

06-29-98 NORMA Oficial Mexicana NOM-055-ZOO-1995, Requisitos mínimos para la elaboración de vacunas emulsionadas inactivadas contra la influenza aviar subtipo H5N2.

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

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-055-ZOO-1995, REQUISITOS MINIMOS PARA LA ELABORACION DE VACUNAS EMULSIONADAS INACTIVADAS CONTRA LA INFLUENZA AVIAR SUBTIPO H5N2

JORGE MORENO COLLADO, 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 I 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 Influenza Aviar, afectan a la avicultura nacional, tanto en su nivel de producción como en la calidad de sus productos.

Que la Influenza Aviar (IA) altamente patógena, es una enfermedad viral, contagiosa y letal que afecta a las aves domésticas y silvestres, porque es causa de una alta morbilidad y mortalidad.

Que los virus de baja patogenicidad pueden sufrir mutaciones hacia una alta patogenicidad, lo cual podría ocasionar mortalidades hasta del 100% de las aves en las granjas infectadas.

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 las aves mediante vacunas contra la influenza aviar.

Que para proteger a la avicultura nacional contra la influenza aviar, es necesario estandarizar los requisitos mínimos para la producción de vacunas empleadas en la prevención y control de esta enfermedad, a fin de garantizar que su producción sea de la más alta calidad.

Que por los motivos señalados en los párrafos anteriores, con fecha 13 de agosto de 1997, se publicó en el Diario Oficial de la Federación el Proyecto de Norma Oficial Mexicana NOM-055-ZOO-1995, Requisitos mínimos para la elaboración de vacunas empleadas en la prevención, control y erradicación de la influenza aviar, iniciando con ello el trámite a que se refieren los artículos 45, 46 y 47 fracción I de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, por lo que con fecha 4 de mayo de 1998, se publicó en el mismo órgano las respuestas a los comentarios recibidos en relación a dicho Proyecto.

Que en virtud de este proceso legal, se modificaron los diversos puntos del proyecto inicial que resultaron procedentes y por lo cual se expide la presente Norma Oficial Mexicana NOM-055-ZOO-1995, Requisitos mínimos para la elaboración de vacunas emulsionadas inactivadas contra la influenza aviar subtipo H5N2.

INDICE

1. Objetivo y campo de aplicación
2. Referencias
3. Definiciones y abreviaturas
4. Requisitos mínimos para la elaboración y control de calidad de vacuna inactivada contra la influenza aviar, emulsionada
5. Vacuna inactivada de influenza aviar combinada, emulsionada
6. Sanciones

7. Concordancia con normas internacionales
8. Bibliografía
9. 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 uniformar los requisitos mínimos que deben cumplir las vacunas, antígenos y reactivos empleados en la prevención y control de la influenza aviar. Es aplicable a este tipo de productos que se fabriquen en México o se importen.

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 es necesario consultar las siguientes normas oficiales mexicanas:

NOM-003-ZOO-1994, Criterios para la operación de laboratorios de 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-029-ZOO-1995, Características y especificaciones para las instalaciones y equipo de laboratorios de pruebas y/o análisis en materia zoosanitaria.

NOM-044-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Influenza Aviar.

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

NOM-030-SCFI-1993, Información comercial-Declaración de cantidad en la etiqueta-Especificaciones.

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 ser utilizada en la evaluación de la respuesta inmune "in vitro".

3.2. Antisuero AntiH5: antisuero reconocido por la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural.

3.3. Inmunogenicidad: prueba de control de calidad para asegurar que un producto estimula la formación de un título mínimo de anticuerpos contra influenza aviar, medido a través de una técnica establecida.

3.4. Aseguramiento de la calidad: conjunto de actividades necesarias para asegurar que los productos cumplan con las características requeridas para su uso.

3.5. Biológico: todo producto elaborado a partir de organismos vivos, sus componentes o productos de su metabolismo, que se emplean para el diagnóstico y prevención de la influenza aviar.

3.6. Campaña: la Campaña Nacional contra la Influenza Aviar.

3.7. Cepa aprobada: virus de influenza aviar que ha sido autorizado por la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, para ser empleado en la producción de vacunas, antígenos y/o reactivos de diagnóstico.

3.8. Control: conjunto de medidas zoosanitarias que tiene por objeto disminuir la incidencia y prevalencia de la influenza aviar en un área geográfica determinada.

3.9. Diagnóstico: identificación de la enfermedad de influenza aviar mediante datos clínicos y pruebas de laboratorio.

- 3.10. DIEP: Dosis Infectante Embrión de Pollo 50%.
- 3.11. Dosis: cantidad recomendada en la etiqueta del producto para ser administrada en el animal.
- 3.12. Dirección: Dirección General de Salud 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 o embalajes.
- 3.15. Inactivación viral: prueba de control de calidad para asegurar que el virus de influenza aviar del lote de un producto biológico ha sido inactivado.
- 3.16. E.I.A.: Enfermedad de la Influenza Aviar.
- 3.17. Fecha de caducidad: fecha asignada al lote de un producto, que designa el término del periodo en que puede aplicarse.
- 3.18. I.A.: Influenza Aviar.
- 3.19. Laboratorio de producción aprobado: laboratorio autorizado por la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, para la producción de los biológicos utilizados en la prevención y diagnóstico de la Campaña Nacional contra la Influenza Aviar.
- 3.20. Laboratorio de control de calidad: laboratorio autorizado por la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, que verifica que los productos biológicos utilizados en la prevención y diagnóstico de la Campaña Nacional contra la Influenza Aviar, cumplan con las especificaciones establecidas por esta Norma.
- 3.21. Lote: cantidad de producto biológico, elaborado bajo condiciones equivalentes de operación y durante un periodo determinado.
- 3.22. Médico veterinario aprobado: profesional autorizado por la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, para la realización de actividades específicas establecidas en la misma autorización.
- 3.23. Número de lote: cualquier combinación de letras, números o símbolos, que sirven para la identificación de un lote y bajo el que se amparan todos los documentos referentes a su manufactura y control.
- 3.24. Potencia: prueba de constatación para asegurar que un producto biológico es capaz de estimular una respuesta inmune suficiente para evitar que las aves susceptibles enfermen de influenza aviar, la que se expresará en porcentaje de protección, de acuerdo a lo establecido en esta Norma.
- 3.25. Producto liberado: es aquel que aprobó satisfactoriamente el total de las pruebas de control de calidad y/o de constatación y que está listo para su comercialización.
- 3.26. Protocolo de manufactura: conjunto de procedimientos de buenas prácticas de manufactura que garanticen la calidad exigida por los requisitos mínimos de esta Norma, en los productos biológicos empleados en la Campaña Nacional contra la Influenza Aviar.
- 3.27. Protocolo de garantía de calidad: conjunto de procedimientos de buenas prácticas de manufactura y de laboratorio, que garanticen la calidad en las pruebas empleadas para la verificación y aprobación de los productos biológicos empleados en la Campaña Nacional contra la Influenza Aviar.
- 3.28. Producto regulado: producto bajo control de la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural.
- 3.29. Secretaría: Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural.
- 3.30. Seguridad o inocuidad: prueba de control de calidad y/o de constatación para asegurar que un producto no cause reacciones adversas atribuibles al mismo.
- 3.31. Semilla maestra: cepa de virus de influenza aviar autorizada, identificada, seleccionada y almacenada permanentemente a un nivel de pasaje específico, empleada para la producción de semilla de trabajo.

3.32. Semilla de trabajo: cepa de virus de influenza aviar elaborada a partir de la semilla maestra, identificada, seleccionada y almacenada permanentemente a un nivel de pasaje específico, empleada para la producción de vacuna.

3.33. S.S.F.: Solución Salina Fosfatada.

3.34. Titulación: prueba de control de calidad para asegurar que los lotes producidos contienen la cantidad de virus de influenza aviar, establecido en esta Norma.

3.35. Técnicas: conjunto de procedimientos empleados para la elaboración y control de calidad de los productos biológicos utilizados en la Campaña Nacional contra la Influenza Aviar.

3.36. U HA: Unidades Hemaglutinantes.

3.37. Vacuna: preparación del virus de la influenza aviar H5N2, que introducida en el organismo animal produce en éste la inmunización contra la influenza aviar.

3.38. Vacuna emulsionada: es un inmunógeno inactivado por medios físicos o químicos para perder su capacidad infectiva, el cual ha sido mezclado en una fase oleosa para liberarlo lentamente con el objeto de establecer un estímulo antigénico prolongado.

3.39. Vacuna recombinante: es una vacuna en donde el genoma de un microorganismo es sometido a manipulación genética para ser insertado a uno o varios genes de uno o varios organismos y que son responsables de brindar protección para prevenir las enfermedades de los mismos.

4. Requisitos mínimos para la elaboración y control de calidad de vacuna inactivada contra la influenza aviar, emulsionada

Las vacunas contra la influenza aviar que sean importadas o producidas en el país, deben cumplir con lo establecido en esta Norma y en la Norma Oficial Mexicana NOM-044-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Influenza Aviar y demostrar por medio de pruebas de laboratorio y/o las correspondientes constancias documentales que cumplen con los siguientes requisitos mínimos.

4.1. Semilla maestra:

Virus de influenza aviar tipo A, subtipo H5N2.

Cepa: A/CHICKEN/MEXICO/232/94/CPA, avirulenta.

Procedencia: Comisión México - Estados Unidos de América para la Prevención de Fiebre Aftosa y otras Enfermedades Exóticas.

Mantenimiento y/o almacenaje.

La semilla se conserva a -70°C , estabilizada con 50% de estabilizante sacarosa, fosfatos de sodio, monoglutamato de sodio y albúmina sérica bovina fracción 5 estéril.

4.2 Semilla trabajo:

Los viales de semilla de trabajo elaborados por la Productora Nacional de Biológicos Veterinarios, serán de uso exclusivo para la producción de vacuna, al aumentar el número de pases existe el riesgo potencial de que la cepa viral pierda sus características originales, modificando su inmunogenicidad y potencia y no se permiten pases de la semilla de trabajo.

Mantenimiento y/o almacenaje.

La semilla se conserva a $-70^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$, estabilizada con 50% de estabilizante sacarosa, fosfatos de sodio, monoglutamato de sodio y albúmina sérica bovina fracción 5 estéril.

- Pruebas de control de calidad a la semilla de trabajo:

Identidad: mediante pruebas serológicas, empleando sueros específicos.

La semilla de trabajo debe dar reacción positiva a antisueros específicos ANTI H5N2.

Esterilidad: mediante inoculación en medios para desarrollo de bacterias, hongos y mycoplasma, caldo soya tripticaseína, caldo tioglicolato y caldo Sabouraud, dextrosa y caldo PPLO.

Estos medios de cultivo se incuban por grupos a tres temperaturas: ambiente ($18 - 24^{\circ}\text{C}$), 30°C y 37°C , durante 14 días.

No debe observarse desarrollo de bacterias, hongos y mycoplasmas, en los medios de cultivo empleados.

Titulación: se efectúa en embriones de pollo libres de patógenos específicos de 9 días de edad, usando diluciones décuples de 1 a 10 de la semilla maestra. Se inoculan las diluciones a partir de 10-6, 10-7, 10-8, 10-9 y 10-10, con 0.2 ml/embrión vía cavidad alantoidea. Se eliminan los embriones muertos a las 24 horas (si en éstos se observa que presentan hemaglutinación se considerarán positivos), los embriones se incuban a 37°C, durante 96 horas; el líquido alantoideo de cada dilución se somete a prueba de hemaglutinación. Se anotan los resultados de embriones positivos y negativos y la DIEP 50%, se calcula por el método de Spermann-Karber o Reed y Muench.

El título mínimo de virus de influenza aviar debe ser de por lo menos 109 DIEP 50%/ml.

4.3. Producción:

Se emplean embriones de pollo de 8 a 10 días de edad, libres de los patógenos como *Salmonella* spp., *Mycoplasma gallisepticum* y virus de influenza aviar.

La semilla de trabajo se diluye 1:1,000, los embriones se inoculan con 0.2 ml de la dilución en la cavidad alantoidea y se incuban a 37°C durante 72 horas, lo que equivale a 105.0 -105.4 DIE/dosis a 1:2500.

4.4. Cosecha:

Los fluidos deben ser cosechados de acuerdo a las buenas prácticas de manufactura que permitan una cosecha libre de contaminantes y de material de la yema.

Del granel, se toman muestras representativas para pruebas de control de calidad:

- Identidad:

La cosecha debe dar una reacción positiva a antisueros específicos anti H5 de referencia.

- Titulación:

El título de virus de influenza aviar será de: 108.7- 109.0 DIEP 50%/ml y/o un mínimo de 32 U HA.

4.5. Inactivación:

El granel resultante de la cosecha se inactiva con un volumen de solución amortiguada de betapropiolactona al 0.25% por nueve volúmenes de fluido, para obtener una concentración final del 0.025%, equivalente a una dilución 1:4,000.

Se puede utilizar como inactivante el formaldehído de 0.1 a 0.2% v/v, el uso de otros inactivantes como la etilenamina binaria será autorizado por la Dirección y conforme a buenas prácticas de manufactura.

Se toman muestras representativas para pruebas de control de calidad:

Inactivación: se hace con 13 embriones de 9-11 días de edad, libres de patógenos específicos, inoculando 0.2 ml del virus inactivado. Incubar durante 7 días, eliminar embriones muertos a las 24 horas, deberán ajustarse a 10 embriones. Vigilar mortalidad hasta los 7 días, haciendo HA, si no hemaglutinan cosechar los fluidos y congelar. A los 7 días a los embriones vivos se les hace el mismo procedimiento que a los muertos y se vuelven a inocular otra serie de 13 embriones de los fluidos colectados de los embriones vivos del primer pasaje y 13 embriones los fluidos colectados de los embriones muertos del primer pasaje, se sigue el mismo procedimiento. Al final del segundo pasaje no debe existir hemaglutinación en ningún embrión.

- Esterilidad:

No debe observarse desarrollo de bacterias y hongos en los medios de cultivo empleados.

4.6. Emulsificación del fluido viral inactivado:

El granel inactivado y estabilizado se emulsifica, inicialmente formulando la fase acuosa, como sigue:

Fluido alantoideo 16.0%

TWEEN 80 1.0%

Agua destilada* 10.0%

La fase oleosa previamente formulada:

Vaselina nf 55 70.0%

SPAN 80 3.0%

- Se toman muestras representativas para pruebas de control de calidad.
- El laboratorio productor puede utilizar otro tipo de emulsiones, siempre y cuando garantice una emulsión estable.
- Esterilidad:

No debe observarse desarrollo de bacterias y hongos en los medios de cultivo empleados.

- Inocuidad o seguridad:

Se inoculan por vía subcutánea 10 aves de 3 a 4 semanas con una doble dosis de vacuna equivalente a 1.0 ml y se dejan 10 controles, se observan durante 21 días. Los animales no deben presentar signos de la enfermedad atribuibles al producto.

- Inmunogenicidad:

Se inoculan por vía subcutánea 10 aves de 3 a 4 semanas de edad y libres de anticuerpos contra la I.A. con una dosis de vacuna de 0.5 ml, a los 14-21 días se sangran y se obtiene suero, el cual se somete a prueba de inhibición de la hemaglutinación. Se anotan los títulos obtenidos y se reporta el promedio de los mismos.

- Por lo menos 80% de las aves deben presentar un título de anticuerpos mínimo de 1:10, a 14 días post-inoculación. A los 21 días el total de animales darán reacción positiva, con un título mínimo de 1:10.

Prueba de la hemaglutinación (HA) e inhibición de la hemaglutinación (IH) para el control de calidad de la vacuna.

- Objetivo:

Identificar el virus de la I.A.

Generalidades de las pruebas.

Equipo e instrumentos:

- Agitador para microplacas.
- Microaglutinoscopio.
- Potenciómetro o tiras de papel indicador de pH.
- Cronómetro.

Materiales:

- Microplacas con fondo en "u".
- Microplacas con fondo plano.
- Pipeta multicanales con volumen ajustable de 25 a 50 µl.
- Pipeta multicanales con volumen ajustable de 100 a 200 µl.
- Puntas para micropipeta.
- Contenedores de plástico para reactivos.

Reactivos y soluciones:

S.S.F. con un pH de 7.2 a 7.4

Diluyente para el antígeno: se emplea la S.S.F. adicionada con 0.02% de albúmina sérica bovina.

Anticoagulante de Alseaver.

Biológicos:

Eritrocitos de pollo lavados a una concentración final de 0.5% en S.S.F.

Suero testigo positivo contra el serotipo de virus que se utiliza en la prueba.

Antígeno viral (H5N2) inactivado.

Preparación del antígeno:

- a) Inocular huevos embrionados de pollo de 9 a 11 días de edad con 0.1 ml de una dilución 10-3 de la cepa viral con el pase autorizado por la Secretaría por la vía de la cavidad alantoidea.
- b) Incubar los huevos inoculados a 35-36°C por 3 días, revisarlos diariamente; descartar los muertos dentro de las primeras 24 horas. Los embriones muertos después de las primeras 24 horas y los que viven aún al tercer día, se refrigeran a 4°C durante toda la noche cosechando el fluido alantoamniótico (FAA) de todos los huevos con embriones vivos o muertos.
- c) Inactivar el virus con betapropiolactona (BPL) a una concentración final de 0.01% por 2 horas a temperatura ambiente, después dejar toda la noche a 4°C. La suspensión de virus debe ser agitada o mezclada constantemente durante todo el proceso de inactivación.
- Nota: la BPL es un carcinógeno y debe ser manejada cuidadosamente.
- d) Después de la inactivación, ajustar el pH del FAA de 7.0 a 7.2 usando bicarbonato de sodio al 10% usualmente se requieren de 1-2 ml/100 ml de FAA.
- e) Comprobar la ausencia de virus viable en el FAA inoculando huevos embrionados de pollo, con una dilución generalmente 1:10 de la preparación viral inactivada.
- f) Centrifugar el antígeno a 1500g por 30 minutos para eliminar los precipitados que puedan haberse formado durante el proceso de inactivación.

Condiciones ambientales:

Temperatura ambiental ideal de 18 a 22°C con medidas de bioseguridad.

- Procedimiento para la prueba de hemaglutinación (HA) para la titulación del antígeno.

El principio de la HA se basa en la capacidad de la hemaglutinina (una de las dos glicoproteínas presentes en la superficie de los ortomixovirus) de unirse a receptores que se encuentran en la membrana de los eritrocitos.

La HA se produce cuando la proporción de la hemaglutinina viral y la de eritrocitos es equivalente, permitiendo la unión de varios eritrocitos adyacentes a una unidad de hemaglutinina. Esto tiene por objeto detectar y cuantificar la presencia de virus hemaglutinantes provenientes de aislamientos, propagados en huevos embrionados o en cultivos celulares.

- Colocar 50 µl de diluyente para el virus en cada uno de los 12 pozos de dos filas de una microplaca con fondo en "u" para la realización de la prueba por duplicado.

- Agregar 50 µl del diluyente en el primer pozo de cada fila.

- Utilizando micropipeta o microdiluidores de 50 µl, se efectúan diluciones logaritmo base 2 seriadas (de 1:2 a 1:1024) del antígeno de los pozos 1 al 10, dejando los 2 últimos de cada fila sin antígeno para que sirvan como control de eritrocitos.

- Agregar 50 µl de la suspensión de eritrocitos al 0.5% a cada pozo y agitar la microplaca para mezclar los reactivos.

- Cubrir la microplaca e incubar a temperatura ambiente. Realizar la lectura hasta que se forme un botón bien delimitado en el fondo de los pozos testigo de eritrocitos.

Interpretación de la titulación:

El punto final de la titulación está en la dilución más alta del antígeno en la que exista el 100% de hemaglutinación. Se considera que en esta dilución existe una unidad hemaglutinante (U HA).

La dilución conteniendo las U HA deseadas del antígeno se determina dividiendo el punto final de la HA entre el número de unidades que se busca.

Preparación de las muestras de suero.

Identificar con exactitud las muestras problema que se someterán a la prueba.

Diluir los sueros en una microplaca con fondo plano identificada como "placa de la dilución inicial" dilución 1:5, depositando en todos los pozos 100 µl de S.S.F. y, posteriormente, depositar 25 µl de cada suero en el pozo respectivo, siguiendo el orden secuencial de las muestras.

Ejemplo: en el pozo a1 colocar el suero número 1; en el pozo a12 el suero número 12; en el pozo b1 el suero número 13 y así sucesivamente hasta el pozo h12 en el cual se colocará el suero número 96.

- Prueba de la inhibición de la hemaglutinación (IH).

La IH es la interacción de anticuerpos específicos con la hemaglutinina viral homóloga, evitando la aglutinación de los eritrocitos de pollo por el virus de la I.A.

Procedimiento para la prueba.

- Con una micropipeta de 12 canales, transferir 25 µl de las muestras procesadas en cualquiera de las formas antes mencionadas, a la línea de pozos a1 al a12 de la "microplaca de la dilución inicial" dilución 1:5 a la primera línea de pozos de una microplaca con fondo en "u" en la que se efectuará la prueba y en la que previamente se hayan colocado 25 µl de S.S.F. en todos los pozos para la realización de dos diluciones dobles seriadas.

- Se mezclan las muestras y se transfieren 25 µl de los pozos de la línea a a la b, se mezclan nuevamente y se descartan 25 µl. En la línea a la dilución quedará 1:10 y en la línea b será 1:20.

- Esta operación se repite con los demás sueros empleando 2 pozos por cada suero. En cada microplaca de prueba se debe colocar un suero positivo y eritrocitos únicamente con S.S.F., como testigos.

- Una vez efectuadas las diluciones agregar 25 µl del antígeno de influenza aviar, diluido en el "diluyente para el antígeno", conteniendo 4 U HA/25µl. cubrir, agitar e incubar la microplaca a temperatura ambiente durante 30 minutos.

La dilución conteniendo las U HA del antígeno que se requieren para la prueba se determina dividiendo el punto final del la HA entre el número de unidades deseadas. Ejemplo: título del antígeno=256 U HA, unidades deseadas=4 ($256/4=64$), haciendo una dilución 1:64 se obtendrán 4 U HA en 25 µl. Después de agregar el la dilución antígeno se deberá comprobar el número de U HA utilizadas en la prueba.

- Agregar 50 µl de la suspensión de eritrocitos de pollo al 0.5% a cada pozo, cubrir y agitar la placa e incubar a temperatura ambiente hasta que los eritrocitos testigo sedimenten hasta formar un botón bien delimitado, 30-45 minutos.

- Algunos sueros contienen aglutininas naturales que aglutinan en forma inespecífica a los eritrocitos y si no se eliminan pueden obtenerse resultados erróneos (falsos positivos). Estas reacciones inespecíficas en las diluciones iniciales pueden evitarse diluyendo los sueros 1:10 y empleando ésta como dilución inicial.

- Interpretación de resultados:

Esta prueba se lee cuando los eritrocitos testigo sedimenten, formando un botón circular, con bordes bien delimitados, en el fondo del pozo. La inhibición de la hemaglutinación producida por los sueros positivos tiene un patrón semejante al de los eritrocitos testigo, un botón circular con bordes definidos que se desliza tomando la forma de una lágrima en el fondo del pozo, al inclinar la microplaca en un ángulo de 45°.

Cuando los sueros son negativos y no alcanzan a inhibir la acción hemaglutinante del antígeno, los eritrocitos se sedimentan formando una capa uniforme en el fondo de los pozos. Deberá efectuarse la titulación para determinar el punto final de las muestras que resulten positivas en esta prueba tamiz, realizado un número mayor de diluciones logaritmo base 2 seriadas.

Todos los sueros que produzcan inhibición de la hemaglutinación en la dilución 1:10 deben considerarse positivos.

Fórmulas de cálculo para resultados:

En esta técnica no se utilizan fórmulas de cálculo para resultados.

Indices de reproducibilidad y repetibilidad:

Del 90% si se sigue estrictamente el método descrito con reactivos y biológicos semejantes.

Potencia:

Se realizará en instalaciones aisladas, de acuerdo a las indicaciones emitidas por la Dirección. Sólo se efectuará para fines de registro o cuando así lo considere la Secretaría.

- La vacuna estimulará una protección a los 21 días de 80-100%, para que la prueba sea válida deben morir cuando menos el 80% de los animales control sin vacunar.

Pruebas fisicoquímicas:

El PHI será de 7.0 a 7.2, determinado con un potenciómetro previamente calibrado.

Concentración de timerosal: será de 0.01% (p/v).

Pruebas de estabilidad de la emulsión: a diferentes temperaturas: 4°C, 25°C y 37°C.

4.7. Envasado:

- El producto se envasa en forma estéril en frascos de polietileno de alta densidad, 500.5 ml, equivalentes a 1,000 dosis.

Los frascos se decoran indicando el nombre del producto, la formulación y las instrucciones de uso, de acuerdo a las indicaciones de la Dirección.

En la cara central debe presentar la leyenda:

"Para su aplicación en las áreas determinadas por la Secretaría".

- Se toman muestras representativas para pruebas de control de calidad.

Esterilidad:

- No debe observarse desarrollo de bacterias y hongos en los medios de cultivo empleados.

Pruebas fisicoquímicas:

- El PHI será de: 7.0 a 7.2, determinado con un potenciómetro previamente calibrado.

- Concentración de timerosal: será de 0.01% (p/v).

- Pruebas de estabilidad de la emulsión: a diferentes temperaturas: 4°C, 25°C y 37°C.

- Inspección óptica:

Se efectúa al 100% y se separan los frascos que presenten defectos en el retapado, impresión o cualquier alteración que afecte su buena presentación.

4.8. Características del producto:

a) Elaborado a partir de la cepa: a/Chicken/México/232/94/CPA, avirulenta, inactivado con betapropiolactona y emulsionado, que protege aves susceptibles contra la influenza aviar provocada por la variante H5N2, se aplica por vía subcutánea en la parte posterior del cuello.

b) Puede ocasionar lesiones en el sitio de la aplicación, inflamación y necrosis.

c) Los lotes de producto antes de la inactivación presentan un título de: 8.7-9.0 logaritmo base 10, DIEP 50%/0.5 ml y/o un mínimo de 32 U HA.

d) Presentación: 1,000 dosis, contenidas en 500 ml.

e) Dosis: 0.5 ml.

4.9. Liberación de la vacuna:

Cuando aprueba satisfactoriamente el total de pruebas de control de calidad efectuadas durante la producción, la vacuna es liberada.

5. Vacuna inactivada de influenza aviar combinada emulsionada

La vacuna inactivada de influenza aviar podrá combinarse únicamente con fluido viral inactivado de virus de la enfermedad de Newcastle. Cada fracción deberá probarse en forma independiente conforme a la norma que regule cada virus.

6. Sanciones

El incumplimiento a las disposiciones contenidas en la presente Norma, será sancionado conforme con lo dispuesto en la Ley Federal de Sanidad Animal y la Ley Federal sobre Metrología y Normalización.

7. Concordancia con normas internacionales

Esta Norma Oficial Mexicana no es equivalente a alguna norma internacional.

8. Bibliografía

OIE Manual (1992).- Highly Pathogenic Avian Influenza (Fowl Plague), (A15), 123 - 129.

Xie, Z. y Stone, D. H. (1990): Immune Response to Oil-Emulsion Vaccines With Single or Mixed Antigens of Newcastle Disease, Avian Influenza, and Infectious Bronchitis. *Avian Diseases* 34:154-162.

Haemagglutination and Haemglutination Inhibition for Avian Influenza. Avian Section, NVSL. Haemagglutination and Haemagglutination Inhibition Test. Official Journal of the European Communities, No. 1 167/11.

Métodos para expresar las tasas de anticuerpos. En: Thrusfield, M. *Epidemiología Veterinaria*. Ed. Acribia. España. 1990.

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 27 de mayo de 1998.- El Director General Jurídico, Jorge Moreno Collado.- Rúbrica.