad o avidez. La reactividad del antígeno deberá ser probada comparando la reacción de aglutinación con un antígeno de referencia de acuerdo al siguiente procedimiento:

Se utilizarán 20 muestras de leche de vacas previamente identificadas, que incluya 10 positivas y 10 negativas; para la lectura de los resultados se utilizará el siguiente criterio:

Resultado positivo (+):

Columna de leche	Anillo de crema	Valor
Blanca Azul	4	
Ligeramente coloreada	Azul	3
Ligeramente coloreada	Ligeramente coloreado	2
Mismo color de la crema	Mismo color de la leche	1

Resultado negativo (-):

Columna de leche	Anillo de crema	Valor
Francamente coloreada	Blanco o ligeramente coloreado	0

Los puntos obtenidos del antígeno serán comparados con los obtenidos del antígeno de referencia.

Para que la prueba sea considerada satisfactoria no deberá existir ninguna diferencia entre los antígenos.

Para efectos de constatación, el elaborador y/o titular del registro, y deberá asegurar las características arriba señaladas, durante todo el periodo de vigencia que ofrezca, por cada lote de producto que no será menor a 10 meses ni mayor a 22 y para muestras de retención, será hasta tres meses más, posteriores a la caducidad indicada en la etiqueta del mismo.

4.4. Requisitos mínimos para el antígeno de *Brucella abortus* "Cepa 1119-3" para el diagnóstico mediante la prueba de fijación de complemento.

4.4.1. Características del producto. Suspensión de células de *B. abortus* cepa 1119-3, inactivada por calor y concentrada por centrifugación, para obtener un paquete celular al

4.5%, para ser usado en el diagnóstico de la brucelosis mediante la prueba de fijación del complemento.

4.4.2. Medios de producción. Medios de cultivo artificiales que permitan el crecimiento de la bacteria, concentrándose por centrifugación para obtener el paquete celular, que se estandarizará a una concentración del 4.5%.

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

4.4.3.1. Prueba de esterilidad. Esta prueba consiste en determinar que el producto está libre de cualquier contaminante y demostrar la inactivación del microorganismo empleado.

a) El análisis bacteriológico, usando medios para crecimiento aerobio y anaerobio, deberá mostrar que el producto está exento de cualquier bacteria viva.

b) Deberán realizarse las pruebas necesarias a fin de demostrar que el producto está libre de hongos y levaduras.

4.4.3.2. Prueba de concentración de iones de hidrógeno. Deberá tener un pH no menor de 6.8 y no mayor de 7.0.

4.4.3.3. Prueba de determinación de fenol residual. Se utilizará una prueba colorimétrica. El resultado para considerarse satisfactorio deberá estar entre 0.3% a 0.5%.

4.4.3.4. Prueba de concentración celular. Por el método de Fitch Hoopkins deberá obtenerse una concentración celular del 4.5%.

4.4.3.5. Prueba de homogeneidad. Se realizará por el examen microscópico del antígeno para demostrar la pureza de la bacteria empleada, uniformidad celular y ausencia de autoaglutinación y de cuerpos extraños; éstas se efectuarán además de las pruebas bacteriológicas que se requieran a fin de comprobar que los microorganismos cumplen con las características señaladas en los manuales de referencia de la OPS y de la OIE.

4.4.3.6. Prueba de sensibilidad o avidéz. La reactividad del antígeno deberá ser probada comparando la reacción de aglutinación con un antígeno de referencia de acuerdo al siguiente procedimiento:

Diluir la suspensión del antígeno original a una concentración celular equivalente al 0.045%. Esta dilución deberá realizarse cuando menos 12 horas antes de utilizarse y se conservará en refrigeración.

- Se utilizarán 20 sueros de bovinos previamente identificados, que incluyan positivos a diferentes títulos (10) y negativos (10).

Para la lectura se utilizará el siguiente criterio:

Aglutinación completa (+): La mayor parte de las células de la mezcla suero antígeno son aglutinadas, con presencia de grumos bien definidos. Valor 1 punto.

Aglutinación incompleta (I): Existe un grado intermedio de reacción de aglutinación, la presencia de grumos es incompleta. Valor ½ punto.

Reacción negativa (-): Una mezcla homogénea de suero antígeno, sin ninguna evidencia de aglutinación y sin grumos. Valor 0 puntos.

Los puntos obtenidos del antígeno serán comparados con los obtenidos del antígeno de referencia.

Para que la prueba sea considerada satisfactoria no deberá mostrar una diferencia mayor de tres (3) puntos, entre los antígenos y no deberá existir una diferencia de un (1) punto (+) en alguno de los sueros.

Para efectos de constatación, el elaborador y/o titular del registro deberá asegurar las características arriba señaladas, durante todo el periodo de vigencia que ofrezca, por cada lote de producto que no será menor a 10 meses ni mayor a 22 y para muestras de retención, será hasta tres meses más, posteriores a la caducidad indicada en la etiqueta del mismo.

4.4.4. El antígeno citado en el punto 4.4.1. deberá acompañarse de los siguientes reactivos, que son indispensables para la realización de la prueba de fijación del complemento:

4.4.4.1. Hemolisina. Suero hiperinmune de conejo anti-eritrocitos de carnero. Obtenido a partir de inmunización periódica vía intravenosa o subcutánea de uno o más conejos sanos con una suspensión de eritrocitos de carnero.

4.4.4.2. Complemento. Conjunto de sustancias de naturaleza proteica, contenido en una mezcla de sueros de cobayo que se une a un complejo de unión antígeno-anticuerpo.

4.4.4.3. Eritrocitos de carnero sensibilizados. Eritrocitos de carnero lavados, no hemolizados, combinados con hemolisina.

4.5. Requisitos mínimos para el antígeno de *Brucella ovis* para el diagnóstico de la epididimitis ovina mediante la prueba de inmunodifusión doble.

4.5.1. Características del producto. Extracto proteico a partir del procesamiento en solución salina caliente de células de *B. ovis* cepa REO 198, que contenga 45-65% de proteínas, mayoritariamente Grupo III de membrana externa; y 0.3 a 1.5% de KDO, correspondiente a un 10-55% de LPS-R.

4.5.2. Medios de producción. Medios de cultivo artificiales que permitan el crecimiento de la bacteria; que una vez cosechada se lava con suero salino frío, concentrándose por centrifugación para obtener el paquete celular que sirva para la extracción del antígeno. Las células se pesan y resuspenden en suero salino a una proporción final de 10% peso/volumen. La extracción se realiza en autoclave a vapor fluente a 100°C durante 15 minutos. Se enfría y centrifuga (12,000 g/15 min. a 4°C) y posteriormente se dializa de acuerdo al método de Myers.

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

4.5.3.1. Prueba de esterilidad. Esta prueba consiste en determinar que el producto está libre de cualquier contaminante y demostrar la inactivación del microorganismo empleado.

a) El análisis bacteriológico, usando medios para crecimiento aerobio y anaerobio, deberá mostrar que el producto está exento de cualquier bacteria viva.

b) Deberán realizarse las pruebas necesarias a fin de demostrar que el producto está libre de hongos y levaduras.

4.5.3.2. Prueba de sensibilidad o avidez. La reactividad del antígeno deberá ser probada comparando la reacción de aglutinación con un antígeno de referencia.

4.6. Requisitos mínimos para otros productos para el diagnóstico de brucelosis mediante otras pruebas no mencionadas.

4.6.1. Características del producto. El fabricante y/o titular del producto deberá especificar el tipo de producto del que se trata anotando las características fisicoquímicas del producto y sus medios de producción.

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

4.6.2.1. Prueba de pureza. En el proceso de producción deberán realizarse pruebas microscópicas para demostrar la pureza de la bacteria o componente empleado; éstas se efectuarán además de las pruebas bacteriológicas que se requieran a fin de comprobar que los microorganismos o sus fracciones cumplen con las características señaladas en los manuales de referencia de la OPS y de la OIE.

4.6.2.2. Prueba de esterilidad. Esta prueba consiste en determinar que el producto está libre de cualquier contaminante y, en su caso, demostrar la inactivación del microorganismo empleado.

a) El análisis bacteriológico, usando medios para crecimiento aerobio y anaerobio, deberá mostrar que el producto está exento de cualquier bacteria viva.

b) Deberán realizarse las pruebas necesarias a fin de demostrar que el producto está libre de hongos y levaduras.

4.6.2.3. Pruebas de concordancia. La reactividad del antígeno deberá ser probada comparando la reacción con la prueba de fijación de complemento, con la que se harán pruebas de concordancia y de sensibilidad, especificidad y valores predictivos negativo y positivo:

Prueba de concordancia:

Se aplicará la prueba estadística denominada "J de Jouden".

$J = (\text{Copositividad} + \text{Conegatividad}) - 1$

Copositividad = positivos en ambos / positivos del estándar

Conegatividad = negativos en ambos / negativo del estándar

Interpretación:

Concordancia completa $J = +1$

Concordancia mala $J = 0$

Sin concordancia $J = -1$

5. Requisitos mínimos de las vacunas para la prevención de la brucelosis

5.1. Requisitos mínimos generales de las vacunas para la prevención de la brucelosis:

5.1.1. Tanto los lotes de semilla como los lotes finales deberán someterse a los siguientes controles:

- Ausencia de contaminantes biológicos.
- Identidad con la cepa vacunal.
- Determinación de la tasa de disociación.

5.1.2. Cada lote de semilla deberá, además de lo marcado en el punto anterior, someterse a los controles siguientes:

- Virulencia residual (tiempo de persistencia 50%)
- Inmunogenicidad

5.1.3. Los lotes finales, además, serán sometidos a un control de viabilidad.

5.1.4. El control que se haga al lote de semilla deberá realizarse al menos cuatro meses antes de la fabricación del primer lote final. El control del lote final se hace un mes antes de su comercialización y puede hacerse durante su periodo de caducidad.

5.2. Requisitos mínimos para la vacuna de *Brucella abortus* "Cepa 19".

5.2.1. Características del producto. Cultivo vivo de colonias lisas de *Brucella abortus* "Cepa 19".

5.2.2. Medios de producción. Podrán utilizarse medios de cultivo artificiales y usuales que permitan el crecimiento de esta bacteria.

5.2.3. Requisitos de prueba: por cada lote de producto terminado, antes de que salga al mercado, el elaborador y/o titular del registro deberá realizar las siguientes pruebas:

5.2.3.1. Prueba de pureza: esta prueba consiste en determinar que el producto vacunal está libre de cualquier contaminante demostrable y que sólo contiene la cepa original.

- Deberán realizarse las pruebas necesarias a fin de demostrar microscópicamente la ausencia de contaminantes.

- El análisis bacteriológico cualitativo deberá mostrar que la vacuna contiene *Brucella abortus* cepa 19 y que se encuentra libre de bacterias contaminantes, utilizando medios para crecimiento aerobio y anaerobio.

Deberán realizarse las pruebas necesarias a fin de demostrar que el producto está libre de hongos y levaduras.

5.2.3.2. Prueba de viabilidad. La vacuna será reconstituida con el diluyente que la acompaña, de acuerdo a las instrucciones del laboratorio productor y se considerará como dilución 100.

Posteriormente, se harán diluciones seriadas logarítmicas decimales, en botellas que contengan 90 ml de caldo peptonado al 1%. Cada dilución se hará agitando durante 30 segundos la botella, evitando que se forme espuma. De cada dilución se inocularán 0.1 ml a cada una de 4 cajas de Petri, conteniendo medio de agar triptosa adicionado con extracto de

levadura al 1%, o agar papa, para el crecimiento del microorganismo. Posteriormente se incubarán a 37°C durante 96 horas.

La vacuna aprobada de dosis clásica, recomendada para becerras de 3 a 6 meses de edad, debe contener una cuenta total mínima de 2×10^{10} colonias de *Brucella abortus* por dosis de 5 ml y 8×10^{10} como máximo; con una variación permitida de ± 0.3 de logaritmo.

La vacuna de dosis reducida elaborada con la Cepa 19 para bovinos, debe contener una cuenta total mínima de 3×10^9 como máximo y 3×10^8 como mínimo, con una variación de ± 0.3 de logaritmo por dosis de 2 ml.

5.2.3.3. Prueba de disociación. Esta prueba puede realizarse con las colonias de bacterias obtenidas en la prueba de viabilidad o con el producto reconstituido de acuerdo a las indicaciones del laboratorio productor. En ambos casos, una asada se sembrará por estría cruzada en una caja de Petri, conteniendo agar triptosa e incubando a 37°C durante 96 horas pasado este tiempo se realizarán las tinciones con el colorante de White Wilson o la prueba de aglutinación con acriflavina.

La prueba se considerará satisfactoria cuando no exista aglutinación, grumos ni filamentos con la acriflavina, y en la prueba con el colorante de White Wilson ninguna colonia tome el color del reactivo y en caso de observarse colonias rugosas, intermedias o indeseables no deberá exceder del 5% de colonias rugosas, de intermedias rugosas o mucoides.

Para efecto de comprobación, a nivel mercado, el elaborador y/o titular del registro deberá asegurar el grado de protección y una cuenta viable adecuada de colonias por dosis, durante todo el periodo de vigencia que ofrezca por cada lote de producto, desde su fecha de elaboración y hasta 3 meses más posteriores a la caducidad, indicada en la etiqueta, para muestras de retención.

5.2.3.4. Prueba de vacío. Esta prueba se debe realizar en un cuarto oscuro, empleando el aparato de Tessler, 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.

5.2.3.5. Prueba de concentración de iones hidrógeno. Para estas vacunas deben tener un pH no menor de 6.5 y no mayor de 6.8.

5.2.3.6. Prueba de humedad. Esta prueba consiste en determinar el porcentaje de humedad que tiene la vacuna liofilizada, que debe ser igual o menor del 4%; se puede determinar por los métodos de Alderhalden, Karl Fischer o termogravimétrico.

5.3. Requisitos mínimos para la vacuna de *Brucella melitensis* "Cepa REV-1".

5.3.1. Características del producto. Cultivo vivo de colonias lisas de *Brucella melitensis* "Cepa REV 1".

5.3.2. Medios de producción. Podrán utilizarse medios de cultivo artificiales y usuales que permitan el crecimiento de esta bacteria.

5.3.3. Requisitos de prueba: por cada lote de producto terminado, antes de que salga al mercado, el elaborador y/o titular del registro deberá realizar las siguientes pruebas:

5.3.3.1. Prueba de pureza: esta prueba consiste en determinar que el producto vacunal está libre de cualquier contaminante vivo o activo demostrable y que sólo contiene la cepa original.

- Deberán realizarse las pruebas necesarias a fin de demostrar microscópicamente la ausencia de contaminantes.

- El análisis bacteriológico cualitativo deberá mostrar que la vacuna contiene *Brucella melitensis* cepa REV-1 y que se encuentra libre de bacterias contaminantes, utilizando medios para crecimiento aerobio y anaerobio.

Deberán realizarse las pruebas necesarias a fin de demostrar que el producto está libre de hongos y levaduras.

5.3.3.2. Prueba de viabilidad. La vacuna será reconstituida con el diluyente que la acompaña de acuerdo a las instrucciones del laboratorio productor y se considerará como dilución 100. Posteriormente, se harán diluciones logarítmicas decimales, en botellas que contengan 90 ml de caldo peptonado al 1%. Cada dilución se hará agitando durante 1 minuto la botella, evitando que se forme espuma. De cada dilución se inocularán 0.1 ml a cada una de 4 cajas de Petri, conteniendo medio de agar triptosa, para el crecimiento del microorganismo.

Posteriormente, se incubarán a 37°C durante 96 horas.

La vacuna aprobada de dosis clásica, recomendada para cabritas y corderas de 2 a 3 meses de edad, debe contener una cuenta total mínima de $1 \text{ a } 3 \times 10^9$ colonias de *Brucella melitensis* por dosis; con una variación permitida de ± 0.3 de logaritmo.

La vacuna en dosis reducida de la cepa REV 1 para ovejas y cabras, debe contener una cuenta total mínima de $5 \text{ a } 10 \times 10^4 \pm 0.3$ de logaritmo por dosis.

5.3.3.3. Prueba de disociación. Esta prueba puede realizarse con las colonias de bacterias obtenidas en la prueba de viabilidad o con el producto reconstituido de acuerdo a las indicaciones del laboratorio productor. En ambos casos, una asada se sembrará por estría cruzada en una caja de Petri, conteniendo agar triptosa e incubando a 37°C durante 96 horas; pasado este tiempo, se realizarán las tinciones con el colorante de White Wilson, o la prueba de aglutinación con acriflavina.

La prueba se considerará satisfactoria cuando no exista aglutinación, grumos, ni filamentos con la acriflavina y en la prueba con el colorante de White Wilson ninguna colonia tome el color del reactivo, y en caso de observarse colonias rugosas, intermedias o indeseables no deberá exceder del 5% de colonias rugosas, de intermedias rugosas o indeseables.

Para efecto de comprobación, a nivel mercado, el elaborador y/o titular del registro deberá asegurar el grado de protección y una cuenta viable adecuada de colonias por dosis, durante todo el periodo de vigencia que ofrezca por cada lote de producto, desde su fecha de elaboración y hasta 3 meses más posteriores a la caducidad, indicada en la etiqueta, para muestras de retención.

5.3.3.4. Prueba de vacío. Esta prueba se debe realizar en un cuarto oscuro, empleando el aparato de Tessler, 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.

5.3.3.5. Prueba de concentración de iones hidrógeno. Para estas vacunas deben tener un pH no menor de 6.5 y no mayor de 6.8.

5.3.3.6. Prueba de humedad. Esta prueba consiste en determinar el porcentaje de humedad que tiene la vacuna liofilizada, que debe ser igual o menor del 4%; se puede determinar por los métodos de Alderhalden, Karl Fischer o termogravimétrico.

5.4. Requisitos mínimos para otros productos para la inmunización contra *Brucella* spp.

5.4.1. Características del producto. En el caso de productos elaborados con células bacterianas completas: cultivo vivo de colonias puras de *Brucella* spp. de una cepa reconocida por laboratorios internacionales de referencia como cepa vacunal. En el caso de otros productos se someterá a evaluación específica por parte de la Secretaría.

5.4.1.1. Medios de producción. Podrán utilizarse medios de cultivo artificiales y usuales que permitan el crecimiento de esta bacteria; o los que la Secretaría especifique para productos no bacterianos.

5.4.1.2. Requisitos de prueba: por cada lote de producto terminado, antes de que salga al mercado, el elaborador y/o titular del registro deberá realizar las siguientes pruebas:

Prueba de pureza: esta prueba consiste en determinar que el producto vacunal está libre de cualquier contaminante demostrable y que sólo contiene la cepa original.

- Deberán realizarse las pruebas necesarias a fin de demostrar microscópicamente la ausencia de contaminantes.

- El análisis bacteriológico cualitativo deberá mostrar, en su caso, que la vacuna contiene alguna cepa reconocida como vacunal de *Brucella* spp. y que se encuentra libre de bacterias contaminantes, utilizando medios para crecimiento aerobio y anaerobio.

Deberán realizarse las pruebas necesarias a fin de demostrar que el producto está libre de hongos y levaduras.

5.4.2. Requisitos mínimos para la vacuna de *Brucella abortus* cepa RB51.- Características del producto: cultivo vivo de colonias rugosas de *Brucella abortus* RB51.

5.4.2.1. Medios de producción: podrán utilizarse aquellos medios de cultivo que permitan el crecimiento en cantidad suficiente de esta bacteria.

5.4.2.2. Requisitos de prueba: para cada lote de producto terminado antes de salir al mercado, el elaborador y/o titular del registro, debe realizar las siguientes pruebas:

Prueba de pureza: esta prueba consiste en determinar que el producto vacunal está libre de cualquier contaminante y que sólo contiene la cepa original.

Se deben realizar las pruebas necesarias a fin de mostrar microscópicamente la ausencia de contaminantes.

Se debe demostrar la presencia de *Brucella abortus* cepa RB51 mediante análisis bacteriológico cualitativo, asimismo que se encuentra libre de bacterias contaminantes con la utilización de medios aeróbicos y anaeróbicos y libre de hongos y levaduras.

5.4.2.3. Prueba de viabilidad: la vacuna será reconstituida con el diluyente recomendado por el laboratorio productor y ésta será considerada como dilución 0.

En botellas que contengan 90 ml de caldo peptonado al 1%, se deben hacer diluciones logarítmicas decimales seriadas.

Cada dilución se debe hacer al agitar la botella 30 segundos, evitando que se forme espuma; de cada dilución se inoculará 0.1 ml en cada una de cuatro cajas de Petri que contengan medio agar triptosa o medio agar papa adicionada con extracto de levadura al 1%.

Posteriormente se incuban a 37°C a no menos de 48 ni más de 72 horas.

La lectura final será un promedio de las cuatro cajas sembradas por dilución.

La vacuna para ser utilizada en becerras de 4 a 11 meses de edad, debe contener una cuenta total mínima de 1×10^{10} y máxima de 3×10^{10} unidades formadoras de colonias por dosis de 2 ml con una variación permitida de ± 0.3 de logaritmo.

La vacuna recomendada para hembras de más de 11 meses de edad debe contener una cuenta total mínima de 1×10^9 y máxima de 3×10^9 unidades formadoras de colonias por dosis de 2 ml con una variación permitida de ± 0.3 de logaritmo.

5.4.2.4. Prueba de rugosidad o estabilidad "in vitro": esta prueba se lleva a cabo en una caja de Petri que contenga agar triptosa en la que se siembra por estría cruzada la muestra a probar.

La caja se incuba a no menos de 48 horas ni más de 72 horas.

Procedimiento:

1. Suspender la vacuna en agua destilada estéril.

2. Incubar a 37°C (para favorecer la autoaglutinación), separar el sobrenadante sin centrifugar; es de esperarse que en el sedimento estén las bacterias que están en fase R y que autoaglutinaron.

3. Realizar diluciones del sobrenadante de 101 a 1010 y colocar gotas de cada una de ellas de 10 y 20 microlitros y por duplicado en una caja de Petri con medio de cultivo e incubar por tres días.

4. Realizar la tinción de las colonias por el método de White Wilson: las colonias rugosas se tiñen de azul, el 100% de las colonias debe ser rugoso. Se debe comparar siempre con un cultivo de *Brucella abortus* cepa 2308 en fase lisa, la cual debe ser 100% negativa. Se deben contar idealmente 300 colonias siendo el mínimo 200.

5. De una de las colonias que se haya presentado crecimiento confluyente, tomar una asada de la colonia y mezclar con una gota de acriflavina en una laminilla de vidrio, mezclar y determinar la autoaglutinación.

5.4.2.5. Para efectos de aseguramiento de calidad a nivel mercado, el elaborador y/o titular del registro, debe asegurarse de que la cuenta viable por dosis permitida durante todo el periodo de vigencia que se ofrezca por cada lote de producto, se conserve la calidad de la vacuna desde su fecha de elaboración hasta tres meses después de la fecha de expiración indicada en la etiqueta de las muestras de retención.

5.4.2.6. Prueba de estabilidad "in vivo" y atenuación.- Inocular dos ratones (BALB-C de preferencia) con 3×10^{10} células de RB51 en solución salina fisiológica estéril, por vía intraperitoneal. Sacrificar un ratón a las tres semanas, obtener el bazo, macerarlo con 2 ml de caldo soya tripticasa. Cultivar en una caja con medio de cultivo, colocando gotas de 20 microlitros de la suspensión, así como gotas de tres diluciones del macerado por duplicado. Cuando hay crecimiento significa que la cepa no está demasiado atenuada. Se tiñen con el método de White Wilson. Se espera que todas las colonias sean rugosas, es decir, que no revirtieron "in vivo".

El segundo ratón se sacrifica a las 5 semanas. Se espera encontrar menos de 100 unidades formadoras de colonias en el bazo. Se confirma la atenuación de la cepa.

5.4.2.7. Prueba de potencia y serología.- Se utilizarán dos grupos de siete ratones BALB-C cada uno. A un grupo se le vacuna con 3×10^{10} unidades formadoras de colonias de RB51 vía intraperitoneal, al otro grupo se le inocula solución salina estéril. Dos animales de cada grupo son sangrados a los 21 días post-inoculación y se les corren las pruebas de rutina para brucelas lisas. Seis o siete semanas post-inoculación, cinco ratones de cada grupo se desafían con 5×10^4 unidades formadoras de colonias de *Brucella abortus* cepa 2308 vía intraperitoneal. El volumen de inoculación tanto de la vacuna, la solución salina y el desafío no debe ser menor de 0.1 ml ni mayor de 0.8 ml. Posteriormente, dos semanas después del desafío se sacrifican los ratones, se examinan los bazos bajo condiciones de esterilidad, se maceran con solución salina estéril y se hacen diluciones. Se siembran en una placa con medio de cultivo y se incuban por 48 horas, se cuentan las colonias y se calculan las unidades formadoras de colonias. Los vacunados deben dar un título de por lo menos 0.9 logaritmo base 10 de unidades formadoras de colonias menos por bazo que los del grupo 2.

6. Productos importados

Cuando los antígenos, reactivos, biológicos y vacunas sean de importación, deberán cumplir con lo señalado en esta Norma, así como los demás requisitos que se establezcan en otras disposiciones sobre la materia.

7. Sanciones

El incumplimiento a 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.

8. Concordancia con normas internacionales

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

9. Bibliografía

- Alton, G.G., Jones, L.M., Angus, R.D. & Verger, J.M.: Techniques for the brucellosis laboratory. INRA, París, 1988.
- Crespo-León, F.: Brucelosis ovina y caprina. Office International des Epizooties, París, 1994.
- Department of Health, Ministry of Agriculture, Fisheries and British Pharmacopoeia (Veterinary) 1993. HMSO, United Kingdom, 1993.

- Garin-Bastuji, B.: Contrôle officiel du vaccin Rev. 1 en France. Modalités-Critères-Sanction., Laboratoire National de Référence des Brucelloses Animales, CNEVA, Maisons-Alfort, France.

- Office International des Epizooties: Brucellosis in sheep, goats and swine (B23,54,52). in Manual. O.I.E., París, 1992.

- World Health Organization: Joint FAO/WHO Expert Committee on Brucellosis. WHO, Technical Report Series No. 740, Geneva, 1986.

10. Disposiciones transitorias

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

Sufragio Efectivo. No Reelección.

México, D.F., a 10 de septiembre de 1997.- El Director General Jurídico, Roberto Zavala Echavarría.- Rúbrica.