

**07-01-96 Norma Oficial Mexicana NOM-036-ZOO-1996 Requisitos Mínimos para las vacunas contra la Fiebre Porcina Clásica**

---

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

**Norma OFICIAL MEXICANA NOM-036-ZOO-1996 REQUISITOS MÍNIMOS PARA LAS VACUNAS CONTRA LA FIEBRE PORCINA CLÁSICA**

ROBERTO ZAVALA ECHAVERRIA, 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; 4° Fracciones I, III y V, 12, 16, 21, 28, 29, 44 y 47 de la Ley Federal de Sanidad Animal; 1°, 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 Fiebre Porcina Clásica (FPC), afectan a la ganadería nacional, tanto en su nivel de producción como en la calidad de sus productos.

Que la Fiebre Porcina Clásica es una enfermedad altamente transmisible; de rápida diseminación en los cerdos susceptibles, de morbilidad y mortalidad variable, dependiendo de la patogenicidad de la cepa viral y grado de susceptibilidad de la piara.

Que la Fiebre Porcina Clásica constituye el principal factor limitante del desarrollo de la porcicultura nacional y restringe las posibilidades de exportación, ya que diversos países interesados en la adquisición de carne de cerdo producida en el país, condicionan los tratados comerciales a la ausencia de FPC.

Que la importancia económica de la especie porcina la hace ocupar el segundo lugar en lo que se refiere a producción de toneladas de carne en el país y con el fin de elevar la producción, así como mejorar la calidad de los productos del cerdo, resulta necesario establecer el control y erradicación de esta enfermedad, permitiendo con esto que la porcicultura se desarrolle en mejores condiciones sanitarias.

Que es necesario garantizar la producción de vacunas de la más alta calidad contra la Fiebre Porcina Clásica, para inmunizar al hato porcino nacional.

Que los biológicos utilizados para prevenir la FPC en los cerdos deben reunir características de buena calidad, ya que la vacunación contra la FPC resulta una estrategia vital en las zonas en control de la campaña nacional contra la FPC, debido a que permite reducir la incidencia de esta enfermedad y por consiguiente salvaguardar la inversión que representa la piara nacional.

Que para alcanzar los objetivos señalados en los párrafos anteriores, con fecha 29 de noviembre de 1995, se publicó en el Diario Oficial de la Federación el Proyecto de Norma Oficial Mexicana NOM-043-ZOO-1995, Requisitos mínimos para las vacunas contra la fiebre porcina clásica.

Que en virtud de que dentro del término de 90 días a que se refiere la fracción I, del artículo 47 de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, no se presentaron comentarios al proyecto, las disposiciones del mismo han resultado procedentes en sus términos.

Que por todo lo anterior y con el objeto de mantener el orden cronológico en la clave de las normas en esta materia, he tenido a bien expedir la NOM-036-ZOO-1996, REQUISITOS MÍNIMOS PARA LAS VACUNAS CONTRA LA FIEBRE PORCINA CLÁSICA.

**ÍNDICE**

1. OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACIÓN
2. REFERENCIAS
3. DEFINICIONES
4. REQUISITOS MÍNIMOS QUE DEBEN CUMPLIR LAS SEMILLAS DE TRABAJO DE LAS VACUNAS CONTRA LA FIEBRE PORCINA CLÁSICA
5. REQUISITOS MÍNIMOS QUE DEBEN CUMPLIR CADA LOTE DE VACUNA, ANTES DE SALIR AL MERCADO
6. SANCIONES
7. CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES
8. BIBLIOGRAFÍA
9. DISPOSICIONES TRANSITORIAS APÉNDICES NORMATIVOS

## 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 contra la Fiebre Porcina Clásica.

1.2. Esta Norma es aplicable a todas las vacunas contra la Fiebre Porcina Clásica que se fabriquen en México o se importen.

1.3. Las pruebas descritas en esta Norma, deben aplicarse a todos los lotes de producción de vacuna contra la Fiebre Porcina Clásica, para efectuar pruebas de control de calidad y/o con fines de constatación.

1.4. 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.

1.5. La aplicación de las disposiciones contenidas en esta Norma, compete 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 deben consultarse 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-CC-1-1990, Sistemas de Calidad-Vocabulario.

## 3. DEFINICIONES

Para efecto de la presente Norma, se entiende por:

3.1. Calidad: Conjunto de propiedades y características de un producto, que le confieren la aptitud para satisfacer las necesidades explícitas o implícitas preestablecidas.

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

3.3. Control: Conjunto de medidas zoosanitarias que tienen por objeto disminuir la incidencia o prevalencia de la Fiebre Porcina Clásica en un área geográfica determinada.

3.4. Control de calidad: Conjunto de pruebas "in vivo" e "in vitro", que deben efectuarse con el fin de confirmar las características físicas, químicas y biológicas de los productos biológicos para uso en animales.

3.5. Dosis: Cantidad del producto recomendada en la etiqueta, para ser administrada en el animal.

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

3.7. Fecha de Caducidad: Fecha asignada a un producto, que designa el término del periodo de uso.

3.8. Fiebre Porcina Clásica (FPC): Antes denominada "Cólera Porcino", enfermedad altamente contagiosa, causada por un virus de la familia togaviridae, de curso generalmente agudo, pero que puede tener una presentación atípica. En la presentación típica los cerdos pueden presentar anorexia, fiebre de 41°C o más, temblores musculares, postración, constipación intestinal que alterna con periodos de diarrea, secreción mucopurulenta en los ojos y eritema en la piel.

En los estadios finales de la enfermedad pueden observarse trastornos nerviosos, parálisis y por último la muerte.

En la forma atípica, que es causada por las llamadas cepas de baja virulencia, los signos observados pueden incluir los siguientes:

a) "Tremor" congénito conocido como mioclonia congénita o cerdos brincadores la que se manifiesta en cerdos recién nacidos o de pocas horas de haber nacido. Se caracteriza con temblores en la cabeza, cuello, dorso y miembros posteriores.

b) Afección de recién nacidos por contagio procedente de cerdas reproductoras infectadas y no vacunadas, los cuales mueren de FPC aguda sin que la enfermedad afecte a las cerdas y por animales sanos vacunados con virus vivo modificado, con la característica que sólo se afectan animales jóvenes.

c) Esta definición no excluye la existencia de otras formas de presentación de la FPC.

3.9. Laboratorio Aprobado: Laboratorio reconocido por la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, para realizar servicios de constatación, pruebas de diagnóstico en materia zoonosanitaria y/o pruebas de control de calidad relacionadas con esta Norma.

3.10. Lote: Cantidad específica de cualquier vacuna, que ha sido elaborada bajo condiciones equivalentes de operación y durante un mismo período.

3.11. Producto terminado: El que está envasado e identificado, previo a las pruebas de constatación.

3.12. Prueba de ausencia de virus contaminantes: Análisis que se utiliza para demostrar que la vacuna está libre de virus contaminantes específicos.

3.13. Prueba de cohabitación: Análisis que se efectúa para demostrar que el virus vacunal no es excretado por los cerdos vacunados.

3.14. Prueba de humedad: Análisis que se realiza para determinar el porcentaje de humedad en la vacuna liofilizada.

3.15. Prueba de identidad: Análisis que se efectúa para confirmar que las vacunas contra la FPC están elaboradas con una cepa estandarizada del virus de la FPC.

3.16. Prueba de potencia: Análisis que se realiza para asegurar que las vacunas son capaces de inducir protección adecuada contra un virus virulento de FPC. La protección se expresará de acuerdo con lo establecido en las especificaciones de calidad del producto y/o en las normas oficiales mexicanas aplicables.

3.17. Prueba de pureza: Análisis que se efectúa para confirmar que la vacuna está exenta de materiales extraños y/o microorganismos contaminantes.

3.18. Prueba de seguridad o inocuidad: Análisis que se lleva a cabo para asegurar que un producto no cause reacciones desfavorables atribuibles al mismo.

3.19. Prueba de vacío: Análisis que se realiza para determinar la presencia o ausencia de vacío en los frascos de vacuna.

3.20. Secretaría: La Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural.

3.21. Semilla de trabajo: Cepa del virus de FPC identificado, seleccionado y almacenado permanentemente a un nivel de pasaje específico, empleado para la producción de vacuna.

3.22. Vacuna contra la FPC: Producto biológico elaborado a base de virus activo modificado de la FPC, autorizado por la Secretaría, que se utiliza para la prevención de la Fiebre Porcina Clásica en los cerdos.

#### **4. REQUISITOS MÍNIMOS QUE DEBEN CUMPLIR LAS SEMILLAS DE TRABAJO DE LAS VACUNAS CONTRA LA FIEBRE PORCINA CLÁSICA**

4.1. El virus semilla de trabajo, debe estar libre de bacterias aerobias y anaerobias, mycoplasmas, hongos, levaduras, así como de cualquier otro agente biológico contaminante. Para la realización de esta prueba, referirse al "Apéndice A" (Normativo): Prueba de Esterilidad.

4.2. El virus semilla de trabajo debe ser neutralizado por suero hiperinmune monoespecífico contra el virus de la FPC. Para la realización de esta prueba, referirse al "Apéndice B" (Normativo): Prueba de Identidad.

4.3. El virus semilla de trabajo debe estar libre de virus de la Diarrea Viral Bovina y del virus de la Enfermedad de Aujeszky. Para la realización de esta prueba, referirse al "Apéndice C" (Normativo): Prueba de Ausencia de Virus Contaminantes.

4.4. El virus semilla de trabajo, después de ser aplicado en los cerdos, no debe ser diseminado. Para la realización de esta prueba, referirse al "Apéndice F" (Normativo): Prueba de Cohabitación.

#### **5. REQUISITOS MÍNIMOS QUE DEBEN CUMPLIR CADA LOTE DE VACUNA, ANTES DE SALIR AL MERCADO**

Las vacunas contra la FPC, ya sean importadas o producidas en el país, deben demostrar por medio de pruebas de laboratorio que cumplen con los siguientes requisitos mínimos:

5.1. El 100% de la muestra representativa del lote de vacuna debe tener vacío.

5.2. El 100% de la muestra representativa del lote de la vacuna liofilizada debe tener un porcentaje de humedad igual o menor a 4 %.

El lote o sublote de vacuna que no reúna los requisitos de vacío y humedad antes especificados, debe exhibir en su etiqueta una fecha de caducidad de seis meses, contados a partir de la fecha de producción.

5.3. La vacuna debe estar libre de bacterias aerobias y anaerobias, mycoplasmas, hongos, levaduras, así como de cualquier otro agente biológico contaminante. Para la realización de esta prueba, referirse al "Apéndice A" (Normativo): Prueba de Esterilidad.

5.4. El virus vacunal debe ser neutralizado por suero hiperinmune monoespecífico contra el virus de la FPC. Para la realización de esta prueba, referirse al "Apéndice B" (Normativo): Prueba de Identidad.

5.5. La vacuna debe estar libre de los virus de la Diarrea Viral Bovina y de la Enfermedad de Aujeszky. Para la realización de esta prueba, referirse al "Apéndice C" (Normativo): Prueba de Ausencia de Virus Contaminantes.

Las pruebas se deben efectuar en el Centro Nacional de Servicios de Diagnóstico en Salud Animal y/o en un laboratorio aprobado por la Secretaría.

#### **PRUEBAS IN VIVO.**

5.6. El 0.01 (la centésima parte) de una dosis de vacuna debe proteger por lo menos al 80 % de los cerdos desafiados con una cepa virulenta del virus de la FPC, con un título de 106 DLC 50 %.

Asimismo, cuando menos el 80 % de los cerdos controles no vacunados, deben morir o enfermar de FPC durante el período de observación post-desafío: 14 días. En caso de que no enfermen o mueran el 80% de los cerdos testigos, la prueba debe repetirse. Para la realización de esta prueba, referirse al "Apéndice D" (Normativo): Prueba de Potencia.

5.7. La vacuna no debe causar alteraciones en la salud de los cerdos vacunados con 5 dosis administradas en una sola aplicación. Para la realización de esta prueba, referirse al "Apéndice E" (Normativo): Prueba de Seguridad e Inocuidad.

5.8. El 100 % de los cerdos que cohabiten con cerdos vacunados deben resultar negativos a la prueba de sueroneutralización-interferencia viral para la detección de anticuerpos séricos contra el virus de la FPC

La prueba de cohabitación se realizará cada 20 lotes que provengan de la misma semilla de trabajo aprobada y en caso de constatación esporádica, cada seis meses. Para la realización de esta prueba, referirse al "Apéndice F" (Normativo): Prueba de Cohabitación.

#### **6. SANCIONES**

El incumplimiento de las disposiciones contenidas en esta Norma, se sancionará conforme a lo establecido por 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 con ninguna Norma internacional.

#### **8. BIBLIOGRAFÍA**

Aguilar, R. R. y San Ibañez, S.A.: Diseño de instalaciones porcinas en producción porcina editado por: Trujillo, D.E. y Flores, C.J. F.M.V.Z. Departamento de Producción Animal cerdos UNAM 1a. Ed. 1988.

British Pharmacopoeia Veterinary. 1993.

CENASA. SARH. IICA Guía técnica para el diagnóstico de la Fiebre Porcina Clásica. México, D.F. 1993.

Code of Federal Regulations. Animals and Products. 9 U.S.A., 1993. p 544.

Fried Helm Horsch: Inmunoprofilaxis de los Animales Domésticos, Editorial Acribia, Zaragoza, España, 1984.

Manual of Standards for diagnostic tests and vaccines Office International des Epizooties, OIE, París, 1992.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. 1992. Manual of standards for Diagnostic Tests and Vaccines.

Organización Panamericana de la Salud: Producción, Control de Calidad y Uso de Vacunas con adyuvante oleoso contra la Fiebre Aftosa, 1987.

Programa de Adiestramiento en Salud Animal para América Latina.

Requisitos Mínimos Para la Vacuna Contra el Cólera Porcino-GPE SARH-JICA 1982.

Requisitos mínimos para los productos biológicos de uso en porcinos, DGSA-SARH, México 1990.

Ross, F.R and Whittlestone, P.: Recovery of, identification of and Serological Response to Porcine Mycoplasmas, in methods in Mycoplasmaology vol. II Edited by Tully G.J. and Razin, S. 1983 Academic Press, U.S.A.

S.A.R.H. - México 1992. Requisitos mínimos para la vacuna contra la FPC.

S.A.R.H. - México 1990. Requisitos mínimos para las vacunas que serán utilizadas dentro de la Campaña Nacional para el Control y Erradicación del Cólera Porcino.

S.A.R.H. Subsecretaría de Ganadería. Dirección General de Salud Animal - México 1990. Campaña Nacional contra el Cólera Porcino (Manual de Normas y Procedimientos).

SARH, UNAM, OIRSA y CANIFARMA 1988. Memorias del curso de Actualización de Normas de Control de Calidad para Productos Biológicos Veterinarios.

U.S.D.A.-A.P.H.I.S. Code of Federal Regulations. Part 113.26 Detection of viable bacteria and fungi in live vaccines 1994.

## **9. 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 24 de mayo de 1996.- El Director General Jurídico, Roberto Zavala Echavarría.- Rúbrica.

## "APÉNDICE A" (NORMATIVO)

### PRUEBA DE ESTERILIDAD

#### - Objetivo.

Demostrar la ausencia de contaminación por bacterias aerobias, específicamente *Erisipelothrix rhusopathiae*, anaerobias, *Mycoplasma* spp., hongos y levaduras en las vacunas contra la FPC.

#### - Campo de aplicación.

Pruebas de constatación y de control de calidad de cada uno de los lotes de vacuna contra la FPC, producida a partir de líneas celulares establecidas y/o cultivos celulares primarios.

#### - Generalidades.

Demostrar que la vacuna está libre de contaminantes específicos activos.

#### - Equipo e instrumentos.

Asa bacteriológica calibrada a 0.2 ml.

Autoclave.

Balanza granataria.

Baño María (56°C).

Cajas para ratones, con bebederos.

Campana de flujo laminar y/o área estéril, apropiada para pruebas bacteriológicas.

Estufa bacteriológica.

Mecheros Bunsen.

Sistema para microanaerobiosis.

#### - Materiales.

Cajas de Petri de 60 mm de diámetro. Gradillas para tubos de vidrio.

Jeringas de 5 ml desechables.

Matraces de vidrio o de plástico

Membranas de celulosa con poros de 0.22 y 0.45 micras.

Papel aluminio.

Pipetas de 1, 2, 5 y 10 ml.

Pipetas Pasteur

Probetas de vidrio o de plástico.

Torundas de algodón.

Tubos de vidrio con tapón de rosca, con capacidad de 30 ml.

#### - Reactivos.

Acetato de Talio al 10%

Agar noble.

Agar nutritivo.

Agua desionizada.

Bacitracina.

Caldo PPLO.

Caldo Sabouraud.

Caldo soya tripticaseína.

Caldo Tioglicolato.

Extracto fresco de levadura.

Infusión cerebro-corazón.

Medio de Friss: Para vacunas producidas en cultivo primario de cerdo.

Medio de Hayflick: para vacunas producidas en líneas celulares establecidas.

Meticilina.

Penicilina 100 000 U.I./ml.

Rojo de Fenol al 0.5% y 1%

Suero de equino.

Suero de porcino libre de Mycoplasma spp.

- Biológicos.

Ocho ratones adultos de 28 a 32 días de edad, con un peso de 15 gramos y de la misma camada.

Vacuna contra la FPC.

- Procedimiento.

Para todas las cepas vacunales, reconstituir siete viales por cada lote con su respectivo diluyente e inocular una serie de cinco tubos que contengan medio líquido y dejar cinco tubos como testigos. Inocular dos cajas de medio sólido. Lo anterior se inocula de acuerdo al siguiente cuadro:

MEDIO	INOCULO	37 °C	22° C	CANTIDAD DE MEDIO
CALDO TIOGLICOLATO	---	---	---	---
	1 ml	1 TUBO	1 TUBO	20 ml
	2 ml	1 TUBO	1 TUBO	20 ml
CONTROL	---	1 TUBO	1 TUBO	20 ml
CALDO DE SOYA	1 ml	1 TUBO	1 TUBO	20 ml
TRIPTI TIOGLICASEINA	1 ml	1 TUBO	1 TUBO	20 ml
CONTROL	---	---	1 TUBO	20 ml
AGAR SABOURAUD	0.2 ml	---	1 CAJA	15 ml
AGAR NUTRITIVO	0.2 ml	---	1 CAJA	---

Observación diaria durante 14 días.

Procedimiento para detección de *E. rhusopathiae*

Para demostrar que la vacuna está libre de *E. rhusopathiae*, inocular ocho ratones por vía intraperitoneal con 0.5 ml de la vacuna reconstituida.

Mantener a los ratones en observación diaria durante siete días. Procedimiento para detección de Mycoplasma

De cada mezcla de vacunas, inocular 1 ml en 10 ml de medio de Hayflick\* si las vacunas están elaboradas en líneas celulares, utilizar medio de Friss\*\* cuando las vacunas estén elaboradas en cultivo primario de origen porcino. Mezclar perfectamente e incubar a 37°C con atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> y un 95% de nitrógeno.

De la misma vacuna, inocular 0.25 ml en 2 cajas de Petri con medio sólido e incubar a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de nitrógeno.

Observar diariamente a simple vista los tubos para detectar algún cambio de color (de rojo a amarillo).

Las cajas deben observarse en el microscopio estereoscópico para detectar colonias típicas de Mycoplasma.

Al cuarto día hacer una siembra de los tubos de medio líquido en 2 cajas de medio sólido, incubar a 37°C con atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>, este procedimiento se repite al octavo y treceavo día. Desechar a los 28 días en caso de que no haya crecimiento de Mycoplasma spp.

Interpretación de resultados.

La prueba se considera satisfactoria cuando no exista crecimiento en ninguno de los medios empleados.

La prueba es satisfactoria si a los 28 días de incubación no hay cambio de color o crecimiento de colonias de Mycoplasma spp.

La prueba de inoculación en ratones es satisfactoria cuando los mismos permanezcan sanos al término del período de observación.

- Índices de reproducibilidad y repetibilidad.

100 % si se sigue el procedimiento descrito.

\*Medio de Hayflick:

Agua deionizada	90 ml
Caldo PPLO	1.89 g
Acetato de Talio al 10%	0.25 ml
Solución de rojo de fenol al 1%	0.25 ml
Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min.	
Adicionar glucosa	0.5 g
Suero de equino	20 ml
Extracto fresco de levadura	10 ml
Penicilina 100 000 UI/ml	0.5 ml

Envasar en tubos de vidrio en volúmenes de 10 ml y mantener a una temperatura de -20°C hasta su uso.

El medio sólido se utiliza en una concentración del 0.8% al 1.2% adicionando agar noble o ionagar N 2.

\*\*Medio de Friss completo. Medio líquido no selectivo.

Solución de Hanks BSS	500 ml
Infusión cerebro corazón	8.2 g
Caldo PPLO (sin cristal violeta)	8.7 g
Solución de Hanks BSS	500 ml
Agua deionizada	750 ml
Esterilizar en autoclave a 121°C 15 min	
Adicionar en forma estéril:	
Extracto fresco de levadura	60 ml
Rojo de fenol al 0.5%	4.5 ml
Bacitracina	250 mg
Meticilina	250 mg
Acetato de Talio	130 mg
Suero porcino libre de Mycoplasma	443 ml
Ajustar el pH a 7.4	---

Adicionar 5 ml de suero de conejo anti M. hyorhinis a 100 ml de medio no selectivo.

El medio sólido se prepara igual que el medio Hayflick.



## **"APÉNDICE B" (NORMATIVO)**

### **PRUEBA DE IDENTIDAD**

**- Objetivo.**

Confirmar que las vacunas contra la FPC están elaboradas con una cepa estandarizada del virus de la FPC.

**- Campo de aplicación.**

Pruebas de Constatación y pruebas de control de calidad de la mezcla de los sublotos, que constituyan cada uno de los Lotes de producción de las vacunas contra la FPC producidos en México o importados.

**- Generalidades.**

Esta prueba se basa en la identificación del virus vacunal por medio de la técnica de sueroneutralización-interferencia viral.

**- Equipo e instrumentos.**

Baño maría a 37°C y 56°C.

Bomba de vacío.

Estufa bacteriológica.

Microscopio invertido.

Refrigerador o cuarto frío 4°C

**- Materiales.**

Agitador eléctrico automático.

Frascos de vidrio de 50, 100 y 300 ml de capacidad.

Gradillas para tubos de vidrio.

Jeringas de 5 ml desechables.

Mecheros de Bunsen o campana de flujo laminar.

Papel aluminio.

Pipetas serológicas de 5, 10 y 20 ml.

Torundas de algodón

Tubos de vidrio con tapón de rosca de baquelita con capacidad de 30 ml mínimo.

**- Reactivos.**

Alcohol al 70%.

Bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>).

L-glutamina.

Medio mínimo esencial (MEM) para cultivos de tejidos.

Solución amortiguadora de fosfatos (SAF) pH 7.0-7.2.

Solución de antibióticos: Penicilina, Estreptomicina y Anfotericina B.

**- Biológicos.**

Cultivo celular primario de células de testículo de cerdo en monoestrato (ST).

Suero de cabra libre de anticuerpos contra FPC.

Suero hiperinmune contra el virus de la FPC, producido en cabra o conejo.

Vacuna contra la FPC.

**- Preparación y acondicionamiento de la muestra.**

Reconstituir la vacuna en condiciones estériles y mantenerla en baño de hielo para su manejo.

**- Procedimiento.**

1. Mezclar igual volumen de virus vacunal con suero hiperinmune e incubar a 37 °C durante 1 hora.
2. Inocular con 0.1 ml de la mezcla 10 tubos que contengan ST. en monoestrato, dejando cinco tubos testigos.
3. Incubar a 37°C durante 1 hora.
4. Adicionar medio de mantenimiento 0.5 ml a cada tubo.
5. Incubar a 37 °C en forma estacionaria durante 5 días.

6. Eliminar el medio de los tubos.
7. Desafiar con 0.5 ml de virus de Estomatitis Vesicular (VSV) 200 DICC 50% por ml en medio de mantenimiento (para la cepa GPE).
8. Incubar a 37°C durante 3 días en sistema rotatorio (para la cepa GPE).
9. Para las otras cepas vacunales se procede a hacer el desafío con virus de la FPC cepa E- (200 dosis infectantes 50% por ml) se incuba 5 días en sistema estacionario.
10. Eliminar el medio de los tubos y desafiar con 200 DICT 50% por ml de virus de la Estomatitis Vesicular (VSV).
11. Incubar en sistema rotatorio tres días.

- Interpretación de resultados.

Para la cepa GPE:

El resultado es satisfactorio cuando en todos los tubos infectados se observe efecto citopático.

Para otras cepas vacunales, se considera satisfactorio el resultado cuando no se presente el efecto citopático.

- Índices de reproducibilidad y repetibilidad.

100% si se sigue el procedimiento descrito.

## **"APÉNDICE C" (NORMATIVO)**

### **PRUEBA DE AUSENCIA DE VIRUS CONTAMINANTES**

**- Objetivo.**

Demostrar que las vacunas utilizadas en la prevención de la FPC están libres de virus contaminantes específicos: virus de la Diarrea Viral Bovina y virus de la Enfermedad de Aujeszky, así como de otros agentes virales contaminantes.

**- Campo de aplicación.**

Pruebas de constatación y de control de calidad de cada uno de los lotes de vacuna contra la FPC producidos a partir de líneas celulares establecidas y/o a partir de cultivo primario de cerdo.

**- Generalidades.**

Esta prueba se utiliza para demostrar que la vacuna contiene únicamente virus de FPC.

**- Equipo e instrumentos.**

- Baño María a 37°C y 56°C.
- Bomba de vacío.
- Estufa bacteriológica.
- Microscopio invertido.
- Refrigerador o cuarto frío a 4°C.

**- Materiales.**

- Agitador-mezclador de líquidos.
- Botellas lecheras de 15 ml para cultivo celular.
- Charolas metálicas.
- Frascos de vidrio de 50, 100 y 300 ml de capacidad.
- Gradillas para tubos de vidrio.
- Jaulas para conejo, con sus comederos y bebederos.
- Jeringas de 5 ml desechables.
- Mecheros de Bunsen o campana de flujo laminar.
- Papel aluminio.
- Torundas de algodón
- Tubos de vidrio con rosca y tapón de baquelita con capacidad de 30 ml

**- Reactivos.**

- Alcohol al 70%
- Bicarbonato de Sodio (NaHCO<sub>3</sub>).
- L-glutamina.
- Medio esencial mínimo (MEM) para la conservación de cultivos de tejidos.
- Solución amortiguadora de Fosfatos (SAF) pH 7.0-7.2
- Solución de Alsever.
- Solución de antibióticos: Penicilina, Estreptomicina y Anfotericina B.

**- Biológicos.**

- Cultivo celular primario de células de testículo de cerdo en monoestrato (ST).
- Dos conejos de 1.5 a 2.0 Kg de peso.
- Línea celular establecida PK-15 (monoestrato).
- Suero de cabra libre de anticuerpos contra FPC.
- Suero hiperinmune contra el virus de FPC, producido en cabra o conejo.
- Suspensión de glóbulos rojos de ave o de cuye, al 0.1%.
- Vacuna contra la FPC.

**- Preparación y acondicionamiento de la muestra.**

Reconstituir dos viales de cada sublote de vacuna contra la FPC y mezclarlos en un frasco estéril.

- Procedimiento.

- Colocar 9 ml de la mezcla de vacuna en un tubo de vidrio.
- Adicionar 9 ml de suero hiperinmune inactivado previamente a 56°C por 30 minutos.
- Mezclar.
- Incubar en baño María a 37°C o estufa a 37°C durante 60 minutos.
- Añadir 2 ml de la mezcla vacuna-suero hiperinmune a cada una de 4 botellas\* con cultivo primario de células de testículo de porcino y a cada una de 4 botellas con cultivo celular de la línea PK15.
- Se deben preparar 2 botellas de cada uno de los cultivos celulares antes mencionados, con el fin de dejarlos como testigos.
- Extraer la SAF antes de añadir el inóculo.
- A los controles se les adiciona medio de cultivo de mantenimiento (MEM + 2% NaHCO<sub>3</sub>, 5% suero de cabra, 2% de solución de antibióticos y 1% de L-glutamina).
- Esparcir el inóculo por todo el monoestrato e incubar a 37°C en la estufa durante una hora, moviendo cada 15 minutos todas las botellas.
- Retirar el inóculo y adicionar 5 ml de SAF para lavar el monoestrato.
- Extraer la SAF.
- Adicionar a todas las botellas 15 ml de medio de mantenimiento e incubar en la estufa a 37°C por 10 días, observando cada tercer día para detectar efecto citopático.
- A las botellas, se les extrae el medio y se enjuagan 2 veces con SAF.
- Inocular 2 ml de la suspensión de glóbulos rojos por botella, incluyendo los controles negativos.
- La mitad de las botellas se incuban a 37°C por 30 minutos y la otra mitad a 4°C por una hora.
- Pasado el tiempo de incubación 30 y 60 minutos, respectivamente, se procede a observar al microscopio para ver si hay o no "rosetas de hemoadsorción".
- Para demostrar que la vacuna no contiene virus de la Pseudorabia se deben inocular dos conejos por vía subcutánea con un mililitro de la vacuna reconstituida.
- Los conejos deben mantenerse en observación durante 21 días postinoculación.

\* Antes de inocular las botellas, extraer el medio de cultivo con una cánula conectada a una bomba de vacío. Adicionar 5 ml de SAF a cada botella y mover suavemente las botellas para lavar el monoestrato.

- Interpretación de resultados.

El lote de vacuna se considera satisfactorio cuando no se observe efecto citopático alguno y no se haya observado hemoadsorción en ninguna de las botellas.

La prueba de inoculación en conejos se considera satisfactoria, cuando los mismos permanezcan sanos hasta el fin del periodo de observación.

- Índices de reproducibilidad y repetibilidad.

100 % si se sigue el procedimiento descrito.

## **"APÉNDICE D" (NORMATIVO)**

### **PRUEBA DE POTENCIA**

**- Objetivo.**

Demostrar que las vacunas contra la FPC son capaces de proteger a los cerdos contra la infección por un virus virulento de FPC.

**- Campo de aplicación.**

Pruebas de constatación y pruebas de control de calidad de todos los lotes de vacuna contra la Fiebre Porcina Clásica.

**- Generalidades.**

Esta prueba se utiliza para demostrar la potencia de las vacunas contra la FPC.

**- Equipo e instrumentos.**

- Agitador de tubos.
- Chaira.
- Cuchillo.
- Engargoladora.
- Gradilla.
- Mecheros de Bunsen.
- Segueta.
- Tijeras.

**- Materiales.**

- Bolsa de plástico o frascos de vidrio de boca ancha con tapa hermética.
- Frascos de vidrio con capacidad de 20 ml mínimo.
- Frascos de vidrio con capacidad de 50, 100, 300 y 500 ml.
- Jeringas desechables de 10 ml con aguja hipodérmica del No. 21 x 38.
- Marcador indeleble.
- Pipetas de 1, 2, 5 y 10 ml.
- Retapa de aluminio.
- Sistema de identificación de cerdos.
- Tapones para frascos de vacuna.
- Termómetros clínicos.
- Torundas de algodón.
- Tubos de vidrio con tapa de rosca de 20 ml mínimo de capacidad.

**- Reactivos.**

Alcohol etílico al 70%.

**- Biológicos.**

Vacuna para la FPC reconstituida.

Virus de desafío de FPC cepas ALD, Ames o Lederle, 106DL 50%.

Diez cerdos de 18 a 20 kg de peso, negativos a anticuerpos contra el virus de la FPC o con un título de anticuerpos contra el virus de la FPC de 1:4 como máximo, determinados por la prueba de sueroneutralización-interferencia viral.

**- Condiciones ambientales.**

Agua limpia y fresca.

Alimentación de acuerdo a la etapa.

Área de alta bioseguridad.

Corraletas limpias, previamente desinfectadas, aisladas de las demás áreas de laboratorio y/o granja.

Espacio vital mínimo de 0.33 m<sup>2</sup> por animal.

Ventilación adecuada.

- Preparación y acondicionamiento de la muestra.

Reconstituir 4 viales de vacuna por sublote, hacer la mezcla y a partir de ésta diluir la dosis recomendada por el laboratorio productor 1:100 con diluyente de la misma vacuna.

- Procedimiento.

- Reconstituir 4 frascos de vacuna y hacer una mezcla en un frasco de vidrio.
- Homogeneizar y preparar una dilución final de 1:100 de la dosis recomendada por el laboratorio productor.
- Tapar el frasco con dilución y engargolar. Mantener el frasco a una temperatura de 4°C hasta el momento de la aplicación.
- Inocular 5 cerdos por lote de vacuna por la vía y dosis recomendada.
- 5 cerdos permanecerán como testigos.
- Registrar temperaturas rectales diariamente durante 14 días.
- Llevar a cabo inspección clínica de todos los animales.
- Desafío:
  - El día 14 deben ser desafiados todos los cerdos, incluyendo los testigos, con un virus patógeno de FPC, preparado en dosis de 10<sup>6</sup> DLC 50% (dosis letal cerdo) contenidas en 1 ml y aplicada por vía intramuscular.
- Observación post-desafío:
  - Registrar la temperatura rectal y los signos clínicos de todos los animales diariamente. Transcurridos 14 días postdesafío, todos los cerdos deben ser sacrificados.
  - Hacer necropsia únicamente de los cerdos testigos y de los cerdos vacunados que llegasen a morir. Lo anterior con la finalidad de confirmar el diagnóstico de FPC.
  - Deben colectarse muestras de tonsila, nódulo linfático retrofaríngeo, mandibular y bazo.
  - En los órganos antes mencionados se debe llevar a cabo la prueba de inmunofluorescencia para diagnóstico de FPC.
  - Los resultados de las pruebas de laboratorio, deben quedar anexados al expediente correspondiente a cada cerdo.

- Interpretación de resultados.

La prueba se considera satisfactoria si por lo menos el 80% de los cerdos vacunados sobreviven al desafío y no presentan signos clínicos o lesiones características de FPC y cuando por lo menos cuatro de los cinco cerdos testigos mueran y/o hayan presentado signos y lesiones características de FPC en el transcurso de los 14 días post-desafío.

Si el 80% de los cerdos testigos no enferma o muere, debe repetirse la prueba.

- Índices de reproducibilidad y repetibilidad.

100 % si se sigue el procedimiento descrito.

## **"APÉNDICE E" (NORMATIVO)**

### **PRUEBA DE SEGURIDAD E INOCUIDAD**

**- Objetivo.**

Demostrar que las vacunas contra la FPC no causan alteraciones en la salud de los cerdos, aún cuando se apliquen en sobredosis.

**- Campo de aplicación.**

En pruebas de constatación y en pruebas de control de calidad de cada uno de los lotes de vacuna contra la FPC.

**- Generalidades.**

Esta prueba se aplica para confirmar la inocuidad y seguridad de las vacunas contra la FPC.

**- Materiales.**

- Frascos de vidrio con diferentes capacidades de 50, 100, 300 y 500 ml.
- Jeringas desechables de 20 ml con aguja hipodérmica del No. 20 x 32.
- Marcadores grasos.
- Tapones de hule para frascos de vacuna.
- Termómetros.
- Reactivos.
- Alcohol al 70% etílico.

**- Biológicos.**

Vacuna para la prevención de la FPC reconstituida.

Dos lechones por lote a probar, con un peso de 18 a 20 kg libres de, o con un título máximo de anticuerpos contra el virus de la FPC de 1:4, determinados por la prueba de sueroneutralización-interferencia viral.

**- Condiciones ambientales.**

Alojamiento para los cerdos: corraletas limpias, previamente desinfectadas, aisladas de las demás áreas del laboratorio y/o de la granja.

Alimentación de acuerdo a la etapa.

Agua limpia y fresca.

Ventilación adecuada.

Espacio vital mínimo de 0.33 m<sup>2</sup> por cerdo.

**- Preparación y acondicionamiento de la muestra.**

Se reconstituyen 4 frascos de vacuna de cada lote a probar y se mezclan en un sólo frasco.

**- Procedimiento.**

- Inyectar por vía intramuscular lentamente 5 dosis en cada uno de los cerdos
- Observar a los cerdos diariamente durante 14 días para descartar alguna reacción adversa al producto.
- Registrar la temperatura rectal de cada uno durante el periodo de observación.

**- Interpretación de resultados.**

Se considera satisfactorio cuando los cerdos no presenten signos clínicos atribuibles a la vacuna.

**- Índices de reproducibilidad y repetibilidad.**

100% si se sigue el procedimiento descrito.

## **"APÉNDICE F" (NORMATIVO)**

### **PRUEBA DE COHABITACIÓN**

**- Objetivo.**

Demostrar que el virus vacunal de la FPC no es excretado por los cerdos vacunados.

**- Campo de aplicación.**

Pruebas de constatación y pruebas de control de calidad de las vacunas contra la FPC.

**- Generalidades.**

Con esta prueba se puede demostrar que el virus vacunal no es transmitido de los cerdos vacunados, hacia los no vacunados.

**- Materiales.**

- Frascos de vidrio con diferentes capacidades 50, 100, 300 y 500 ml.
- Gradillas.
- Jeringas desechables de 5 ml con aguja hipodérmica de 21 x 38 mm.
- Termómetro.
- Tubos de vidrio de 13 x 100 con tapón de aluminio.

**- Biológicos.**

- Por cada lote de vacuna, dos cerdos, que pueden ser los que fueron utilizados en la Prueba de seguridad, de 18 a 20 kg de peso con un título de anticuerpos contra el virus de la FPC, no mayor de 1:4 determinado por la prueba de sueroneutralización-interferencial viral.
- Por cada lote de vacuna, dos cerdos de 18 a 20 kg de peso, totalmente libres de anticuerpos contra el virus de la FPC determinados por la prueba de sueroneutralización-interferencia viral.
- Cuando se trate de 10 lotes, se utilizarán cuatro cerdos: dos por cada cinco lotes.

**- Vacuna contra la FPC reconstituida.**

**- Condiciones ambientales.**

- Alojamiento para los cerdos que se ocupan en esta prueba: corraletas limpias, previamente desinfectadas, aisladas de las demás áreas de la granja o laboratorio.
- Alimento de acuerdo a la etapa y al libre acceso.
- Agua limpia y fresca.
- Ventilación adecuada.
- Espacio vital mínimo de 0.33 m<sup>2</sup> por animal.

**- Procedimiento.**

- Los dos lechones que fueron utilizados para la prueba de seguridad, deben alojarse junto con los dos cerdos de cohabitación libres de anticuerpos, durante 21 días. Se debe registrar la temperatura de los cuatro cerdos diariamente.
- Después de 21 días de prueba se sangran para obtener suero.
- Las muestras de suero sanguíneo de estos cerdos, se debe someter a la prueba de interferencia viral-sueroneutralización para detectar anticuerpos contra el virus de la FPC.

**- Interpretación de resultados.**

Se considera satisfactoria la prueba, cuando los cerdos no hayan manifestado signos clínicos de FPC y en las muestras de suero sanguíneo no se detectan anticuerpos séricos contra el virus de la FPC.

**- Índices de reproducibilidad y repetibilidad.**

100 % si se efectúa en las condiciones descritas.