



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**PROYECTO DE UN MANUAL DE LECTURA PREVIA PARA
EL ESTUDIO DE LA PRODUCCION Y CONTROL
DE SUEROS Y VACUNAS**

T E S I S

Que para obtener el Título de:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P r e s e n t a n :

Mirna Cecilia Greco Eguiarte

Esperanza Solis Bravo

México, D. F.

1979



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

TESIS 1979

M. t. ~~158~~

156



Jurado asignado originalmente según el tema:

PRESIDENTE	PROF. MAGDALENA ACOSTA SEGURA
VOCAL	PROF. MA. DOLORES LASTRA ASPILICUETA
SECRETARIO	PROF. SALVADOR MARTIN SOSA
1er. SUPLENTE	PROF. NOEHMI MONROY DE AMOR
2do. SUPLENTE	PROF. MA. CRISTINA BELTRAN AGUERREBERE

Sitio donde se desarrolló el tema: Bibliotecas y Laboratorios
productores.

Nombre completo y firma de los sustentantes:

Mirna Cecilia Greco Eguiarte _____

Esperanza Solís Bravo _____

Nombre completo y firma del asesor del tema:

Prof. Magdalena Acosta Segura _____

Vo.Bo. _____

Con Cariño

..... A mis Padres, Esposo e Hijos

Mirna Cecilia Greco Eguiarte

A mis Padres; Carlos y Narcisa

A mis Hermanos, Tios y Primos

A mi abuelita Esperanza

A todas las personas que han contribuido
a la terminación de mi carrera y a mi de
sarrollo como profesionista.

Con cariño para:

Anita, Abe y Erica

Esperanza Solis Bravo

Agradecemos al personal químico

y técnico de:

Instituto Nacional de Higiene (S.S.A.)

Instituto Nacional de Virología (S.S.A.)

Laboratorios MYN S.A.

Laboratorios Hyland S.A.

Al Dr. Salvador Martín S.

Mtra. Dolores Lastra A.

Q.F.B. Socorro Salas

Q.F.B. Ma. Luisa García P.

Dr. Pedro Mirassou T.

Les agradecemos su ayuda y
apoyo

A la maestra Q.F.B. Ma. Magdalena
Acosta S. le agradecemos el haber
nos proporcionado su valioso tiem
po y experiencia para guiarnos en
la realización de este trabajo.

CONTENIDO

	PAG.
I. Objetivo	1
II. ✓ Reglamentación Vigente para Laboratorios Productores y de Inspección de Sustancias Biológicas	2
III. Vacunas Constituidas por Bacterias Vivas Atenuadas	
✓ A. Vacuna BCG	15
IV. Vacunas Constituidas por Bacterias Inactivadas	
A. Vacuna Antitifoídica	28
✓ VB. Vacuna Antipertussis	42
V. Toxoides	
✓ A. Toxoide Tetánico	58
B. Toxoide Diftérico	72
VI. Vacunas Constituidas por Virus Vivos Atenuados	
✓ A. Vacuna Antipoliomielítica	84
B. Vacuna Antisarampionosa	103
C. Vacuna Antivariólica	123
D. Vacuna Antirrubéola	139
VII. Vacunas Constituidas por Virus Inactivados	
A. Vacuna Antirrábica	157
VIII. Sueros Homólogos	
✓ A. Gamma globulina Humana Normal	173
B. Gamma globulina Humana Anti-D	186
IX. Sueros Heterólogos	
✓ A. Antitoxina Tetánica	199
✓ B. Suero Antialacrán	213
C. Suero Antiviperino	225
D. Suero Antirrábico	238
X. Apéndices	
Apéndice I : Pruebas Biológicas	248
Apéndice II: Pruebas Químicas	278

O B J E T I V O

Uno de los problemas que se presentan en los cursos de Inmunología al estudiar la producción y control de sueros y vacunas, es que la información relativa a estos productos es demasiado especializada y se encuentra publicada solo en revistas.

Este manual de lectura previa está orientado básicamente a recopilar en forma sistemática la información sobre los productos biológicos -- que se utilizan en gran escala en México, debido a la importancia que tiene este aspecto de la Inmunología en la formación del Q.F.B.

Para realizar el presente trabajo de tesis, se tomó como base el material elaborado por los alumnos de varios semestres de la asignatura - Inmunología (345), realizado bajo la supervisión del la Prof. Q.F.B. - Magdalena Acosta S., se realizaron una serie de visitas a los Laboratorios productores de biológicos con el fin de tener la información - al día, se complementó ésta en la fuentes bibliográficas y finalmente se le dió a los capítulos que integran este manual una redacción uniforme.

Como la preparación y control de estos productos es sumamente dinámica y se modifica constantemente, este manual tendrá que ser modificado de continuo, para lo cual, los compañeros de generaciones posteriores lo irán actualizando semestre a semestre por medio de visitas a los laboratorios productores y reportando sus experiencias en forma de adenda a cada capítulo.

Este manual servirá fundamentalmente como fuente de información general para la preparación de trabajos de seminario y como obra de consulta para ampliar conocimientos extraclase.

REGLAMENTACION VIGENTE PARA LABORATORIOS
FABRICANTES Y DE INSPECCION DE SUSTANCIAS BIOLÓGICAS

Todos los laboratorios que se dediquen a la fabricación de productos biológicos como son ; sueros, vacunas, alergenos, etc... deben tener licencia expedida por la Secretaría de Salubridad y Asistencia (S.S.A.). Este organismo oficial debe tener conocimiento de los métodos utilizados en la manufactura y el control de los productos biológicos elaborados y sus Oficiales Sanitarios comprobarán en inspecciones anuales que los métodos no han sido modificados.

NORMAS GENERALES PARA LABORATORIOS FABRICANTES.

1.0 PERSONAL

La fabricación debe ser dirigida por una persona que domine las técnicas de la elaboración de productos biológicos y que conozca los principios científicos en que se fundan estas técnicas. Esta persona debe tener, además, la autoridad suficiente para mantener la -diciplina entre el personal, en el que debe haber especialistas con una formación adecuada a las necesidades de la fabricación de los productos elaborados en el establecimiento. La S.S.A. debe llevar un registro en el que consten los nombres y títulos de estos -especialistas, en particular de los firmantes de los protocolos. Todo el personal asignado a la fabricación, a la ejecución de las

pruebas de control y el cuidado de los animales debe estar inmunizado con vacunas específicas y someterse regularmente a un reconocimiento médico que permita verificar su estado clínico satisfactorio.

El personal encargado de los laboratorios de control debe ser distinto del asignado al departamento de fabricación y no debe estar a las órdenes del jefe de este último. El establecimiento deberá tener por lo menos un Responsable y un auxiliar de Responsable ante la S.S.A. de la Identidad, pureza, conservación, preparación, dosificación y manufactura de los productos, que deberán ser profesionales con títulos legalmente registrados de Químico Farmacéutico Biólogo, o profesionales con títulos equivalentes legalmente registrados.

2.0 LOCALES E INSTALACIONES

2.1 Edificios

Todos los locales y edificios usados para la fabricación, para la ejecución de las pruebas de control y el mantenimiento de los animales, deben proyectarse de manera que reúnan las mejores condiciones para la limpieza, protección contra el polvo, los insectos, roedores, etc..., y construirse con los materiales adecuados. En todos estos locales, a excepción de las áreas estériles, habrá instalaciones de agua corriente, caliente y fría, así como desagüe.

Se tomarán las precauciones adecuadas para impedir la contaminación del sistema de desagüe con efluentes peligrosos y la diseminación de microorganismos por el aire. El personal dispondrá de los vestuarios y demás servicios necesarios. Todos los edificios y locales deben mantenerse constantemente limpios.

Cuando el local destinado a la fabricación de un biológico se emplee para la fabricación de otro, se esterilizará antes y después de fabricar en él dicho producto. Toda persona ajena a la producción que penetre a los locales de fabricación con fines de inspección deberá estar provista de ropa protectora esterilizada.

2.2 Cámaras de Temperatura Constante

La instalación debe comprender cámaras frigoríficas e incubadoras de suficiente capacidad, en las que la temperatura pueda mantenerse constante dentro de los límites deseados. Se deberá contar -- con registros constantes visibles.

2.3 Areas Estériles

Los locales estériles deberán ser de las menores dimensiones posibles, de techo bajo y superficie lisa, con objeto de lograr una mejor limpieza, deberán estar a presión positiva y el aire será filtrado y esterilizado. El personal laborará con vestuario estéril adecuado.

2.4 Instalaciones de Lavado y Esterilización

El establecimiento dispondrá de las instalaciones adecuadas para el lavado, así como de autoclaves, esterilizadores de calor seco y filtros esterilizantes. Los aparatos térmicos para esterilizar deberán tener registros de temperatura visibles.

2.5 Locales para los Animales

La disposición y los materiales de construcción de estos locales deben permitir el mantenimiento de las debidas condiciones de limpieza y protección eficaz contra insectos y otros animales.

Debe haber además locales aislados para mantener en cuarentena animales recién adquiridos, almacén para pienso, áreas aisladas para mantener animales en observación que han sido inoculados con microorganismos patógenos, locales para mantener animales empleados en pruebas que no representen peligrosidad, un lugar especial para la prueba de pirógenos, un local aislado para realizar autopsias y estudios anatomopatológicos.

2.6 Aparatos

Los instrumentos y aparatos deben ser de alta precisión y se calibrarán y comprobarán con regularidad

3.0 INSPECCION DE LA PRODUCCION

3.1 Métodos de Producción

Los métodos de producción estarán aprobados por la S.S.A.. Se prepararán instructivos donde consten los detalles de todas las fases de la fabricación y del control de calidad de cada producto. Toda modificación se someterá al dictamen de la S.S.A., y solo en caso de su aprobación podrá ponerse en práctica. Cada producto se fabricará en un local independiente y con material exclusivo. En los locales de fabricación no debe haber cepas de microorganismos que no sea las utilizadas en la obtención del producto biológico de que se trate.

3.2 Limpieza

Todas las instalaciones, aparatos y materiales usados en la fabricación deberán estar limpios y en caso necesario, estériles y exentos de pirógenos.

3.3 Orden

Todos los recipientes deberán tener rótulos firmemente adheridos que permitan la fácil identificación del contenido.

3.4 Precauciones contra la Contaminación

Todas las operaciones con los microorganismos esporógenos o con vi

rus se efectuarán en locales exclusivos, aislados y dotados con todo el material necesario. Se evitará la formación de aerosoles y se controlará que todos los desechos sean esterilizados antes de proceder a su eliminación para evitar contaminaciones en el propio local. Habrá que disponer de suficiente personal para que ningún miembro de él, en la misma jornada, trabaje en locales destinados a distintos productos. Las piezas anatomopatológicas deben examinarse en los locales exclusivos para ello (2,5), distintos a los empleados para la fabricación. Debe reducirse al mínimo el número de visitantes y no se permitirá a éstos la entrada a las áreas estériles.

3.5 Cuidado de los Animales

Los animales empleados en la producción o control no deben presentar ningún síntoma de enfermedades transmisibles, y deben estar convenientemente alojados; con una alimentación equilibrada y en las debidas condiciones de higiene. Los animales empleados en la producción o comprobación deberán tenerse en cuarentena por lo menos durante una semana, con observación diaria, por un veterinario especializado en animales de laboratorio. En algunos casos es conveniente mantener los locales a temperatura óptima para la especie de que se trate. También puede ser necesario disponer de razas puras. No se permitirá la salida del establecimiento de ningún animal vivo o muerto, éstos deberán ser incinerados.

4.0 ENVASADO Y RECIPIENTES

4.1 Salas de Envasado

El envasado debe hacerse en locales exclusivos, que se mantendrán en las debidas condiciones de esterilidad y dispondrán de instalaciones apropiadas para trasvasar cantidades específicas de sustancias biológicas.

4.2 Procedimientos de Envasado

El envasado se llevará a cabo de manera que no se produzca ninguna contaminación o alteración del producto y en locales totalmente in dependientes de los sectores donde se manipulan microorganismos vi vos y en particular virus. El procedimiento de envasado debe com probarse al menos dos veces al año; para ésto se llenarán como mínimo 500 ampollitas con un medio de cultivo rico, exento de sustancias bacteriostáticas y se incubará el lote completo. La proporción de contaminación no deberá llegar al 1% y todos los contaminantes deberán ser identificados.

4.3 Recipientes

Los recipientes se cerrarán lo más pronto posible después de llenados. Los tapones deben ser de un material que no provoque alteración.

ción del producto y permita conservar el cierre hermético hasta la fecha de caducidad del preparado.

5.0 PRUEBAS

Todas las pruebas de control se llevarán a cabo en locales distintos a los destinados a la producción. En las normas formuladas para cada producto biológico, se describirán las pruebas necesarias en las distintas fases de producción.

6.0 REGISTROS

6.1 Protocolos de Registros y Producción

Se llevará un registro permanente de todos los datos relativos a las diferentes fases de fabricación, control, envasado y distribución. También se dejará constancia escrita de todas las pruebas realizadas cualesquiera que sean los resultados. Los protocolos se conservarán hasta la fecha de caducidad del producto y estarán a disposición de la S.S.A..

6.2 Registro de Cultivos

Se anotarán en registros especiales todos los pases que se hayan practicado con cada uno de los cultivos existentes en los estable-

cimientos. Todos los cultivos estarán rotulados y se conservarán en orden.

7.0 MUESTRAS

De cada lote los Oficiales Sanitarios retirarán una cantidad suficiente de muestras para enviarlas al Laboratorio Nacional de Control de la S.S.A.. El laboratorio productor conservará una reserva de muestra de cada lote, como material de referencia hasta la fecha de caducidad del mismo y para repetir las pruebas si es necesario.

8.0 ROTULACION

Todos los productos deben llevar una etiqueta que permita identificarlos. El Código Sanitario de los Estados Unidos Mexicanos determina los datos que deben constar en la etiqueta del envase y en el paquete o caja exterior.

Indicaciones mínimas en la etiqueta del envase:

- El nombre del producto (denominación internacional, marca registrada o ambas cosas).
- Nombre de la enfermedad a la cual se destina de acuerdo a la nomenclatura internacional.
- Especificación del tipo de animal, germen, toxina o veneno que se usó para su preparación.

- La razón social del establecimiento preparador y la dirección -- del mismo
- El número de registro en la S.S.A..
- La leyenda "Hecho en México" o "Envasado en México" y el producto de importación llevará el gentilicio del país de origen precedido de la palabra "producto".
- Contenido neto, peso escurrido o drenado del producto expresado en unidades del sistema métrico decimal.
- El número del lote terminado.
- Requisitos de almacenamiento y fecha de caducidad.
- Las leyendas y textos deben escribirse en español en la parte de la etiqueta que normalmente se presenta al consumidor en el momento de la venta, se puede repetir en otros idiomas pero en caracteres menores y en lugar distinto a los correspondientes al idioma español, en caso que por el tamaño del envase no pueda contener todos los datos, quedará sujeta a lo que disponga la S.S.A..
- Modo de empleo.
- Indicación de sustancias capaces de producir reacciones nocivas y en caso necesario concentración de las mismas.
- Contraindicaciones que tenga el producto.
- La dosis recomendada y vía de administración.
- Instrucciones precisas para la descontaminación, inutilización o destrucción de los envases vacíos, en el caso de que éstos contengan sustancias peligrosas.

9.0 DISTRIBUCION Y EXPEDICION

9.1 Autorización de Distribución

No se autorizará la distribución de ningún lote, mientras no se hayan practicado y evaluado todas las pruebas necesarias y cumplido los requisitos oficiales de control externo y, además, si no se ha establecido una producción de calidad constante. Si un lote no cumple las normas de inocuidad se considerará interrupción de la producción y solo se reanudará la distribución de lotes cuando se demuestre de nuevo la constancia o satisfacción de las normas de inspección

9.2 Expedición

Las sustancias biológicas se expedirán con las precauciones debidas para que el producto conserve su actividad al llegar al punto de destino.

10.0 ALMACENAMIENTO Y FECHA DE CADUCIDAD

Las indicaciones sobre temperatura de almacenamiento y fecha de caducidad reproducidas en la etiqueta y proyecto de envase, deben estar basadas en datos experimentales y se someterán para su aprobación al Laboratorio de Control de la S.S.A..

10.1 Condiciones de Almacenamiento

La fecha de caducidad de la sustancia biológica se determinará y se fijará con el visto bueno de las autoridades del Laboratorio de Control de la S.S.A..

NORMAS GENERALES PARA LABORATORIOS DE CONTROL E INSPECCION

1.0 ADMINISTRACION Y PERSONAL

El Laboratorio Nacional de Control, estará administrado, directa o indirectamente por la S.S.A.. En el caso de que la fabricación y la inspección se efectúen en el mismo establecimiento, el Laboratorio Nacional de Control constituirá un servicio independiente que dependerá directamente de la S.S.A..

El laboratorio dispondrá además de técnicos de todas las sustancias biológicas que deban someterse a su aprobación.

2.0 LOCALES

Las normas para locales e instalaciones enunciadas en la sección de reglamentación, serán aplicables al Laboratorio Nacional de Control.

3.0 ATRIBUCIONES

La S.S.A. expedirá licencias a los fabricantes y se encargará de -

la inspección regular de sus instalaciones. Los fabricantes se proveerán de una licencia especial para cada sustancia biológica que vayan a preparar, licencia que podrá retirárseles cuando no se ajusten a las normas generales y especiales establecidas para dicha sustancia. Los Oficiales Sanitarios visitarán los locales y verificarán los procedimientos de fabricación.

El Laboratorio Nacional de Control dispondrá de animales sanos de varias especies y razas perfectamente establecidas, en número suficiente para llevar a cabo todas las pruebas necesarias y determinará la naturaleza de las pruebas a las que deberá someterse cada producto. No se autorizará la distribución de ningún lote de una sustancia biológica que no reúna las condiciones exigidas por el Laboratorio Nacional de Control.

B I B L I O G R A F I A

- Organización Mundial de la Salud, 1966, Serie de informes técnicos, 232o Informe, anexo I, Ginebra, II.
- Código Sanitario de los Estados Unidos Mexicanos, 1967, Ed. -- Ediciones Andrade, S.A., 4a. edición, México, D.F.

1.0 INTRODUCCION

La tuberculosis es una infección muy común en nuestro medio. El agente causal es Mycobacterium tuberculosis. Su vía de entrada es la oral, así como las vías respiratorias superiores.

Cuando el bacilo penetra en los tejidos de un individuo o de animal susceptible hay una reacción tisular inmediata; con proliferación de un gran número de células alrededor de los microorganismos para tratar de aislar el punto infeccioso, se forma así un acúmulo de células de color gris-perla con los bacilos tuberculosos en el interior, a estas lesiones se les denomina tubérculos. El proceso descrito ocurre en la mayoría de los individuos en buen estado de salud, con prácticas higiénicas adecuadas y con sus mecanismos de resistencia activos. Como resultado de esta infección los individuos se transforman en tuberculino reacción positivos. Cuando la resistencia del huésped es débil debido a la malnutrición, - al exceso de trabajo o a cualquier otro factor debilitante, los tejidos no son capaces de secuestrar a los bacilos, continúa el crecimiento de éstos destruyendo a las células vecinas y los tubérculos pueden coalescer. El centro del tubérculo toma una apariencia caseosa amarillenta y rápidamente se extiende la infección a todo el órgano. Si esto ocurre en pulmón el tejido se necrosa, se rompe la pared del órgano y la infección invade la pared de los bronquios.

El material caseoso contiene millones de bacilos vivos que se eliminan por el esputo y al toser. Los tejidos destruidos dejan cavernas. Algunas veces el proceso infeccioso invade arterias, destruye la pared de éstas y se presenta hemorragia pulmonar que puede ser fatal.

Aún cuando la infección pulmonar es la más frecuente, este microorganismo puede infectar cualquier tejido desde el epitelial hasta el óseo, siendo también frecuentes las infecciones urogenitales, la meningitis tuberculosa y la osteomielitis tuberculosa.

La infección puede permanecer latente y presentarse en forma activa cuando hay un descenso en los mecanismos de resistencia del paciente.

2.0 DEFINICION

Vaccinum tuberculosis (BCG) exsiccatum es una suspensión obtenida de un cultivo de la cepa Calmette-Guerin de M. tuberculosis género bovino, atenuada, en una concentración que varía de acuerdo con la vía de administración y que se presenta liofilizada; para administrarse por multipuntura (Vaccinum tuberculosis (BCG) exsiccatum percutaneum) debe contener 75 mg/ml; para administración oral (Vaccinum tuberculosis (BCG) exsiccatum perorale) 5 mg/ml y para vía intradérmica (Vaccinum tuberculosis (BCG) exsiccatum) 0.5 mg/ml.

3.0 CEPA

3.1 Origen de la Cepa

La cepa BCG fue aislada por Nocard en bovinos en 1902. Calmette y Guerin encontraron que perdía virulencia cuando se cultivaba en medio de papa glicerínada adicionada de bilis de buey, después de 230 pases resultó avirulenta incluso en cobayos que es la especie más sensible al bacilo. La atenuación abarcó de 1908 a 1920 y enseguida se empezó a administrar pero solo a niños recién nacidos. En 1928, Calmette demostró que las personas con reacción tuberculino-negativa contraían la infección más fácilmente que las tuberculino-reacción positiva, a partir de entonces se administró la vacuna también a individuos mayores con reacción tuberculino-negativa. En México se usa la cepa BCG Danesa 1331 con alta capacidad antigénica. Se recibe liofilizada, se rehidrata con glutamato de sodio al 1.5% estéril y se realizan los controles correspondientes (3.3).

3.2 Lote de Siembra

Se prepara sembrando tubos con medio de Sauton-papa (Sp) con la cepa rehidratada y se incuba a 37°C de 20 a 30 días, se toman muestras para los controles de pureza, identidad y virulencia residual. Se continúan realizando resiembras hasta un total de ocho, después se desecha este lote de siembra y se procede a abrir otra ampollita para reiniciar la línea de cultivo.

3.3 Controles a la Cepa y al Lote de Siembra

3.3.1 Pureza (Apéndice 1, 2.0)

En frotos teñidos con la técnica de Ziehl-Neelsen debe observarse bacilos rectos, delgados, ácido-alcohol resistentes. Además se realizan siembras en los diferentes medios mencionados en pruebas biológicas para esterilidad bacteriana y micótica (Apéndice 1,6.1) ya que Mycobacterium no desarrolla en estos medios.

3.3.2 Identidad (Apéndice 1, 1.0)

La identificación se realiza tomando en cuenta el aspecto morfológico de los bacilos teñidos y la forma típica de las colonias desarrolladas en un medio sólido.

3.3.3 Comprobación de la Ausencia de Mycobacteria Virulentas

Se inyectan 6 cuyes de 250 a 300 g con el equivalente de por lo menos 50 dosis humanas de la vacuna destinada a la inyección intradérmica, por vía subcutánea o intramuscular, se mantienen en observación por lo menos 6 semanas con una alimentación libre de aditivos que puedan alterar el resultado de la prueba (p.e. antibióticos). Al término del período de observación se sacrifican los animales y se efectúa la necropsia para detectar signos macroscópicos de tuberculosis; lo mismo se hará en los animales que hayan muerto antes de terminar el período de observación.

La prueba se considera satisfactoria si ninguno de los cuyes presen

ta signos de tuberculosis y si por lo menos las dos terceras partes de los animales de prueba sobreviven.

Si muere mas de la tercera parte de los cobayos pero ninguno muestra signos de infección tuberculosa, se repite la prueba con otros 6 cuyes por lo menos. Si en esta segunda prueba muere mas de la tercera parte de los animales, se desecha el lote, si no es así, se acepta.

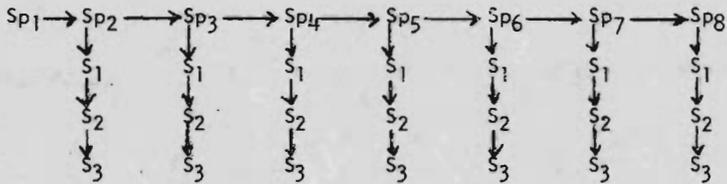
Si se presentan signos de infección tuberculosa se desechará el lote de siembra así como los lotes de producción que se obtuvieron de él mientras se realiza una investigación. Solo se reanudará la producción cuando se haya localizado y eliminado el foco del problema.

4.0 PRODUCCION DE LA VACUNA

Para la producción de la vacuna se usa el medio líquido de Sauton. Este está constituido de asparagina, glicerina, K_2HPO_4 , citrato férrico amoniacal y ácido cítrico y tiene un pH de 7.0. Se esteriliza de 116 a 118°C y 10 a 12 lb durante 25 minutos. Se emplean matraces de 300 ml con 100 ml del medio que se siembran depositando el inóculo en la superficie, se incuba a 37°C durante 8 días. A este cultivo se le denomina S_1 . Se continúan haciendo resiembras sucesivas de acuerdo a una secuencia calculada matematicamente para asegurar un desarrollo óptimo y evitar que el bacilo recupere su virulencia.

Sp = Siembra en medio de Sauton-papa del lote de siembra

S = Siembra en medio de Sauton



4.1.1 Pureza (Apéndice-1, 2.0)

La apariencia del desarrollo bacteriano muestra la pureza del cultivo; debe observarse desarrollo en forma de velo grueso, de color amarillo claro, caseoso y en la parte inferior el medio estará completamente claro.

De los cultivos con las características anteriormente descritas se hacen frotos que se tiñen por el método de Ziehl-Neelsen.

4.2 Cosecha

Los desarrollos de S₁, S₂ y S₃ que hayan pasado satisfactoriamente la prueba de pureza se transfieren a un filtro que lleva adaptado un émbolo, se lavan los matraces con porciones de glutamato al 1.5% estéril y se reúnen los líquidos de lavado con el cultivo; con ayuda del émbolo se elimina el líquido excedente hasta formar una masa húmeda compacta o "plato" de BCG que se coloca sobre papel filtro estéril para eliminar el exceso de agua hasta que contenga solo el 70% de humedad.

4.2.1 Determinación de Humedad

Consiste en determinar con exactitud la humedad que contiene el -- "plato" de BCG para poder calcular las diluciones apropiadas según la concentración a que va a quedar la vacuna.

4.3 Preparación de la Suspensión

Se suspende el desarrollo en solución de glutamato al 1.5% estéril usando esferas de acero inoxidable estériles y un agitador mecánico para disgregar los acúmulos de microorganismos, la concentración de la suspensión está dada según la vía de administración para permitir una correcta dosificación durante el envasado.

5.0 CONTROL AL PRODUCTO TERMINADO A GRANEL

5.1 Esterilidad Bacteriana y Micótica (Apéndice 1, 6.1)

5.2 Comprobación de la Ausencia de Mycobacteria virulentas (3.3.3)

5.3 Cuenta Indirecta de Microorganismos Viables (Apéndice 1, 9.1)

Se usa el respirómetro de Warburg. Se colocan 3 ml de una suspensión que contenga 10 mg de microorganismos/ml en medio de Sauton, en un matraz de Warburg de 6 ml de capacidad y se mantiene con agitación a 37°C durante 2 h; se mide el consumo de oxígeno y el vo-

lumen corresponde a la concentración teórica de microorganismos -- que se saca de tablas obtenidas experimentalmente. También se realiza la cuenta indirecta por siembra en medio sólido. Para ello se preparan diluciones de la suspensión con medio de Sauton a tener 1:20 000, 1:40 000 y 1:80 000, de cada uno, se siembra 0.1 ml en medio de Lowenstein o de Ogawa como sigue: 5 tubos para la -- primera y segunda diluciones y 10 para la tercera; los tubos se incuban a 37°C y se cuenta el número de colonias a las 4 y 6 semanas, de estos datos se calcula estadísticamente el número de microorganismos por mg de vacuna.

5.4 Concentración Total de Microorganismos

Se determina por nefelometría leyendo la suspensión a 400 nm y el valor obtenido en el aparato se interpola en una curva estándar obtenida usando una suspensión de partículas distribuida por la OMS.

5.5 pH (Apéndice II, 4.0)

El pH de la suspensión antes de liofilizar debe ser de 6.0 a 7.2

6.0 ENVASADO

Se dosifica en ampollitas ámbar en volúmenes adecuados según la vía de administración, con agitación continua. Se liofilizan y sellan las ampollitas al vacfo.

7.0 CONTROL AL PRODUCTO TERMINADO ENVASADO

7.1 Esterilidad Bacteriana y Micótica (Apéndice I, 6.1)

7.2 Microorganismos Viables (5.3)

Se toman 10 ampolletas al azar y su contenido se suspende con agua destilada a tener 0.05 mg en 0.1 ml, a partir de esta suspensión - se preparan diluciones 1:10 000, 1:20 000 y 1:40 000 las cuales se siembran en medio de cultivo tal como se describe en 5.3. Se deben encontrar al menos 1×10^6 microorganismos por ml de suspensión.

7.3 Concentración Total de Microorganismos (5.4)

7.4 Prueba de Identidad (3.3.2)

7.5 Prueba de Reactividad Cutánea en el Cuy

Se inyectan 0.1 ml de la vacuna 1:1, 1:10, 1:100 y 1:1000 por lo menos a 4 cuyes de 250 a 300 g, por vía intradérmica probando las cuatro diluciones en cada animal. A la quinta semana se les inyectan 0.1 ml de PPD; los resultados deben coincidir con los obtenidos sistemáticamente en los lotes de producción.

7.6 Comprobación de la Ausencia de Mycobacteria Virulentas (3.3.3)

7.7 Inocuidad (Apéndice I, 8.0)

7.8 Humedad Residual (Apéndice II, 1.0)

No más del 3% ni menos del 1%.

7.9 Estabilidad

Se mantiene un lote de por lo menos 6 ampollitas a 37°C y otro lote, también de por lo menos 6 ampollitas a 4°C y se determina el tiempo en que el contenido de microorganismos viables de las muestras mantenidas a 37°C es de 50% con respecto a las muestras mantenidas a 4°C. El tiempo debe ser mayor o cuando menos igual al obtenido en una vacuna de referencia.

7.10 Control Externo

En México solo el Instituto Nacional de Higiene produce esta vacuna por lo que no se controla en el Laboratorio Central de la S.S.A. - sino que se envían muestras periódicamente al State Serumintitut de Dinamarca para su control.

8.0 ALMACENAMIENTO Y FECHA DE CADUCIDAD

La vacuna liofilizada se debe conservar en ampollita ámbar protegida de la luz, entre 2 y 10°C.

La vacuna es estable 15 meses después de la última prueba de potencia satisfactoria.

9.0 ROTULADO

Además de los datos especificados en la Reglamentación Vigente para Laboratorios Fabricantes de Sustancias Biológicas debe indicar lo siguiente:

Vacuna BCG liofilizada

Cepa usada

Cantidad de microorganismos por dosis humana

Estabilizador empleado

No contiene conservadores

Volumen total contenido en el envase después de rehidratar

Volumen y naturaleza del diluyente

Dosis recomendada

Vía de administración /

Fecha de caducidad

Consérvese entre 2 y 10 °C

Protéjase de la luz

Descártese la vacuna que no se haya empleado en las siguientes 8 h a su rehidratación.

10.0 PRESENTACION Y ESQUEMA DE INMUNIZACION

10.1 Presentación

Envases con 10 o más dosis según la vía de administración con el diluyente por separado.

10.2 Esquema de Inmunización

La vacuna oral se administrará en dosis única a niños recién nacidos que no hayan estado en contacto con enfermos tuberculosos.

Las vacunas por multipuntura, escarificación e intradérmica se administrarán a individuos mayores.

La inmunidad resultante es permanente.

11.0 INDICACIONES Y CONTRAINDICACIONES

11.1 Indicaciones

Después de administrada la vacuna se esperan 6 meses para llevar a cabo la tuberculino-reacción, en la mayoría de los casos se encuentra conversión a tuberculino-reacción positiva. En caso contrario se repite la vacunación y la tuberculino-reacción a los 6 meses; en caso de resultar ésta negativa, ya no se aplica la vacuna pues se trata de un individuo analérgico.

11.2 Contraindicaciones

La OMS recomienda que no se debe administrar a personas con tuberculino-reacción positiva.

Sin embargo en los últimos años, el consenso general de los sanitarios es que la vacuna BCG debe aplicarse a todos los individuos independientemente del resultado de la tuberculino-reacción, ya -- que los riesgos al aplicarla a individuos tuberculino-reacción positiva son de menor importancia si se considera que al administrar la vacuna se tiene mayor seguridad de que el individuo quedó efectivamente protegido frente a la infección.

B I B L I O G R A F I A

- Organización Mundial de la Salud, 1960, Serie de informes técnicos, 18^o informe, Ginebra; 29.
- Wiessmann ,E., Microbiología Médica, 1974, Salvat Ed. S.A., España, 67.

VACUNA ANTITIFOIDICA

1.0 INTRODUCCION

Salmonella typhi penetra al organismo debido a la ingestión de productos contaminados; los alimentos que se consumen crudos pueden adquirir el microorganismo por contacto con las manos sucias de portadores asintomáticos. Las epidemias con frecuencia son ocasionadas por la contaminación del agua potable con aguas negras, esto sucede especialmente en los casos de desastres. Los mariscos cuando provienen de zonas donde se descargan aguas negras son también fuente de infección.

El periodo de incubación es de 10 a 14 días, gradualmente se desarrolla fiebre recurrente con tendencia a elevarse, la cefalea intensa y la adenitis mesentérica suelen ser los síntomas más destacados durante los primeros 10 días y van acompañados de malestar general, anorexia, náuseas y vómito; durante este periodo son comunes el estreñimiento, las molestias abdominales y meteorismo. Hacia la tercera semana la fiebre se mantiene elevada con variaciones diarias - entre 39 y 40.5°C asociadas con escalofríos y sudoración intensa; - en ocasiones se presenta delirio y se observa en el paciente una expresión turbada y de asombro. La administración de antipiréticos produce un brusco descenso de la temperatura seguido a las pocas horas de un ascenso hasta el nivel anterior; en casos benignos la temperatura se mantiene alta durante una o dos semanas y luego tiende a normalizarse hacia el trigésimo día. Son características de es

ta fase la leucopenia, esplenomegalia y la aparición de un exantema constituido por brotes de manchas rosadas que se encuentran principalmente en el tronco, este exantema es difícil de detectar en personas de piel muy oscura, también puede presentarse diarrea.

A nivel sistémico el bacilo invade el tejido linfático del intestino y de allí pasa a los ganglios mesentéricos multiplicándose en ellos para llegar al conducto torácico, de donde pasan a la circulación general, debido a esto durante la primera semana puede realizarse el diagnóstico mediante el hemocultivo.

A partir del torrente circulatorio se disemina a varios órganos incluyendo riñón; ocasionando bacteriuria. Los microorganismos también se localizan en ganglios linfáticos, en bazo; el cual se hace palpable, en pulmón, médula ósea e hígado; se multiplica en vías biliares y regresa con la bilis al intestino delgado lo cual contribuye aún más a la afección de las placas de Peyer. Durante la segunda y tercera semanas se eliminan gran cantidad de bacilos en las heces fecales, esto hace posible el diagnóstico mediante coprocultivo. Las lesiones más importantes en esta etapa son: Necrosis focal del hígado, inflamación de la vesícula biliar, hiperplasia y necrosis del tejido linfoide, por ejemplo de las placas de Peyer, lo cual llega a ocasionar hemorragia y perforación intestinal que pueden ser mortales.

Después de una infección clínica o subclínica, en cierto número de individuos, el bacilo permanece en los tejidos durante períodos de tiempo variables y son eliminados en las excretas, constituyéndose así en portadores convalecientes o portadores sanos permanentes que

como se dijo antes, son fuente de infección. ✓

Los anticuerpos, en títulos detectables por las técnicas de alutina ción, aparecen durante la segunda semana de la enfermedad.

Algunas especies de *Salmonella* causan gastroenteritis, también llamada "intoxicación alimenticia", entre éstas se tiene a *S. typhimurium*, *S. enteritidis* y *S. derby*. Los síntomas comienzan después de 1 a 3 días de incubación y se deben a una irritación local intensa en las mucosas producida por las toxinas liberadas por los microorganismos ingeridos. No se presenta invasión del sistema circulatorio ni diseminación a otros órganos.

2.0 DEFINICION

Vaccinum febris typhoidi (calore-phenolo-inactivatum) es una suspensión en solución salina isotónica que contiene 1000 millones de bacterias por ml de Salmonella typhi 2, inactivadas por calentamiento a 56°C durante 1 h y adicionada del 0.5% de fenol como conservador.

3.0 CEPA

La cepa empleada en la preparación del lote semilla es Salmonella typhi Ty2, que se recibe y conserva liofilizada.

3.1 Lote de Siembra

El material liofilizado se rehidrata con 0.5 a 1.0 ml de infusión -

cerebro -corazón o con agua peptonada al 1% pH 7.2 y se siembran cajas con gelosa nutritiva que se incuban por 24 h a 37°C. Se seleccionan las colonias con aspecto típico que se siembran en tubos con caldo nutritivo y se incuban de 18 a 20 h a 37°C. Con el desarrollo de los tubos se siembran matraces con caldo nutritivo y se incuban de 18 a 20 h a 37°C.

3.2 Controles a la Cepa y al Lote de Siembra

3.2.1 Esterilidad Bacteriana y Micótica (Apéndice 1, 6.1)

3.2.2 Pureza (Apéndice 1, 1.2)

Se realizan frotis que se tiñen por el método de Gram, se deben observar al microscopio exclusivamente bacilos Gram negativos, si hay presencia de cualquier otro tipo de microorganismo el cultivo se desecha.

3.2.3 Prueba de Identidad (Apéndice 1, 1.3.2)

Se realiza por medio de reacciones de aglutinación empleando la suspensión de bacterias vivas y sueros anti-Salmonella typhi (anti-Vi anti-H y anti-O) de alto título. Con los sueros anti-Vi y anti-H se deberán obtener reacciones positivas de acuerdo al título de los sueros, en tanto que con el anti-O la aglutinación será ligera o negativa. Después de calentar la suspensión durante 60 minutos en

baño de agua hirviendo , la aglutinación obtenida con el suero anti-0 será la correspondiente al título de dicho suero.

3.2.4 Prueba de Virulencia

Se emplea un lote de ratones de 15 a 20 g que se inocula por vía intraperitoneal con 0.5 ml de una suspensión en solución salina isotónica conteniendo 5×10^6 microorganismos por ml, obtenidos de un cultivo de menos de 24 h de la cepa. Por lo menos el 50% de los animales inoculados deberán morir en un período de 72 h. ✓

4.0 OBTENCION DE LA VACUNA

4.1 Siembra

Se emplean frascos de Roux conteniendo gelosa nutritiva preparada a partir de carne. Se siembran cada uno de los frascos de Roux con 6 a 8 ml de la suspensión del lote de siembra y se incuban horizontalmente a 37°C durante 18 h.

4.2 Cosecha

Los cultivos se observan macroscópicamente y se desechan los que -- presenten desarrollo atípico. A cada frascos de Roux se le añaden de 10 a 15 ml de solución salina isotónica amortiguada con fosfatos pH 7.2 , se agita suavemente para desprender el desarrollo --

bacteriano y se toma una muestra para realizar un frote que se teñirá al Gram. Las suspensiones que den resultados satisfactorios se reúnen en frascos de centrifuga con succión y filtrando a través de gasa. Se centrifuga a 3500 rpm durante 40 minutos, se elimina el sobrenadante y el sedimento se resuspende en solución salina isotónica amortiguada, las suspensiones contenidas en cada frasco de centrifuga se prueban nuevamente por tinción al Gram.

4.3 Reunión de Concentrados

Las suspensiones que pasaron satisfactoriamente las pruebas de pureza, se reúnen en un frasco Pyrex de 20 litros, en seguida se realiza la cuenta nefelométrica.

4.3.1 Cuenta Directa de Microorganismos ✓

Se toma una muestra de la suspensión concentrada, después de homogeneizarla perfectamente se diluye 1 a 20 y se lee en el nefelómetro a 500 nm y se determina la concentración de bacterias comparando con el estándar de la O.M.S. que consiste en una suspensión de partículas de sílice y que equivale a 10 UI de opacidad por ml de suspensión bacteriana.

4.4 Inactivación

Se le adapta al frasco un termómetro estéril y se coloca en un baño

de agua previamente calentado a $56 \pm 1^{\circ}\text{C}$, cuando la temperatura de la suspensión bacteriana llega a 56°C se empieza a contar el tiempo de calentamiento de 1 h.

Durante el calentamiento la suspensión se agita con frecuencia.

4.4.1 Prueba de inactivación (Apéndice 1, 3.0)

Se siembran dos tubos conteniendo caldo nutritivo con 0.5 ml de la suspensión y dos cajas de gelosa nutritiva con 0.2 ml, se incuban durante 24 h a 37°C . Si se observa crecimiento en cualquiera de los cultivos, se repite el proceso de inactivación con calor y nuevamente se realiza la prueba.

4.5 Dilución Final de la Vacuna

En base al contenido de microorganismos (4.3.2) se realiza la dilución final a tener 1000 millones de bacterias por ml, empleando como diluyente solución salina isotónica amortiguada a pH 7.2 a la que se le adiciona la cantidad necesaria de fenol para tener 0.5% como concentración final.

5.0 CONTROLES AL PRODUCTO TERMINADO A GRANEL

5.1 Esterilidad Bacteriana y Micótica (Apéndice 1, 6.1)

5.2 Pureza (3.2.1)

5.3 Identidad (3.2.2)

5.4 Concentración de microorganismos

Se realiza como se describe en (4.3.2), sin hacer dilución.

5.5 Prueba de Inocuidad (Apéndice I, 8.0)

5.6 Prueba de Potencia (Apéndice I, 9.7)

Animales de Prueba: Se utilizan ratones susceptibles a S. typhi - con un peso de 14 a 16 g y de un solo sexo. Se emplean como mínimo 4 grupos de no menos de 12 animales para cada lote de vacuna; y un lote de 40 animales para el control del microorganismo de prueba. Los ratones se inmunizan con 0.5 ml por vía intraperitoneal - con las diluciones de la vacuna de referencia y de cada uno de los lotes de vacuna en estudio. Estas diluciones se preparan con solución salina isotónica y son 1:40, 1:200, 1:1000 y 1:5000. Por lo menos el 90% de los ratones asignados a cada grupo debe sobrevivir el período de inmunización de 7 días.

Microorganismo de prueba: Se emplea como cepa de prueba una que haya demostrado tener una DL₅₀ de 10 gérmenes/ ml que se conserva liofilizada. Se rehidrata y se siembra en caldo nutritivo, se incuba 48 h a 37°C, se resiembra en gelosa nutritiva y se incuba 24 h a 37°C, con el desarrollo se hacen frotos que se tiñen al Gram para verificar la morfología y pureza de la cepa. El cultivo que se em

plea para hacer la prueba no debe ser de más de 18 h y de no más de 5 pases sucesivos. El desarrollo se suspende en solución salina isotónica, se filtra y se ajusta nefelométricamente a tener 10^9 microorganismos por ml, de esta suspensión se parte para hacer diluciones con solución salina isotónica conteniendo respectivamente ----- 20 000, 2000, 200 y 20 microorganismos por ml y después se diluye con mucina al 5% para tener 1000, 100, 10 y 1 microorganismo en --- 0.5 ml. La primera dilución es la dosis de prueba y las tres últimas se utilizan para la determinación de la DL_{50} .

Desarrollo de la prueba: Todos los ratones inmunizados tanto con la vacuna de referencia como con las vacunas de prueba, se inoculan por vía intraperitoneal, comenzando con los vacunados y terminando con los testigos y no debe transcurrir un tiempo mayor de dos horas y media desde el momento en que se recoge el desarrollo bacteriano hasta que se inocula el último ratón. Los ratones testigos se inoculan en grupos de 10 con 1000, 100, 10 y 1 microorganismos suspendidos en 0.5 ml de mucina.

De la suspensión en solución salina que contiene 20 microorganismos por ml, se siembra 1 ml en una placa de gelosa nutritiva para realizar la cuenta de microorganismos viables,

Esta placa se incuba 24 h a $37^{\circ}C$ y se cuenta el número de colonias desarrolladas que deberá ser cercano a 20.

Después de la inoculación con el cultivo de prueba, se ajusta el número de animales a 10 por cada dilución y se observan diariamente durante tres días. Se anotan las muertes y sobrevivientes de cada dilución y se calcula la DE_{50} por el método de Reed-Muench. La va

cuna de prueba deberá mostrar por lo menos una protección igual a la de referencia.

Los ratones testigos inoculados con la dosis de prueba deberán mostrar una mortalidad del 80 al 100%. Con los resultados de los grupos de ratones testigos inoculados con las diluciones del microorganismo de prueba, se calcula la DL₅₀.

5.7 Controles Químicos

5.7.1 pH (Apéndice II, 4.0)

De 6.8 a 7.2

5.7.2 Contenido de Proteínas Totales (Apéndice II, 11.1)

Debe contener no menos de 0.05 mg/ml

5.7.3 Cloruro de Sodio (Apéndice II, 8.0)

No más de 0.9% de cloruro de sodio

5.7.4 Fenol (Apéndice II, 9.0)

No más de 0.5%

6.0 ENVASADO

Se envasa en frascos ampula con agitación continua.

7.0 CONTROLES AL PRODUCTO TERMINADO ENVASADO

7.1 Esterilidad Bacteriana y Micótica (Apéndice I, 6.1)

7.2 Identidad (3.2.2)

7.3 Inocuidad (Apéndice I, 8.0)

7.4 Potencia (5.6)

7.5 Controles Químicos

7.5.1 pH (Apéndice II, 4.0)

De 6.8 a 7.2

7.5.2 Proteínas Totales (Apéndice II, 11.1)

No menos de 0.05 mg/ml

7.5.3 Cloruro de Sodio (Apéndice II, 8.0)

No mas de 0.9%

7.5.4 Fenol (Apéndice II, 9.0)

No mas de 0.5%

8.0 ALMACENAMIENTO Y FECHA DE CADUCIDAD

La vacuna debe conservarse a una temperatura de 2 a 10°C.

La fecha de caducidad no debe ser posterior a 2 años después de la cosecha de los cultivos, y no debe ser posterior a 18 meses de la última prueba de potencia satisfactoria.

9.0 ROTULADO

Además de los datos especificados en la Reglamentación Vigente para Laboratorios Fabricantes de Sustancias Biológicas, debe indicar lo siguiente:

Vacuna antitifoídica

Cepa empleada

Contenido en millones de bacterias por ml

Conservador y su concentración

Cloruro de sodio y su concentración

Volumen total contenido en el envase

Dosis; 0.5 ml

Vía subcutanea

Fecha de caducidad

Consérvese de 2 a 10°C

Agítese antes de usarse

10.0 PRESENTACION Y ESQUEMA DE INMUNIZACION

10.1 Presentación

Frasco ampula con 5 ml o con 25 ml (10 y 50 dosis respectivamente).

10.2 Esquema de Inmunización

Se aplican dos dosis de 0,5 ml con intervalo de una a dos semanas, en los niños la dosis es de 0.25 ml por vía subcutánea.

En caso de riesgo profesional y en zonas endémicas, se recomienda un refuerzo anual.

11.0 INDICACIONES Y REACCIONES SECUNDARIAS

11.1 Indicaciones

Inmunización activa contra la fiebre tifoidea.

11.2 Reacciones Secundarias

Se aprecia dolor, rubicundez e inflamación en el sitio de la inyección, los síntomas generales pueden llegar a ser severos e incluyen pirexia, malestar general, cefalgia y en raras ocasiones se puede -

llegar a presentar vómito, diarrea y dolor abdominal.

B I B L I O G R A F I A

- Organización Mundial de la Salud, Serie de Informes Técnicos, -- 361^o Informe, Ginebra, 1967, 63.
- Instituto Mexicano del Seguro Social, Cuadro básico de medicamentos, 4^a Ed. , México, 1973, .
- Barrett, J.T., Inmunología 1^a edición, Nueva Ed. Interamericana S.A. de C.V., México, 1972, 131.
- Beeson P.B. y W. McDermott, Tratado de Medicina Interna, Vol I, Editorial Interamericana S.A. , México, 1964, 228.
- Gebhardt L.P. , Microbiología, Ed. Interamericana S.A., México , 19 , 258.
- Jawetz E. , J.L. Melnick y E.A. Adelberg, Manual de Microbiología Médica, 3^a ed. , El Manual Moderno S.A. , 1968, 231.
- Huckstep R.L., Fiebre Tifoidea y otras Infecciones por Salmone-lla, E & S Livingstoe Ltd., Inglaterra, 1962, 110.

VACUNA ANTIPERTUSSIS

1.0 INTRODUCCION

El agente causal de la tosferina, Bordetella pertussis penetra al organismo por las vías respiratorias superiores.

El contagio se produce por el pflugge o por contacto con portadores.

Los síntomas ^{malos que precede a una enfermedad} prodromicos hacen que se pueda confundir con el resfriado común, y consisten en cefalea, ligero acenso de temperatura, dolores musculares y ardor en la garganta.

El período de incubación es de dos semanas, al cabo de las cuales se presenta una etapa catarral con tos que va en aumento. El bacilo se instala en la mucosa de la tráquea y bronquios e interfiere con el movimiento ciliar, al lisarse los microorganismos se liberan endotoxinas que irritan a las células superficiales dando lugar a un incremento de los síntomas catarrales y a una marcada linfocitosis; mas tarde puede presentarse necrosis en el epitelio con infiltraciones polimorfonucleares, inflamación peribronquial y neumonía intersticial. Los bacilos se localizan entre los cilios de las vías respiratorias superiores por lo que esta etapa es la más contagiosa.

En la etapa ^{extrema intensidad de una enfermedad} paroxística que dura de 4 a 5 semanas se presentan los accesos de tos frecuentes acompañados del silbido característico de esta enfermedad y se produce un rápido agotamiento, pudiendo estar asociado con convulsiones, vómito y ^{coloración azul, que surge a medida de la} cianosis, durante esta etapa ^{los accesos violentos e insustentados de los misales} aumenta el riesgo de complicaciones por infecciones colaterales con neumococo y otras bacterias que producen neumonía bronquial. Pos-

teriormente se presenta una etapa de recuperación muy lenta que se prolonga de dos a tres meses.

La tosferina es una enfermedad típica de la infancia que proporciona inmunidad permanente. Su índice de mortalidad es muy bajo en sí misma pero se ve aumentado por las complicaciones colaterales y por la desnutrición.

A esta infección no se le da la importancia que realmente tiene, ya que puede presentarse una secuela encefalítica que con relativa frecuencia causa trastornos neurológicos que pueden llegar hasta el retraso mental irreversible así como trastornos permanentes de la función respiratoria.

2.0 DEFINICION

Vaccinum pertussis es una suspensión de B. pertussis ^{de crecimiento} en fase I inactivada por la adición de timerosal al 0.05%, refrigeración a 5°C -- por dos semanas y calentamiento a 56°C durante 30 minutos, o bien -- por la adición de formalina al 0.07% y calentamiento a 56°C durante 1 h, y que contiene 10 000 millones de bacterias por dosis individual humana y timerosal al 0.01% como conservador.

Casi nunca se emplea sola, sino mezclada con los toxoides tetánico y diftérico adsorbidos en foafato de aluminio.

3.0 CEPAS

Para su preparación se usan las cepas 509 y 134 así como las aisla-

das en la localidad, estas cepas completan el cuadro antigénico necesario y se mantienen liofilizadas.

3.1 Preparación del Lote de Siembra

Se rehidrata una ampollita del cultivo liofilizado de cada cepa con 1 ml de peptona al 1% estéril y se siembra en cajas con medio de Bordet-Gengou incubándolas a 35 °C por 72 h, a cada cultivo se le realizan pruebas de identidad y pureza; los que satisfagan éstas, se siembran en cajas de medio de Bordet-Gengou que se incuban 48 h a 35 °C; del desarrollo se siembran tubos con el mismo medio y se incuban en iguales condiciones.

Con cada tubo se siembra un matraz Erlenmeyer de 500 ml conteniendo 100 ml de medio HBP-1 que se incuba a 35 °C por 24 h con agitación rotatoria (200 rpm).

3.2 Controles a las Cepas y al Lote de Siembra

3.2.1 Pureza (Apéndice I, 2.0)

Se realizan frotos que se tiñen al Gram; deberán observarse exclusivamente cocobacilos Gram-negativos con tendencia a formas cadenas cortas.

3.2.2 Identidad

3.2.2.1 Características del Desarrollo (Apéndice I, 1.1)

En medio de Bordet-Gengou deberán observarse colonias gris-perla, lisas y brillantes a las 48 h de incubación a 34 ó 36°C. En gelosa sangre debe observarse desarrollo con actividad hemolítica a las 48 ó 72 h. No debe haber desarrollo en gelosa nutritiva si el microorganismo está en fase I, ya que cuando cambia de fase sí se produce desarrollo.

3.2.2.2 Prueba de Aglutinación (Apéndice I, 1.3.2)

Se mezclan 0.1 ml de la suspensión bacteriana que contenga 1×10^{10} microorganismos por ml con 0.1 ml del suero antipertussis fase I en diluciones seriadas 1:100, 1:500, 1:1000 y 1:2000, en tubos de 12 X 75 mm, se agita y se adicionan 0.5 ml de solución salina isotónica para facilitar la lectura que se realiza sobre la cara cóncava del espejo de un microscopio para observar mejor la aglutinación, - el título obtenido debe aproximarse al del suero inmune empleado.

3.2.3 Virulencia en Ratón

Se inoculan dosis de 50 000 a 500 000 microorganismos contenidos en 0.03 ml, por vía intracerebral a ratones de 12 g que deberán morir en 5 a 6 días.

Se inoculan 0.03 ml de la suspensión que contiene $50^2 - 500000$ por vía intracerebral a ratones de 12g. Los animales deben morir en 5 a 6 días.

3.2.4 Demonecrosis en Conejo

Se inyectan 0.1 ml de una suspensión que contenga 1000 millones de microorganismos por ml, por vía intradérmica a conejos albinos, después de 48 a 72 h, se deberá observar una zona de necrosis hemorrágica característica en el sitio de la inoculación.

4.0 PREPARACION DE LA VACUNA

Se usa el medio líquido HBP-1 que contiene; ácidos casamínicos, almidón soluble, glutatión, ácido nicotínico, NaCl, KCl, K_2HPO_3 , ---- $MgCl \cdot 7H_2O$, $CaCl_2$, $FeSO_4$, $CuSO_4$, el pH final debe ser de 6.9 .

4.1 Siembra

Con el desarrollo de cada matraz Erlenmeyer (3.l) se siembran garrafones de 4 litros conteniendo 1.5 litros de medio HBP-1, se incuban a 35°C por 18 h con agitación rotatoria (125 rpm) y de este desarrollo se inoculan garrafones de 4 litros conteniendo 1.5 litros del mismo medio que se incuban 48 h a 35°C con agitación rotatoria (-- 125 rpm).

4.2 Cosecha

Se revisan macroscópicamente los cultivos; los que presenten desarrollo atípico se desechan. De los cultivos aceptados se realizan frotos para la prueba de pureza y el contenido de los frascos de desarrollo correspondientes a cada una de las cepas que muestren re-

sultado satisfactorio se pasan a frascos de centrifuga filtrando la suspensión a través de gasa. Se centrifuga a 3000 rpm durante 60 minutos, el sobrenadante se desecha y el sedimento se resuspende en solución salina amortiguada estéril. A estas suspensiones se les realizan las pruebas de esterilidad bacteriana y micótica y de pureza y se reúnen para constituir la "suspensión individual" .

4.3 Controles Intermedios a la "Suspensión Individual"

4.3.1 Pureza (3.2.1)

4.3.2 Esterilidad Bacteriana y Micótica (Apéndice I, 6.1)

4.4 Mezcla de las "Suspensiones Individuales"

Si las pruebas anteriores son satisfactorias se procede a reunir -- los concentrados de las cepas en partes iguales, enseguida se realiza la cuenta nefelométrica, que se hace antes de inactivar, para evitar un resultado erróneo provocado por la lisis de los microorganismos durante el proceso.

4.4.1 Cuenta Nefelométrica

Se determina la concentración de bacterias comparando contra un estándar de la OMS que consiste en una suspensión de vidrio Pyrex que se lee a 530 nm, que equivale a 10 UI de opacidad por ml de suspen-

sión y corresponde a 10 000 millones de microorganismos en 0.5 ml.

4.5 Inactivación

Se ajusta el pH de la suspensión a 7.0 y se adiciona timerosal al 10% hasta tener una concentración final de 0.05% se almacena a 4°C durante una semana y enseguida se somete a calentamiento a 56°C por 30 minutos; se incuba a 24 a 36°C y se almacena a 4°C mientras se realiza la prueba de inactivación, si ésta no es satisfactoria se repite el período de calentamiento una vez más y se realiza nuevamente la prueba, si no es satisfactoria todavía se prolonga el tiempo de refrigeración y se vuelve a probar hasta que se obtengan resultados satisfactorios.

4.5.1 Prueba de Inactivación (Apéndice I, 3.0)

Se siembran alícuotas de la suspensión en medio HBP-1 sólido y líquido, incubándolas a 35°C por 7 días; no debe haber desarrollo.

4.5.2 Pureza (3.2.1)

4.5.3 Atoxicidad

Se pesan dos lotes de por lo menos 10 ratones machos de 4 a 6 semanas y 14 a 16 g cada uno. Un lote se inocula por vía intraperitoneal con un volumen de vacuna que contenga por lo menos 5000 millo-

nes de microorganismos, y el otro con igual volumen de solución salina isotónica (grupo control). A las 72 h se vuelven a pesar los grupos debiendo tener un peso por lo menos igual al inicial. Después de 7 días deberán presentar como mínimo el 60% de la ganancia de peso del grupo control.

Si muere algún ratón la prueba se repite y en esta segunda prueba la mortalidad no debe exceder al 5% .

5.0 CONTROLES AL PRODUCTO TERMINADO A GRANEL

5.1 Esterilidad Bacteriana y Micótica (Apéndice 1, 6.1)

5.2 Inocuidad (Apéndice 1, 8.0)

5.3 Prueba de Potencia (Protección al Ratón) (Apéndice 1, 9.7)

Animales; se emplean ratones de 14 ± 4 g del mismo sexo que se distribuyen al azar en dos lotes de 60 animales y uno de 40 . Los dos lotes de 60 se distribuyen en tres sublotos de 20, en éstos se probará la vacuna estándar y la vacuna problema respectivamente, el otro lote se divide en cuatro subgrupos de 10, de éstos, uno se empleará como control de la virulencia en la dosis de prueba y con los otros tres se determinará la DL_{50} .

Microorganismo de prueba; se utiliza la cepa 18-323 que se mantiene liofilizada y para su utilización se dan tres pases en medio de Bordet-Gengou, se prepara una suspensión del desarrollo del ter

cer pase, de 20 a 24 h de incubación a 35°C, en solución de ácidos casamínicos al 1% en NaCl al 0.6% amortiguada, con pH de 7.1, se ajusta el contenido de microorganismos a 10 unidades de opacidad y se esta suspensión se diluye a una unidad de opacidad (10^9 microorganismos/ml), y enseguida se diluye a que contenga 10^5 microorganismos en 0.03 ml (Suspensión de prueba). De esta suspensión se preparan diluciones 1:50, 1:250 y 1:1250 para el cálculo de la DL₅₀.

Inmunización de los animales; se diluyen las vacuna en incrementos de 5 (tres diluciones cada una) y se inmunizan los ratones inyectando 0.5 ml por vía intraperitoneal, el lote testigo no se inmuniza pero se mantiene en las mismas condiciones que los inmunizados. El intervalo entre la inmunización y la aplicación de la dosis de prueba será de 14 días y por lo menos el 94% de los ratones inmunizados deberá sobrevivir.

Aplicación de la dosis de prueba; Se inoculan los dos lotes de animales inmunizados y 10 ratones del lote testigo con 0.03 ml de la suspensión de prueba por vía intracerebral y los tres lotes restantes de los ratones de control se inoculan con las diluciones de la dosis de prueba conteniendo respectivamente 2000, 400 y 80 microorganismos en 0.03 ml.

La inoculación se realiza comenzando con los animales vacunados y terminando con los testigos; no deberá transcurrir mas de 2.5 horas desde el momento en que se recoja el desarrollo bacteriano y se inocule al último de los animales. Una vez terminada la inoculación, se comprueba la viabilidad de la dosis de prue-

ba sembrando 1 ml de la suspensión que contenga 80 microorganismos en 0.03 ml, diluida 1:5, en una placa con medio de Bordet-Gengou y se incuba a 35°C durante 72 h. La cuenta indirecta deberá equivaler por lo menos a la cuarta parte de la concentración calculada a partir de la opacidad.

Tres días después de la inoculación se eliminan los excedentes de los sublotes para que queden 16 animales en cada uno (Los muertos durante este período se deben al traumatismo de la inyección intracerebral y no se consideran para la prueba). Se mantienen en observación durante 14 días anotando el número de sobrevivientes y muertos para cada dilución, los animales que muestren parálisis o aumento del volumen del craneo al final del período de observación, se considerarán como si hubieran muerto. Por lo menos el 90% de los animales del lote control para la virulencia de la dosis de prueba deberán morir en este período.

La potencia de la vacuna se calcula por el método de Wilson y Worcester y no debe ser menor a 4 UI por dosis individual.

5.4 Controles Químicos

5.4.1 pH (Apéndice II, 4.0)

De 6.8 a 7.4

5.4.2 Proteínas (Apéndice II, 11.1)

No deberá exceder de 0.03 mg/ml.

5.4.3 Timerosal (Apéndice 11, 13.0)

Deberá determinarse para ajustar el contenido final de la vacuna sola o mezclada a 0.01%.

6.0 ENVASADO

Si el producto pasa satisfactoriamente todas las pruebas anteriores se envía al departamento de mezclas finales donde se adiciona a los toxoide tetánico y diftérico adsorbidos en fosfato de aluminio, se ajusta la concentración de timerosal a 0.01% y se envasa con agitación continua (vacuna triple).

Puede además adsorberse en fosfato de aluminio y envasarse como vacuna antipertussis adsorbida sola.

7.0 CONTROLES AL PRODUCTO TERMINADO A GRANEL (DPT)

Como prácticamente toda la producción de vacuna antipertussis se emplea para la preparación de la vacuna triple, aquí se describen el control para dicha vacuna.

7.1 Esterilidad Bacteriana y Micótica (Apéndice 1, 6.1)

7.2 Identidad

Deben obtenerse resultados satisfactorios en las pruebas de identidad para:

Vacuna antipertussis (3.2.2.2)

Toxoide tetánico (Apéndice I, 9.5) 15 Ulf por dosis humana.

Toxoide diftérico (Apéndice I, 9.5) 15 Ulf por dosis humana.

Para realizar las pruebas de identidad y cuantificación de las Ulf, se debe solubilizar el adyuvante con citrato de sodio para poder observar la floculación y la aglutinación en el caso de vacuna antipertussis.

7.3 Inocuidad (Apéndice I, 8.0)

7.4 Potencia

Vacuna antipertussis (5.3)

Toxoide tetánico (Apéndice I, 9.6) 2 UI por ml de suero.

Toxoide diftérico (Apéndice I, 9.6) 2 UI por ml de suero.

7.5 Controles Químicos

7.5.1 pH (Apéndice II, 4.0)

De 5.4 a 7.0

7.5.2 Fosfato de Aluminio (Apéndice II, 7.0)

No más de 4.0 mg/ml expresado como aluminio.

7.5.3 Timerosal (Apéndice II, 13.0)

No más de 0.01%

7.5.4 Formol Residual (Apéndice II, 10.0)

No más de 0.02%

7.5.5 Proteínas (Apéndice II, 11.1)

No hay límite establecido.

8.0 CONTROL AL PRODUCTO TERMINADO ENVASADO (DPT)

8.1 Esterilidad Bacteriana y Micótica (Apéndice I, 6.1)

8.2 Identidad (7.2)

8.3 Potencia (7.4)

9.0 ALMACENAMIENTO Y FECHA DE CADUCIDAD

Se debe conservar entre 2 y 10°C y evitar que se congele.

La fecha de caducidad no será mayor a 18 meses después de realizada la última prueba de potencia satisfactoria a la vacuna antipertu-

ssis y no se debe distribuir el lote después de 12 meses de fabricado.

10.0 ROTULADO

Además de los datos indicados en el Reglamento General para Laboratorios Fabricantes de Sustancias Biológicas, debe indicar lo siguiente:

Vacuna DPT (Diftérica-Pertussis-Tetánica) adsorbida

Concentración expresada en:

Millones de microorganismos por dosis individual humana (antipertusis)

ULf por dosis individual humana (toxoides diftérico y tetánico)

Conservador empleado y su concentración *líquido*

Adyuvante empleado y su concentración *no más de 4 mg/ml, expresado como aluminio*
volumen total contenido en el envase *AlPO₄*

Dosis : 0.5 ml

Vía de administración: Intramuscular profunda ✓

Fecha de caducidad

Consérvese entre 2 y 10°C

No se congele

11.0 PRESENTACION Y ESQUEMA DE INMUNIZACION

11.1 Presentación

La vacuna DPT se presenta en cajas con tres ampollitas de 0.5 ml ca

da una, en frascos ampula con 1.5 ml (tres dosis) y 7.5 ml (quince - dosis).

11.2 Esquema de Inmunización

La vacuna triple se administra en tres dosis de 0.5 ml cada una por vía intramuscular profunda con intervalos de uno a tres meses, empezando a los tres meses de vida, una cuarta dosis al año de la tercera y un refuerzo antes del ingreso a la escuela.

La protección contra la tosferina y la difteria es necesaria solo durante la infancia en tanto que se debe estar protegido frente a tétanos durante toda la vida por lo que se deberá dar como mínimo un refuerzo cada 10 años con toxoide tetánico adsorbido.

12.0 INDICACIONES Y CONTRAINDICACIONES

12.1 Indicaciones

La vacuna triple se administrará a niños entre dos meses y 6 años de edad.

La vacuna simple adsorbida se administrará a los donadores de suero antipertussis de origen humano.

12.2 Contraindicaciones

La vacuna está contraindicada en mayores de 6 años y en personas con antecedentes convulsivos.

B I B L I O G R A F I A

- Organización Mundial de la Salud, 1964, Serie de informes técnicos, 16° Informe, anexo I, Ginebra, 25.
- Organización Mundial de la Salud, 1978, Manual no oficial sobre producción y control de vacuna antipertussis, Ginebra, 5.
- Instituto Nacional de Higiene , 1978, Protocolo para la producción de la vacuna antipertussis, México.
- Jawetz, E., J.L. Melnick y E.A. Adelberg, Manual de Microbiología Médica, 1968, 3a edición, El Manual Moderno S.A., México, 250.
- Wiessman E. , Microbiología Médica, 1974, Ed. Saivat S.A. , España.

TOXOIDE TETANICO

1.0 INTRODUCCION

El agente causal del tétanos es Clostridium tetani. A diferencia de otros tipos de Clostridia, no ocasiona necrosis local, su acción es neurotóxica. Los bacilos o sus esporas penetran al organismo a través de de heridas abiertas; cualquier accidente es potencialmente tetanígeno si la herida se produjo con un objeto sucio, especialmente si está contaminado con heces de herbívoros. El uso de estiércol como fertilizante hace que los accidentes en áreas verdes tengan un alto riesgo de contaminación con tétanos. Esta infección se considera riesgo profesional en jardineros, campesinos, deportistas, personal que maneja ganado, personal médico, de laboratorios y bioterios, plomeros y soldados. Los accidentes que se producen en las playas cercanas a la desembocadura de ríos y canales de aguas negras también tienen un alto riesgo de contaminación con tétanos. Debido a la amplia diseminación de las esporas de C. tetani cualquier herida expuesta tiene la posibilidad de infectarse con este microorganismo.

El periodo de incubación es de 4 a 5 días aunque se puede prolongar por varias semanas, los síntomas prodrómicos cuando se presentan consisten solo en inquietud y cefaleas leves. En las primeras fases de la enfermedad se presenta rigidez muscular con molestias en

la región maxilar, cuello y región lumbar; es típica de esta fase la rigidez de la nuca, el espasmo de los músculos de la masticación (boca de candado) y de los músculos faciales (risa sardónica). Al avanzar la enfermedad se presenta sensación de tirantez en el tórax, rigidez en la pared abdominal, en la espalda y en los miembros, posteriormente sobrevienen espasmos tónicos y dificultad para respirar, toser y deglutir, hay sudoración profusa y fiebre moderada; las convulsiones son favorecidas por estímulos externos -- por ejemplo ruidos, luz intensa etc... Durante este período puede sobrevenir la muerte del paciente por asfixia durante la convulsión; si el paciente sobrevive, la intensidad de los espasmos empieza a decrecer en el curso de la segunda semana aunque el período de recuperación se alarga a veces hasta por varios meses antes que el restablecimiento sea completo. En zonas rurales es todavía común el tétanos neonatal ocasionado por las malas condiciones higiénicas durante la atención del parto. La mortalidad por esta enfermedad depende de la gravedad de la infección y de la oportunidad con que el paciente recibe la antitoxina.

2.0 DEFINICION

Toxoidum tetani es un producto purificado derivado de la toxina obtenida del C. tetani cultivado en un medio líquido apropiado, detoxificada por la adición de formalina a tener 0.35% e incubación a

37°C durante 23 días y adicionado de timerosal como conservador. Se presenta solo (fluido), adicionado de fosfato de aluminio como adyuvante (toxoides adsorbidos), mezclado con toxoide diftérico, vacuna antipertusis y adyuvante (DPT) y mezclado con toxoide diftérico y adyuvante (DT).

3.0 CEPA

Para la producción del toxoide en México se usa la cepa Zagreb que se recibe y conserva liofilizada.

3.1 Conservación de la Cepa

Se rehidrata la cepa con 1 ó 2 ml de medio fluido de tioglicolato, se siembra en un tubo con 30 ml del mismo medio y se incuba a 37°C por 24 h. El contenido de este tubo se pasa a un frasco con 3 litros de medio de Müller y Miller modificado y se incuba de 24 a 48 horas a 35°C procediéndose a la prueba de pureza, si ésta es satisfactoria, se centrifuga la suspensión a 2 000 rpm por 25 minutos, se descarta el sobrenadante lavando el sedimento con solución salina isotónica, se resuspende en leche descremada y luego se envasa en ampolletas que se liofilizan, sellan al vacío y se almacenan a 4°C.

3.2 Lote de Siembra

Se rehidrata el contenido de una ampollita con medio fluido de tigo glicolato y se siembra en un tubo con el mismo medio que se incuba a 37°C por 24 h, se toma muestra para la prueba de pureza y si esta es satisfactoria se siembran los tubos necesarios para el lote de siembra que se incuban en las mismas condiciones. Semanalmente se dan pases para preparar los lotes de siembra y cuando se detecta una disminución en el título de la toxina en los lotes de producción, se descarta la cepa y se comienza con otro cultivo liofilizado. Los cultivos que se dejan para obtener los lotes de siembra subsecuentes se conservan en congelación.

3.3 Controles a la Cepa y al Lote de Siembra

3.3.1 Pureza (Apéndice 1, 2.0)

Se hacen frotis del desarrollo que se tiñen con Gram; se deben observar bacilos Gram-positivos no esporulados.

Se siembran muestras del desarrollo en medio de gelosa-sangre y soya-tripticosa agar que se incuban 7 días a 35°C en aerobiosis y en medio Sabouraud que se incuban 7 días de 18 a 22°C.

No debe haber desarrollo en ningún caso.

4.0 OBTENCION DEL TOXOIDE

Para la obtención del toxoide se deben observar además de las normas especificadas en el Reglamento General para Laboratorios Pro-

ductores de Biológicos las siguientes: "Todas las operaciones de fabricación hasta la detoxificación deberán hacerse en locales completamente separados y utilizando materiales y personal exclusivos" "No se debe colocar en el mismo cuarto de incubación a la toxina y al toxoide", "El personal que labora debe ser exclusivo para este departamento y se debe contar con ropa (incluyendo zapatos), para uso único de la zona de producción", "Están prohibidas las visitas sociales".

Para la producción se usa el medio líquido de Müller y Miller modificado que contiene glucosa, cistina, vitaminas, caseína hidrolizada, NaCl, $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ y $FeCl_3$ a un pH de 6.9 a 7.0, este medio se esteriliza a $121^\circ C$ durante 33 minutos en garrafones de 20 litros - de capacidad colocando 15 litros de medio, el medio se enfría a $-37^\circ C$ después de la esterilización en baño de agua con hielo. El enfriamiento rápido y el volumen de medio crean las condiciones de anaerobiosis necesarias para el microorganismo y además al comenzar el desarrollo de éste, se desprende H_2S que desplaza el aire de los garrafones y se logra la anaerobiosis completa.

4.1 Siembra

Con el desarrollo de los tubos se siembran los garrafones con medio de Müller y Miller modificado, se incuba 6 días a $35^\circ C$ y luego 3 días a $4^\circ C$ para aumentar la liberación de toxinas por lisis.

4.1.1 Pureza (3.3.1)

Solamente se hacen frotos teñidos con Gram.

4.1.2 Cálculo de Unidades Lf (Apéndice I, 9.5) *(precipitación)*

Se diluye la antitoxina patrón hasta tener 50 LF/ml con solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4; se mezclan cantidades crecientes de esta antitoxina empezando con 0.3 ml hasta 0.8 ml con 0.5 ml de la toxina de producción y se completa a 2.0 ml con solución amortiguadora, se incuba a 50°C y se observa en que tubo ocurrió la floculación en primer término. Generalmente esto sucede en 20 o 30 minutos. Se calculan las ULf por ml.

4.1.3 Cálculo de la Dosis Mínima Letal (DML) (Apéndice I, 4.1) ✓

Para comprobar que se tiene un producto tóxico - no hay relación con la inmunogenicidad -
Se toman muestras del cultivo que se centrifugan 20 minutos a ---

3 000 rpm y se separa el sobrenadante, con éste se hacen diluciones con solución de peptona al 1% en cloruro de sodio al 0.5% que comprendan desde 1×10^{-1} hasta 1×10^{-6} ; con cada dilución se inoculan lotes de ratones de 18 a 20 g con 0.5 ml por vía subcutánea, se observan durante 5 días anotando el tiempo de muerte de los ratones, se multiplica la máxima dilución en que murieron los animales por un factor calculado experimentalmente en función del tiempo de muerte y que se encuentra en la siguiente tabla.

(Ref. ; Arch. Exp. Path. Pharmac.:197,536,1941)

Tiempo h	Factor	Tiempo h	Factor	Tiempo h	Factor
12	282	60	2.3	108	1.10
18	45	66	2.0	114	1.05
24	18	72	1.74	120	1.00
30	8.8	78	1.55	126	0.96
36	6.3	84	1.41	132	0.93
42	4.5	90	1.30	138	0.90
48	3.4	96	1.21	144	0.83
54	2.8	102	1.15	150	0.75

4.2 Detoxificación

Se adiciona a la toxina formalina al 35% hasta alcanzar una concentración final del 0.35%, se incuba a 37°C durante 23 días y se realiza la prueba de atoxicidad.

8 m formalin / La toxina

4.2.1 Atoxicidad (Apéndice 1, 5.0)

Se toman muestras del toxoide y se inyectan 5 ml, por vía intramuscular a un mínimo de 5 cuyes de 350 a 450 g, se observan durante - 23 días, no deberán morir ni presentar síntomas de tétanos como son; dificultad al girar para ponerse en pié, parálisis en las extremidades posteriores o encurvamiento de la columna vertebral y además - los animales deben ganar peso; ésto se controla pesándolos cada tercer día. Los resultados son satisfactorios si sobreviven los animales y ninguno presenta síntomas de tétanos, si no es así se continúa la detoxificación y se repite la prueba.

4.3 Purificación y Esterilización

Se ajusta el pH de 7.0 a 7.2 con NaOH 1N y enseguida se procede a clarificar en un filtro prensa para eliminar los restos del desarrollo bacteriano, el toxoide se purifica y concentra por filtración inversa para eliminar los componentes del medio de cultivo y otras proteínas de bajo peso molecular, se adiciona timerosal al 0.01% como conservador y se esteriliza por filtración a través de membrana.

5.0 CONTROL AL PRODUCTO INTERMEDIO A GRANUL

5.1 Esterilidad Bacteriana y Micótica (Apéndice I, 6.1)

5.2 Cálculo de las ULf (4.2.2)

5.3 Controles Químicos

5.3.1 pH (Apéndice II, 4.0)

De 7.0 a 7.1

5.3.2 Formol Residual (Apéndice II, 10.0)

No más de 0.25%

5.3.3 Proteínas (Apéndice II, 11.0)

No hay límite establecido.

5.3.4 Timerosal (Apéndice II, 13.0)

No más de 0.01%

6.0 MEZCLA FINAL

El toxoide concentrado se envía al departamento de mezclas finales donde se adiciona fosfato de aluminio, toxoide diftérico y vacuna antipertusis (Vacuna triple DPT), o bien se mezcla con fosfato de aluminio y toxoide diftérico (DT) o solamente con el adyuvante (Toxoide tetánico adsorbido TT).

7.0 CONTROL AL PRODUCTO TERMINADO A GRANEL (TOXOIDE TETANICO ADSORBIDO)

7.1 Esterilidad Bacteriana y Micótica (Apéndice I, 6.1)

7.2 Inocuidad (Apéndice I, 8.0)

7.3 Potencia (Apéndice I, 9.6)

Se usan por lo menos 10 cuyes de 500 g que se inmunizan con la mitad de la dosis total para el humano, se dejan de 6 a 8 semanas y se cuantifican los anticuerpos presentes en el suero. El producto se acepta si el suero de los cuyes contiene un mínimo de 2 UI -

de antitoxina/ml o si la respuesta es por lo menos igual a la de un toxoide de referencia.

7.4 Controles Químicos

7.4.1 pH (Apéndice II, 4.0)

Entre 7.2 y 7.4

7.4.2 Fosfato de Aluminio (Apéndice II, 7.0)

No más de 4 mg/ml expresado como aluminio.

7.4.3 Formol Residual (Apéndice II, 10.0)

No más de 0.02%

7.4.4 Timerosal (Apéndice II, 13.0)

No más de 0.01%

8.0 ENVASADO

Se envasa en frascos ampula o en ampollitas, con agitación continua.

9.0 CONTROL AL PRODUCTO TERMINADO ENVASADO

9.1 Esterilidad Bacteriana y Micótica (Apéndice 1, 6.1)

9.2 Identidad (4.1.2)

El cálculo de las Ulf se considera prueba de identidad en el producto terminado, es necesario disolver el adyuvante con citrato de sodio para apreciar la floculación. En el caso de la vacuna triple, después de solubilizar el adyuvante se centrifuga para eliminar las bacterias.

9.3 Potencia (7.3)

10.0 ALMACENAMIENTO Y FECHA DE CADUCIDAD

Se conserva entre 2 y 10°C y no debe congelarse.

El producto es estable hasta 2 años después de la última prueba de potencia satisfactoria.

11.0 ROTULADO

Además de los datos especificados en el Reglamento General para Laboratorios Productores de Biológicos, debe indicar lo siguiente:

Toxóide tetánico adsorbido

Cantidad de toxoide expresada en ULf por dosis humana

Conservador empleado y su concentración

Adyuvante empleado y su concentración

Concentración de cloruro de sodio

Volumen total contenido en el envase

Dosis; 0.5 ml

Vía intramuscular

Fecha de caducidad

Consérvese entre 2 y 10°C

No se congele

12.0 PRESENTACION Y ESQUEMA DE INMUNIZACION

12.1 Presentación

Se presenta en ampolletas con 0.5 ml conteniendo 10 ULf del toxoide o en frascos ampula con dosis múltiples. El toxoide fluido se presenta solo en dosis individuales.

12.2 Esquema de Inmunización

El toxoide tetánico adsorbido se administra a personas mayores de 6 años en dos dosis de 0.5 ml separadas por intervalos de uno a dos meses, una tercera al año de la segunda y un refuerzo cada 10 años.

La vacuna triple se administra en tres dosis de 0.5 ml cada una, -

separadas por intervalos de 1 mes empezando a los 3 meses de vida y una cuarta dosis un año después de la tercera, es muy recomendable dar un refuerzo antes de que el niño ingrese a la escuela y posteriormente se dan refuerzos cada 10 años con toxoide tetánico adsorbido.

La mezcla de toxoides diftérico-tetánico adsorbidos está indicada para aquellos individuos mayores de 6 años que no han sido inmunizados con la vacuna triple, y que son susceptibles a la difteria (reacción de Shick positiva verdadera).

13.0 INDICACIONES Y CONTRAINDICACIONES

13.1 Indicaciones

Cuando se ha completado y mantenido el esquema de inmunización es recomendable, pero no absolutamente necesario, administrar el toxoide de fluido después de un accidente potencialmente tetanígeno con el fin de lograr un aumento en el título de antitoxina.

13.2 Contraindicaciones

Hipersensibilidad al toxoide tetánico.

No se administrará el toxoide a personas con esquema de vacunación incompleto en caso de accidente potencialmente tetanígeno; en ese caso se debe administrar la antitoxina y posteriormente continuar el esquema de vacunación.

B I B L I O G R A F I A

- Organización Mundial de la Salud, 1960, Serie de informes técnicos, 17° Informe, Ginebra, 42.
- Instituto Nacional de Higiene, S.S.A., 1976, Método de producción de Toxoide Tetánico, México.
- Wiessmann ,E., Microbiología Médica, 1974, Salvat Editores, España, 118.
- Harrison, T.R., Medicina Interna I, 1973, Ed. La Prensa Médica - Mexicana, 4a. edición en español, México, 958.

TOXOIDE DIFTERICO

1.0 INTRODUCCION

El agente causal de la difteria es Corynebacterium diphtheriae. -
Su patogenicidad radica en la capacidad de liberar exotoxinas. -
Aunque la infección es exclusiva para el hombre, la exotoxina es pa-
tógena para el cuy, conejo, perro, gato y aves.

La enfermedad se trasmite a través del flügge y se presenta por lo
general a nivel de las mucosas del tracto respiratorio superior.

El período de incubación es de 2 a 6 días y los síntomas prodrómi-
cos son variados y poco significativos, generalmente se presenta -
palidez, anorexia, quebrantamiento, ocasionalmente vómitos y una muy
ligera elevación de temperatura, enseguida se empieza a generar la
exotoxina que produce necrosis en el epitelio y ésto ocasiona un -
exudado de fibrina y leucocitos que producen las pseudomembranas -
de color blanco-grisáceo caracterfsticas de esta infección, los bor-
des de las pseudomembranas sangran y el proceso necrótico genera un
olor característico; estas membranas pueden ocasionar dificultades
respiratorias e incluso asfixia, lo cual hace necesaria la traqueot-
omía. Los trastornos respiratorios se deben a que la exotoxina
inhibe la formación de citocromo B. Cuando el caso es grave, la
exotoxina ocasiona infarto ganglionar en el cuello lo que da lugar
al proceso inflamatorio conocido como "cuello de toro". La exo-
toxina liberada llega a torrente circulatorio provocando alteracio-
nes en otros órganos, por ejemplo, degeneración parenquimatosa en

corazón, hígado, riñones y cápsulas suprarrenales, parálisis del paladar blando, de los músculos oculares y de las extremidades.

Otras formas de la infección son: Difteria cutánea (típica de zonas tropicales), en los labios, en la vagina, en la vulva y en heridas pero todas estas formas son raras. Cuando se presenta la muerte se debe generalmente a obstrucción de las vías respiratorias, paro cardíaco o ambas causas.

En nuestro medio esta infección está casi erradicada. Se presentan casos de portadores sanos del bacilo que son de importancia epidemiológica.

2.0 DEFINICION

Toxodium diphteriae es un derivado de la toxina obtenida de C. diphteriae cultivado en un medio líquido apropiado, detoxificada por la adición de formalina y que lleva timerosal al 0.01% como conservador.

3.0 CEPA

Se usa la cepa lisogénica Park Williams-8 (PW-8) para la producción de la exotoxina. Esta cepa se recibe y conserva liofilizada, para lo cual se sigue un método semejante al descrito en toxoide tetánico (3.1).

3.1 Lote de Siembra

Se rehidrata el contenido de una ampolleta con medio de Michigan y se siembra en un tubo con el mismo medio que se incuba inclinado - de 32 a 34 °C durante 48 h, se toman muestras para la prueba de pureza y si ésta es satisfactoria se siembran los tubos necesarios - para el lote de siembra. Semanalmente se dan pases para preparar los lotes de siembra y cuando se detecta una disminución en el título de la toxina en los lotes de producción se descarta la cepa y se comienza con otro cultivo liofilizado.

3.2 Controles a la Cepa y al Lote de Siembra

3.2.1 Pureza

Se realizan frotos que se tiñen al Gram, se deben observar bacilos rectos o ligeramente curvos. La cepa PW-8 se comporta en forma irregular en cuanto a la tinción de Gram. El desarrollo es típico en forma de velo observándose el medio de cultivo completamente claro.

4.0 OBTENCION DEL TOXOIDE

Para la producción se usa el medio de Miller y Müller que contiene; vitaminas, cistina, cistefna, ácidos casamínicos, maltosa y iones de Na, Mg, Ca y Fe. La cantidad de Fe contenida en el medio es crítica, siendo la óptima de 0.14 $\mu\text{g/ml}$.

4.1 Siembra

Los tubos del lote de siembra se incuban de 32 a 34°C por 24 h colocándolos en un ángulo de inclinación de 20° respecto a la horizontal con el fin de asegurar una máxima superficie de desarrollo, se repite la prueba de pureza y si es satisfactoria se siembran 100 - cajas de Povitsky de 5 litros que contengan 500 ml de medio Miller y Müller, se incuban 6 días de 32 a 34°C. Se revisa cada caja para comprobar que el aspecto del desarrollo es el típico y se reúne el contenido de las cajas en frascos Pyrex de 20 litros. Enseguida se procede a clarificar en un filtro prensa y se toman muestras para el cálculo de las ULf, DML y determinación del N-amino.

4.1.1 Cálculo del Nitrógeno-amino (N-amino) (Apéndice II, 14.0)

4.1.2 Cálculo de las ULf (Apéndice I, 9.5)

Se diluye la antitoxina patrón hasta tener 100 Lf/ml con solución amortiguada con fosfatos pH 7.2 a 7.4; se mezclan cantidades crecientes de esta antitoxina empezando con 0.3 a 0.8 ml con 1.0 ml - de la toxina de producción y se completa el volumen a 2.0 ml con - solución amortiguadora. Se incuba a 37°C y se observa en que tubo ocurrió la floculación en primer término. Se calculan las ULf/ml.

4.1.3 Cálculo de la Dosis Mínima Letal (DML) (Apéndice I, 4.1)

Se hacen diluciones con solución salina amortiguada que comprendan desde 1:100 a 1:700. Se inyectan cuyes de 250 a 300 g con 5 ml - por vía intraperitoneal y se observan durante 72 h. En base a la máxima dilución en que murieron los cuyes a las 72 h, se calculan - las DML por ml.

4.2 Detoxificación

Se adiciona formalina al 37% según la cantidad calculada en base - al nitrógeno amino, se esteriliza la solución por filtración a tra - vés de membrana y se deja reposar a 22°C una semana ajustando el pH a que no varíe de 7.0 ± 0.1 , después se deja otras 3 semanas de -- 30 a 34°C para que termine la detoxificación y se realiza la prue - ba de atoxicidad.

4.2.1 Atoxicidad (Apéndice 1, 5.0)

Se inoculan 3 conejos Nueva Zelanda de 2.5 Kg con 0.1 ml del toxoi - de por vía intradérmica en la zona del dorso previamente depilada y se observan durante 72 h; ninguno debe presentar eritema en el - sitio de la inoculación. Si no es así, se continúa la detoxifica - ción por mas tiempo y se repite la prueba hasta tener resultados - satisfactorios.

Otra prueba consiste en inyectar 1.0 ml que contengan por lo menos 200 Lf por vía subcutánea a un mínimo de 5 cuyes de 250 a 350 g y se observan durante 30 días. Los animales que mueran en este pe -

ríodo deberán someterse a la necropsia buscando signos de la acción de la toxina especialmente en las cápsulas suprarrenales. La prueba se considera satisfactoria si sobreviven los animales y ninguno presenta signos de intoxicación. Si no es así, se continúa la detoxificación y se repite la prueba hasta tener resultados satisfactorios.

4.3 Purificación y Esterilización

El toxoide se purifica y concentra por filtración inversa para eliminar los componentes del medio de cultivo y otras proteínas de bajo peso molecular, se adiciona timerosal al 0.01% como conservador y se esteriliza por filtración a través de membrana.

5.0 CONTROL AL PRODUCTO TERMINADO A GRANEL

5.1 Esterilidad Bacteriana y Micótica (Apéndice 1, 6.1)

5.2 Cálculo de las ULf (4.1.2)

Se acepta el producto si contiene 1 200 Lf/mg de nitrógeno proteico como mínimo.

5.3 Potencia (Apéndice 1, 9.6)

Se determina cuantificando los anticuerpos presentes en el suero de

cuyes inmunizados y no debe ser inferior a 2 UI/ml.

5.4 Pruebas Químicas

5.4.1 pH (Apéndice II, 4.0)

Entre 7.2 y 7.4

5.4.2 Nitrógeno Proteico (Apéndice II, 11.0)

No hay límite establecido pero este dato sirve para correlacionarlo con la potencia en ULf y determinar si el producto se acepta.

5.4.3 Formol Residual (Apéndice II, 10.0)

No más del 0.02%

5.4.4 Timerosal (Apéndice II, 13.0)

No más del 0.01%

6.0 MEZCLA FINAL

El toxoide concentrado se envía al departamento de mezclas finales donde se adiciona de fosfato de aluminio y de toxoide tetánico, o bien se mezcla con toxoide tetánico y vacuna antipertusis (vacuna

triple, DPT).

7.0 CONTROL AL PRODUCTO TERMINADO A GRANEL (TOXOIDE TETANICO-DIFTERICO ADSORBIDO)

7.1 Esterilidad Bacteriana y Micótica (Apéndice I, 6.1)

7.2 Prueba de Inocuidad (Apéndice I, 8.0)

7.3 Prueba de Potencia (5.3)

7.4 Pruebas Químicas

7.4.1 pH (Apéndice II, 4.0)



7.2 a 7.4

7.4.2 Fosfato de Aluminio (Apéndice II, 7.0)

No más de 4.0 mg/ml expresado como aluminio.

7.4.3 Formol Residual (Apéndice II, 10.0)

No más de 0.02%

7.4.4 Timerosal (Apéndice 11, 13.0)

No más de 0.01%

8.0 ENVASADO

Se envasa en ampolletas o frascos ampula con agitación continua.

9.0 CONTROL AL PRODUCTO TERMINADO ENVASADO

9.1 Esterilidad Bacteriana y Micótica (Apéndice 1, 6.1)

9.2 Prueba de Identidad (Apéndice 1, 9.5)

El cálculo de las ULf se considera prueba de identidad. Es necesario disolver el adyuvante con citrato de sodio para apreciar la floculación.

9.3 Potencia (5.3)

10.0 ALMACENAMIENTO Y FECHA DE CADUCIDAD

Se conserva entre 2 y 10°C y no debe congelarse.

El producto es estable 2 años después de la última prueba de potencia satisfactoria.

11.0 ROTULADO

Además de los datos especificados en el Reglamento General para Laboratorios Productores de Biológicos, debe indicar lo siguiente:

Toxoides Diftérico y Tetánico adsorbidos

Cantidad de los toxoides expresada en ULf por dosis humana

Conservador y su concentración

Concentración de cloruro de sodio

Volumen total contenido en el envase

Dosis: 0.5 ml

Vía: Intramuscular

Fecha de caducidad

Consérvese entre 2 y 10°C

No se congele

12.0 PRESENTACION Y ESQUEMA DE INMUNIZACION

12.1 Presentación

Se presenta en ampolletas conteniendo 10 ULf de toxoide tetánico y 20 ULf de toxoide diftérico o en frascos ampula con dosis múltiples.

12.2 Esquema de Inmunización

Se administra a las personas mayores de 6 años que no fueron vacunadas con la triple (DPT). Se recomiendan 2 dosis con intervalos

de uno a dos meses y una tercera dosis al año de la segunda.

13.0 INDICACIONES Y CONTRAINDICACIONES

13.1 Indicaciones

Este producto debe administrarse a personas con riesgo profesional de difteria, personal médico y paramédico, después de haber realizado la prueba de Shick. Esta consiste en inyectar por vía intradérmica 0.1 ml de toxina diftérica conteniendo 1/50 de DML para el cuye y se observa a las 48 y 72 h. Si no se presenta ninguna al-
teración en el sitio de la inyección se considera al individuo protegido frente a la difteria ya que la antitoxina presente en su organismo neutralizó la toxina inyectada (Shick negativo). Si apa-
rece un eritema en el sitio de la inyección, éste puede deberse a la acción de la toxina (Shick positivo) o bien a una reacción de -
hipersensibilidad frente al producto (Shick positivo falso), para determinar cual es el caso se repite la prueba utilizando toxoide diftérico en lugar de la toxina inyectando 0.1 ml de una dilución 1:20 de la dosis humana y realizando la lectura de 48 a 72 h des-
pués de su aplicación; si se forma nuevamente el eritema, signifi-
ca que el individuo está hipersensibilizado al toxoide y no debe -
vacunarse, si no hay cambio en el sitio de la inyección se considera que la priemra reacción se debió a la toxina y el individuo es Shick positivo verdadero, en este caso debe aplicarse el toxoide.

13.2 Contraindicaciones

No se administrará el toxoide a personas Shick negativas ni a las Shick positivos falsos.

B I B L I O G R A F I A

- Organización Mundial de la Salud, 1960, Serie de informes técnicos, 17^o Informe, Ginebra, 32.
- Secretaría de Salubridad y Asistencia, Control de Enfermedades Transmisibles, 1972, México, 51.
- Wiesmann, E., Microbiología Médica, 1974, Salvat Editores, Barcelona, 61.

VACUNA ANTIPOLIOMIELITICA ORAL

TIPO SABIN

1.0 INTRODUCCION

El agente causal de la poliomielitis es un Picornavirus que presenta tres tipos: 1, 2 y 3, sólo diferenciables serológicamente. Estos tipos son patógenos únicamente para el hombre y los primates. La vía de entrada del virus es la oral, replicándose en un principio en el tejido linfático, especialmente en amígdalas y en placas de Peyer; puede alcanzar sistema nervioso central por vía sanguínea donde causa daños a nivel de médula espinal y de bulbo raquídeo. Puede cursar asintomática como poliomielitis menor o abortiva caracterizada por fiebre, malestar, faringitis con o sin cefalalgia y vómito, o causar desde parálisis en menor grado hasta la muerte por falla respiratoria o cardíaca en la poliomielitis bulbar. La parte mas dañada son las neuronas motoras de la médula espinal ocasionando parálisis flácida irreversible.

En los casos de parálisis el período de incubación es de una a dos semanas y las primeras manifestaciones son de fiebre y dolor de cabeza durante los primeros tres días, aunque en el adulto a veces no se manifiestan, al cuarto día se presenta un descenso leve de la temperatura y al siguiente día aumenta más (curva de dromedario) y empieza a aparecer somnolencia, inquietud, síntomas meningíticos además de manifestaciones paralíticas en las extremidades.

Esta infección proporciona inmunidad tipo-específica permanente y

se presenta principalmente en niños porque a esta edad hay mas sujetos no inmunes, aunque no se excluyen adultos e incluso ancianos. La infección es propiciada por las malas condiciones higiénicas y aunque existe la posibilidad de parálisis, el índice de ésta respecto a los infectados es muy bajo, entre 0.5 y 1.0 por mil.

2.0 DEFINICION

Vaccinum poliomyelitis perorale typus I, II, III (Vacuna antipoliomielítica tipo Sabin) es una suspensión de poliovirus atenuado de los tipos 1, 2 y 3 obtenida en cultivos primarios de tejido de riñón de mono, conteniendo una cantidad apropiada de cada uno de los tres serotipos.

3.0 CEPAS

Se requieren cepas de los tres serotipos, las empleadas son: --- LSc,2ab de tipo 1, P 712,ch,2ab de tipo 2 y Leon,12a₁b del tipo 3, que son las obtenidas por el Doctor Sabin.

Estas cepas no deben haber sufrido ningún pase en líneas celulares continuas y únicamente podrán realizarse como máximo tres pases en cultivos primarios a partir de la cepa original.

3.1 Lote de Siembra

El lote de siembra se prepara en cultivo de tejido de riñón de mo-

no, en la misma forma que se describe a continuación para el lote de producción y se conserva repartido en alícuotas a -60°C .

3.2 Controles a la Cepa y al Lote de Siembra

Se realizan los mismos controles que se describen para producto a granel. En la prueba de neurovirulencia en monos (5.3) además de las vías de inoculación descritas, se inyectan por vía intramuscular 5 ml de la suspensión semilla, repartiendo este volumen en varios sitios, después de 21 días se hace una evaluación comparativa con un lote similar que se inocula con una suspensión de referencia.

4.0 OBTENCION DE LA VACUNA

4.1 Preparación de los Cultivos Celulares

Se emplean cultivos de células de riñón de mono del género *Cercopithecus* (*C. aethiops*) a los cuales se les ha realizado previamente la prueba de la tuberculina y que se deben mantener durante 40 días antes de la prueba en condiciones ambientales semejantes a su lugar de origen.

Si el índice de mortalidad durante la cuarentena sobrepasa el 5% mensual, se prolonga la observación durante 40 días.

Los monos que hayan pasado satisfactoriamente el período de observación se anestesian y trabajando en condiciones de esterilidad se

extraen los riñones que se colocan en cajas Petri. Los animales se someten a necropsia en busca de lesiones de origen tuberculoso o viral (especialmente las producidas por el virus B). Los riñones se descapsulan y reducen a fragmentos de 3 a 4 mm, se pasan a un aparato de tripsinización de flujo continuo durante 3 a 4 h, empleando solución de tripsina al 0.25%. Las células tripsinizadas se lavan con solución de Hanks adicionado de hidrolizado de lactoalbúmina, 2% de suero de ternera y 200 UI por ml de penicilina y - estreptomicina, centrifugando a 1000 rpm durante 10 minutos a 5°C, el paquete celular se suspende en solución de Hanks y se determina el número de células viables mediante el método de coloración con rojo neutro y se ajusta a 600 000 células/ml.

Con el 75% de esta suspensión se siembran frascos de Roux de 3 litros con 400 ml cada uno, con el 25% restante se siembran frascos de un litro con 100 ml cada uno y que servirán como controles de - esterilidad viral de los cultivos tisulares; todos los frascos se incuban a 36°C durante 5 días al final de los cuales se elimina la solución de Hanks y se adiciona medio de Earle con 0.4% de glucosa y con hidrolizado de lactoalbúmina, después de 48 h de incubación se cambia el medio de Earle separando muestras de éste para su control (4.1.1).

4.1.1 Controles a los Cultivos Celulares Antes de Inocular

Se investiga la ausencia de virus contaminantes mediante siembra - de las muestras de los sobrenadantes en cultivos de tejido de ri-

ñón de mono y de conejo (4.4.1). Los frascos de control se obser-
van cuidadosamente para comprobar la ausencia de efectos citopá-
ticos.

4.2 Inoculación de los Cultivos Celulares de Riñón de Mono

Cada frasco del lote de producción se inocula con 2 ó 3 ml de ví-
rus semilla conteniendo aproximadamente $10^{3.5}$ DICT₅₀, se dejan --
los frascos control sin inocular y se incuban todos los frascos
a $34 \pm 0.1^\circ\text{C}$ hasta el momento de la cosecha.

4.3 Cosecha

La cosecha se efectúa cuando el efecto citopatogénico es completo,
48 a 72 h después de la inoculación. Los cultivos se someten a -
un ciclo de congelación-descongelación y se reúnen los fluídos pro-
cedentes de los frascos que se hayan preparado con los riñones de
un solo mono, a esta mezcla se le denomina "suspensión individual".
Se separan muestras para control y la suspensión restante se alma-
cena a -60°C .

4.4 Pruebas a los Frascos de Control de los Cultivos Celulares de Riñón de Mono

4.4.1 Subcultivo en Líneas Celulares Susceptibles

Los cultivos celulares que se dejaron sin inocular con los poliovirus (4.2) se incuban en las mismas condiciones que los frascos sembrados con el virus y se observan microscópicamente en el momento de la inoculación del lote de producción, en el momento de la cosecha y 14 días después de la inoculación. Los mismos días en que se hacen las observaciones se cambia el medio de mantenimiento y se mezclan alícuotas de los sobrenadantes de todos los frascos de control que se inoculan en diluciones 1:1 a 1:3 en sistemas celulares primarios de tejido renal de mono Cercopithecus (diferente al usado para la producción), de mono rhesus, de alguna línea de células humanas como tejido renal o de amnion y tejido renal de conejo; los cultivos se observan periódicamente durante 14 días y si al final de la observación hay duda del resultado, se mantienen otros 14 días en observación y si persiste la duda se reincuba otro cultivo obtenido de la misma especie pero de diferente animal y usando la misma técnica. Al hacer la última observación se realiza la prueba de hemadsorción.

4.4.2 Prueba de Hemadsorción

Algunos de los frascos de control, así como los tubos de los distintos subcultivos de la prueba anteriormente descrita, se someten a la investigación de la presencia de agentes productores de hemadsorción, para ello, al final de la observación se elimina el fluido sobrenadante de los frascos y tubos y se cubre la monocapa celular con una suspensión de eritrocitos de cuyo al 0.5% en solución amor-

tiguadora de fosfatos, se deja 30 minutos a 4°C, se lava el cultivo con solución salina isotónica y se observa al microscopio la adsorción de los glóbulos rojos sobre la capa celular; si los glóbulos rojos no se adhieren a la capa celular, significa que no hay contaminación por agentes virales productores de hemadsorción y la prueba es satisfactoria.

4.5 Controles a Cada Suspensión Viral Individual

4.5.1 Esterilidad Bacteriana y Micótica (Apéndice 1, 6.1)

4.5.2 Título del Virus (Cálculo de la DICT₅₀) (Apéndice 1, 9.2)

El contenido de virus se determina por titulación de las DICT₅₀ en cultivos de tejido renal de mono Cercopithecus, utilizando como -- punto de comparación un Patrón Internacional de Referencia.

4.5.3 Prueba de Identidad (Seroneutralización) (Apéndice 1, 1.3.3)

Se neutralizan 3 alícuotas de la suspensión individual con una cantidad igual de cada uno de los tres sueros homólogos incubando 4 h a 36°C y 12 h a 5°C; se inoculan lotes de 5 tubos de cultivos de - células renales de Cercopithecus con 0.5 ml de cada una de las mezclas y 1.0 ml de la solución de Earle adicionada de hidrolizado de - lactoalbúmina se incuban a 36°C durante 3 días y se observan los - tubos; el lote de tubos que no presente daño celular corresponderá

al tipo de poliovirus presente en la suspensión individual.

4.5.4 Investigación de Micoplasma

Se realizan siembras en placas de Micoplasma-agar y caldo-Micoplasma que se incuban en aerobiosis y en anaerobiosis (5% de CO₂ y 95% de N₂) a 36°C. Se incuban las placas cuando menos 14 días, y el caldo no menos de 3 ni mas de 5, realizando subcultivos del caldo. Tanto las placas como los tubos se someten a la prueba de coloración con azul-azur de metileno de Dienes.

4.5.5 Investigación de M. tuberculosis

Se inyectan 5 cuyes tuberculino-reacción negativa con 0.5 ml de la suspensión individual por vía intraperitoneal y 0.1 ml por vía intracerebral. Se observan durante 42 días tomándoles la temperatura rectal diariamente durante los primeros 21 días. Los animales que mueran antes de las primeras 24 h deben ser reemplazados de inmediato pues su muerte se debe al traumatismo de la inyección. - Al término del período de observación, la mortalidad total no debe ser mayor del 20%. A los animales sobrevivientes se les realiza nuevamente la prueba de la tuberculina que se lee a las 48 h y debe ser negativa. Si los resultados no son satisfactorios, se repite la prueba con 10 cuyes y si esta segunda prueba no es satisfactoria se desecha la suspensión individual.

Se siembran además alícuotas de la suspensión en medio de Lowestein

y Jensen con y sin glicerol que se incuban a 36°C por 42 días y no deberá haber desarrollo.

4.5.6 Prueba en Ratón Lactante

Cada suspensión de virus se ensaya en un mínimo de 20 ratones de - menos de 24 h de nacidos; a cada uno de los animales se les inyecta 0.01 ml de la suspensión individual por vía intracerebral y 0.1 ml por vía intraperitoneal. Las muertes ocurridas en las siguientes 24 h se deben al traumatismo de la inyección y no se consideran para la prueba. Se observan durante 21 días y los que mueran o presenten signos patológicos pagadas las primeras 24 h se someten a la autopsia para descubrir la presencia de agentes extraños; este examen se hace macroscópicamente por inspección directa y por subinoculación de suspensiones procedentes de órganos adecuados por vía intracerebral e intraperitoneal a por lo menos 5 ratones lactantes. Así mismo se harán suspensiones de los órganos de los animales sobrevivientes excepto piel y se inocularán a 5 ratones más. Se observan diariamente durante 14 días. La prueba se considera satisfactoria si sobreviven por lo menos el 80% de los ratones y ninguno presenta signos de infección.

4.5.7 Prueba en Ratón Adulto

Cada suspensión individual se ensaya como mínimo en 20 ratones de 25 a 30 g de peso; cada animal se inyecta con 0.03 ml de la suspen

sión individual por vía intracerebral y 0.5 ml por vía intraperitoneal. Las muertes ocurridas en las siguientes 24 h se deben al traumatismo de la inyección y no se consideran para la prueba. Se observan durante 21 días, y los que mueran o presenten signos patológicos pasadas las primeras 24 h se someten a la autopsia para descubrir la presencia de agentes extraños. Si la mortalidad es mayor del 20% se repite la prueba con 40 ratones. Al término del período de observación todos los animales se someten a la necropsia y en caso de duda se harán subinoculaciones con suspensiones de los órganos sospechosos a ratones de 25 a 30 g de peso.

4.5.8 Prueba para la Detección del Virus B

Se inoculan 10 conejos de 1.5 a 2.5 Kg con 10 ml de la suspensión viral; 1.0 ml por vía intradérmica y 9.0 ml por vía subcutánea, repartiendo este volumen en varios sitios. Los animales se mantienen en observación por 21 días, los que mueran antes de 24 h se substituyen por otros.

La prueba es satisfactoria si sobrevive el 80% de los animales y ninguno presenta lesiones en el sitio de aplicación de la suspensión, ni muestra señales de infección generalizada por virus B o por algún otro agente viral.

Si la mortalidad es mayor del 80% se repite la prueba con 10 conejos y ninguno debe morir. Tanto los animales que se mueran como los que sobrevivan se someten a la necropsia por personal especializado.

4.5.9 Investigación del Virus SV₄₀

Si al inocular el fluido obtenido durante la tercera observación - de los frascos de control (4.4.2) se aprecia efecto citopático, pero al reinocular otro cultivo del mismo tipo de células no hay daño celular, se inyectan por lo menos 5 ratones y un conejo con fracciones del cultivo; si los animales no muestran signos de infección ni mueren, se considera que la suspensión está exenta de contaminación viral. Si en la reinoculación se aprecia daño celular pero no se produce alteración en los animales, se considera que la suspensión está contaminada con virus SV₄₀ y se procede a descartar la cosecha.

4.5.10 Pruebas en Cultivos de Células Susceptibles

4.5.10.1 Prueba en Cultivo de Células Renales de Mono

Se neutralizan alícuotas de la suspensión individual con suero inmune homólogo obtenido en caballo y se incuba 4 h a 36°C y 12 h a 5°C; de esta mezcla se preparan diluciones 1:1, 1:2 y 1:3 y se inoculan 0.5 ml de cada una, más 1.0 ml de solución de Earle adicionada de hidrolizado de lactoalbúmina, a lotes de 20 tubos con cultivo de células de riñón de mono Rhesus y 20 de Cercopithecus diferentes a los usados en producción. Se incuba en forma rotatoria a 36°C y se observa a los 5, 10 y 14 días; se hará un subcultivo de los tubos con células renales de Cercopithecus en el mismo tipo de

tejido y no deberá observarse daño celular en los tubos.

4.5.10.2 Prueba en Cultivos de Células Renales de Conejo

Se preparan 15 a 20 tubos con cultivo de células renales de conejo de 2 a 3 semanas de edad y se inoculan con 0.5 ml de la suspensión individual conservada a -40°C ; después de 1 h de absorción se adiciona 1.5 ml de solución de Earle adicionada de hidrolizado de lactoalbúmina y 5% de suero de ternera, se incuban en forma rotatoria a 36°C durante 14 días observando los tubos a los 6, 10 y 14 días. No deberá apreciarse efecto citopático y en caso de duda se observará por más tiempo y se realizará un subcultivo en el mismo tipo de células y con igual técnica.

4.5.11 Prueba de Capacidad de Replicación a 40°C (rct/ 40°C)

Se hacen diluciones de 10^{-1} a 10^{-8} de la suspensión individual y se inoculan lotes de 10 tubos de cultivo de células renales de Cercopithecus con 0.5 ml de cada dilución por duplicado y con 1.0 ml de solución de Earle, una serie se incubaba a $40 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ y la otra a $36.5 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$. Siete días después se leen los tubos y se calcula la DICT_{50} por el método de Reed-Muench (4.5.3).

La rct/ 40°C se calcula por diferencia entre el título a 36.5°C y el título a 40°C , debiendo ser 10^5 DICT_{50} más alta la incubada a 36.5°C para el polivirus tipo 3, y 10^6 DICT_{50} más alta para los tipos 1 y 2. Si la diferencia en los títulos es menor, indica que la cepa -

está recobrando su virulencia y debe descartarse.

4.6 Mezcla de las Suspensiones Individuales

Solamente podrán mezclarse las suspensiones individuales que hayan pasado satisfactoriamente las pruebas anteriores, y a esta mezcla se le realizan los siguientes controles antes de la filtración.

4.6.1 Título del Virus (4.5.2)

4.6.2 Prueba rct/40°C (4.5.11)

4.6.3 Prueba para la detección del Virus B (4.5.8)

4.6.4 Investigación de M. tuberculosis (4.5.5)

Se realiza con 15 cuyes

4.7 Clarificación

La mezcla de las suspensiones individuales que pasaron satisfactoriamente todas las pruebas anteriores se pasa a través de filtros adecuados y se congela a -40°C mientras se realizan los controles a producto clarificado

5.0 CONTROLES AL PRODUCTO CLARIFICADO

- 5.1 Esterilidad Bacteriana y Micótica (Apéndice 1, 6.1)
- 5.2 Título del virus (4.5.2)
- 5.3 Prueba de Identidad (4.5.3)
- 5.4 Investigación de Mycoplasma (4.5.4)
- 5.5 Investigación de M. tuberculosis (4.5.5)
- 5.6 Prueba en Ratón Lactante (4.5.6)
- 5.7 Prueba en Ratón Adulto (4.5.7)
- 5.8 Prueba de Detección de Virus B (4.5.8)
- 5.9 Investigación del Virus SV₄₀ (4.5.9)
- 5.10 Pruebas en Cultivos Celulares Susceptibles (4.5.10)
- 5.11 Prueba rct/40°C (4.5.11)
- 5.12 Prueba de Neurovirulencia

Se emplean monos Rhesus (Macaca mulata) o Cynomolgus que se mantienen en las mismas condiciones descritas para los monos de produc-

ción pero en locales aislados.

Se inoculan 10 monos con 1.0 ml de la suspensión del virus clarificado y 10 animales con 1.0 ml de una dilución 1:10, por vía intratalámica. Los animales se mantienen en observación de 18 a 21 días, al término de este período se sacrifican y se realizan estudios histopatológicos de muestras tomadas del tálamo, mesoencéfalo, nódulo elongado, cuello cervical y médula a nivel de vértebras lumbares.

Se inoculan además 5 monos con 0.2 ml de la suspensión del virus clarificado; 5 con una dilución 1:10; 5 con 1:100; 5 con 1:1000 y 5 más con 1:10 000. La inoculación se hace por vía intrarraquídea a nivel de la quinta vértebra lumbar. Los animales se mantienen en observación de 18 a 21 días, al término de este período se sacrifican y se llevan a cabo los estudios histopatológicos de la región de la médula cercana al sitio de la inoculación y de otros niveles tanto de médula como del sistema nervioso central.

La prueba se considera satisfactoria si por lo menos el 80% de los animales no muestran signos de parálisis mono o bilateral, ni signos clínicos que puedan atribuirse a la vacuna.

Los resultados de esta prueba deben ser iguales o mejores que los obtenidos con un lote de referencia que deberá probarse cuando menos cada dos años.

6.0 ENVASADO

Si el producto pasa satisfactoriamente todas las pruebas descritas

anteriormente, se procede a mezclarlo con el estabilizador (El mas usado es sacarosa al 50% pues además mejora el sabor de la vacuna), y a envasarlo en frascos ampula de color ámbar. Enseguida se congela y se almacena a -20°C .

7.0 CONTROLES AL PRODUCTO TERMINADO ENVASADO

7.1 Esterilidad Bacteriana y Micótica (Apéndice I, 6.1)

7.2 Prueba de Inocuidad (Apéndice I, 8.0)

Se emplean 10 ratones que se inoculan por vía intraperitoneal con 0.5 ml de la vacuna y 5 cuyes que se inoculan por vía intraperitoneal con 5.0 ml. Los animales se mantienen en observación durante 10 días.

7.3 Prueba de Potencia (4.5.2)

7.4 Prueba de Identidad (4.5.3)

8.0 ALMACENAMIENTO Y FECHA DE CADUCIDAD

La vacuna debe mantenerse congelada a -20°C hasta el momento de su distribución y a menos de 0°C hasta que su empleo, evitando -- que se descongele. Cuando se va a utilizar, se descongela y se debe mantener de 2 a 10°C durante un máximo de 90 días; después -

de este período se debe desechar la vacuna esterilizando el envase.

La fecha de caducidad no será posterior a 2 años de la fecha en que se haya practicado la última determinación de la concentración con resultados satisfactorios.

9.0 ROTULADO

Además de los datos especificados en la Reglamentación Vigente para Laboratorios Fabricantes de Sustancia Biológicas debe indicar:

Vacuna antipoliomielítica oral de virus vivo atenuado

Cepas utilizadas

Obtenida en células renales de mono

Concentración de cada tipo del virus, expresado en $DICT_{50}$ por dosis humana

Estabilizadores y su concentración

No contiene conservadores

Volumen total contenido en el envase

Dosis: 0.1 ml

Vía: Oral

Fecha de caducidad

Consérvese a $-20^{\circ}C$ o a una temperatura menor

Una vez descongelada consérvese entre 2 y $10^{\circ}C$

Descártese la vacuna que no se haya empleado en los siguientes 90 días después de su descongelamiento, esterilizando el frasco.

Protéjase de la luz

10.0 PRESENTACION Y ESQUEMA DE INMUNIZACION

10.1 Presentación

Frasco ampula con 1.0 ml (10 dosis), frasco ampula con 5.0 ml (50 dosis).

10.2 Esquema de Inmunización

Se administran tres dosis por vía oral a niños mayores de 3 meses a intervalos de 30 días.

11.0 INDICACIONES Y CONTRAINDICACIONES

11.1 Indicaciones

Inmunización activa contra la poliomielitís.

11.2 Contraindicaciones

No existen razones por las que no se pueda administrar a cualquier persona mayor de 3 meses, sin embargo algunos sanitaristas opinan que en personas mayores de 4 años, podría presentarse antagonismo del virus vacunal con la flora del aparato digestivo.

B I B L I O G R A F I A

- Code of Federal Regulations, 1977, parte 600 a 1299, U.S.A., - Government printing office, Washington, 65.
- Organización Mundial de la Salud, 1971, Serie de Informes técnicos, 24^o informe, anexo I, Ginebra, 29.
- Wiesmann, E., Microbiología Médica, 1974, Salvat Ed. S.A., Barcelona, España, 219.
- Fenner, F. y D.O. White, Virología Médica, 1973, Ed. La Prensa Médica Mexicana, México, 272.

VACUNA ANTISARAMPIONOSA

1.0 INTRODUCCION

El sarampión es una enfermedad endémica típica de la infancia, debido a su elevada contagiosidad y a la inmunidad permanente que deja. El virus se transmite por el aire a través del pflugge la -- contaminación también puede llevarse a cabo por vía transconjuntival.

La infección tiene un período de incubación de 9 a 12 días hasta la aparición del período prodrómico, que está caracterizado por fiebre, estornudos, tos, catarro, conjuntivitis, que en ocasiones puede ser severa, la aparición de las placas de Koplik, (que son máculas rojas o úlceras con un centro blanco-azuloso en la mucosa bucal) y tres días más tarde aparece el exantema maculopapuloso típico del sarampión en la cabeza y posteriormente en el pecho, tronco y extremidades. Los primeros días de incubación, se caracterizan por una multiplicación generalizada de este paramixovirus, sobre todo en los tejidos linfáticos. La multiplicación general del virus produce laringitis, bronquitis y otras manifestaciones, pudiendo en algunas ocasiones producir encefalomielitis. Los virus son eliminados con las secreciones nasales, faríngeas y conjuntivales. Entre las complicaciones está la neumonía sarampionosa del lactante y la encefalitis mencionada anteriormente, que se presenta en 1 de cada 1 000 casos de sarampión grave y que tiene un 15% de letalidad o de curaciones con secuela permanente. Durante la infección

el tracto respiratorio se vuelve más susceptible al ataque de bacterias, dando como secuela, bronquitis, bronconeumonía y otitis media. Al cabo de 3 a 5 días el exantema va desapareciendo paulatimamente junto con la fase febril dando paso a la convalescencia.

✓ 2.0 DEFINICION

Vaccinum morbillorum vivum es una suspensión de virus sarampiñoso atenuado, obtenida en cultivos primarios de tejido de embrión de pollo o de otro origen, conteniendo por lo menos 1 000 DICT₅₀ por dosis humana.

✓ 3.0 CEPA

Las cepas más empleadas son: La Schwarz, Edmonston B, Belgrado, -- Zagreb, Leningrad-16. Estas cepas no deben haber sufrido ningún pase en líneas celulares continuas y estarán exentas de neurovirulencia. Únicamente podrá realizarse, como máximo, diez pases en cultivos primarios a partir de la cepa original.

3.1 Lote de Siembra

El lote de siembra se prepara en cultivos de tejido de embrión de pollo o de otro origen en la misma forma que se describe a continuación para el lote de producción y se conserva repartido en alícuotas a -60°C.

3.2 Controles a la Cepa y al Lote de Siembra

Se realizan los mismos controles que se describen para el lote de producción.

4.0 OBTENCION DE LA VACUNA PREPARADA EN CULTIVOS CELULARES DE EMBRION DE POLLO

4.1 Preparación de los Cultivos Celulares

Se emplean cultivos de células de embrión de pollo. El pie de cría debe proceder de una granja sin antecedentes de infección por Salmonella, viruela aviar, Mycobacterium tuberculosis aviar, virus de Rous, virus de la leucosis aviar, micoplasma y otros agentes patógenos para estas aves. Los animales productores de huevo deben nacer y desarrollarse en ambiente estéril en el propio laboratorio. Se utilizan embriones de 10 días, los huevos se sumergen en una solución acuosa de yodo al 1% y se acomodan en charolas adecuadas para eliminar el exceso de la solución de yodo. Trabajando en condiciones de esterilidad se extraen los embriones y se colocan en cajas Petri; se eliminan las cabezas, patas, alas y vísceras y el resto de los embriones se reduce a fragmentos de 2 a 3 milímetros. El tejido se lava dos veces con solución salina isotónica amortiguada con fosfatos y una tercera vez con solución de tripsina al 0.25%. Se deja que el tejido sedimente, se decanta el sobrenadante y el tejido se pasa a un matraz de tripsinización, se agrega más

solución de tripsina, dejando a temperatura ambiente con agitación magnética continua durante 30 a 45 minutos. Las células tripsinizadas se pasan a un frasco de centrifuga y se lavan tres veces con medio de Earle adicionado del 0.5% de lactoalbúmina. Se determina el número de células viables mediante el método de coloración con rojo neutro, se ajusta la concentración a 600 000 células viables/ml con medio 199 adicionado de 0.5% de suero de ternera. Los frascos para la obtención de los cultivos celulares se siembran con esta suspensión y se incuban a 35°C de 24 a 48 h, se elimina el medio de crecimiento, separando muestras de éste para su control, y se agrega medio 199 a cada frasco.

4.2 Inoculación de los Cultivos Celulares de Embrión de Pollo

Cada frasco se inocula con 0.5 ml de virus semilla, dejando el 10% de los frascos sin inocular como controles de esterilidad viral. Se incuban a $32 \pm 0.5^\circ\text{C}$ (dependiendo de la cepa) hasta el momento de la cosecha.

4.2.1 Lavado de las Monocapas Celulares Inoculadas

Al día siguiente de la inoculación se lavan los tejidos para eliminar el interferón y el suero de ternera que pudiera estar presente, para esto el sobrenadante se elimina por aspiración, y se adiciona medio 199 lavando suavemente la capa celular, este medio se elimina por aspiración y finalmente se adiciona más medio 199 a cada --

frasco. Los frascos control se tratan de la misma manera inmediatamente antes de lavar los frascos inoculados.

4.3 Cosecha

La cosecha se efectúa cuando el efecto citopatogénico es casi completo, 6 a 8 días después de la inoculación. Los cultivos se congelan colocando los frascos en un baño de hielo seco-alcohol, inmediatamente se descongelan y el contenido se extrae mediante vacío reuniéndolo en un solo frasco graduado, se agrega un volumen igual de estabilizador (contiene: KOH, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , ácido glutámico y lactosa), se separan muestras para control que se conservan a -70°C y la suspensión del virus se almacena a -60°C .

4.4 Pruebas a los Frascos Control de Tejido de Embrión de Pollo

4.4.1 Subcultivos en Líneas de Células Susceptibles (Apéndice 1, 6.2.2)

Los cultivos celulares que se dejaron sin sembrar con el virus sarampionoso (4.2) se incuban en las mismas condiciones que los frascos sembrados con el virus y se observan al microscopio para detectar efecto citopático por un período no menor de 14 días a partir de la siembra del lote de producción, si el proceso del lote dura más de 14 días, el período de observación se prolonga aún más. Al final del período de observación o al tiempo de la cosecha del virus, se reúnen alícuotas de los sobrenadantes de todos los fras-

cos control, y por lo menos 5 ml de la mezcla se inocula en líneas celulares de tejido renal de mono *Cynomolgus*, de *Cercopithecus*, de alguna línea de células humanas como tejido cardíaco, Fl-Amnion, - K.B., WI-38, células amnióticas humanas y tejido de embrión de pollo. Estos cultivos se observan periódicamente durante 14 días al final de los cuales se realiza la prueba de hemadsorción.

4.4.2 Prueba de Hemadsorción (Apéndice 1, 6.2.2)

Dos de cada cinco frascos de control, así como los tubos de las distintas líneas de subcultivos de la prueba anteriormente descrita, se someten a la investigación de la presencia de agentes productores de hemadsorción, para ello, al final de los 14 días de observación se elimina el fluido sobrenadante de los frascos y tubos, se lavan las monocapas y se adiciona una suspensión de glóbulos rojos de cuy, se refrigera a 5°C durante 30 minutos, se lava la capa celular y se observa al microscopio la adsorción de los glóbulos rojos sobre la capa de tejido celular, si los glóbulos rojos no se adhieren a la capa de células significa que no hay contaminación por agentes virales productores de hemadsorción y la prueba es satisfactoria.

4.4.3 Investigación del Virus de la Leucosis Aviaria. Prueba de RIF -- (Factor de Resistencia a la Infección)

Se prepara un cultivo primario de embriones de 11 días de incuba-

ción; que provengan de animales en los que se ha comprobado que están libres de virus RIF. Cuando la monocapa celular alcanza del 85 al 100% se procede a hacer subcultivos tripsinizando las células, éstas se lavan y se ajustan a una concentración de 2×10^5 células viables/ml para preparar los subcultivos que se incuban a -37°C en atmósfera con una mezcla de aire y CO_2 , pH 7.4 y humedad relativa de 90-100%. Seis horas después de preparado, el primer subcultivo se inocula con el sobrenadante de los frascos de control. Se siguen haciendo subcultivos hasta un total de seis. La investigación de RIF se realiza por el método de formación de placas, para ésto se utilizan cajas de Petri de plástico que tienen una cuadrícula grabada. La prueba de RIF se hace con las suspensiones de células obtenidas de los subcultivos cuarto, quinto y sexto realizándose de la siguiente manera: La suspensión de células tripsinizadas se ajusta a 2.5×10^5 células viables/ml y se siembran en las cajas de Petri a las cuales se les da un movimiento de rotación para distribuir homogéneamente las células sobre la superficie de las cajas, se incuban con atmósfera de CO_2 y cuatro horas después se inoculan con 0.1 ml de una dilución adecuada del virus del Sarcoma de Rous (RSV) de la cepa Bryan CT925; este virus se obtiene de tumores de pollos infectados y se conserva en ampollitas a -85°C . Veinticuatro horas después de la inoculación se elimina el medio de crecimiento y se coloca el medio de recubrimiento, que debe estar a una temperatura no mayor de 43°C ; éste es un medio -- que además de los nutrientes lleva agar. Al cuarto o quinto día de incubación se adiciona medio nutritivo y al sexto día se agrega

rojo neutro; al séptimo día se observa para ver si hay efecto citopatógeno, éste puede involucrar grupos de células o bien células aisladas, que se aprecian agrandadas conteniendo acúmulos de granulaciones de color rojo intenso. Este efecto citopatógeno se inhibe cuando las células del embrión de pollo contiene virus de la leucosis aviaria. Las células normales presentan una coloración roja menos intensa y tienen un aspecto uniforme. La prueba es satisfactoria si se observa efecto citopático. Los resultados se comparan con controles RIF-negativos constituidos por cultivos de tejido sin sembrar con este virus, y controles RIF-positivos inoculados con 100 DICT₅₀ de virus RIF. Estas mismas pruebas se realizan sobre una muestra de células tripsinizadas de los frascos control de cada lote de producción de vacuna.

4.4.4 Investigación de Micoplasma

Se realizan siembras en placas de micoplasma-agar y caldo-micoplasma que se incuban en aerobiosis y en anaerobiosis (5% de CO₂ y 95% de N₂) a 36°C. Se incuban las placas cuando menos 14 días y el caldo no menos de 3 ni más de 5, realizando subcultivos del caldo. Tanto las placas como los tubos se someten a la prueba de coloración con azul-azur de metileno de Dienes.

4.5 Controles a la Suspensión de Virus Antes de la Clarificación

4.5.1 Esterilidad Bacteriana y Micótica (Apéndice I, 6.1)

4.5.2 Título del Virus (Apéndice 1, 9.2)

El contenido del virus se determina por titulación de las $DICT_{50}$ - en cultivos de tejido de embrión de pollo o células de la línea Ve ro, utilizando como punto de comparación un Patrón de Referencia - Internacional de virus sarampiñoso.

4.5.3 Prueba de Identidad (Seroneutralización) (Apéndice 1, 1.3.3)

Se diluye una muestra de la suspensión del virus a tener aproximadamente 100 $DICT_{50}$, se adiciona suero antisarampiñoso de título - conocido. Una muestra similar de la suspensión se mezcla con sue ro normal procedente de la misma especie de que proviene el suero inmune. Se incuban ambas mezclas a $25^{\circ}C$ por una hora así como una muestra de la suspensión de virus diluido; se siembra 0.1 ml de esta suspensión en cada uno de 10 tubos con cultivo de tejido de - embrión de pollo, y 0.2 ml de las mezclas de suero y virus en cada uno de 5 tubos con el mismo tejido. Se incuban a $32^{\circ}C$ por 18 días en forma estacionaria. A los siete, catorce y dieciocho días se observa el efecto citopatogénico. Los tubos sembrados con la mezcla virus-suero inmune deben ser negativos, los tubos sembrados con la mezcla virus-suero normal y los inoculados con el virus solo deben mostrar resultados positivos.

4.5.4 Investigación de M.tuberculosis

Se investigará la presencia de M. tuberculosis humano, bovino y aviar sembrando muestras en medio de Petroff y de Lowenstein-Jensen con y sin glicerol que se incuban de 36 a 38°C (para el bovino y humano) y a 40°C (para el aviar) durante 42 días. No debe haber evidencia de desarrollo.

Un mínimo de 5 cuyes de 350 a 450 g de peso se inoculan por vía intraperitoneal con 5 ml de la suspensión y se mantienen en observación durante 42 días. Los que mueran pasadas las primeras 24 h se someterán a autopsia macroscópica seguida de un estudio microscópico y cultivos para descubrir la posible presencia de M. tuberculosis, todos los animales que sobrevivan al final del período de observación se examinarán de un modo análogo. La prueba es satisfactoria si sobrevive el 80% y ninguno presenta signos de infección.

4.5.5 Prueba en el Ratón Lactante

Cada lote de producción del virus se ensayará en un mínimo de 20 ratones de menos de 24 h de nacidos; a cada uno de los animales se les inyecta 0.01 ml de la suspensión por vía intracerebral y 0.1 ml por vía intraperitoneal. Las muertes ocurridas antes de 24 h se deben al traumatismo por las inyecciones. Los ratones se observan diariamente durante 14 días como mínimo. Todos los ratones que mueran o presenten signos patológicos pasadas las primeras 24 h de la prueba, se someten a autopsia para descubrir la presencia de agentes extraños; este examen se hace macroscópicamente por inspección directa, y por subinoculación intracerebral e intraperitoneal

de suspensiones procedentes de órganos adecuados a otros 5 ratones lactantes como mínimo que se observan diariamente durante 14 días. La prueba se considera satisfactoria si al final del período de observación sobrevive por lo menos el 80% de los ratones inoculados y si ninguno de ellos presenta signos de infección.

4.5.6 Prueba en Ratón Adulto

El lote de producción del virus se ensaya como mínimo en 20 ratones adultos de 15 a 20 g de peso; cada animal se inyecta con 0.03 ml de la suspensión por vía intracerebral y 0.5 ml por vía intraperitoneal. Los ratones se mantienen en observación durante 21 días como mínimo. Las muertes ocurridas antes de 24 h se deben al traumatismo de las inyecciones. Pasadas las primeras 24 h, todos los ratones que mueran o presenten signos patológicos se someten a autopsia para descubrir la presencia de agentes extraños. Este examen se hace macroscópicamente por inspección directa y por subinoculación intracerebral e intraperitoneal de suspensiones procedentes de órganos adecuados a otros 5 ratones como mínimo que se mantendrán en observación durante 21 días más. La prueba se considera satisfactoria si al final del período de observación sobrevive por lo menos el 80% de los ratones inoculados y si ninguno de ellos presenta signos de infección.

4.5.7 Pruebas en Embiones de Pollo

Inoculación en cavidad alantoidea.

Se hacen reaccionar 50 ml de la suspensión viral con suero antisaramplinoso de alto título obtenido en cabras, se deja la mezcla una hora a temperatura ambiente. Se inoculan 150 embriones de 8 a 10 días en la cavidad alantoidea con 0.5 ml por embrión, 10 más se inoculan con una mezcla a partes iguales de estabilizador y medio 199 y se dejan 10 embriones sin inocular como control y 10 como controles adicionales. Todos los embriones se incuban de 35 a 37°C por 7 días observándolos dos veces diarias; las muertes que ocurran en las primeras 24 h no se toman en consideración ya que se deben al traumatismo de la inoculación. Al final del período de incubación los embriones se prueban en:

- Signos patológicos.
- El fluido alantoideo se prueba en aglutinación con glóbulos rojos de pollo.
- Se buscan lesiones en membrana corioalantoidea.
- En caso de duda los fluidos alantoideos se subinoculan en seis embriones adicionales para descartar la presencia de algún agente transmisible.

Si durante el período de observación ocurren muertes, deben realizarse en los fluidos alantoideos las pruebas antes mencionadas así como una siembra en medio fluido de tioglicolato USP que se incuba 7 días de 35 a 37°C; en caso de tener desarrollo bacteriano se preparan frotos que se tiñen al Gram para determinar la morfología de los microorganismos.

Inoculación en saco vitelino.

Se mezclan 50 ml de la suspensión viral con suero antisarampionoso de alto título obtenido en cabras, la mezcla se deja una hora a temperatura ambiente. Se inoculan 150 embriones de 7 a 9 días en saco vitelino, con 0.5 ml por embrión, 10 más de inoculan con la mezcla estabilizador-medio 199, se dejan 10 embriones como controles y 10 como controles adicionales, todos los embriones se incuban de 35 a 37°C durante 7 días observándolos dos veces diarias, al final del período de incubación los embriones que sobreviven se prueban en:

- Signos patológicos.
- Presencia de cuerpos de inclusión en tejido de saco vitelino. Para esto se hacen frotis con el tejido de saco vitelino que se tiñen por el método de Macchiavello; en caso de existir contaminantes se observan al microscopio cuerpos de inclusión que toman un color rojo sobre fondo azul.
- En caso de duda los fluido alantoideos se subinoculan en seis embriones adicionales para descartar la presencia de agentes transmisibles.

4.5.8 Investigación de Mycoplasma (4.4.4)

4.5.9 Prueba en Cultivos de Células Susceptibles

Se toman muestras de suspensión de virus sin clarificar, se neutralizan con suero antisarampionoso de título elevado y se siembran, con esta mezcla, cultivos celulares de tejido renal de mono verde,

Cynomolgus, tejido de embrión de pollo y de alguna línea de células humanas como tejido cardíaco, tejido amniótico humano, Fl-Amnion, - K.B., WI-38. Estos cultivos se observan periódicamente durante - 14 días al final de los cuales se les realiza la prueba de hemadsorción (4.4.2).

5.10 Prueba de RIF

Se emplean cultivos secundarios de tejidos de embriones de pollo - procedentes de animales comprobados RIF negativos preparados como se ha descrito en (4.4.3), que se inoculan con:

Mezcla 1. Suspensión del virus sarampionoso sin clarificar ni diluir con estabilizador, adicionado de suero antisarampionoso de alto título.

Mezcla 2. 100 DICT₅₀ de virus RIF mas suero antisarampionoso de título elevado.

Mezcla 3. 100 DICT₅₀ de virus RIF adicionado del estabilizador empleado en la misma concentración que se agregó a la vacuna de la mezcla 1.

Control positivo. Únicamente virus RIF.

Control negativo. Cultivos de células sin inocular.

Las mezclas anteriores se siembran en dos o más frascos con cultivos de células y se procede a hacer hasta seis subcultivos que se prueban con virus RSV como se describió en 4.4.3. La presencia - de virus RIF se detecta por el grado de inhibición del efecto cito patogénico de RSV comparado con los controles negativos.

4.6 Clarificación

Antes del envasado de la vacuna, se procede a descongelar la suspensión viral colocando los frascos en baño de agua a 37°C, se agrega celita estéril a tener 0.1% p/v y se filtra, el filtrado se mezcla nuevamente con celita estéril y se repite la filtración, se agrega 1.0% de albúmina sérica humana estéril. La operación del filtrado se hace en frío. Se toman muestras para control y se procede a envasar en frascos ampula ámbar y se liofiliza.

5.0 CONTROLES AL PRODUCTO CLARIFICADO

5.1 Prueba de Neurovirulencia

Se utilizan de 20 a 22 monos *Cynomolgus* jóvenes, clínicamente sanos, tuberculino-reacción negativa, a los que previamente se les investigan anticuerpos frente al sarampión y poliovirus 1, 2 y 3. Los monos se anestesian y se procede a hacer la inyección intratálmica de 0,5 ml de la suspensión del virus en cada hemisferio, por vía intrarraquídea de 0,5 ml y por vía intramuscular 1 ml, así como 200 mg de acetato de cortisona y 300 000 UI de penicilina también por vía intramuscular. La dosis total del virus inoculado a cada mono no deberá ser inferior a una dosis para el hombre. Estos animales se mantienen en observación 17 a 21 días inspeccionándolos diariamente para detectar signos de parálisis o de cualquier infección interrecurrente. Los animales que mueran en las prime-

ras 24 h después de la inyección podrá reemplazarse por otro. Al final del período de observación se toma una muestra de sangre de cada mono, se anestesia profundamente, se perfunden con formalina y se toman secciones del cerebro y de la médula espinal. De las muestras tomadas del cerebro y de la médula espinal se hacen estudios histopatológicos buscando evidencia de agentes patógenos que pudieran estar presentes en la suspensión del virus. En la muestra de sangre se investiga la presencia de anticuerpos frente a sarampiión y por lo menos el 80% deben tener un título mínimo de --- 0.2 UI/ml. Se hace la necropsia de los animales poniendo especial cuidado en buscar signos patológicos en pulmón y cavidad pleural. Si los estudios histopatológicos no son concluyentes se hacen sub-inoculaciones. Si los resultados de las pruebas son satisfactorios en el 80% de los animales se acepta la vacuna. Para descartar la posible introducción accidental de virus sarampionosos naturales se utilizarán como testigos cuatro o más monos, que se mantendrán en las mismas jaulas de los animales inoculados o en jaulas separadas y se tendrán en observación de 27 a 31 días; al hacer la inoculación de los animales de prueba y 10 días después de haberlos sacrificado se tomarán muestras de sangre de los monos control y no deberá contener anticuerpos frente al sarampión.

6.0 CONTROL AL PRODUCTO TERMINADO ENVASADO

6.1 Esterilidad Bacteriana y Micótica (Apéndice 1, 6.1)

6.2 Prueba de Inocuidad (Apéndice I, 8.0)

6.3 Prueba de Potencia (4.5.2)

Se realiza como se describe en 4.5.2, el título del virus no debe ser menos de 1 000 DICT₅₀ por dosis humana.

6.4 Prueba de Identidad (4.6.3)

6.5 Humedad Residual (Apéndice II, 1.0)

No más del 3% ni menos del 1%.

6.6 Solubilidad (Apéndice II, 3.0)

7.0 ALMACENAMIENTO Y FECHA DE CADUCIDAD

La vacuna liofilizada debe conservarse siempre a una temperatura entre 2 y 10°C.

La fecha de caducidad no será posterior a doce meses de la fecha en que se haya practicado la última determinación de la concentración del virus con resultados satisfactorios.

8.0 ROTULADO

Además de los datos especificados en la Reglamentación Vigente pa-

ra Laboratorios Fabricantes de Sustancias Biológicas, debe indicar lo siguiente:

Vacuna antisarampionosa de virus vivo atenuado.

Cepa utilizada.

Tejido en cual se propagó el virus.

Concentración expresada en $DICT_{50}$ por dosis humana.

Estabilizador empleado.

No contiene conservadores.

Volumen total contenido en el envase después de rehidratar.

Volumen y naturaleza del diluyente.

Dosis: 0.5 ml.

Vía subcutánea.

Fecha de caducidad.

Conservese entre 2 y 10°C.

Protéjase de la luz.

Descártese la vacuna que no haya sido empleada en las siguientes -
8 h a su rehidratación.

9.0 PRESENTACION Y ESQUEMA DE INMUNIZACION

9.1 Presentación

Suspensión inyectable liofilizada. En dosis individuales de ---
0.5 ml una vez rehidratada, o también en envases de 10 dosis. El
empaque debe contener el líquido para la rehidratación.

9.2 Esquema de Inmunización

Una sola dosis por vía subcutánea.

10.0 INDICACIONES, CONTRAINDICACIONES Y EFECTOS SECUNDARIOS

✓ 10.1 Indicaciones

Inmunización activa contra el sarampión. Se aplica a partir del octavo mes de vida, aunque es mas seguro para lograr la inmunización, aplicarla cuando el niño tiene un año de edad.

✓ 10.2 Contraindicaciones

Contraindicada en las personas sensibles a las proteínas de embrión de pollo.

10.3 Efectos Secundarios

Después de 5 a 12 días de aplicada la vacuna puede presentarse fiebre y exantema.

B I B L I O G R A F I A

- Organización Mundial de la Salud, 1966, Serie de informes técnicos, 329° Informe, anexo 2, 54.

- Code of Federal Regulations, 1977, Food and Drugs parts 600 to 1299, U.S.A. Government printing office, Washington, 78.

- Fenner, F. y D.O. White, Virología Médica, 1973, Ed. La Prensa Médica Mexicana, México, 323.

VACUNA ANTIVARIOLICA

1.0 INTRODUCCION

La viruela es una enfermedad infecciosa causada por un Poxvirus. De acuerdo con la gravedad de la infección se considera que hay dos formas: "Variola mayor" (viruela clásica) que es una enfermedad grave con una mortalidad de 40 a 50% y "Variola minor" o alastrim que es más benigna, con una mortalidad menor del 1%; también existen casos de viruela hemorrágica en la que al segundo o tercer día se inicia un exantema hemorrágico difuso, seguido de equimosis y de hemorragias y que es mortal.

La viruela fue uno de los más grandes azotes de la humanidad hasta que se generalizó el empleo de la vacuna que Edward Jenner introdujo en 1798. En nuestro país el último caso reportado fué en 1951 y a nivel mundial no se ha registrado ningún caso a partir del año de 1978.

La enfermedad tiene un período de incubación de 10 a 12 días; los síntomas comienzan bruscamente con fiebre, cefalea, pérdida del apetito y náusea, en pocos días aparecen en la piel y mucosas, lesiones que evolucionan de máculas a pápulas, vesículas y pústulas que comienzan a secarse de 10 a 11 días después de la aparición de la mácula. Los pacientes que se recuperan de esta infección presentan cicatrices indelebiles y es frecuente que el virus desarrolle en la cornea con lo cual se pierde absolutamente la visión.

Los pacientes no son infecciosos durante el período de incubación,

sino hasta que parecen los signos en las mucosas que es cuando el virus está presente en las secreciones nasales y orales; las lesiones cutáneas son infectivas en cuanto ocurre la ruptura de las vesículas o de las pústulas, además el virus es lo suficientemente resistente para persistir en estado infeccioso en las costras y en la ropa de cama del enfermo por periodos prolongados.

La recuperación en la viruela confiere inmunidad para toda la vida; la inmunidad adquirida por la vacunación con el virus vaccinia es menos prolongada, sin embargo, en la mayoría de los países ha sido eliminada la exigencia de vacunar contra la viruela, pero la vacuna sigue ofreciéndose a quien la solicite.

2.0 DEFINICION

Vaccinum variolae es una suspensión en solución salina isotónica de virus vacunal vivo, obtenido de pústulas desarrolladas en la dermis de animales, conteniendo por lo menos 5×10^7 Unidades Pustulizantes por ml, y adicionada de glicerina al 50% y fenol al 0.5% .

También puede cultivarse el virus en membrana corioalantoidea de embrión de pollo o en cultivos de tejidos apropiados, estas vacunas no llevan glicerina ni conservador y se presentan liofilizadas.

3.0 CEPA

La cepa utilizada en México procede del Instituto Lister de Inglat

rra de donde se recibe liofilizada. El número de pases efectuados a partir de esta cepa no debe exceder en ningún caso de diez.

3.1 Lote de Siembra

✓ El lote de siembra se prepara en pases alternados conejo-carnero con la técnica que se describe a continuación para el lote de producción y se conserva a -20°C . El virus obtenido en conejo recibe el nombre de lapina. Se emplean lotes de seis conejos de 2,5 a 3,0 kg, que tenga la piel libre de lesiones y de lunares de pelo grueso.

3.2 Controles a la Cepa y al Lote de Siembra

✓ Se realizan los mismos controles que se describen para el lote de producción.

4.0 PRODUCCION DE LA VACUNA EN CARNERO

4.1 Animales

✓ Se emplean carneros, de preferencia hembras, de aproximadamente 40 kg, que no presenten evidencia de enfermedades, especialmente de la piel, ectoparásitos o infecciones de las vías respiratorias. Se tasquila completamente al animal y se baña con agua tibia y jabón, poniendo especial cuidado en la limpieza de las pezuñas las --

cuales se rebajan con una cuchilla. Los animales se mantienen en cuarentena cuando menos dos semanas en locales con iluminación difusa y una temperatura entre 25 y 28°C, durante la cuarentena se toma la temperatura rectal dos veces al día. Se les realiza la prueba a la tuberculina que debe ser negativa, así como también se investiga la presencia de anticuerpos anti-poxvirus en el suero, los carneros que tengan cualquier evidencia de enfermedad durante el período de cuarentena se descartan.

Los pisos, paredes, techos y tarimas de los pesebres se deben lavar y desinfectar diariamente con una solución de cloruro de benzalcohol.

4.2 Inoculación

Antes de la inoculación se rasura al animal exceptuando la cabeza, extremidades y el costado que queda sobre la mesa de operaciones al sujetarlo sobre ella. Se baña completamente al animal con agua y jabón neutro, teniendo especial cuidado en limpiar perfectamente las pezuñas.

Se coloca y sujeta al animal sobre una mesa y se lava la zona de inoculación diez o más veces con agua y jabón neutro. Todos los lavados se hacen de la zona central a la periferia. Se da un lavado con alcohol de 96% para desengrasar la piel. El último lavado se hace con abundante agua estéril para eliminar el alcohol y sin tocar con las manos la zona.

Para realizar la inoculación el operador se recubre con ropa esté-

El, seca la zona aseptizada con toallas estériles y afsla el campo con compresas también estériles.

La zona de inoculación se cubre con la suspensión del lote de siembra y se escarifica la piel con la parte roma de un bisturí o con un peine de agujas metálicas procurando romper la epidermis sin provocar sangrado y se cubre nuevamente la zona de inoculación con la suspensión del lote de siembra.

Se deja en reposo al animal durante unos minutos para que seque el inóculo y se pasa al establo de incubación.

4.3 Incubación

Los animales se pasan al establo de incubación alojándolos en peseres individuales, con tarimas que se lavan cada vez que el animal orina o defeca. La comida y el agua de bebida deben esterilizarse, el local tendrá iluminación indirecta y una temperatura entre 22 y 25°C.

A los cinco días se procede a la cosecha del material contenido en las pústulas que constituye la "pulpa".

4.4 Cosecha de la Pulpa

Se coloca al animal sobre la mesa, se sujeta y se procede a aplicarle anestesia profunda. Se lava la zona inoculada, del centro a la periferia unas diez veces y se trata con cloruro de benzalconio al 0.01% cubriéndola con una compresa estéril y dejando actuar el de-

sinfectante por 20 minutos. Mientras tanto se sacrifica el carnero por sangría de la yugular y finalmente se lava la zona de inoculación con abundante agua estéril. El operador se cubre con ropa estéril y aísla el campo con compresas. El contenido de las pústulas, se recoge con una cucharilla de Volkman estéril y se deposita en un vaso de precipitados estéril, previamente tarado, se pesa y se guarda en el congelador a -20°C mientras se procede a realizar la necropsia del animal; si se encuentra alguna evidencia de enfermedad infecciosa se desecha la pulpa.

4.5 Trituración

La pulpa colectada se adiciona de tres partes p/v de solución salina amortiguada y se tritura por 20 minutos en un homogenizador refrigerado. La suspensión se pasa a través de una malla de acero inoxidable con objeto de eliminar el pelo que creció en la zona de inoculación durante el periodo de incubación, así como las partículas grandes de tejido y se congela a -20°C mientras se realizan las pruebas de control.

4.6 Controles intermedios a la Suspensión Viral

4.6.11 Cuenta Total de Microorganismos Extraños a la Vacuna

Se hacen diluciones de la suspensión 1:10, 1:100 y 1:1000 con solución amortiguadora de Mc. Ihlvaine 0.004 Mol/litro; cuando menos tres

muestras de 1 ml de cada dilución se siembran en gelosa nutritiva, se incuban primero 72 h entre 18 y 22°C y después 48 h entre 32 y 37°C, siguiendo la técnica de cuenta directa en placa por siembra profunda. Se incluye un control de la solución amortiguadora que se emplee para preparar las diluciones. A partir del número de colonias que se desarrollen en las placas, se calcula el número de microorganismos viables por ml extraños a la vacuna. Si este número excede a 500, la suspensión deberá sujetarse a un tratamiento de purificación.

4.6.2 Investigación de Estreptococo Hemolítico y Estafilococo Coagulasa Positivo

Cuando menos 1 ml de la dilución 1:100 de la suspensión viral se cultiva en tres o más placas de gelosa sangre que se incuban 48 h a 37°C, y si se encuentran colonias hemolíticas de Streptococcus hemoliticus o Staphylococcus aureus coagulasa positiva, la suspensión se desecha.

4.6.3 Investigación de Coliformes

Por lo menos tres muestras de la dilución 1:100 de la suspensión viral se cultivan en medio EMB. Las placas se incuban 48 h a 37°C. Si se encuentran coliformes indica contaminación fecal y la suspensión deberá someterse a un tratamiento de purificación y se revisarán las condiciones del establo durante la incubación ya que la po-

sitividad de la prueba indica higiene deficiente.

4.6.4 Investigación de Anaerobios Esporulados Patógenos

Se siembran 0.1 ml de la vacuna en 10 tubos con medio fluido de tioglicolato y se someten a 65°C por una hora para inactivar a los microorganismos no esporulados y se incuban a 37°C durante una semana. Se observa el desarrollo y de cada tubo que presente reducción, se inocula a cada uno de por lo menos 5 ratones por vfa intramuscular una mezcla de 0.2 ml de cultivo y 0.1 ml de una solución de cloruro de calcio al 4%, recientemente preparada, y una mezcla de 0.5 ml de cultivo con 0.1 ml de solución de cloruro de calcio a cada uno de - por lo menos dos cuyes por la misma vfa. Los animales deben estar en observación una semana y si alguno de ellos presenta síntomas de tétanos o muere de una infección por gérmenes anaerobios esporulados se deschará la vacuna.

5.0 PREPARACION DE LA SUSPENSION GLICERINADA Y FENOLADA

En caso de no ser satisfactorias las pruebas de pureza microbiana, la vacuna puede tratarse por ultracentrifugación con gradientes de densidad para eliminar contaminaciones no peligrosas. Se adiciona a la suspensión solución salina amortiguada conteniendo glicerina y fenol a tener una concentración final del 50% y del 0.5% respectivamente. En el caso de que la vacuna se presente liofilizada, no se debe agregar glicerina ni fenol, sino un diluyente adecuado y time-

rosal al 0.01% como conservador y se realiza la prueba de potencia.

5.1 Potencia (Apéndice I, 9.1.2.2) (Cálculo de las UP)

5.1.1 Prueba en Membrana Corioalantoidea de Embrion de Pollo

Para el cálculo de las Unidades Pustulizantes (UP), se emplean embriones de 15 días de incubación a 38°C. Se usan 5 embriones por cada dilución de la vacuna en estudio y de la de referencia y cinco controles negativos. Se revisan por transiluminación y se marca la zona que ocupa la cámara de aire, se elige el sitio de inoculación que será una zona poco vascularizada. Se perfora la cámara de aire y se hace un corte en el sitio de inoculación, el corte debe abarcar el cascarón y su membrana pero sin llegar a la corioalantoidea, sobre el corte se colocan dos gotas de solución amortiguadora de Mc.Ihlvaine pH 7.2. Se hace una ligera succión por la perforación de la cámara de aire con lo que la membrana corioalantoidea se desprende de la del cascarón.

Se prueban las diluciones seriadas 10^{-2} , 10^{-3} , hasta 10^{-10} . Cada embrión se inocula con 0.1 ml de las diluciones y los controles negativos con solución amortiguadora de Mc.Ihlvaine y se incuban de 35 a 37°C durante 72 h.

Se cosechan las membranas corioalantoideas poniéndolas en formol al 0.1% y se realiza la cuenta de las pústulas por observación con ayuda de una lupa para efectuar el cálculo en base al promedio del número de pústulas y la dilución correspondiente, obteniéndose así la

cantidad de UP/ml en el material original. La semilla debe tener una potencia de mas de 5×10^8 UP/ml y la suspensión glicerinada y fenolada 5×10^7 , si el resultado es considerablemente mayor, se diluye con solución salina adicionada del 50% de glicerina y el 0.5% de fenol en base al título de la vacuna.

5.1.2 Prueba en la Dermis de Coenjo

Se utilizan conejos de 2.5 a 3.0 kg. Para la prueba se elimina el pelo del dorso a tirones, ya que el empleo de depilatorios inactiva al virus, con un sello de goma se marcan 8 areas rectangulares de 2.5 por 5.0 cm y mediante un escarificador se levanta cuidadosamente la piel de estas zonas. Las diluciones de la vacuna en estudio y de la vacuna de referencia que se emplean son 1:1 000, 1:3 000, 1:10 000 y 1:30 000, debiendose probar en un mismo animal la vacuna en estudio y la de referencia. Con 0.2 ml de cada se impregna una zona escarificada.

El resultado se lee al sexto día y se expresa en términos de la confluencia de pústulas en la zona de inoculación correspondiente a cada dilución. Para que la vacuna sea satisfactoria debe obtenerse un prendimiento similar al de la vacuna de referencia y aproximadamente de la siguiente intensidad:

1:1 000	80 a 100% de confluencia
1:3 000	40 a 60% de confluencia
1:10 000	20 a 30% de confluencia
1:30 000	3 a 10 pústulas

Si se obtiene un mayor preñdimiento la prueba se repite partiendo - de diluciones 1:2 y 1:3 de la suspensión para determinar cual debe ser la dilucion que muestre un preñdimiento similar al descrito.

6.0 CONTROL AL PRODUCTO TERMINADO A GRANEL

6.1 Cuenta Total de Microorganismos Extraños a la Vacuna (4.6.1)

6.2 Prueba de Inocuidad

Se inoculan 5 cuyes con 0.5 ml del producto terminado a granel por vía subcutánea, después de una semana los animales no deben presentar abeeso en el sitio de la inoculación, sino unicamente una inducción ligera.

6.3 Prueba de Potencia (5.1)

6.4 Fenol (Apéndice II, 9.0)

No mas del 0.5%

6.5 Cloruro de Sodio (Apéndice II, 8.0)

No mas del 0.5%

7.0 ENVASADO

Se envasa en tubos capilares cerrados por un extremo, empleando vacío y se sella el otro extremo a la flama.

8.0 CONTROL AL PRODUCTO TERMINADO ENVASADO

8.1 Cuenta Total de Microorganismos Extraños a la Vacuna (4.6.1)

Se toman al azar de 15 a 20 capilares que se colocan en solución de fenol al 0.5%, durante unos minutos, se limpia el exterior con una compresa de gasa estéril y trabajando junto a la flama del mechero se vacía su contenido con ayuda de una pera de hule, en un tubo de ensayo estéril. Se mezcla para homogenizar la suspensión y de esta se parte para realizar las diluciones para la cuenta total de microorganismos extraños a la vacuna y la prueba de potencia.

8.2 Identidad

Al realizar la prueba de potencia, la vacuna debe producir lesiones características en la membrana corioalantoidea de embrión de pollo o en la dermis de conejo.

8.3 Potencia (5.1)

El límite de aceptación cuando la prueba se realiza en embrión de pollo es de 5×10^7 UP/ml, cuando se lleva a cabo en conejo el prediagnóstico debe ser similar al obtenido en la vacuna de referencia.

8.4 Prueba de Estabilidad Acelerada

Una muestra de cada lote se incuba de 35 a 37°C durante una semana y se prueba la potencia por el método de UP/ml en embrión de pollo. La prueba es satisfactoria si baja cuando mucho dos logaritmos, --- (5×10^5 UP/ml).

9.0 ALMACENAMIENTO Y FECHA DE CADUCIDAD

En el laboratorio productor, la vacuna a granel puede almacenarse - por un tiempo practicamente indefinido a -20°C y el producto envasado hasta por nueve meses en las mismas condiciones.

La fecha de caducidad es de 3 meses siempre y cuando se conserve a menos de 0°C ; usualmente en el congelador de los refrigeradores co munes.

10.0 ROTULADO

Además de los datos especificados en el Reglamento General para Laboratorios Fabricantes de Sustancias Biológicas, la etiqueta de la caja debe indicar lo siguiente:

Vacuna antivariólica de virus vivo atenuado

Cepa utilizada

Animal (o tejido) en el cual se propagó el virus

Concentración expresada en UP/ml

Conservador empleado y su concentración

Estabilizador empleado y su concentración

Concentración de cloruro de sodio

Número de tubos capilares contenidos en la caja y dosis en cada uno

Vía: Multipresión o multipuntura

Fecha de caducidad

Consérvese a menos de 0°C

11.0 PRESENTACION Y ESQUEMA DE INMUNIZACION

11.1 Presentación

Tubos capilares con 10 dosis individuales cada uno, en cajas de 100.

11.2 Esquema de Inmunización

La vacunación debe hacerse después de cumplido el año de edad para reducir el peligro de encefalitis postvacunal.

La vacunación se realiza colocando una gota de vacuna sobre la piel previamente asepticada y aplicando multipresión o multipuntura.

12.0 INDICACIONES, CONTRAINDICACIONES Y EFECTOS SECUNDARIOS

12.1 Indicaciones

Se emplea en la inmunización activa contra la viruela.

12.2 Contraindicaciones

La vacuna antivariólica está contraindicada en individuos con lesiones en la piel, ya que en este caso puede presentarse la "vacuna generalizada" que reviste una gravedad igual a la de la viruela y puede llegar a ocasionar la muerte.

Está absolutamente contraindicada durante el embarazo.

12.3 Efectos Secundarios

Puede presentarse encefalitis postvacunal, vacuna generalizada, eczema vacunal e infecciones secundarias en el sitio de la vacunación.

13.0 CARACTERISTICAS DE LA RESPUESTA A LA VACUNACION

Son tres las reacciones que se observan:

- La reacción de primovacunación (RPV) o de prendimiento típico -- primario (PTP) se manifiesta en el sitio de la aplicación por la presencia a las 24 ó 48 h de una mácula que evoluciona a pápula en 3 ó 4 días, a vesícula a los 4 a 6, a pústula al noveno y formación de costra entre los 15 y 21 días, dejando una cicatriz indelible.

Esta reacción de primovacunación es de esperarse cuando el individuo es vacunado por primera vez e indica que no tenía inmunidad.

Si no hay prendimiento primario será necesario repetir la vacunación hasta conseguir la reacción de RPV.

- Reacción acelerada (RA), aparece una vesícula aproximadamente al quinto día que evoluciona a pústula mas tarde y toda la reacción antes descrita se completa en un periodo de 10 días.
Indica que existe inmunidad parcial.
- Reacción inmediata (RI). Presenta solo la fase de mácula y pápula, evoluciona de 24 a 48 h y desaparece en un máximo de 3 días más.
Indica que la persona es inmune y la reacción se debe a que es hipersensible al virus.

B I B L I O G R A F I A

- Organización Mundial de la Salud, Series de Informes Técnicos, - 1959, Informe técnico No. 180, Ginebra, 11.
- Instituto Nacional de Higiene, S.S.A., 1978, Método de producción de Vacuna Antivariólica Glicerizada, México.
- Fenner, F. y D.O. White, Virología Médica, 1973, Ed. La Prensa Médica Mexicana, México, 258.

VACUNA ANTIRRUBEOLA

1.0 INTRODUCCION

El virus de la rubeola (Rubellavirus) solo es patógeno para el hombre y no se trasmite a animales de experimentación.

El virus penetra al organismo mediante el pflügge e infecta la mucosa rinofaríngea.

El período de incubación es de 2 semanas y los síntomas prodrómicos son breves o casi inexistentes; el cuadro clínico comienza súbitamente con la aparición de exantema rosado, fiebre e infarto en los ganglios cervicales, suboccipitales y postauriculares típicos de la enfermedad pero que son fáciles de confundir con síntomas de otros padecimientos. En adultos, se puede presentar también dolor de cabeza, endurecimiento de las articulaciones, sensación de lasitud e inflamación moderada de la garganta.

En sí la infección es moderada y poco peligrosa, mas el riesgo verdadero de la infección radica en la posibilidad de que las mujeres no inmunes (aproximadamente el 15% en nuestro medio), contraigan la enfermedad durante el embarazo, debido a que el virus tiene efecto teratogénico: Ceguera (cataratas, retinopatía, glaucoma), -- sordera (degeneración cloquear), defectos cardíacos congénitos (especialmente la persistencia del conducto arterioso, a veces acompañado por estenosis de las arterias pulmonares) y retardo mental frecuentemente con microcefalia. Los efectos no teratogénicos incluyen retardo en el crecimiento, osteítis, púrpura trombocitopénica,

hepatoesplenomegalia, anemia hemolítica y neumonía intersticial.

En general si la infección ocurre en el primer trimestre del embarazo sobreviene el aborto, en los meses siguientes la posibilidad de daño al feto va disminuyendo aunque se dan casos de retraso mental aún cuando la infección ocurra al octavo mes del embarazo.

La mejor manera de evitar estas complicaciones consiste en la vacunación de todas las mujeres en edad de concebir que no sean inmunes al virus; para detectarlas se debe realizar la prueba de inhibición de la hemaglutinación desarrollada por el doctor Stewart en 1967 y vacunar a aquellas en que se demuestre que no tienen anticuerpos frente al virus de la rubeola.

2.0 DEFINICION

Vaccinum rubella vivum es una suspensión de virus obtenido en cultivo primario de tejido de riñón de conejo conteniendo por lo menos 1 000 DICT₅₀ y no mas de 25 μ g de sulfato de neomicina por dosis humana.

3.0 CEPA

Se usa la cepa Cendehill aislada en cultivo de células renales de mono verde y atenuada por pases repetidos en cultivo primario de riñón de conejo. En la producción no se deben realizar mas de cinco pases a partir del lote de semilla con el cual se llevó a cabo la prueba de campo.

3.1 Lote de Siembra

El lote de siembra se prepara de la misma forma que se describe para la preparación del lote de producción y se conserva repartido en alícuotas a -60°C .

3.2 Controles a la Cepa y al Lote de Siembra

Se realizan las pruebas de identidad por seroneutralización, de esterilidad bacteriana y micótica y de potencia de la misma manera - que se describen para el lote de producción; además, se debe realizar la prueba de neurovirulencia en monos. Si esta prueba es satisfactoria el virus semilla podrá usarse en la producción.

4.0 OBTENCION DE LA VACUNA PREPARADA EN CULTIVOS CELULARES DE RIÑON DE CONEJO

Esta vacuna se puede obtener en cultivo de células de embrión de pato o en cultivo de células renales de conejo, aquí se describe la segunda técnica que es la que se usa para la producción de la vacuna que se distribuye en México.

4.1 Preparación de los Cultivos Celulares

Se emplean cultivos de células de riñón de conejo a los que se les ha realizado previamente pruebas para detectar anticuerpos frente

a virus adventicios. Estos animales deben haber nacido y crecido dentro del laboratorio bajo un control riguroso y deben permanecer bajo control durante seis meses cuando menos, antes de iniciar la producción. Los animales que cumplan con estos requisitos se anes^utesian y trabajando en condiciones de esterilidad, se extraen los riñones que se colocan en cajas Petri. Los conejos se someten a la necropsia en busca de lesiones que evidencfen tuberculosis, mixomatosis, fibromatosis, viruela de conejo y otras enfermedades tí^upicas de ellos.

Los riñones se descapsulan y reducen a fragmentos de 3 a 4 mm, se pasan a un aparato de tripsinización, se lavan dos veces con solución salina isotónica amortiguada con fosfatos y una tercera vez con solución de tripsina al 0.25%, se deja sedimentar y el sobren^udante se decanta. Se adiciona mas solución de tripsina y se deja 45 minutos a temperatura ambiente con agitación continua. Se cen^utrifuga, se decanta el sobrenadante y las células tripsinizadas se lavan con solución de Hanks adicionada de hidrolizado de lactoalbú^umina, 8% de suero fetal de ternera y 50 µg de neomicina (solución de Melnick "A", de crecimiento), se centrifuga a 1 000 rpm durante 10 minutos y a una temperatura de 5°C. Se determina el número de células viables mediante el método de coloración con rojo neutro y se siembran frascos de Roux con esta suspensión, se incuban 5 días a 36°C y al cabo de estos se elimina el medio de crecimiento y se adiciona solución de Earle adicionada de hidrolizado de lactoalbú^umina y 0.4% de glucosa (solución de Melnick "B", de mantenimiento), después de 48 h se cambia el medio de mantenimiento por medio fres^u

co y se separan muestras del medio para control de esterilidad viral (4.4.1).

4.2 Inoculación de los Cultivos Celulares

Cada frasco se inocula con 0.5 ml del virus semilla dejando el 25% de los frascos sin inocular como controles de esterilidad viral.

Se incuban de uno a dos días a 35°C.

4.3 Cosecha

La cosecha se efectúa reuniendo los cultivos que se someten a un ciclo de congelación-descongelación y se reúnen en un frasco, a éste se le adiciona un volumen igual de estabilizador (contiene KOH, KH_2PO_4 , ácido glutámico y lactosa), se separan muestras para control y la suspensión restante se almacena a -60°C.

4.4 Pruebas a los Frascos Control de Tejido de Riñón de Conejo

4.4.1 Subcultivos en Líneas Celulares (Apéndice 1, 6.2.2)

Los cultivos celulares que se dejaron sin inocular con el virus semilla se incuban en las mismas condiciones que los frascos sembrados con el virus y se observan al microscopio durante el período de incubación para detectar efecto citopático. Se toman muestras para detectar contaminación por Nosema cuniculi usando tinción de Giemsa o inmunofluorecencia. Los sobrenadantes de los frascos de control

se reúnen con el fluido retirado antes de inocular y se siembran - 5 ml de esta mezcla en cada uno de por lo menos 5 tubos con cultivos de líneas celulares de humano, simio y riñón de conejo, se observan durante 14 días y no debe aparecer efecto citopático debido a la presencia de virus adventicios. Al final del período de incubación se realiza la prueba de hemadsorción a todos los tubos.

4.4.2 Prueba de Hemadsorción (Apéndice 1, 6.2.2)

A los frascos de control y a los tubos de las distintas líneas celulares de (4.4.1) se les realiza la prueba de hemadsorción; para ello al final de la observación se elimina el fluido sobrenadante y se adiciona una suspensión de eritrocitos de cuy al 0.5% en solución amortiguadora de fosfatos, se refrigera 30 minutos a 5°C, se lava la capa celular y se observa al microscopio la adsorción de - los eritrocitos. Si los glóbulos rojos no se adhieren a la capa de células significa que no hay contaminación con agentes productos de hemadsorción y la prueba es satisfactoria.

4.5 Controles a la Suspensión del Virus antes de la Clarificación

4.5.1 Esterilidad Bacteriana y Micótica (Apéndice 1, 6.1)

4.5.2 Título del Virus (Apéndice 1, 9.2)

El contenido del virus se determina por titulación de las $DICT_{50}$ - en cultivos de riñón de conejo, utilizando como punto de compara-

ción un patrón de referencia de virus de la rubeola.

4.5.3 Identidad (Seroneutralización) (Apéndice 1, 6.2.3)

Se diluye una muestra de la suspensión del virus hasta tener -----
100 DICT₅₀/ml, se adiciona suero antirrubeola de alto título. Una muestra similar de la suspensión viral se mezcla con suero normal procedente de la misma especie de que procede el suero inmune. Se incuban ambas muestras por una hora a 25°C así como una muestra de la suspensión de virus diluido; se siembra 0.1 ml de esta suspensión en cada uno de 10 tubos con cultivo de células de riñón de conejo, y 0.2 ml de las mezclas suero-virus en cada uno de 5 tubos del mismo tejido. Se incuban a 32°C por 18 días en forma estacionaria. A los 7, 14 y 18 días se observa el efecto citopatogénico; los tubos sembrados con la mezcla virus-suero inmune deben ser negativos, en tanto que los sembrados con virus-suero normal y virus diluido solo, deben mostrar resultados positivos.

4.5.4 Investigación de M. tuberculosis

Se investigará la presencia de M. tuberculosis humano sembrando -- muestras en medio de Petroff y de Lowenstein-Jensen con y sin glicerol que se incuban de 36 a 38°C por 42 días, no debe haber evidencia de desarrollo.

4.5.5 Prueba en Ratón Lactante

Cada lote de producción del virus se ensayará en un mínimo de 20 ratones de menos de 24 h de nacidos; a cada uno de los animales se les inyecta 0.01 ml de la suspensión por vía intracerebral y 0.1 ml por vía intraperitoneal; las muertes ocurridas antes de 24 h se deben al traumatismo de las inyecciones. Los ratones se observan diariamente durante 14 días como mínimo. Todos los ratones que mueran o presenten signos patológicos pasadas las primeras 24 h de la prueba, se someten a autopsia para descubrir la presencia de agentes extraños; este examen se hace macroscópicamente por inspección directa y por subinoculación intracerebral e intraperitoneal de suspensiones de tejidos adecuados a otros 5 ratones como mínimo que se observan diariamente durante 14 días. La prueba se considera satisfactoria si al final del periodo de observación sobrevive por lo menos el 80% de los animales inoculados y ninguno presenta signos de infección.

4.5.6 Prueba en Ratón Adulto

El lote de producción del virus se ensaya como mínimo en 20 ratones adultos de 15 a 20 g; cada animal se inyecta con 0.03 ml de la suspensión por vía intracerebral y 0.5 ml por vía intraperitoneal. Los ratones se mantienen en observación durante 21 días como mínimo. Las muertes que ocurren antes de 24 h se deben al traumatismo de las inyecciones. Pasadas las primeras 24 h todos los rato-

nes que mueran o presenten signos patológicos se someterán a autopsia para descubrir la presencia de agentes extraños. Este examen se hace macroscópicamente por inspección directa y por subinoculación intracerebral e intraperitoneal de suspensiones de tejidos apropiados a otros 5 ratones como mínimo que se mantienen en observación por 21 días más. La prueba se considera satisfactoria si al final del período de observación sobrevive por lo menos el 80% de los animales inoculados y ninguno presenta signos de infección.

4.5.7 Prueba en Embriones de Pollo

Inoculación en la cavidad alantoidea

Se hacen reaccionar 50 ml de la suspensión viral con suero antiirruboia de alto título, se deja la mezcla 1 h a temperatura ambiente. Se inoculan 150 embriones de 8 a 10 días en la cavidad alantoidea con 0.5 ml por embrión, 10 más se inoculan con una mezcla a partes iguales de estabilizador y medio de mantenimiento, se dejan 10 embriones sin inocular como control y 10 más como controles adicionales. Todos los embriones se incuban de 35 a 37°C por 7 días observandolos dos veces diarias; las muertes que ocurran a las primeras 24 h no se toman en consideración ya que se deben al traumatismo de la inoculación. Al final del período de incubación se prueban en:

A. Signos patológicos.

B. El fluido alantoideo se prueba en aglutinación con glóbulos rojos de pollo.

- C. Se buscan lesiones en la membrana corioalantoidea.
- D. En caso de duda los fluidos alantoideos se subinoculan en seis embriones adicionales para descartar la presencia de algún agente transmisible.

Si durante el periodo de observación ocurren muertes, deben realizarse en los fluidos alantoideos las pruebas antes mencionadas así como una siembra en medio fluido de tioglicolato USP que se incuba 7 días de 35 a 37°C; en caso de tener desarrollo bacteriano se preparan frotis que se tiñen al Gram para determinar la morfología de los microorganismos.

Inoculación en saco vitelino

Se mezclan 50 ml de la suspensión viral con suero antirrubéola de alto título, la mezcla se deja 1 h a temperatura ambiente. Se inoculan 150 embriones de 7 a 9 días en saco vitelino con 0.5 ml -- por embrión, 10 más se inoculan con la mezcla estabilizador-medio de mantenimiento, se dejan 10 embriones como controles y 10 más como controles adicionales. Todos los embriones se incuban de 35 a 37°C durante 7 días observándolos dos veces diarias, al final del periodo de incubación los embriones que sobreviven se prueban en:

- A. Signos patológicos.
- B. Presencia de cuerpos de inclusión en el saco vitelino. Para esto se hacen frotis con el tejido del saco vitelino que se tiñen por el método de Machiavello; en caso de existir contaminantes, se observan al microscopio cuerpos de inclusión que toman un color rojo sobre fondo azul.

C. En caso de duda los fluidos alantoideos se subinoculan en seis embriones adicionales para descartar la presencia de algún agente transmisible.

Estas dos pruebas se realizan también con muestras del virus sin neutralizar.

4.5.8 Inoculación en Cultivo de Células de Riñón de Mono

Un volumen de la suspensión viral diluido al equivalente de por lo menos 500 dosis humanas se neutraliza con suero antirrubéola de alto título de origen no-humano ni simio, la muestra se incuba 1 hora a temperatura ambiente y se inoculan 0,5 ml a por lo menos 5 tubos con cultivo de células de riñón de mono Cercopithecus o Erythrocybus patas se incuban de 35 a 37°C durante 14 días como mínimo observándolos diariamente, la vacuna es satisfactoria si no hay evidencia de efecto citopático. Esta prueba se realiza también con muestras del virus de producción sin neutralizar.

4.5.9 Pruebas en Otros Cultivos de Células

Se toman muestras de la suspensión del virus que se neutralizan con suero antirrubéola de alto título y se siembran en cultivos celulares de riñón de mono Rhesus, de mono Cynomolgus y de conejo así como en células humanas. Se incuban durante 14 días y no debe haber evidencia de la presencia de virus adventicios.

Esta prueba se realiza también con muestras del virus de producción sin neutralizar.

4.5.10 Inoculación de Conejos

Una muestra de por lo menos 15 ml de cada lote de producción debe probarse por inoculación en conejos. Se usan 5 conejos sanos de 1.5 a 2.5 Kg que se inyectan con 1.0 ml cada uno por vía intradérmica en varios sitios y 2.0 ml por vía subcutánea. Los animales se observan por 30 días y todos los que mueran o presenten signos de enfermedad después de las primeras 24 h se someterán a autopsia examinando órganos y cerebro. La prueba es satisfactoria si sobrevive por lo menos el 80% de los animales y si ninguno presenta lesiones de cualquier tipo en el sitio de inoculación que puedan evidenciar la presencia de agentes extraños en la suspensión del virus.

4.5.11 Prueba de Inoculación a Cuyes

Se inoculan 5 cuyes de 350 a 450 g con 0.1 ml de la suspensión por vía intracerebral y 5.0 ml por vía intraperitoneal, se observan -- por 42 días y todos los animales que se sacrifiquen por enfermedad o que mueran pasadas las primeras 24 h deberán someterse a la necropsia. Al término del periodo de observación los animales sobrevivientes se sacrifican y se someten a la necropsia en busca de lesiones producidas por M.tuberculosis o por algún agente viral.

La prueba es satisfactoria si sobrevive por lo menos el 80% de los animales inoculados y ninguno presenta lesiones atribuibles a M. tu
berculosis o a algún virus adventicio presente en la suspensión.

4.5.12 Pruebas para la Detección de otros Agentes Adventicios

En cada lote debe probarse la ausencia de agentes patógenos para - los conejos como: Toxoplasma, encefalitozon, herpes de conejo, virus vacuolating, virus syncycial, mixovirus y reovirus. Para és- to se usarán las pruebas de identidad apropiadas en cada caso. La suspensión se considera satisfactoria si los resultados obteni- dos son negativos en cada caso.

5.0 CLARIFICACION

Antes del envase se la vacuna se procede a descongelar la suspen- sión viral en baño de agua, se centrifuga y el sobrenadante se fil- tra a través de membrana.

6.0 CONTROLES AL PRODUCTO CLARIFICADO

6.1 Esterilidad Bacteriana y Micótica (Apéndice I, 6.1)

6.2 Título del Virus (4.5.2)

Debe contener no menos de 1 000 DICT₅₀ por cada 0.5 ml.

.3 Neurovirulencia en Monos

Se usan monos en los que se ha comprobado la ausencia de anticuerpos frente al virus de la rubeola inhibidores de la hemaglutinación. Se inoculan, bajo anestesia profunda, con una muestra tomada después de la clarificación pero antes de la dilución final del virus, por lo menos 20 monos *Cercopithecus* o *Macacus* con 1.0 ml de la suspensión viral por vía intramuscular en la extremidad posterior derecha, con 200 mg de acetato de cortisona en la izquierda, 300 000 UI de penicilina en la extremidad superior derecha, 0.5 ml de la suspensión viral en la región talámica de cada hemisferio y 0.5 ml por vía intraespinal a la altura de las vértebras lumbares.

Los monos se observan durante 17 a 21 días y en ningún caso deberán observarse síntomas de parálisis o cualquier trastorno neurológico, las muertes que ocurran en las primeras 48 h no se consideran para la prueba y el animal debe substituirse por otro inmediatamente. Al final del período de observación se sacrifican los animales y se toman muestras del tálamo y de la médula espinal a nivel lumbar y cervical, para la recuperación del virus que deberá ser negativa. Además se realizan estudios histopatológicos y en ningún caso debe observarse daño en esas regiones atribuible a neurotropismo del virus o a la presencia de agentes extraños. En caso de duda por los hallazgos histopatológicos, se hará un examen de diferentes partes del cerebro sospechoso así como la recuperación del virus de los tejidos nerviosos extraídos del animal.

La prueba es satisfactoria si sobrevive el 90% de los animales, si

no presentan una pérdida de peso mayor del 25% y si por lo menos - el 70% de los animales inyectados inicialmente sobreviven las primeras 48 h.

La prueba se repite si a las 48 h sobreviven menos del 70% de los animales inoculados inicialmente.

7.0 ENVASADO

La vacuna se envasa en frascos ampula ámbar en dosis individuales, se liofilizan y sellan al vacío.

8.0 CONTROLES AL PRODUCTO TERMINADO ENVASADO

8.1 Esterilidad Bacteriana y Micótica (Apéndice I, 6.1)

8.2 Inocuidad (Apéndice I, 8.0)

8.3 Potencia (4.5.2)

No menos de 1 000 DICT₅₀ por dosis humana

8.4 Identidad (4.5.3)

8.5 Humedad Residual (Apéndice II, 1.0)

No más del 2%

8.6 Solubilidad (Apéndice II, 3.0)

9.0 ALMACENAMIENTO Y FECHA DE CADUCIDAD

La vacuna liofilizada se debe conservar a temperatura inferior a -10°C.

La fecha de caducidad no será mayor a doce meses después de la última prueba de potencia satisfactoria.

10.0 ROTULADO

Además de los datos especificados en la Reglamentación Vigente para Laboratorios Fabricantes de Sustancias Biológicas, debe indicar lo siguiente:

Vacuna antirrubeola de virus atenuado

Cepa utilizada

Tejido en el cual se cultivó el virus

Antibióticos y su concentración

Estabilizador empleado

No contiene conservadores

Protéjase de la luz

Contiene 1 000 DICT₅₀ por dosis humana

Dosis: 0.5 ml por vía subcutánea

Volumen y naturaleza del diluyente

Fecha de caducidad

Descártese la vacuna que no se haya empleado en las siguientes 8 h

después de su rehidratación y durante ese tiempo manténgase entre 2 y 8°C.

Si se emplea alcohol para aseptizar la piel debe dejarse evaporar completamente ya que éste inactiva la vacuna.

11.0 PRESENTACION Y ESQUEMA DE INMUNIZACION

11.1 Presentación

Se presenta liofilizada en frascos ampula ámbar con el disolvente para rehidratar a 0.5 ml (dosis individual), en cajas con 1 ó 10 dosis.

11.2 Esquema de Inmunización

Una sola dosis por vía subcutánea.

12.0 INDICACIONES Y CONTRAINDICACIONES

12.1 Indicaciones

Se deben vacunar todos los niños desde 1 año de edad y a mujeres en edad reproductiva con resultados negativos a la prueba de inhibición a la hemaglutinación. En este caso la mujer no deberá embarazarse hasta que hayan transcurrido dos ciclos menstruales después de haber recibido la vacuna.

12.2 Contraindicaciones

No es necesario administrar la vacuna a personas con reacción de inhibición a la hemaglutinación positiva.

Como no hay información suficiente para demostrar que la vacuna es tá exenta de efectos teratogénicos no se debe administrar a mujeres embarazadas.

La vacuna está contraíndicada en personas sensibles a las proteínas de riñón de conejo, en este caso se usará la obtenida en cultivo celular de embrión de pato.

B I B L I O G R A F I A

- Organización Mundial de la Salud, 1977, Serie de informes técnicos, 28^o Informe, anexo 3, Ginebra, 59.
- Code of Federal Regulations, 1977, U.S.A. Government printing office, Washigton, 84.
- Fenner, F. y D.O. White, Virología Médica, 1973, Ed. La Prensa Médica Mexicana, México, 354.
- Weisman E., Microbiología Médica, 1974, Ed. Salvat, Barcelona España, 257.

VACUNA ANTIRRABICA

1.0 INTRODUCCION

La rabia es una enfermedad infecciosa del sistema nervioso, común al hombre y practicamente a cualquier animal de sangre caliente, - siendo el perro y el gato las fuentes de infección mas importantes para el humano, pero la "rabia selvática" se presenta además en animales silvestres como zorros, mofetas, ardillas y lobos.

Los vampiros, aún cuando no llegan a padecer la infección son reservorios que la trasmiten al hombre y especialmente al ganado al - succionarles la sangre para alimentarse.

Estos animales así como ciertos murciélagos insectívoros tienen el virus en las glándulas salivales y en los panículos adiposos de -- grasa café de manera que pueden trasmitir el virus a otros animales vía los aerosoles de las secreciones de estos murciélagos. Generalmente la transmisión a los seres humanos ocurre cuando son mordidos por los animales rabiosos, aunque basta el contacto con la saliva del animal en un arañazo o simple escoriación.

El período de incubación depende de la edad, sitio y magnitud de - las heridas; generalmente es de 20 días a 3 meses pudiendo ser mas corto en niños, y cuando las heridas son extensas o si éstas están en la zona de la cabeza y cuello, aunque se han reportado períodos de incubación tan cortos como de una semana y tan largos como de - un año.

En la mortalidad por rabia intervienen varios factores; especie del

animal infectante, sitio y extensión de las heridas, eficacia de los primeros auxilios y el lapso entre el accidente y la vacunación o la seroprofilaxis-vacunación.

De la zona infectada el virus avanza por los nervios periféricos - para alcanzar por último el Sistema Nervioso Central. Los síntomas prodrómicos en el hombre incluyen malestar, ansiedad e hipersensibilidad alrededor de la herida. En el cuadro clínico los músculos presentan espasmos dolorosos, principalmente en los músculos de la deglución, después puede o no presentarse la parálisis, el delirio, el estado de coma y la muerte le sigue en el curso de una semana, algunos autores afirman que la muerte es común pero no inevitable. En la mayoría de los casos la infección puede evitarse mediante la administración de la vacuna y en los casos de mordeduras graves mediante la prevención combinada con el suero antirrábico y la vacuna, pero una vez que la infección se ha desarrollado el suero antirrábico es absolutamente ineficaz y tampoco existen otros agentes antivirales que pudieran curar la infección.

Cuando se ha establecido la etiología del padecimiento se mantiene a los pacientes aislados administrándoles sedantes en solución salina glucosada hasta que ocurra la muerte.

2.0 DEFINICION

La vacuna antirrábica Fuenzalida está constituida por una suspensión al 1% p/v de tejido cerebral de ratones lactantes infectados con virus rábico fijo, inactivado por radiaciones ultravioleta.

Contiene 0.1% de fenol y 0.01% de timerosal como conservadores.

2.1 Otros Tipos de Vacunas Antirrábicas

Vacuna Semple: Está constituida por una suspensión al 5% de tejido cerebral de conejos o de carneros adultos infectados con virus rábico fijo inactivado por calentamiento a 37°C por 48 a 72 h, contiene fenol al 0.5% y timerosal al 0.01% como conservadores.

Vacunas obtenidas en cultivos celulares:

Se encuentran en período experimental y entre ellas podemos citar:

La PMBHK21 que se prepara propagando la cepa PM de virus rábico fijo en células de riñón de criceto recién nacido.

La 38FC que se prepara en células diploides humanas WI38.

2.2 Vacunas para Uso Veterinario

Se incluye en este tipo de vacunas la preparada con la cepa ERA que se obtiene a partir de cultivos celulares de riñón de cuy recién nacido inoculados con virus rábico fijo.

También se emplean vacunas obtenidas por inoculación en saco vitelino de embriones de pollo, con variantes de la cepa Flury, y que pueden ser de bajo número de pases (LEP) o de alto número de pases -- (HEP) y en ambas su presentación final es liofilizada.

En México se está empleando también para animales la vacuna Fuenzalida, pero la concentración final de la suspensión cerebral es del 2.5%.

3.0 CEPAS

Se utilizan las siguientes: Cepa CVS241/4, cepa 51/123 de origen canino, aislada en Chile y cepa 91/122-1 de origen humano, aislada en Chile.

Con ellas se preparan tanto el "virus de reserva" como el "virus de trabajo" de la siguiente manera.

3.1 Lote de Siembra

Se inoculan por vía intracerebral 50 ratones de 11 a 16 g de peso (tres o cuatro semanas de edad) con cada cepa del virus vacunal. Los animales se observan diariamente y a partir del cuarto día aquellos que presenten signos de rabia son sacrificados y se les extraen los cerebros. Con el tejido nervioso obtenido se prepara una suspensión al 20% en agua bidestilada estéril conteniendo 2% de suero de caballo estéril, 200 UI de penicilina y 200 mg de estreptomicina por cada ml. Esta suspensión se envasa y liofiliza en alícuotas de 1 ml, que se conservan a -40°C ; aproximadamente el 40% se destina para virus de reserva y el 60% restante se utiliza como lote de siembra.

3.2 Controles a la Cepa y al Lote de Siembra

3.2.1 Título del Virus (Apéndice I, 4.2)

Se determina la Dosis Letal Media (DL_{50}) en ratones blancos de 11 a 16 g (3 a 4 semanas de edad) de un solo sexo. Generalmente se -- prueban 5 diluciones en incrementos de 10 utilizando como diluyente solución amortiguadora de Sørensen. De cada dilución se inoculan 0.03 ml por vía intracerebral. Los animales se mantienen en observación durante un período de 14 días, las muertes que ocurran durante las primeras 72 h no se deben considerar como producidas por el virus sino por el traumatismo de la inyección.

Diariamente se anota el número de muertes y al final del período de observación, los animales que presenten parálisis también serán considerados como muertos

El cálculo de la DL_{50} se hará por el método de Reed-Muench.

3.2.2 Límite de Contaminación Bacteriana

Se siembran cada uno de 10 tubos, que contienen 9 ml de medio flujido de tioglicolato de sodio (USP) con 1 ml de la suspensión viral. El quinto tubo se agita manualmente y se transfiere 1 ml de esta - suspensión al sexto tubo, se mezcla y se toma 1 ml que se pasa al séptimo tubo continuandose con este procedimiento hasta el décimo tubo (dilución 10^{-6}). Todos los tubos se incuban a $35^{\circ}C$ y se observan diariamente durante 7 días. Se admite como máximo un desarrollo de la contaminación bacteriana en 10^{-2} . Un alto grado de contaminación es indicio de que existen deficiencias en la técnica de producción y a pesar de que las bacterias son inactivadas por - irradiación con luz ultravioleta, su presencia puede ocasionar --

reacciones locales generales.

3.2.3 Identidad (Seroneutralización) (Apéndice 1, 1.3.3)

Para esta prueba se emplea suero antirrábico de alto título que se hace reaccionar con la dilución del "virus de reserva" 10^{-1} . La mezcla se incuba a 37°C durante 90 minutos y se inoculan 0.03 ml a ratones de 11 a 16 g por vía intracerebral.

Simultáneamente se inocula un lote de ratones testigo con una mezcla de suero normal y virus rábico a la concentración de 10^{-1} , incubada en las mismas condiciones.

Si los ratones inoculados con la mezcla de virus de reserva y suero antirrábico sobreviven y los testigos inoculados con suero normal y virus mueren, se comprueba que se trata de virus rábico.

Las cepas semilla se controlan periódicamente y cuando es necesario se obtiene más "virus de trabajo" a partir del "virus de reserva".

4.0 OBTENCIÓN DE LA VACUNA

4.1 Inoculación de los ratones

Se inoculan por vía intracerebral, ratones lactantes de no más de 5 días de edad con 0.01 ml de una dilución de la suspensión del "virus de trabajo" que deberá tener alrededor de 100 DL_{50} para el ratón adulto.

4.1.1 Control del Título del Inóculo

La misma dilución que se empleó para el lote de producción se inyecta en dosis de 0.03 ml a 10 ratones adultos de 11 a 16 g por vía intracerebral para determinar la viabilidad del virus. Se les mantiene en observación durante 14 días y si algunos ratones permanecen sanos durante este período se debe renovar la suspensión del "virus de trabajo", pero se puede utilizar la cosecha; en cambio si ninguno desarrolla la infección se desecha el lote de ratones lactantes inoculados.

4.2 Cosecha

Los ratones lactantes se sacrifican a las 72 h de la inoculación, colocándolos en un recipiente hermético con un algodón impregnado con éter o cloroformo.

Los ratones sacrificados se colocan en una bolsa de gasa y se sumergen durante 10 minutos en una solución de fenol al 5%. Se sacan de esta solución, se depositan en charolas y se realiza la cosecha dentro de ambiente estéril. La cosecha de cerebros se realiza mediante un aparato estéril constituido por un frasco que tiene una conexión a un tubo de hule, al final del cual se adapta una aguja hipodérmica de calibre grueso y bisel corto, este frasco se conecta al vacío para poder realizar la succión de los cerebros. Se toma cada ratón entre los dedos índice y pulgar y se introduce la aguja en cada uno de los hemisferios cerebrales. El vacío se

regula con una pinza de Mohr. El material así obtenido se conserva a -40°C mientras se continúa con la preparación de la vacuna.

4.3 Preparación de la Suspensión Cerebral

Se descongelan los cerebros a temperatura ambiente y se prepara una suspensión al 10% p/v del tejido en agua bidestilada estéril en friada a 4°C . Se homogeniza procurando que no se eleve la temperatura.

4.4 Centrifugación de la Suspensión Cerebral

La suspensión de tejido al 10% se centrifuga a 2 500 rpm durante - 10 minutos y se recoge el sobrenadante, se afora con agua bidestilada estéril fría, para restituir el volumen original de virus.

4.5 Controles a la Suspensión Antes de la Inactivación

4.5.1 Límite de Contaminación Bacteriana (3.2.2)

4.5.2 Prueba de Identidad (3.2.3)

4.5.3 Título del Virus (3.2.1)

Se consideran satisfactorios los títulos que oscilan entre $10^{6.3}$ y $10^{7.3}$.

4.6 Inactivación del Virus

La suspensión al 10% centrifugada se diluye al doble, agregando agua bidestilada estéril y fría. El virus se inactiva por radiación utilizando un esterilizador de plasma de flujo continuo (J.J. Dill Ultraviolet, Kalamazoo, Michigan, USA, equipado con medidor de flujo modelo A-350).

La suspensión del virus se expone en forma de película fina sobre las paredes interiores del tubo de acero inoxidable que rota a 1000 rpm. Las lámparas de luz ultravioleta están ubicadas en el centro del tubo a 1 cm de distancia de las paredes. El material se expone a la luz que produce un juego de cuatro lámparas ultravioleta, la suspensión viral fluye a una velocidad de 250 ml por minuto.

4.7 Dilución Final de la Vacuna

Inmediatamente después de la irradiación, la suspensión al 5% se diluye con cuatro volúmenes de agua bidestilada que debe contener la cantidad necesaria de fenol y timerosal para que alcancen una concentración final de 0.1 y 0.01% respectivamente.

El empleo del fenol es para preservar el antígeno contra la acción de las enzimas del tejido nervioso, así como conservador.

5.0 CONTROL AL PRODUCTO TERMINADO A GRANEL

5.1 Esterilidad Bacteriana y Micótica (Apéndice I, 6.1)

5.2 Prueba de Inactivación (Apéndice I, 3.2)

Se inoculan 16 ratones adultos de 11 a 16 g de peso, por vía intra cerebral con 0.03 ml y 16 ratones lactantes, por vía intracerebral con 0.01 ml de la vacuna. Los animales no deben mostrar signos de rabia durante 14 días. La prueba se realiza dividiendo en subbloques de 20 litros la vacuna para mayor seguridad en la prueba. Para verificar la ausencia de otros factores no relacionados con el virus rábico se continúa la observación de los animales 30 días.

5.3 Prueba de Inocuidad (Apéndice I, 8.0)

5.4 Prueba de Potencia por el Método NIH (Apéndice I, 9.7)

5.5 Controles Químicos

5.5.1 pH (Apéndice II, 4.0)

De 6.8 a 7.4

5.5.2 Contenido de Proteínas (Apéndice II, 11.0)

No más de 0.1%

5.5.3 Conservadores

Fenol (Apéndice II, 9.0): No más de 0.1%

Timerosal (Apéndice II, 13.0): No más de 0.01%

6.0 ENVASADO

La vacuna se envasa con agitación continua, en frascos ampula en volúmenes de 15 ml.

7.0 CONTROLES AL PRODUCTO TERMINADO ENVASADO

7.1 Esterilidad Bacteriana y Micótica (Apéndice I, 6.1)

7.2 Prueba de Potencia (Apéndice I, 9.7)

7.3 Prueba de Identidad

La prueba de potencia se considera como prueba de identidad.

8.0 ALMACENAMIENTO Y FECHA DE CADUCIDAD

La vacuna debe conservarse de 2 a 10°C evitando la congelación ya que el fenol a temperaturas inferiores a 0°C desnaturaliza el antígeno.

La fecha de caducidad no será mayor de 6 meses de la fecha en que se haya practicado la última prueba de potencia con resultados satisfactorios.

9.0 ROTULADO

Además de los datos especificados en la Reglamentación Vigente para Laboratorios Fabricantes de Sustancias Biológicas, debe indicar lo siguiente:

Vacuna antirrábica

Cepa utilizada

Obtenida en tejido cerebral de raton lactante

Concentración del virus por dosis humana.

No contiene antibióticos

Estabilizadores y su concentración

Conservadores y su concentración

Volumen total contenido en el envase

Dosis; 1 ml

Via; subcutánea en la región interescapulovertebral o región abdominal.

Fecha de caducidad

Consérvese entre 2 y 10°C, evitando la congelación

Protejase de la luz

10.0 PRESENTACION Y ESQUEMA DE INMUNIZACION

10.1 Presentación

Frasco ampula conteniendo 15 ml (cantidad suficiente para un esquema de inmunización).

10.2 Esquema de Inmunización

El esquema de inmunización comprende 14 dosis (una diaria) de un - ml de la vacuna.

11.0 INDICACIONES, REACCIONES SECUNDARIAS Y CONTRAINDICACIONES

11.1 Indicaciones

Selección de los pacientes que deben recibir el tratamiento.

No todas las personas mordidas por un animal rabioso tienen que recibir tratamiento sistemáticamente. Debido a que éste no es inocuo, ya que acarrea varias molestias e inclusive puede producir la muerte.

11.1.1 Zona Donde se Produjo el Ataque

En zonas enzoóticas, cualquier persona que haya sido mordida por un animal de sangre caliente, que no pueda ser observado debe recibir el tratamiento preventivo. Por lo que se refiere a México, se considera zona enzoótica de rabia.

11.1.2 Condiciones en que se Produjo el Ataque

Cuando el animal muerde sin provocación, se debe localizar y vigilar por lo menos 10 días y si:

Sobrevive los 10 días	No se debe vacunar
Muere después de los 10 días	No se debe vacunar
Muere durante los 10 días y el diagnóstico de laboratorio es positivo.	Se debe vacunar
Cuando el animal no se localiza	Se debe vacunar

11.1.3 Características del Contacto con la Saliva Infectada

Si hay heridas producidas por dientes o garras del animal	Se debe vacunar
Si hay contacto con saliva recién emitida, en la piel íntegra	No se debe vacunar
Si hay contacto con saliva recién emitida, en la piel lesionada	Se debe vacunar
Si hay contacto con saliva recién emitida, en lesiones en proceso de cicatrización	No se debe vacunar
Si hay contacto con objetos que haya lamido el animal	No se debe vacunar
Si hay contacto con otro animal que jugó o peleó con el animal sospechoso	No se debe vacunar

Si hay lesión o escoriación por roce brusco de la tela sobre la piel pero la tela no está perforada

No se debe vacunar

Además de las características del contacto con la saliva se deben tomar en consideración los resultados del laboratorio:

Cuadro clínico de rabia	Resultados de laboratorio	
Si hay	positivo	Se debe vacunar
No hay	negativo	No se debe vacunar
Si hay	negativo	No se debe vacunar
No hay	positivo	Se debe vacunar

11.2 Reacciones Secundarias más Comunes en la Vacunación antirrábica

Los niños son menos sensibles a presentar complicaciones neuroparalíticas, mientras que los adultos las presentan con más frecuencia y generalmente son más graves.

Debe tomarse en consideración cualquier antecedente alérgico o vacunación previa. Es frecuente que ocurran reacciones locales durante el tratamiento presentándose respuesta inflamatoria.

Los casos de complicaciones alérgicas al tratamiento antirrábico - pueden presentarse durante o después de la vacunación y pueden tener un comportamiento mielítico dorso lumbar ascendente semejante al síndrome de Landry o también se presenta encefalomielitis o encefalitis sin parálisis.

Los mecanismos patogénicos en los accidentes neurológicos postvacu

Si hay lesión o escoriación por roce bruso

co de la tela sobre la piel pero la tela

no está perforada

No se debe vacunar

Además de las características del contacto con la saliva se deben tomar en consideración los resultados del laboratorio:

Cuadro clínico de rabia	Resultados de laboratorio	
Si hay	positivo	Se debe vacunar
No hay	negativo	No se debe vacunar
Si hay	negativo	No se debe vacunar
No hay	positivo	Se debe vacunar

11.2 Reacciones Secundarias más Comunes en la Vacunación antirrábica

Los niños son menos sensibles a presentar complicaciones neurológicas, mientras que los adultos las presentan con más frecuencia y generalmente son más graves.

Debe tomarse en consideración cualquier antecedente alérgico o vacunación previa. Es frecuente que ocurran reacciones locales durante el tratamiento presentándose respuesta inflamatoria.

Los casos de complicaciones alérgicas al tratamiento antirrábico - pueden presentarse durante o después de la vacunación y pueden tener un comportamiento mielítico dorso lumbar ascendente semejante al síndrome de Landry o también se presenta encefalomielitis o encefalitis sin parálisis.

Los mecanismos patogénicos en los accidentes neurológicos postvacu

nales no han sido bien aclarados, pero la opinión mas aceptada es que se trata de una reacción inmunológica por la presencia de isoantígenos en la vacuna especialmente en la mielina.

No existe un tratamiento específico para estas alteraciones, pero el uso de corticosteroides favorece la recuperación.

Los casos mortales son relativamente frecuentes especialmente cuando las manifestaciones son de tipo mielítico y encefalomielítico.

11.3 Contraindicaciones

A los pacientes hipersensibilizados a las proteínas de tejido cerebral habrá de administrárseles la vacuna obtenida en embrión de pato.

B I B L I O G R A F I A

- Lopez Pintado, F., Salud Pública de México, 1974, 16, 451.
- World Health Organization, Laboratory techniques in rabies, -- 1954, Informe técnico No. 23, Ginebra.
- Fenner, F. y D.O. White, Virología Médica, 1973, Ed. La Prensa Médica Mexicana, México, 343.

GAMMA GLOBULINA HUMANA NORMAL

1.0 INTRODUCCION

La gamma globulina humana normal es un preparado que contiene anticuerpos frente a los microorganismos que frecuentemente causan infección en el humano y que dejan inmunidad permanente. Este producto se obtiene a partir de placentas o de plasma de donadores.

La diferencia con las gamma globulinas hiperinmunes de origen humano (antitetánica, antipertussis, anti-D, etc.) es que éstas últimas se obtienen exclusivamente a partir del plasma de donadores inmunizados exprofeso con el antígeno correspondiente.

La gamma globulina normal se emplea en la profilaxis temporal y en la atenuación de infecciones virales así como para el tratamiento en los estados de hipo y agamma globulinemia.

Este producto contiene fundamentalmente anticuerpos frente a sarampión, varicela, rubeola, poliomielitis y parotiditis.

Para su aplicación, las gamma globulinas se purifican por el método de Cohn de precipitación con etanol o sus modificaciones, y cuando se parte de plasma se obtienen como subproductos de empleo terapéutico: Albúmina, factor antihemofílico y fibrinógeno, así como otras proteínas plasmáticas que se emplean para la obtención de reactivos para laboratorio. En la purificación de las gamma globulinas de origen placentario también se obtiene como subproducto albúmina.

2.0 DEFINICION

Inmunoglobulinum humanum normale es una solución de anticuerpos purificados, obtenidos de plasma o placentas y que contiene todos los anticuerpos presentes en el adulto normal.

Además se le adiciona un estabilizador, generalmente glicina, 0.3 mol/litro y timerosal al 0.01% como conservador; se presenta líquida o liofilizada.

3.0 OBTENCION DE LA GAMMA GLOBULINA HUMANA NORMAL

3.1 Obtención del Material

3.1.1 Obtención del Plasma

La sangre debe provenir de individuos sanos, que no hayan padecido enfermedades recientemente. Antes de cada donación se debe investigar la presencia del antígeno asociado a la hepatitis B (^{SIDA} Ags HB), realizar la serología de lues y las determinaciones de hematocrito y hemoglobina.

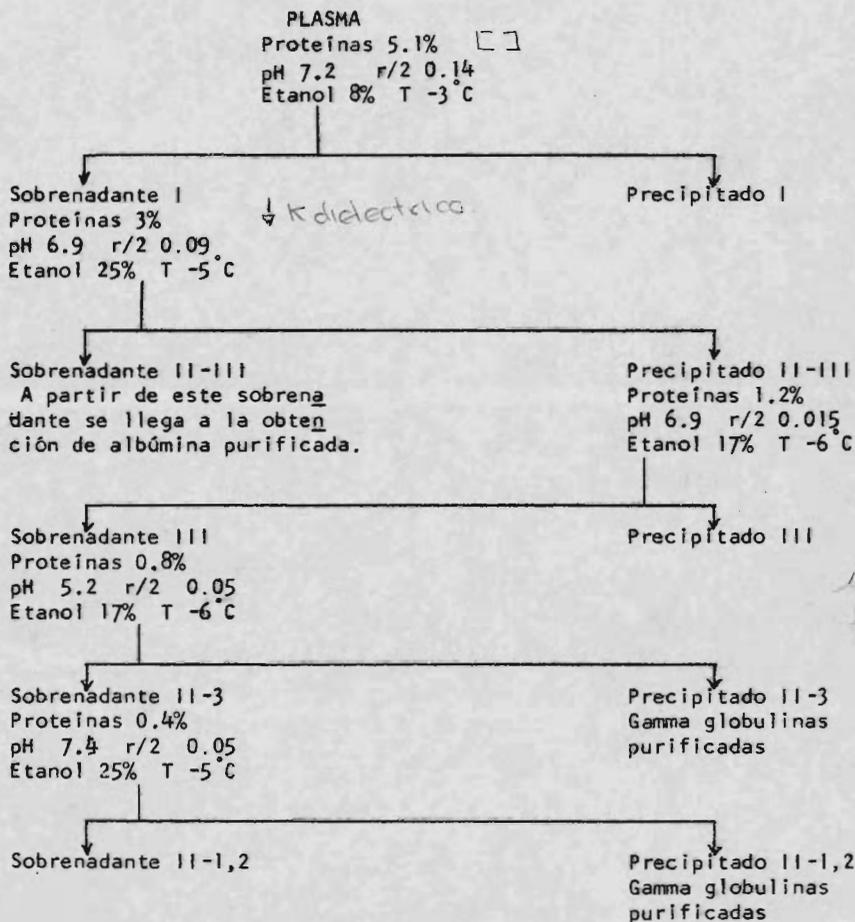
Los donadores pueden ser sangrados cada 40 días extrayéndoles un volumen máximo de 500 ml. La sangre se recibe en recipientes estériles que contengan anticoagulante ACD, se centrifuga a 1000 rpm por 5 minutos en frjo. El paquete celular se vuelve a inocular al donador (plasmaféresis) y el sobrenadante se congela y envía al laboratorio para su procesamiento.

3.1.2 Obtención de las Placentas

Las placentas se seleccionan y congelan en las instituciones hospitalarias, su transporte y almacenamiento se realiza a -20°C .

3.2 Obtención de las Gamma Globulinas

3.2.1 Fraccionamiento del Plasma



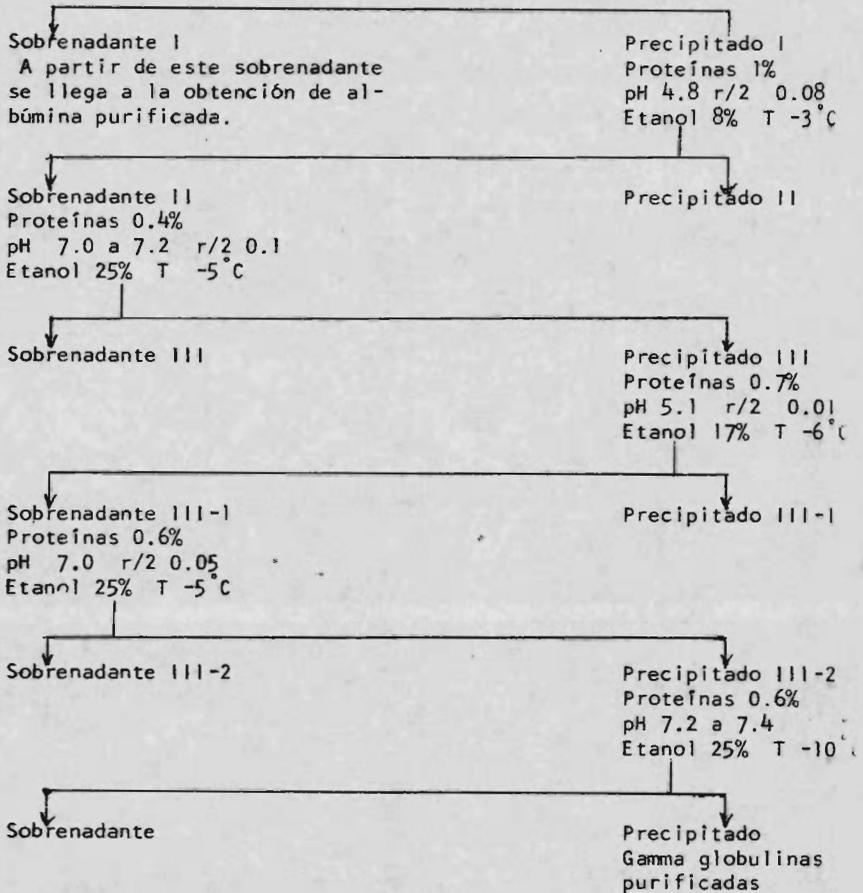
El plasma se descongela en condiciones controladas para evitar la -
redisolución del crioprecipitado que contiene el factor antihemofí-
lico; se reúnen los plasmas procedentes de por lo menos 1000 dona-
dores y se centrifugan en frío para recuperar el crioprecipitado, -
el sobrenadante obtenido se trata de acuerdo con el esquema simpli-
ficado para el fraccionamiento del plasma según el método 6 y 9 de
Cohn que se menciona inicialmente.

3.2.2 Obtención de las Gamma Globulinas a Partir de Placentas

Las placentas recibidas se descongelan dos días antes de iniciar el
proceso, se muelen y se adicionan de solución salina al 0.8% ---
(1:1 p/v) y pulpa de papel, la mezcla se centrifuga a 2000 rpm y
el sobrenadante se vuelve a centrifugar para clarificarlo a -----
16000 rpm. El extracto de placenta obtenido se trata de acuerdo
con el siguiente esquema simplificado para la obtención de gamma -
globulina a partir de placenta según el método de Taylor.

-	-	-	-	-
-	-	-	-	-
-	-	-	-	-
-	-	-	-	-

EXTRACTO DE PLACENTA
pH 6.0 a 6.9
Etanol 25% T -5°C



3.3 Controles que se Llevan a Cabo Durante el Proceso

3.3.1 pH (Apéndice II, 4.0)

3.3.2 Proteínas Totales (Apéndice II, 11.3)

Se determina para conocer el rendimiento durante el proceso y para poder ajustar las concentraciones de proteínas en cada paso.

3.3.3 Electroforesis (Apéndice II, 6.0)

Se usa como control secundario de pureza.

3.3.4 Cloruros (Apéndice II, 8.0)

Se determina para calcular y ajustar la fuerza iónica en cada paso del proceso.

3.4 Preparación Final

Se determina el peso de los precipitados obtenidos, y trabajando en frío, se homogeniza la pasta con solución de glicina 0.3 Mol/litro en proporción (1:1), a esta suspensión se le adiciona agua (4:1) y se agita en frío de 2 a 4 horas. Se deja reposar la mezcla toda la noche y el sobrenadante se decanta y liofiliza para concentrarlo.

3.5 Dilución y Esterilización

La gamma globulina liofilizada se disuelve en una mezcla de agua y glicina 0.3 Mol/litro (1:1), adicionando timerosal a tener 0.01%

y se ajusta el pH a 6.8 con solución amortiguadora de acetatos. La esterilización se lleva a cabo por filtración y se realizan los controles al producto a granel.

4.0 CONTROL AL PRODUCTO TERMINADO A GRANEL

4.1 Esterilidad Bacteriana y Micótica (Apéndice I, 6.1)

4.2 Prueba de Inocuidad (Apéndice I, 8.0)

4.3 Prueba de Pirógenos (Apéndice I, 7.0)

4.4 Prueba de Potencia

El Instituto Nacional de Higiene S.S.A. recomienda lo siguiente: Antes de proceder a la purificación se deben determinar los anticuerpos presentes contra la difteria, viruela y poliomielitis. El producto es aceptable, si después de la purificación y dilución los títulos de anticuerpos aumentaron cuando menos cinco veces con respecto a los iniciales. El Code of Federal Regulations U.S.A. recomienda lo siguiente: La solución de gamma globulina debe contener - no menos de 2 UI de antitoxina diftérica por ml; cuando menos 0.5 veces el nivel de protección de una inmunoglobulina antivariólica de referencia; anticuerpos antipoliomielíticos de los tipos 1 y 2 con un poder de neutralización igual al de la referencia y 2.5 veces -- más en el caso del tipo 3.

4.5 Controles Químicos

4.5.1 pH (Apéndice II, 4.0)

Una solución en cloruro de sodio 0.5 Mol/litro al 1% (p/v) debe tener un pH de 6.4 a 7.2

4.5.2 Sólidos Totales (Apéndice II, 2.0)

No más del 20%

4.5.3 Proteínas Totales (Apéndice II, 11.3)

De 14 a 17%

4.5.4 Timerosal (Apéndice II, 13.0)

No más del 0.01%

4.5.5 Inmunoelectroforesis (Apéndice II, 6.0)

Con suero antihumano polivalente deberán aparecer únicamente las bandas correspondientes a las gamma globulinas.

4.5.6 Cloruros (Apéndice II, 7.0)

No más del 0.5%

5.0 ENVASADO

Se dosifica en frascos ampula según la concentración de gamma globulina que tenga el lote y la presentación requerida. Para asegurar su actividad durante el período de vigencia se adiciona un 20% de exceso.

6.0 CONTROL AL PRODUCTO TERMINADO ENVASADO

6.1 Esterilidad Bacteriana y Micótica (Apéndice I, 6.1)

6.2 Identidad (Apéndice I, 1.3.1)

Esta prueba se realiza por inmunodifusión en placa, empleando suero antihumano polivalente.

6.3 Pirógenos (Apéndice I, 7.0)

6.4 pH (4.5.1)

6.5 Humedad Residual (Liofilizado) (Apéndice II, 1.0)

No más del 2%

6.6 Solubilidad en su disolvente (Liofilizado) (Apéndice II, 3.0)

7.0 ALMACENAMIENTO Y FECHA DE CADUCIDAD

El producto líquido debe mantenerse entre 2 y 10 °C.

El producto liofilizado debe mantenerse a menos de 25 °C.

La fecha de caducidad es de 2 años después de la última prueba de potencia satisfactoria para la presentación líquida y 5 años para la presentación liofilizada.

8.0 ROTULADO

Además de los datos mencionados en el Reglamento General para Laboratorios Productores de Sustancias Biológicas debe indicar lo siguiente:

Gamma globulina humana normal purificada

Concentración de gamma globulina en mg de proteínas por ml

Estabilizador y su concentración

conservador y su concentración

Concentración de cloruro de sodio

Volumen total contenido en el envase

Volumen y naturaleza del disolvente (liofilizado)

Vía de administración: Intramuscular *por vía IV FIBO EL 2*
S OBLIG. RESERVAIONES GOV EL 200

Fecha de caducidad

Consérvese entre 2 y 10 °C (líquido) y a menos de 25 °C (liofilizado)

Las dosis recomendadas se deben especificar según el caso, de preferencia en un instructivo anexo.

9.0 PRESENTACION

Se presenta en frascos ampula con el producto liofilizado o con 1 a 2 ml de producto líquido que contiene 165 ó 330 mg de proteínas por ml.

10.0 INDICACIONES Y CONTRAINDICACIONES

10.1 Indicaciones

La gamma globulina humana se emplea en la profilaxis y terapéutica para conferir inmunidad pasiva temporal en base a los anticuerpos que contiene. Aunque se usa en infecciones muy diversas como sarampión, rubeola, varicela, poliomielitis, hepatitis e infecciones bacterianas, su efectividad solo se ha demostrado en los siguientes casos, en los cuales se recomienda su aplicación por vía intramuscular en las dosis que aquí se indican, aún cuando es siempre preferible utilizar los sueros hiperinmunes cuando se disponga de ellos.

Indicaciones	Dosis (mg/kg)	Observaciones
Sarampión	32	Profilaxis
	32 - 80	Atenuación
	80 - 160	En casos graves
	160 - 320	En encefalitis
Parotiditis	32 - 48	Profilaxis y atenuación en niños
	976 (dosis total)	Jovenes y adultos
	960 (dosis total)	Gestantes
Varicela	32 - 48	Profilaxis
	48 - 80	Atenuación
Rubeola	32 - 48	Profilaxis y atenuación
	5600 - 7200 (dosis total)	Gestantes

Poliomielitis	48 - 80 160	Profilaxis Atenuación
Hipo y agamma globulinemias	160 - 192 96	Dosis inicial Mantenimiento (Una vez al mes)

10.2 Contraindicaciones

Está contraindicado a personas sensibles a las proteínas humanas.

B I B L I O G R A F I A

- Organización Mundial de la Salud, 1969, Series de Informes Técnicos, 19° informe, anexo 2, Ginebra, 47.
- Ministry of Health and Welfare, Minimum Requirement of Biologic Products, 1966, Japón, 141.
- Ministerio de Sanidad, Farmacopea Oficial de la República Italiana, Octava Edición, Vol. II, 1972, Roma, 587.
- Taylor, H.L., F.C. Bloom, K.B. McCall, L.A. Hyndman y H.H. Anderson, The preparation of gamma globuline from placental blood by ethanol fractionation, J. Am. Chem. Soc. 78, 1956, 1356.
- Instituto Nacional de Higiene, Información proporcionada en la Unidad de Hemoderivados, 1979.

- Kirk, C.F. y W.H. Othmer, Enciclopedia de las Ciencias y la Tecnología, 1970, Lea & Febiger Inc., Londres, 146. 152.

1.0 INTRODUCCION

En 1939 Levine y Stetson describieron un anticuerpo presente en el suero de una mujer embarazada cuyo feto murió "in utero" al octavo mes. Después del parto la mujer sufrió una reacción hemolítica - al ser transfundida con la sangre del marido que era compatible en el sistema ABO. Lavine y Stetson sostuvieron que la mujer había - sido sensibilizada durante el embarazo por un antígeno del feto, heredado del padre y que el anticuerpo materno había reaccionado con algún antígeno de los glóbulos rojos del marido, siendo ésta la causa de la reacción transfusional. En 1940 Landsteiner y Wiener encontraron que los sueros de conejos inmunizados con glóbulos rojos de monos rhesus aglutinaban los eritrocitos del 85% de los individuos de raza blanca.

Entonces se pudo establecer la relación entre el anticuerpo descrito por Levine y Stetson y los anticuerpos presentes en el suero de otras pacientes con reacciones post-transfusionales cuyo origen se desconocía, así como con los anticuerpos anti-Rh obtenidos en los conejos inmunizados por Landsteiner y Wiener. En el año siguiente, Levine y sus colaboradores señalaron la importancia clínica de este anticuerpo anti-Rh como causa frecuente de la eritroblastosis fetal. El grupo sanguíneo del feto está determinado por el de los padres, así en el factor Rh: Si la madre es Rh negativa y el padre Rh positivo heterocigoto, hay 50% de probabilidades de que el hijo sea ---

Rh positivo y se pueda llegar a presentar la isoimmunización; si el padre es Rh positivo homocigoto, todos los hijos serán Rh positivos y habrá también riesgo de isoimmunización. El estímulo antigénico ocurre cuando la madre que carece de antígeno D, y ha tenido un embarazo normal, entra en contacto con los eritrocitos del hijo en el momento del parto, o bien cuando hay mezcla de sangres durante la gestación por ejemplo, por un traumatismo.

Una vez que la madre tiene ya anticuerpos frente al factor Rh se presentará en los embarazos posteriores el problema de la destrucción de los eritrocitos, lo que da como resultado partos prematuros o abortos cada vez mas tempranos.

En la eritroblastosis fetal, los isoanticuerpos de la madre que pasan a través de la placenta, ocasionan la producción de eritrocitos inmaduros (eritroblastos) para substituir a los que son destruidos. Como consecuencia de ésto hay deficiencia en la oxigenación, pues los eritroblastos son incapaces de transportar oxígeno y además la hemoglobina liberada se transforma en bilirrubina y afecta al sistema nervioso del feto (kernicterus). El recién nacido presenta anemia, edema grave (que es signo de daño cardíaco), hay hepatomegalia, esplenomegalia y edema pulmonar. Al segundo o tercer día se desarrolla el kernicterus que presenta como síntomas principales letargia, disminución del apetito y pérdida del "reflejo del Moro", la muerte ocurre en el 75% de los casos y si el recién nacido sobrevive -- presenta sordera, retraso mental y parálisis.

Este problema se trata mediante la exsanguineotransfusión con sangre Rh negativa, ésto es con el fin de que los anticuerpos maternos

presentes en la sangre del recién nacido, no destruyan los eritrocitos que se están introduciendo, así como reducir el nivel de bilirrubina. Este tratamiento también se puede practicar al feto aunque es peligroso.

La prevención de la isoimmunización materno-fetal se logra aplicando la gamma globulina anti-D a la madre antes de que transcurran 72 h del primer parto, cuando ya se ha comprobado que el hijo es Rh positivo y repetir este procedimiento en los partos siguientes siempre que el hijo sea Rh positivo. En todos los casos de aborto accidental o provocado; también se deberá aplicar el suero anti-D lo más rápido posible; la gamma globulina anti-D bloquea la capacidad antigénica de los eritrocitos Rh positivos que pasan a la madre y no se produce el estímulo antigénico.

El factor Rh no es el único causante de la isoimmunización materno-fetal aunque sí el más importante; por ejemplo, en el sistema ABO también se presentan incompatibilidades pero en un porcentaje reducido.

2.0 DEFINICION

Inmunoglobulinum humanum anti-D es una solución de anticuerpos purificados obtenidos del plasma de donadores Rh negativos, inmunizados con glóbulos rojos Rh positivos y que contiene anticuerpos anti-D en una proporción de 250 a 300 µg/dosis, además contiene 0.3 Mol/litro de glicina como estabilizador y timerosal al 0.01% como conservador. Se presenta liofilizada.

3.0 OBTENCION DEL SUERO

3.1 Inmunógeno

Los eritrocitos Rh positivos se obtienen de donadores sanos del -- grupo O, sin antecedentes de hepatitis, en los que se investigará - la presencia del Ag_sHB y de anticuerpos frente a éste. Los donadores de eritrocitos no deben pertenecer a los sistemas Kell y Duffy (K y Fy^a) para disminuir la posibilidad de que los donadores de suero anti-D formen anticuerpos frente a estos sistemas. También se excluirán a los individuos que posean antígeno D^u.

Se extrae sangre al donador y se recibe en recipientes estériles con anticoagulante ACD, la sangre se centrifuga en frío, se decanta el sobrenadante y los eritrocitos se lavan 3 ó 4 veces con solución salina isotónica amortiguada estéril, se deben eliminar los glóbulos blancos y las plaquetas mediante centrifugación diferencial. Se - prepara una suspensión al 0.5% con solución salina amortiguada estéril y se mantiene en refrigeración.

3.2 Selección de los Donadores de Suero Anti-D

Las personas elegidas para la inmunización primaria o secundaria -- frente al Rh deben ser varones sanos Rh negativos o mujeres sanas - Rh negativas menopáusicas desde dos años antes como mínimo, o que -- hayan sufrido esterilización quirúrgica. Deben ser individuos que posean antígenos de grupos sanguíneos frecuentes como el K y el Lu^b.

Las cantidades necesarias de plasma anti-D se obtienen de un grupo relativamente reducido de donadores y éstos deben ser informados ampliamente sobre la inmunización, la plasmaféresis y los riesgos que entrañan estos procesos.

3.3 Esquema de Inmunización

3.3.1 Inmunización Primaria

En todos los programas de inmunización primaria con eritrocitos Rh positivos se prevee un 35% de fracasos, debido a que no se dispone de un método para detectar a las personas refractarias al inmúnogeno. Las siguientes son algunas de las dosis que se han probado y los resultados obtenidos; de éstas se eligirá la mas apropiada para el laboratorio productor.

Volumen inyectado por vía intravenosa	% de personas con <u>res</u> puesta positiva a los seis meses.
1 ml en una dosis	15%
40 ml en una dosis	33%
500 ml en una dosis	65%
2 a 4 ml fraccionados en dos dosis	50%

3.3.2 Inmunización Secundaria

En ciertos individuos, el título de anticuerpos alcanza un nivel máximo tras la inmunización primaria y no aumenta después con la inmunización secundaria; en otros casos los títulos de anticuerpos pueden

seguirse elevando durante mas de doce meses mediante la administraci3n de 0.5 a 1.0 ml de la suspensi3n de eritrocitos cada 5 a 8 semanas, posteriormente se administra de 0.1 a 0.5 ml del inmun3geno por v3a intravenosa cada 2 a 3 meses.

3.4 Sangr3a de Prueba

Antes de la cosecha se realiza una sangr3a de prueba para determinar la concentraci3n de inmunoglobulina anti-D en el suero, tambi3n se determina en esa muestra la concentraci3n de hemoglobina, prote3nas s3ricas totales, transaminasa s3rica y la relaci3n alb3mina/globulina; estos valores se comparan con los obtenidos en sangr3as sucesivas para determinar con que frecuencia deber3n hacerse 3stas. En cada donaci3n se realiza la serolog3a de lues y la prueba para detectar la presencia del ant3geno asociado a la hepatitis B.

3.4.1 Determinaci3n de Anticuerpos Anti-D

La concentraci3n de anticuerpos anti-D se determina por el m3todo de Hughes-Jones. Para la prueba se mezclan al3cuotas del suero inmune con diferentes concentraciones de gl3bulos rojos Rh positivos ----- (CCDee), se incuban a 37°C durante 24 h con agitaci3n frecuente.

Las suspensiones se centrifugan a 4°C y los gl3bulos rojos se lavan 3 veces con soluci3n salina isot3nica fr3a. Despu3s se adiciona suero anti-gamma globulina marcado con I_2^{125} y se incubaba a 37°C durante 10 minutos. Las suspensiones se centrifugan, se elimina el

sobrenadante y se determina la radioactividad presente en los eritrocitos.

3.5 Obtención del Plasma

Se podrán realizar extracciones de 500 ml cada 40 días. La sangre se recibe en recipientes estériles con anticoagulante ACD, se centrifuga a 1000 rpm por 5 minutos en frío. El paquete celular se regresa al donador (plasmaféresis) y el sobrenadante se congela y envía al laboratorio para su procesamiento.

Se puede aumentar la frecuencia de los sangrados de acuerdo con los resultados de las pruebas de hemoglobina y proteínas séricas totales. Si la concentración de proteínas séricas del donador desciende a menos de 6 g/100 ml se suspenderán las sangrías por lo menos - dos meses o hasta que presente niveles normales, y si la baja de proteínas séricas prevalece se eliminará definitivamente al donador.

3.6 Purificación de las Gamma Globulinas

Ver: GAMMA GLOBULINA HUMANA NORMAL (3.2)

4.0 CONTROL AL SUERO PURIFICADO A GRANEL

4.1 Esterilidad Bacteriana y Micótica (Apéndice I, 6.1)

4.2 Prueba de Inocuidad (Apéndice I, 8.0)

4.3 Prueba de Pirógenos (Apéndice I , 7.0)

4.4 Contenido de Gamma Globulina Anti-D (3.4.1)

El contenido de gamma globulina anti-D deberá ser de por lo menos el 15% de las proteínas totales del producto.

4.5 Controles Químicos

4.5.1 pH (Apéndice II, 4.0)

Una solución en cloruro de sodio 0.5 Mol/litro al 1% (p/v) debe tener un pH de 6,4 a 7.2.

4.5.2 Sólidos Totales (Apéndice II, 2.0)

No más del 20%

4.5.3 Proteínas Totales (Apéndice II, 11.3)

Se determinan para relacionar el dato con el contenido de gamma globulina anti-D

4.5.4 Timerosal (Apéndice II, 13.0)

No mas del 0.01%

4.5.5 Cloruros (Apéndice II, 7.0)

No más del 0.5 %

4.5.6 Inmunoelectroforesis (Apéndice II, 6.0)

Con suero antihumano polivalente deberán aparecer únicamente las bandas correspondientes a las gamma globulinas.

5.0 ENVASADO

Se dosifica en ampollitas o frascos ampola según la concentración de gamma globulina anti-D del lote para tener 260 a 300 ug de anticuerpos anti-D por dosis. Para asegurar su actividad durante el período de vigencia se debe adicionar un 20% de exceso. El producto se liofiliza y sella al vacío.

6.0 CONTROL AL PRODUCTO TERMINADO ENVASADO

6.1 Esterilidad Bacteriana y Micótica (Apéndice I, 6.1)

6.2 Identidad (Apéndice I, 1.3.1)

Esta prueba se realiza por inmunodifusión en placa empleando suero antihumano polivalente.

6.3 Pirógenos (Apéndice I, 7.0)

6.5 Humedad Residual (Apéndice II, 1.0)

No más del 2%

6.6 Solubilidad en su Disolvente (Apéndice II, 3.0)

7.0 ALMACENAMIENTO Y FECHA DE CADUCIDAD

El producto es estable durante 3 años después de la última prueba de potencia satisfactoria.

Se debe mantener entre 2 y 10°C.

8.0 ROTULADO

Además de los datos especificados en la Reglamentación Vigente para Laboratorios fabricantes de Sustancias Biológicas, debe indicar lo siguiente:

Inmunoglobulina humana anti-D purificada

Concentración de anticuerpos anti-D en ug/dosis

Conservador y su concentración

Concentración de cloruro de sodio

Volumen total contenido en el envase después de rehidratar

Volumen y naturaleza del disolvente

Vía de administración; intramuscular

Dosis recomendada

Fecha de caducidad

Consérvese entre 2 y 10 °C

9.0 PRESENTACION

Frasco ampula con 250 ó 300 ug de gamma globulina anti-D

10.0 INDICACIONES Y CONTRAINDICACIONES

10.1 Indicaciones

Se debe administrar el suero anti-D a todas las mujeres Rh negativas que no estén inmunizadas contra el factor Rh y que den a luz un producto Rh positivo. Se debe administrar el suero anti-D a todas las mujeres Rh negativas no inmunizadas , inmediatamente después de cualquier accidente durante el embarazo que pudiera provocar una hemorragia trasplacentaria, como amniocentesis o hemorragia antepartum. Así como también a las mujeres Rh negativas que hayan abortado o recibido una transfusión equivocada.

La dosis administrada será de 250 a 300 ug de inmunoglobulina anti-D por vía intramuscular antes de que pasen 72 h después del parto.

Quando se sospeche de hemorragia trasplacentaria abundante o se trate de una transfusión equivocada, será necesario aumentar la dosis de acuerdo al criterio del médico.

10.2 Contraindicaciones

La gamma globulina anti-D está contraindicada en mujeres Rh negativas que ya hayan sido inmunizadas al factor Rh debido a un parto anterior, aborto o una transfusión equivocada. Las mujeres D^u no deben ser tratadas con los anticuerpos anti-D, en parte porque una alta proporción de los mismos reaccionará con los eritrocitos D^u, con lo cual quedará una cantidad muy pequeña para reaccionar con los hematíes del feto, y por otro lado, el riesgo de formación de anti-Rh por una mujer D^u es pequeño.

B I B L I O G R A F I A

- Organización Mundial de la Salud, 1969, Series de Informes Técnicos, 19^o informe, anexo 2, Ginebra, 47.
- Organización Mundial de la Salud, 1971, Series de Informes Técnicos, Informe No. 468, Prevención de la sensibilización al factor Rh (Informe de un grupo científico de la O.M.S.), Ginebra, 7.
- Organización Mundial de la Salud, Salud Mundial, 1968, México, 18.
- Roel, R.G., A.S. Martínez y N.S. Alcocer, Evaluación de la efectividad de la gamma globulina anti-D, Ginec. Obstet. Mex. 35, 207, 1974, 67.

- M.L. Moore, El recién Nacido y La Enfermera, 1975, Ed. Interamericana, México, 142.
- Leavella y Thonep, Fundaments of Clinical Hematology, 1960, W.B. Saunders Co., U.S.A., 184.
- Freda, V.J., J.G. Gorman y W Pollack, Rh factor; prevention of isoimmunization and clinical trials on mothers, Science, 151, 18 Feb. 1966, 828.
- Ñ.C. Hughes-Jones, The estimation of the concentration and equilibrium constant of anti-D, Immunology, 1967, 12, 565.
- Diccionario de Especialidades Farmacéuticas, 25^o Ed., 1979, Editorial PLM S.A., 799.

ANTOTIXINA TETANICA

1.0 INTRODUCCION

Ver Toxoide Tetánico.

2.0 DEFINICION

Antitoxinum tetani (equinum) es una solución de anticuerpos específicos purificados, obtenidos del plasma de caballos inmunizados con toxoide y toxina tetánicos. Contiene fenol al 0.5% como conservador.

3.0 PRODUCCION DE LA ANTITOXINA

3.1 Inmunógeno

Se utiliza toxoide tetánico con 60 a 70 Unidades floculantes/ml -- (ULf/ml) y toxina tetánica cuya potencia sea de 10 000 a 20 000 DML para el ratón por cada ml.

3.2 Animales

Se emplean caballos jóvenes y sanos. Que no hayan recibido tratamiento con antibióticos especialmente penicilina y estreptomicina. Estos animales se mantienen en cuarentena para verificar que no padecen ninguna infección y se les realiza la prueba de la maleína -

para comprobar que no padecen muermo, enfermedad que es trasmisible al hombre, esta prueba debe dar resultados negativos. Previa a la selección de los animales se les aplican dos dosis de toxoide tetánico, para ver si responden al antígeno.

3.3 Esquema de Inmunización

Al término de la cuarentena los caballos se comienzan a inyectar con el toxoide y la toxina tetánicos cada tercer día, por vía subcutánea en las tablas del cuello, rasurando y asepticando la zona de inoculación. Al término del esquema de inmunización se deja descansar a los animales durante una semana y se procede a tomar una muestra de sangre por punción de la yugular para determinar la cantidad de antitoxina presente en el suero de cada animal.

ESQUEMA BASICO DE INMUNIZACION Y COSECHA

No. de inóculo	días	dosis por caballo (ml)
1	1	5 ml toxoide + 2.5 ml adyuvante
2	3	10 ml toxoide + 2.5 ml adyuvante
3	5	20 ml toxoide + 2.5 ml adyuvante
4	7	30 ml toxoide + 2.5 ml adyuvante
5	9	40 ml toxoide + 2.5 ml adyuvante
6	11	60 ml toxoide + 2.5 ml adyuvante
7	14	40 ml toxina + 2.5 ml adyuvante
8	16	60 ml toxina + 2.5 ml adyuvante
	23	sangría de prueba
	24	sangría de cosecha y plasmaféresis
	25	sangría de cosecha y plasmaféresis
	26	sangría de cosecha y plasmaféresis

El adyuvante empleado en la inmunización de los caballos es; el adyuvante completo de Freund para la primera dosis y el adyuvante incompleto de Freund para las dosis siguientes. El adyuvante com-

pleto de Freund contiene una mezcla de aceite mineral y lanolina - (85:15) con M. tuberculosis inactivado, en una cantidad que varfa de 1 a 100 mg/ml de mezcla según cada laboratorio, el adyuvante in completo no lleva el bacilo.

Cuando la dosis del inóculo es grande el volumen se reparte en varios sitios de las tablas del cuello del animal.

3.3.1 Título de Anticuerpos (Cálculo de las Ulf) (Apéndice 1, 9.5)

Se preparan diluciones del suero de cada caballo que se hacen reaccionar con 10 Lf de toxoide contenidas en un volumen igual al del suero (se puede emplear también toxina).

dil. del suero	Ulf de toxina o toxoide	título del suero Lf/ml
1:70	10	700
1:80	10	800
1:100	10	1000
1:120	10	1200

Los tubos se incuban a 37°C y aquel en que ocurre primero la floculación indica el título de anticuerpos presentes en el suero del caballo.

Si el título es de por lo menos 800 Ulf/ml se procede a realizar la sangría de cosecha, si el título no es suficientemente alto, se repite parte del esquema de inmunización y el número de inóculo en que se inicie dependerá de que tan bajo sea el título obtenido.

3.4 Sangría de Cosecha

Se hacen tres sangrías, una diaria, en la primera se extraen de 6 a 8 litros, en la segunda 4 litros y en la última 4 litros. La sangre se recoge en un recipiente estéril conteniendo anticoagulante ACD o bien citrato de sodio, agitando continuamente el frasco para evitar que la sangre se coagule. La punción se lleva a cabo en la yugular. Se deja sedimentar el paquete celular y en condiciones de esterilidad se saca el plasma de los frascos que se reúne con los plasmas procedentes de otros caballos y se adiciona fenol al 0.5%. El paquete celular se regresa al animal (plasmaféresis).

Los caballos se dejan descansar durante 45 días y se inicia el esquema de mantenimiento.

ESQUEMA DE MANTENIMIENTO Y COSECHA

No. de inóculo	días	dosis por caballo (ml)
1	1	30 ml toxoide + 2.5 ml adyuvante
2	3	40 ml toxoide + 2.5 ml adyuvante
3	5	60 ml toxoide + 2.5 ml adyuvante
4	8	40 ml toxina + 2.5 ml adyuvante
5	10	60 ml toxina + 2.5 ml adyuvante
	17	sangría de prueba
	18	sangría de cosecha y plasmaféresis
	19	sangría de cosecha y plasmaféresis
	20	sangría de cosecha y plasmaféresis

El adyuvante empleado es; el adyuvante incompleto de Freund en todas las dosis.

Se deja descansar al caballo 6 semanas y se repite el esquema de mantenimiento. ✓

Se continúa durante varios años, hasta que decrece el título de anticuerpos o el animal enferma por las sangrías constantes; es frecuente que presenten degeneración amiloidea del hígado.

3.5 Purificación y Concentración del Plasma

Se puede realizar por el método de precipitación con etanol de Cohn, por precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ o bien por el método que combina la digestión con pepsina y la precipitación con sulfato. El plasma debe ser almacenado por lo menos 4 meses a 5°C y para evitar el desarrollo bacteriano se le adiciona 0.5% de fenol. Al término de este período se filtra por gasa y se diluye con dos volúmenes de agua destilada, se ajusta el pH a 3.6 con HCl 1:10, se adiciona pepsina (de actividad 1:10 000) a tener una concentración de la enzima del 0.1%. La pepsina se disuelve en agua antes de adicionarla. El pH se ajusta a 3.2 con HCl 1:10, la temperatura de la mezcla se ajusta de 20 a 23°C y se mantiene durante 1 h verificando que el pH esté constantemente a 3.2.

El pH se ajusta a 4.2 con NaOH 1.0 N y se agregan cristales de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a tener una concentración final del 14%. Se adiciona tolueno hasta una concentración de 0.3% en relación al volumen original del plasma antes de la dilución. La temperatura de la mezcla se ajusta de 54 a 56°C y se mantiene así por 1 h. Se enfría aproximadamente a 20°C . La mezcla se pasa a través de un filtro prensa empacado con lona gruesa y el precipitado se desecha.

Se ajusta el pH del filtrado a 6.8 con NaOH 1.0 N y se adiciona el 22% de sulfato de amonio, para tener así una concentración final del 36%, se deja reposar la mezcla 2 h a temperatura ambiente y se pasa a través de un filtro prensa, el precipitado se deja hasta el día siguiente y se le pasa aire durante 1 h para tenerlo lo mas se

co posible. Se recoge el precipitado que se coloca en bolsas de -
diálisis y se dializa durante 24 h con agua corriente refrigerada,
se reúne el material dializado y se adiciona fenol disuelto en eter
hasta tener una concentración final del 0.3% (o timerosal si el pro
ducto se va a liofilizar hasta tener una concentración final del --
0.005%) y se pasa por un filtro esterilizante para eliminar las par
tículas sólidas que pueda contener. El plasma purificado se sepa
ra en porciones de 500 ml y se dializa nuevamente durante 48 h has
ta que la reacción de identificación de sulfatos sea negativa.
Los dializados se reúnen y se toman muestras para el control inter
medio.

4.0 CONTROL AL PRODUCTO INTERMEDIO

4.1 Conservadores

Fenol (Apéndice II, 9.0) No hay límite establecido

Timerosal (Apéndice II, 13.0) en producto que se va a liofilizar,
no hay límite establecido.

4.2 Pirógenos (Apéndice I, 7.0)

Si la prueba no es satisfactoria se puede intentar la eliminación
de los pirógenos por filtración en material especial y se repite -
la prueba. Si el resultado es satisfactorio se continúan las prue
bas de control.

4.3 Sólidos Totales (Apéndice 11, 2.0)

No más de 20%

4.4 Potencia en ULf (Apéndice 1, 9.5)

Se preparan diluciones del suero purificado que se hacen reaccionar con 10 ULf de toxoide o toxina tetánicos (estándar) contenidos en un volumen igual al del suero. Los tubos se incuban a 37°C y aquel en que ocurre primero la floculación indica el título de anticuerpos presentes en el suero purificado.

4.5 Potencia en UI (Apéndice 1, 9.4)

Como la cantidad de UI que se espera encontrar en el plasma purificado es de más de 1 000, las diluciones que se prueban son: 1:8 000, 1:9 000, 1:10 000, 1:11 000, 1:12 000 etc. Estas diluciones se prueban contra 1 DL+.

5.0 ESTERILIZACION

Se ajusta la concentración de fenol a 0.5% (o de timerosal a 0.01%), se adiciona NaCl a tener el 0.5% para que la solución sea isotónica, se ajusta el pH entre 7.2 a 7.4 con Na_2CO_3 al 16% y se repiten las pruebas de sólidos totales y de contenido de conservadores, si son satisfactorias se esteriliza por filtración.

6.0 CONTROL AL PRODUCTO TERMINADO A GRANEL

6.1 Esterilidad Bacteriana y Micótica (Apéndice I, 6.1)

6.2 Prueba de Inocuidad (Apéndice I, 8.0)

6.3 Prueba de Pirógenos (Apéndice I, 7.0)

6.4 Prueba de Potencia (4.5)

6.5 Controles Químicos

6.5.1 pH (Apéndice II, 4.0)

De 7.2 a 7.4

6.5.2 Sólidos Totales (Apéndice II, 2.0)

No más de 20%

6.5.3 Proteínas Totales (Apéndice II, 11.3)

El límite debe ser de 50 mg por cada 300 UI por lo menos y no mayor de 200 mg/ml.

6.5.4 Sulfatos (Apéndice II, 12.0)

No más de 0.1% ✓

6.5.5 Cloruro de Sodio (Apéndice II, 8.0)

No más de 0.5% de cloruro de sodio (0.3% de cloruros).

6.5.6 Conservadores

Fenol (Algunos laboratorios emplean cresol en concentración de 0.3% en lugar de fenol) (Apéndice II, 9.0). No más de 0.5%
Timerosal (Apéndice II, 13.0). No más de 0.01% si el producto se va a liofilizar.

6.5.7 Inmunoelectroforesis (Apéndice II, 6.0)

No deberán aparecer bandas de inmunoprecipitado correspondientes a otras proteína plasmáticas diferentes de la IgG.

7.0 ENVASADO

Se dosifica en ampollitas o en frascos ampulla según la concentración que tiene el lote y la presentación que se requiera, para asegurar su actividad durante el período de vigencia debe adicionarse un 20% de exceso a la presentación indicada.

8.0 CONTROL AL PRODUCTO TERMINADO ENVASADO

8.1 Esterilidad Bacteriana y Micótica (Apéndice I, 6.1)

8.2 Identidad (Apéndice I, 9.5)

8.3 Humedad Residual (Apéndice II, 1.0) (Producto liofilizado)

No mayor del 1%

8.4 Solubilidad en su disolvente (Apéndice II, 2.0) (Producto liofilizado)

8.5 Potencia (4.5)

Debe corresponder a la indicada en el marbete.

9.0 ALMACENAMIENTO Y FECHA DE CADUCIDAD

El producto envasado líquido es estable durante 2 años si se conserva entre 2 y 10°C. Liofilizado se prolonga su periodo de actividad a 5 años si se conserva a menos de 10°C

10.0 ROTULADO

Además de los datos especificados en la Reglamentación Vigente para Laboratorios Productores de Biológicos, debe indicar lo siguiente

te: /

Antitoxina tetánica

Especie en la que se obtuvo (equina)

Concentración de antitoxina en UI/frasco

Conservador y su concentración

Concentración de cloruro de sodio

Volumen contenido en el envase (en producto liofilizado, después -
de rehidratar).

Volumen y naturaleza del disolvente (producto liofilizado)

Dosis recomendada

Vía de administración: Intravenosa o intramuscular

Fecha de caducidad

Consérvese entre 2 y 10 °C

El instructivo debe especificar que antes de proceder a la aplica-
ción de este producto, deberá practicarse la prueba para inves-
tigar hipersensibilidad a las proteínas equinas, así como las -
instrucciones para la desensibilización.

11.0 PRESENTACION

Se dosifica en frascos ampula cuyo contenido total es:

Para prevención: 2 000 UI y 5 000 UI

Para tratamiento: 10 000 UI y 20 000 UI

12.0 INDICACIONES, CONTRAINDICACIONES Y EFECTOS SECUNDARIOS

12.1 Indicaciones

Prevención del tétanos en personas que han sufrido un accidente potencialmente tetanígeno y que se encuentran en cualquiera de los siguientes casos:

- Nunca han sido vacunados con el toxoide tetánico.
- Estan en proceso de vacunación y todavía no han completado el esquema de inmunización primaria.
- No han continuado con la aplicación de los refuerzos cada 5 ó 10 años con toxoide tetánico para mantener un título alto de antitoxina en su organismo.

La dosis preventiva varfa entre 2 000 y 5 000 UI y se debe aplicar inmediatamente después del accidente.

La dosis terapéutica varfa según el grado de intoxicación que presente el paciente pudiendo ser de 50 000 UI o más. La vía de administración puede ser intramuscular, intravenosa, intrarraquídea y por infiltraciones en la zona de la herida.

En todos los casos, antes de proceder a su aplicación se debe realizar una prueba para verificar que el paciente no está hipersensibilizado a las proteínas equinas. Para realizar esta prueba el suero se diluye 1:10 y se inyectan 0.1 ml por vía intradérmica en la cara interna del antebrazo. Se espera 30 minutos y si durante este tiempo aparece un eritema irregular en el sitio de la inyección, se considera que el paciente es hipersensible por lo que deberá aplicarsele una antitoxina tetánica obtenida en otra especie, por ejemplo de origen humano. En caso de no disponer de este pro

ducto se procederá a la desensibilización inyectando 0.2 ml del suero diluido 1:10 aplicando al mismo tiempo un antihistamínico y a los 20 minutos, aplicar una dosis mayor del suero diluido. Se continúan incrementando las dosis cada 20 minutos, si el paciente no presenta caída de la presión arterial que es el primer síntoma de la reacción antígeno-anticuerpo, hasta aplicar todo el volumen indicado.

12.2 Contraindicaciones

Pacientes sensibilizados a las proteínas de origen equino. En este caso se debe administrar la gamma globulina de origen humano.

12.3 Efectos Secundarios

De los 8 a los 12 días después de la aplicación del suero puede aparecer una reacción caracterizada por la presencia de placas urticáricas, dolores en las articulaciones y febrícula. Este cuadro se conoce con el nombre de *Enfermedad del suero* y se debe a una reacción entre los anticuerpos que ha formado el paciente frente a la proteína equina en esos 8 a 10 días y el suero equino que todavía está presente en su organismo. Esta reacción cede con la aplicación de antihistamínicos pero el paciente está sensibilizado al suero equino y en aplicaciones posteriores tendrá mayores complicaciones.

B I B L I O G R A F I A

- Organización Mundial de la Salud, 1969, Serie de informes técnicos, 21^o Informe, anexo 2, Ginebra, 54.
- Humprey, J.H. y R.C. White, Immunology for Students of Medicine, 1964, 2nd Ed. F.A. Davis Co., Philadelphia, 267.
- Larralde, C., H. Barbosa, O. Robinson, J.L. Molinari y R. del Arco, Optimización de la producción de antitoxina tetánica equina por medio del adyuvante completo de Freund y de la frecuencia de inmunización, 1974, Rev. Inv. Salud Pública, 34, - México, 125.

1.0 INTRODUCCION

En nuestro país hay varias especies de alacranes ponzoñosos principalmente de género Centruroides.

La acción del veneno es esencialmente neurotópica y depende de la talla de la persona y de la cantidad de ponzoña inoculada por el a lacrán, la picadura produce hiperestesia e intenso dolor local, sen sación de hormigueo y adormecimiento de las regiones vecinas, después cosquilleo en la mucosa nasal, dificultad al deglutir y sen sación de "madeja de cabellos" en la garganta; nerviosismo, psialorrea viscosa, hipersecreción nasal, lacrimal y bronquial, así como sudoración profusa. Mas tarde sobrevienen vómitos frecuentes y meteorismo acentuado, disnea con sensación de asfixia por contracción espasmódica de los músculos broncofaríngeos, dificultad en la ventilación pulmonar que ocasiona cianosis, convulsiones tónicas y clónicas de los músculos voluntarios que producen contorsiones en todo el cuerpo, llegando a la tetanización; se presenta micción y defecación involuntarias y erección peneal. La cara refleja intenso sufrimiento, se observa miosis o midriasis, movimiento frecuente del globo ocular, fotofobia, alteración del músculo de la acomodación y ceguera temporal. La temperatura asciende a 40 y 41°C, con pulso de 130. Inicialmente aumenta la presión arterial para luego descender abajo de la normal; la muerte sobreviene por paro respiratorio.

2.0 DEFINICION

Serum anti scorpium (equinum) es una solución de anticuerpos específicos purificados, obtenidos del plasma de caballos inmunizados con las ponzoñas de distintas especies de alacranes del género Centruroides. Contiene un conservador y se presenta líquido o liofilizado.

3.0 PRODUCCION DEL SUERO

3.1 Inmunógeno

Se utiliza la ponzoña obtenida de los télsones de las especies de alacranes más frecuentes en nuestro país, en la siguiente proporción:

50% Centruroides suffusus suffusus Pocock (Durango)

30% Centruroides noxious Hoffman (Nayarit)

10% Centruroides limpidus limpidus Karsch (Guerrero)

10% Centruroides limpidus tecomanus (Colima)

Los télsones se pueden conservar en refrigeración después de haberlos secado, en recipientes herméticos.

Para la extracción de la ponzoña se colocan los télsones en un tamiz y se lavan con abundante agua de la llave, después de dejarnos unos minutos con solución de fenol al 5% y se lavan con agua destilada estéril para eliminar los restos de fenol. Se pasan a un homogenizador en proporción de 60 glándulas por cada 0.25 ml de solu

ción salina y se tritura durante unos minutos. La suspensión se centrifuga a 3 000 rpm durante 15 minutos, el sobrenadante se recolecta y el sedimento se suspende en el mismo volumen de solución salina, se centrifuga y se decanta el sobrenadante; esta operación se realiza cuatro veces para extraer la mayor cantidad posible de ponzoña. Finalmente los sobrenadantes se reúnen y se adiciona un volumen igual de glicerina y timerosal a tener la concentración del 0.03%.

50 : 200 (4)
20 : 100 (5)
100 : 125 (1.25)
10 : 12.5 (125)

3.1.1 Titulación del Veneno (DL₅₀) (Apéndice 1, 4.2)

De cada lote de ponzoña se hacen diluciones seriadas usando 1.25 como factor de dilución. Se inyectan 0.5 ml de cada dilución en la vena caudal de un lote de ratones de 18 a 20 g de peso que se mantienen en observación durante 24 h, anotando el número de muertes y sobrevivientes, con los datos obtenidos se calcula la DL₅₀ por el método de Reed y Muench.

3.2 Animales

Ver ANTITOXINA TETANICA (3.2)

Como la ponzoña puede estar contaminada con esporas de Clostridium tetani los caballos que se emplean para la obtención del suero antialacrán deben estar vacunados con toxoide tetánico.

3.3 Esquema de Inmunización

Al término de la cuarentena los caballos se comienzan a inyectar con la ponzoña en las tablas del cuello y el lomo, rasurando y aseptizando la zona de inoculación. Al término del esquema se deja descansar a los animales durante 10 días y se procede a tomar una muestra de sangre por punción de la yugular para determinar la cantidad de antitoxina presente en el suero de cada animal

ESQUEMA BASICO DE INMUNIZACION Y COSECHA

No. de inóculo	días	dosis por caballo (ml)	vía
1	1	60 DL ₅₀ (5 ml) + 5 ml adyuvante	intramuscular - fraccionada
2	9	60 DL ₅₀ (5 ml) + 5 ml adyuvante	" "
3	16	40 DL ₅₀ (18 ml)	alrededor de - las induraciones formadas por las primeras inoculaciones, en 3 dosis de 6 ml cada una a intervalos de 2 h.
4	18	40 DL ₅₀ (18 ml)	" "
5	20	40 DL ₅₀ (18 ml)	" "
	30	Sangría de prueba	
	31	Sangría de cosecha y plasmaféresis	
	32	Sangría de cosecha y plasmaféresis	
	33	Sangría de cosecha y plasmaféresis	

El adyuvante empleado es el adyuvante completo de Freund en la primera dosis y el incompleto en la segunda dosis.

3.3.1 Título de Anticuerpos (Prueba de Neutralización) (Apéndice 1,9.4)

Se hacen diluciones seriadas usando 1.25 como factor de dilución, de los sueros obtenidos en la sangría de prueba, se mezclan estas diluciones con la cantidad suficiente de ponzoña de Centruroides suffusus

Se lleva a cabo como se describe en (3.3.1) y el título de anticuerpos no debe ser inferior al poder de neutralización de 150 DL50 por dosis de 5 ml.

5 ml de suero anti-inflamación neutralización 150 DL50

4.5 Controles Químicos

4.5.1 pH (Apéndice II, 4.0)

De 7.2 a 7.4 EN PREPARACION, COMO EN GRANUL

4.5.2 Sólidos Totales (Apéndice II, 2.0)

No más del 20%

4.5.3 Contenido de Proteínas (Apéndice II, 11.3)

No mayor de 200 mg/ ml

4.5.4 Sulfatos (Apéndice II, 12.0)

No más del 0.1%

4.5.5 Concentración de Cloruro de Sodio (Apéndice II, 8.0)

No más de 0.5%

3	5	60 DL ₅₀ (18 ml)	Intramuscular fraccionada
4	7	60 DL ₅₀ (18 ml)	Intramuscular fraccionada
	17	Sangría de prueba	
	18	Sangría de cosecha y plasmaféresis	
	19	Sangría de cosecha y plasmaféresis	
	20	Sangría de cosecha y plasmaféresis	

Se deja descansar al caballo 20 días y se reinicia el esquema de mantenimiento.

Después de la aplicación de 5 ó 6 esquemas de mantenimiento, se deja descansar a los animales durante 2 meses y se reinicia el esquema de mantenimiento.

Se continúa durante varios años, hasta que decrece el título de anticuerpos o el animal enferma por las sangrías constantes; es frecuente que se presente degeneración amiloidea del hígado.

3.5 Purificación y Concentración del Plasma

VER ANTITOXINA TETANICA (3.5)

4.0 CONTROL AL PRODUCTO TERMINADO A GRANEL

4.1 Esterilidad Bacteriana y Micótica (Apéndice I, 6.1)

4.2 Inocuidad (Apéndice I, 8.0)

4.3 Pirógenos (Apéndice I, 7.0)

4.4 Prueba de Potencia

suffusus Pocock a tener un mínimo de 3 DL₅₀ en 0.5 ml de la mezcla. Estas mezclas se dejan 1h a temperatura ambiente y se inyectan 0.5 ml en la vena caudal a ratones de 18 a 20 g de peso, se utilizan 10 ratones por dilución. Se observan durante 24 h. El cálculo de la cantidad de DL₅₀ neutralizadas por el suero se efectúa por el método de Reed-Muench.

Al llegar al título máximo de anticuerpos; cuando 1 ml neutraliza por lo menos 12 DL₅₀ se procede a la sangría de cosecha.

3.4 Sangría de Cosecha

Se hacen tres sangrías, una diaria, en la primera se extraen de 6 a 8 litros, en la segunda 4 litros y en la última 4 litros. La sangre se recoge en un recipiente estéril conteniendo anticoagulante ACD o bien citrato de sodio, agitando continuamente el frasco para evitar que la sangre se coagule. La punción se lleva a cabo en la yugular. Se deja sedimentar el paquete celular y en condiciones de esterilidad se saca el plasma de los frascos que se reúne con los plasmas procedentes de otros caballos y se adiciona fenol al 0.5%. El paquete celular se regresa al animal (plasmaféresis). Los caballos se dejan descansar durante 20 días y se inicia el esquema de mantenimiento.

ESQUEMA DE MANTENIMIENTO Y COSECHA

No. de inóculo	días	dosis por caballo	Vía
1	1	60 DL ₅₀ (18 ml)	Intramuscular fraccionada
2	3	60 DL ₅₀ (18 ml)	Intramuscular fraccionada

4.5.6 Conservadores

Fenol o cresol 0.5 y 0.3% respectivamente (Apéndice II, 9.0)

Timerosal al 0.01% cuando el producto se va a liofilizar (Apéndice II, 13.0)

4.5.7 Inmunoelectroforesis (Apéndice II, 6.0)

No deberán aparecer bandas de inmunoprecipitado correspondientes a proteínas plasmáticas diferentes a las gamma globulinas.

5.0 ENVASADO

Se dosifica en ampolletas o frascos ampula según la concentración de anticuerpos que tenga el lote.

Para asegurar la actividad durante el período de vigencia debe adicionarse un 20% de exceso de la presentación indicada.

6.0 CONTROL AL PRODUCTO TERMINADO ENVASADO

6.1 Esterilidad Bacteriana y Micótica (Apéndice I, 6.1)

6.2 Identidad (Apéndice I, 1.3.1)

6.3 Humedad Residual (Si es liofilizado) (Apéndice II, 1.0)

No más del 1%

6.4 Solubilidad en su Disolvente (Si es liofilizado) (Apéndice II, 3.0)

7.0 ALMACENAMIENTO Y FECHA DE CADUCIDAD

El producto envasado líquido es estable durante 2 años si se conserva entre 2 y 10°C.

Liofilizado prolonga su período de actividad a 5 años si se conserva a menos de 10°C.

8.0 ROTULADO

Además de los datos especificados en la Reglamentación Vigente para Laboratorios Fabricantes de Sustancias Biológicas, debe indicar lo siguiente:

Suero antialacrán polivalente

Especies de que se obtuvo

Concentración de anticuerpos expresadas en DML para el cu neutralizadas por el suero

Conservador y su concentración

Concentración de cloruro de sodio

Volumen total contenido en el envase

Naturaleza y volumen del disolvente (producto liofilizado)

Dosis recomendada

Vía de administración intravenosa o intramuscular

Fecha de caducidad

Consérvese entre 2 y 10°C

El instructivo debe especificar que antes de proceder a la aplicación de este producto, deberá practicarse la prueba para inves

(10)

tigar hipersensibilidad a las proteínas equinas, así como las instrucciones para la desensibilización.

9.0 PRESENTACION

Se dosifica en frascos ampula en volúmenes de acuerdo con el título de anticuerpos para que equivalga al poder de neutralización de 75 DLM para el cuyo . Este valor se obtiene multiplicando el número de DL_{50} neutralizadas para el ratón por el factor 0.3638 (este factor se determinó experimentalmente).

10.0 INDICACIONES, EFECTOS SECUNDARIOS Y PRECAUCIONES

10.1 Indicaciones

Para el tratamiento de la intoxicación producida por picadura de a lacrán Centruroides. La dosis terapéutica varía según el grado de intoxicación que presente el paciente. En los niños las dosis deben ser mayores que en los adultos, ya que por su talla pequeña la acción de la ponzoña es mas enérgica.

10.2 Efectos Secundarios

De 8 a 12 días después de la aplicación del suero puede aparecer una reacción sérica caracterizada por la aparición de placas urticáricas, dolores en las articulaciones y febrícula, este cuadro se

(11)

conoce con el nombre de "enfermedad del suero", y se debe a una reacción entre los anticuerpos que ha formado el paciente frente a la proteína equina en esos 8 a 10 días y el suero equino que todavía está presente en el organismo. Esta reacción cede con la aplicación de antihistamínicos pero el paciente está sensibilizado al suero equino y en aplicaciones posteriores tendrá mayores complicaciones.

10.3 Precauciones

No es recomendable la administración de analgésicos derivados del opio así como la ingestión de bebidas alcohólicas, ya que se ha comprobado que presentan una acción sinérgica con la ponzoña. Es conveniente rodear con hielo el miembro afectado con objeto de provocar una vasoconstricción que retarde la difusión de la ponzoña.

B I B L I O G R A F I A

- Organización Mundial de la Salud, 1969, Series de informes técnicos, 21^o informe, Anexo 2, Ginebra, 54.

- Cámara Nacional de la Industria de Laboratorios Químico-Farmacéuticos, Fármacos 1973, 1973, Ed. Muñoz, México D.F., 14.

- Monroy-Velasco, J. y J.M. Monroy-Nieto, Alacranes venenosos de México, Recopilación 1960-1961, Rev. Mex. Ciencias Med.

- Oropeza, R.M., G. Garcia-Perez y Calderón Manes, 1972, Un nuevo método para la obtención de suero antialacrán, México, Rev. Inv. Salud Pública, 32; 163.

- Stahnke, H.L., Some pharmacological and biochemical characteristics of Centruroides sculpturatus Ewing scorpion venom, -- 1963, Poisonous Animals Research Laboratory, Arizona State University U.S.A., 63.

SUERO ANTIVIPERINO

1.0 INTRODUCCION

En nuestro país las serpientes venenosas están ampliamente distribuidas en todo el territorio. Los géneros más comunes son el *Bothrops*, *Crotalus* y *Micrurus*.

La serpiente del género *Bothrops* más común es *Bothrops asper* que se localiza en la vertiente del Golfo de México desde el sur de Tamaulipas hasta Quintana Roo y en Chiapas.

El veneno de las serpientes del género *Bothrops* produce una intensa reacción local, tiene acción necrótica y anticoagulante.

En la zona de la mordedura se produce un dolor intenso seguido de la aparición de edema que se extiende con rapidez, se presentan zonas de equimosis en toda la extremidad afectada. Varias horas -- después aparecen flictenas hemáticas que se rompen formando úlceras, posteriormente se desarrollan extensas zonas de necrosis que en ocasiones hace necesaria la fasciotomía o aún la amputación.

Al entrar el veneno a la circulación, actúa sobre el fibrinógeno - produciendo microcoágulos que impiden la formación de coágulos mayores, ésto ocasiona que los orificios dejados por los colmillos - de la serpiente sangren profusamente, además por la acción proteolítica del veneno se produce fibrinolisis y en casos severos ocurren hemorragias en diferentes órganos e incluso en sistema nervioso que llegan a ocasionar la muerte. El paciente presenta sudación intensa, náuseas, taquicardia y lipotimia, el hematocrito es-

tá bajo y el tiempo de coagulación aumentado de acuerdo a la severidad del envenenamiento.

Las serpientes del género *Crotalus* son conocidas como "cascabel" - debido a los anillos córneos articulados que poseen en la cola y - que emiten un sonido característico al vibrar rápidamente.

Estas serpientes son bastante agresivas y entre las más comunes están: *C. basiliscus basiliscus*, *C. atrox*, *C. scutulatus scutulatus*, *C. molossus*, *C. triseratus triseratus*, *C. durissus*, *C. ruber ruber*, que se encuentran distribuidas en toda la República Mexicana. Los principales efectos del veneno de las serpientes del género -- *Crotalus* son neurotóxicos y hemolíticos mientras que la reacción - local es muy escasa.

En la zona de la mordedura es frecuente encontrar un ligero edema poco doloroso acompañado por enrojecimiento y calor, éstos desaparecen rápidamente dejando una sensación de adormecimiento en la zona.

A nivel sistémico el veneno posee una poderosa acción neurotóxica debido a que altera un proceso enzimático a nivel de la placa terminal provocando astenia rápida y progresiva, posteriormente se -- presenta la parálisis flácida. Esta es mas notoria en los músculos cervicales (cabeza caída), párpados, músculos oculares, lengua y en los músculos de las extremidades.

Se presenta hemólisis masiva con daños y necrosis en los túbulos - que puede originar una insuficiencia renal aguda que es de aparición tardía.

La muerte ocurre por paro respiratorio debido a la parálisis de los

músculos intercostales.

2.0 DEFINICION

Antivenenum Crotalus basiliscus basiliscus, Bothrops asper (equinum), es una solución de anticuerpos específicos purificados, obtenidos del plasma de caballos inmunizados con el veneno de estas -- serpientes. Contiene timerosal al 0.01% como conservador cuando se presenta liofilizado, o cresol al 0.3% cuando se presenta líquido.

3.0 PRODUCCION DEL SUERO

3.1 Inmunógeno

Se utiliza el veneno de víboras de los géneros Crotalus y Bothrops antes mencionadas mantenidas en cautiverio.

La cosecha del veneno se realiza cada mes, para ello se sujeta cuidadosamente al animal por la cabeza y se le fuerza a morder una -- membrana delgada de plástico colocada sobre una copa de ensayo, así el veneno escurre dentro del recipiente.

El producto recolectado se centrifuga, se liofiliza y puede conservarse durante años sin alteración. Para su empleo se disuelve en solución salina isotónica a tener 2 mg de veneno por ml, se adiciona timerosal a una concentración final del 0.03% y 10% de glicerina almacenándose en refrigeración.

3.1.1 Titulación del Veneno (Apéndice 1, 4.2)

De cada lote de veneno se hacen diluciones seriadas en incrementos de 1.25 y se inyectan 0.5 ml de cada dilución a lotes de ratones - de 18 a 22 g de peso por vía intravenosa, se mantienen en observación durante 24 h anotando el número de muertes y sobrevivientes - en cada dilución, con los datos así obtenidos se calcula la DL₅₀ - por el método de Reed y Muench.

3.2 Animales

Ver: ANTITOXINA TETANICA (3.2)

3.3 Esquema de Inmunización

Al término de la cuarentena los caballos se comienzan a inyectar - por vía subcutánea en las tablas de cuello y lomo, rasurando y aseptizando la zona de inoculación.

ESQUEMA BASICO DE INMUNIZACION Y COSECHA

No. de i- nóculo	Días	Dosis por caballo (DL ₅₀)	Adyuvante	Vol. final
1	1	50 (<u>C.bassiliscus</u>)	+ 2 ml Freund completo	20 ml
2	8	50 (<u>C.bassiliscus</u>)	+ 2 ml Freund incompleto	20 ml
3	15	40 (<u>C.bassiliscus</u>)	+ Alginato de sodio al 2% (Vol.equiv. al del veneno) y 9 ml CaCl ₂ al 4%	20 ml
4	18	40 (<u>C.bassiliscus</u>)	+ " " "	20 ml

5	21	40 (<u>C.basiliscus</u>)	+	"	"	20 ml
6	24	40 (<u>C.basiliscus</u>)	+	"	"	20 ml
		50 (<u>B.asper</u>)				
		0.5 ml de veneno poli- valente (1)				
7	27	40 (<u>C.basiliscus</u>)	+	"	"	20 ml
		50 (<u>B.asper</u>)				
		0.5 ml de veneno poli- valente (1)				
	34	Sangría de prueba				
	35	Sangría de cosecha y plasmaféresis				
	36	Sangría de cosecha y plasmaféresis				
	37	Sangría de cosecha y plasmaféresis				

(1): El veneno polivalente es una mezcla de los venenos de distintos géneros y especies del país.

3.4 Sangría de Prueba (Apéndice I, 9.7)

Se obtienen muestras de sangre y una vez separado el suero se determina el título de anticuerpos con la prueba de protección al ratón como se describe a continuación:

Titulación del veneno Cálculo de la DL₅₀

Dil. del veneno (p/v)	No. de ratones	S		M		Tot. Acumulados		% muertes
		S	M	S	M			
1:9000	8	0	8	0	17	17	17/17= 100	
1:13500	8	1	7	1	9	10	9/10= 90	
1:20250	8	6	2	7	2	9	2/9 = 22	

Cálculos:

$$\frac{90 - 50}{90 - 22} \times \log 1.5 = \log \text{ del factor del } 50\%$$

$$0.588 \times 0.1761 = 0.1035$$

$$\log DL_{50} = \log 13500 + 0.1035$$

$$\log DL_{50} = 4.2338$$

$$DL_{50} = 17132$$

La DL₅₀ del veneno está contenida en la dilución 1:17132 que equivale a : 1:17132 = 0.0000583 g/ml

Como se administraron 0,5 ml:

$$0.0000583 \times 0,5 = 0.0000291 \text{ g}$$

Titulación del suero Cálculo de la DE₅₀

Dil. del suero	No. de ratones			Tot. acumulados		% muertes	
		S	M	S	M		
1:10	8	7	1	11	1	12	1/12 = 8
1:20	8	4	4	4	5	9	5/9 = 55
1:40	8	0	8	0	13	13	13/13 = 100

Se aplicaron 0,5 ml de una mezcla a partes iguales de cada dilución con la ponzoña diluida 1:1500 a cada ratón.

Cálculos:

$$\begin{aligned} \frac{50 - 8}{55 - 8} \times \log 2 &= \log \text{ del factor del } 50\% \\ 0,8936 \times 0,3010 &= 0,2690 \\ \log DE_{50} &= \log 10 + 0,2690 \\ \log DE_{50} &= 1,2690 \\ DE_{50} &= 18,578 \end{aligned}$$

La DE₅₀ está contenida en 0,25 ml del suero diluido 1:18,578 por lo que 1 ml de suero contiene 74,3 DE₅₀.

Se considera la inmunización satisfactoria si cada ml del suero de caballo es capaz de neutralizar 12 DL₅₀ del veneno.

3.5 Sangría de Cosecha

Se hacen tres sangrías, una diaria, en la primera se extraen de -- 6 a 8 litros, en la segunda 4 litros y en la última 4 litros. La sangre se recoge en un recipiente estéril conteniendo anticoagulante ACD o bien citrato de sodio, agitando continuamente el frasco para evitar que la sangre se coagule. La punción se lleva a cabo en la yugular. Se deja sedimentar el paquete celular y en condi-

ciones de esterilidad se decanta el plasma de los frascos que se re_úne con los plasmas procedentes de otros caballos y se adiciona fe_nol al 0.5%. El paquete celular se vuelve a inocular al animal - (plasmaféresis). Los caballos se dejan descansar durante 6 semanas y se inicia el esquema de mantenimiento.

ESQUEMA DE MANTENIMIENTO Y COSECHA

No.de i- noculo	Días	Dosis por caballo (DL ₅₀)	Adyuvante	Vol. final
1	1	100 (<u>C.basiliscus</u>) 500 (<u>B.asper</u>) 0.5 ml veneno poliva_ lente (l)	+ Alginato de sodio al 2% (Vol.equiv. al del veneno) y 9 ml CaCl ₂ al 4%	20 ml
2	3	100 (<u>C.basiliscus</u>) 500 (<u>B.asper</u>) 0.5 ml veneno poliva_ lente (l)	+ " "	20 ml
3	5	200 (<u>C.basiliscus</u>) 500 (<u>B.asper</u>) 0.5 ml veneno poliva_ lente (l)	+ " "	20 ml
4	8	250 (<u>C.basiliscus</u>) 500 (<u>B.asper</u>) 0.5 ml veneno poliva_ lente (l)	+ " "	20 ml
5	11	300 (<u>C.basiliscus</u>) 500 (<u>B.asper</u>) 0.5 ml veneno poliva_ lente (l)	+ " "	20 ml
	18	Sangría de prueba		
	19	Sangría de cosecha y plasmaféresis		
	20	Sangría de Cosecha y plasmaféresis		
	21	Sangría de cosecha y plasmaféresis		

Se deja descansar al caballo durante 6 semanas y se reinicia el es_quema de mantenimiento.

Se continúa durante varios años, hasta que el título de anticuerpos decrece o el animal enferma por las sangrías constantes, es frecuen_te la degeneración amiloidea del hígado.

3.6 Purificación y Concentración del I

Ver: ANTITOXINA TETANICA (3.5)

4.0 CONTROL AL PRODUCTO TERMINADO A GR

4.1 Esterilidad Bacteriana y Micótica

4.2 Inocuidad (Apéndice I, 8.0)

4.3 Pirógenos (Apéndice I, 7.0)

4.4 Potencia (3.4)

4.5 Controles Químicos

4.5.1 pH (Apéndice II, 4.0)

De 7.2 a 7.4

4.5.2 Sólidos Totales (Apéndice II, 2.0)

No más del 20%

4.5.3 Proteínas Totales (Apéndice II, 11.3)

No más de 200 mg/ml

4.5.4 Sulfatos (Apéndice II, 12.0)

No más del 0.1%

4.5.5 Cloruro de Sodio (Apéndice II, 8.0)

No más de 0.5%

4.5.6 Conservadores

Fenol o cresol no más de 0.3% (Apéndice II, 9.0)

Timerosal no más del 0.01% cuando el producto se va a liofilizar.
(Apéndice II, 13.0)

4.5.7 Inmunolectroforesis (Apéndice II, 6.0)

No deberán aparecer bandas de inmunoprecipitado correspondientes a otras proteínas plasmáticas diferentes de la IgG.

5.0 ENVASADO

Se dosifica en ampollitas o frascos ampola según la concentración de anticuerpos que tiene el lote.

Para asegurar su actividad durante el período de vigencia debe adju

cionarse un 20% de exceso de la presentac

6.0 CONTROL AL PRODUCTO TERMINADO ENVASADO

6.1 Esterilidad Bacteriana y Micótica (Apéndice

6.2 Identidad (Apéndice 1, 1.3.1)

6.3 Humedad Residual (si el producto es liofiliza

No mayor del 1%

6.4 Solubilidad en su Disolvente (Liofilizados) (Apé

7.0 ALMACENAMIENTO Y FECHA DE CADUCIDAD

El producto debe conservarse entre 2 y 10°C.

La presentación líquida es estable durante 2 años,
este tiempo se prolonga a 5 años.

8.0 ROTULADO

Además de los datos especificados en la Reglamentación
Laboratorios Productores de Sustancias Biológicas debe
siguiente:

Suero antiviperino (C. basiliscus basiliscus, B. asper)

Especie en que se obtuvo (equina)

Concentración de anticuerpos expresada en DL_{50} para el ratón neutralizadas por ml de suero

Conservador y su concentración

Concentración de cloruro de sodio

Volumen total contenido en el envase

Naturaleza y volumen del disolvente

Dosis recomendada

Vías de administración: Intravenosa o intramuscular

Fecha de caducidad

Consérvese entre 2 y 10°C

El instructivo debe especificar que antes de proceder a la aplicación del producto deberá practicarse la prueba para investigar la hipersensibilidad a las proteínas equinas, así como las instrucciones para la desensibilización.

9.0 PRESENTACION

Se presenta en frascos ampula, en volúmenes de acuerdo con el título de anticuerpos para que equivalgan al poder de neutralización - de 790 DL_{50} para el ratón de veneno de C.bassiliscus bassiliscus y 780 DL_{50} para el ratón de veneno de B.asper.

10.0 INDICACIONES Y EFECTOS SECUNDARIOS

10.1 Indicaciones

Para el tratamiento de la intoxicación producida por mordedura de serpientes de los géneros *Crotalus* y *Bothrops*. Inicialmente se recomienda aplicar un frasco por infiltración local y uno por vía intramuscular, posteriormente la dosis varía según el grado de recuperación que presente el paciente. Si la intoxicación es aguda, se recomienda la administración por venoclisis.

10.2 Efectos Secundarios

De 8 a 10 días después de la aplicación del suero puede aparecer una reacción sérica caracterizada por la aparición de placas urticarias, dolores en las articulaciones y febrícula, este cuadro se le conoce con el nombre de "enfermedad del suero", y se debe a una reacción entre los anticuerpos que ha formado el paciente frente a las proteínas equinas, en esos 8 a 10 días, y el suero equino -- que todavía está presente en el organismo. Esta reacción cede con la administración de antihistamínicos pero el paciente está sensibilizado al suero equino y en aplicaciones posteriores tendrá mayores complicaciones.

B I B L I O G R A F I A

- Organización Mundial de la Salud, 1972, Series de Informes Técnicos, 23^a informe, Ginebra, 33.
- Instituto Nacional de Higiene, Información proporcionada, 1979.

- Oropeza R.M., G.C.Pérez y S.C. Manes, Esquema modificado para la obtención de sueros antiofídicos, Rev. Inv. Salud Pública (México) 12:79, 1972.

- Marcos Restrepo Igaza, Mordeduras por serpientes, Antioquia Médica (Colombia), 6 19, 459, 1969.

- T.J. Glass Jr. Dr., Mordeduras de Serpientes, Tribuna Médica, - 12 19, 9, 1971.

SUERO ANTIRRABICO

1.0 INTRODUCCION

Ver: VACUNA ANTIRRABICA (1.0)

2.0 DEFINICION

Serum antirrabicum (equinum) es una solución de anticuerpos específicos purificados, obtenidos del plasma de caballos inmunizados con virus rábico fijo inactivado y viable. Contiene un conservador y se presenta líquido o liofilizado.

3.0 PRODUCCION DEL SUERO

3.1 Inmunógeno

Para la preparación del inmunógeno se inoculan ratones de 10 a 14 g por vía intracerebral con la cepa CFW de virus rábico, los animales se observan diariamente y una vez que presenten signos de rabia se sacrifican y se les extraen los cerebros. Estos se trituran con solución salina isotónica adicionada del 2% de suero estéril de caballo ajustándose la suspensión al 25% p/v.

El 50% de esta suspensión se envasa en amolletas de 1 ml y se mantiene a -70°C . El 50% restante se inactiva a 56°C durante 90 minutos, se diluye 1:4 en solución salina amortiguada y se mantiene en refri

geración hasta que se vaya a usar.

3.1.1 Título del Virus (Apéndice 1, 4.2)

Del lote de virus sin inactivar se hacen diluciones seriadas en incrementos de 10 con solución amortiguadora de Sörentsen. Se inoculan 0.03 ml de cada dilución por vía intracerebral a lotes de ratones de 10 a 14 g utilizando un mínimo de 10 animales por dilución. Los ratones se mantienen en observación durante 21 días, las muertes que ocurran en las primeras 72 h no se deben al virus sino al traumatismo de la inyección. Se anota el número de muertes de cada dilución y al final del período de observación, los animales que presenten parálisis también serán considerados como muertos. Se calcula la DL_{50} por el método de Reed y Muench.

3.2 Animales

Ver: ANTITOXINA TETANICA (3.2)

3.3 Esquema de Inmunización

Al término de la cuarentena los caballos se comienzan a inyectar -- con el virus en las tablas del cuello y el lomo, rasurando y aseptizando la zona de inoculación. Al término del esquema se deja descansar a los animales durante una semana y se procede a tomar una muestra de sangre por punción de la yugular para determinar la cantidad de anticuerpos presentes en el suero de cada animal.

ESQUEMA BASICO DE INMUNIZACION Y COSECHA

No. de inóculo	Días	Dosis por caballo	Adyuvante (Toxoide tetánico adsorbido)	Vía
1	1	10 ml virus inactivado	50 Ulf	Intramuscular fracc.
2	3	10 ml virus inactivado	50 Ulf	" "
3	5	10 ml virus inactivado	50 Ulf	" "
4	8	20 ml virus inactivado	100 Ulf	" "
5	10	20 ml virus inactivado	100 Ulf	" "
6	12	20 ml virus inactivado	100 Ulf	" "
7	15	40 ml virus inactivado	200 Ulf	" "
8	17	40 ml virus inactivado	200 Ulf	" "
9	19	40 ml virus inactivado	200 Ulf	" "
10	26	40 DL ₅₀ de virus CFW		" "
11	33	80 DL ₅₀ de virus CFW		" "
	40	Sangría de prueba		
	41	Cosecha y plasmaféresis		
	42	Cosecha y plasmaféresis		
	43	Cosecha y plasmaféresis		

3.3.1 Título del Suero (Prueba de Seroneutralización) (Apéndice 1, 9.4)

Se preparan diluciones seriadas en incrementos de 10 de los sueros obtenidos en la sangría de prueba, se mezclan estas diluciones con la cantidad suficiente de virus rábico al 20% p/v a tener ----- 300 DL₅₀ / ml, se procede de igual manera con el suero de referencia de la O.M.S. que contiene 80 UI/ml. Estas mezclas se incuban por 1 h a 37°C y se inyectan 0.03 ml de cada dilución a lotes de ratones de 10 a 14 g por vía intracerebral,

Se inoculan además otros lotes de ratones con diluciones del virus de prueba para el cálculo de la DL_{50} .

Los animales se mantienen en observación durante 21 días y se calcula la DE_{50} de los sueros y la DL_{50} del virus de prueba por el método de Reed y Muench.

La inmunización es satisfactoria si se obtienen aproximadamente --- 200 UI por ml de suero.

3.4 Sangría de Cosecha

Se hacen tres sangrías, una diaria, en la primera se extraen de 6 a 8 litros, en la segunda 4 litros y en la tercera 4 litros. La sangre se recoge en un recipiente estéril conteniendo anticoagulante - ACD o bien citrato de sodio, agitando continuamente el frasco para evitar que la sangre se coagule. La punción se lleva a cabo en la yugular. Se deja sedimentar el paquete celular y en condiciones de esterilidad se saca el plasma de los frascos que se reúne con los - plasmas procedentes de otros caballos y se adiciona fenol al 0.5%. El paquete celular de regresa al animal (plasmaféresis). Los caballos se dejan descansar durante 28 días y se inicia el esquema de - mantenimiento.

ESQUEMA DE MANTENIMIENTO

No. de inóculo	días	Dosis por caballo	Vía
1	1	40 DL_{50} de virus CFW	intramuscular fracc.
2	8	80 DL_{50} de virus CFW	" "
	15	Sangría de prueba	
	16	Cosecha y plasmaféresis	
	17	Cosecha y plasmaféresis	
	18	Cosecha y plasmaféresis	

Se dejan descansar los animales por 28 días y se reinicia el esquema de mantenimiento.

Se continúa durante varios años, hasta que decrece el título de anticuerpos o el animal enferma por las sangrías constantes; es frecuente que se presente degeneración amiloidea del hígado.

3.5 Purificación y Concentración del Suero

Ver: ANTITOXINA TETANICA (3.5)

4.0 CONTROL AL PRODUCTO TERMINADO A GRANEL

4.1 Esterilidad Bacteriana y Micótica (Apéndice I, 6.1)

4.2 Inocuidad (Apéndice I, 8.0)

4.3 Pirógenos (Apéndice I, 7.0)

4.4 Potencia

Se lleva a cabo como se describe en (3.3.1)

4.5 Controles Químicos

4.5.1 pH (Apéndice II, 4.0)

De 7.2 a 7.4

4.5.2 Sólidos Totales (Apéndice II, 2.0)

No más del 20%

4.5.3 Contenido de Proteínas (Apéndice II, 11.3)

No mayor de 200 mg/ml

4.5.4 Sulfatos (Apéndice II, 12.0)

No más del 0.1%

4.5.5 Cloruro de Sodio (Apéndice II, 8.0)

No más del 0.5%

4.5.6 Conservadores

Fenol o cresol 0.5 y 0.3% respectivamente (Apéndice II, 9.0)

Timerosal al 0.01% en producto liofilizado (Apéndice II, 13.0)

4.5.7 Inmunolectroforesis (Apéndice II, 6.0)

No deberán aparecer bandas de inmunoprecipitado correspondientes a proteínas plasmáticas diferentes a las gamma globulinas.

5.0 ENVASADO

Se dosifica en frasco ampula según la concentración que tiene el lote para dar la presentación de 1000 UI por frasco. Para asegurar su actividad durante el período de vigencia debe adicionarse un 20% de exceso a la presentación indicada.

6.0 CONTROL AL PRODUCTO TERMINADO ENVASADO

6.1 Esterilidad Bacteriana y Micótica (Apéndice I, 6.1)

6.2 Identidad (Apéndice I, 9.5)

6.3 Potencia (4.4)

Debe corresponder a la indicada en el marbete.

6.4 Humedad Residual (Apéndice II, 1.0) (Liofilizados)

No mayor del 1%

6.5 Solubilidad en su disolvente (Apéndice II, 3.0) (Liofilizados)

7.0 ALMACENAMIENTO Y FECHA DE CADUCIDAD

El producto envasado líquido es estable durante 2 años si se conserva entre 2 y 10°C. Liofilizado se prolonga el período de actividad a 5 años si se conserva a menos de 10°C.

8.0 ROTULADO

Además de los datos especificados en la Reglamentación Vigente para Laboratorios Productores de Sustancias Biológicas, debe indicar lo siguiente:

Suero Antirrábico

Especie en la que se obtuvo (Equina)

Concentración de anticuerpos en UI/ml

Conservador y su concentración

Concentración de cloruro de sodio

Volumen contenido en el envase (En producto liofilizado, después de rehidratar)

Volumen y naturaleza del disolvente (Liofilizado)

Dosis recomendada

Vía de administración : Intramuscular

Fecha de caducidad

Consérvese entre 2 y 10°C

El instructivo debe especificar que antes de proceder a la aplicación de este producto, deberá practicarse la prueba para investigar hipersensibilidad a las proteínas equinas así como las instrucciones para la desensibilización.

9.0 PRESENTACION

Se dosifica en frascos ampula cuyo contenido total es : 1000 UI

10.0 INDICACIONES, CONTRAINDICACIONES Y EFECTOS SECUNDARIOS

10.1 Indicaciones

Para el tratamiento combinado con la vacuna antirrábica en individuos que han sufrido el ataque de un animal rabioso, cuando las heridas son extensas o están localizadas en cabeza, tronco o extremidades superiores.

El suero se administra a razón de 40 UI por kg de peso por vía intramuscular y EN NINGUN CASO SUBSTITUYE A LA VACUNA.

10.2 Contraindicaciones

Pacientes sensibilizados a las proteínas de origen equino; en este caso se administrará de ser posible el suero antirrábico de origen humano.

10.3 Efectos Secundarios

De los 8 a los 12 días después de la aplicación del suero puede aparecer una reacción caracterizada por la presencia de placas urticáricas, dolores en las articulaciones y febrícula. Este cuadro se

conoce con el nombre de "enfermedad del suero" y se debe a una reacción entre los anticuerpos que ha formado el paciente frente a la proteína equina en esos 8 a 10 días y el suero equino que todavía está presente en su organismo. Esta reacción cede con la aplicación de antihistamínicos pero el paciente queda sensibilizado al suero equino y en aplicaciones posteriores tendrá mayores complicaciones.

B I B L I O G R A F I A

- Organización Mundial de la Salud, 1969, Series de Informes Técnicos , 21^o informe, anexo 2, Ginebra, 54.
- World Health Organization, Laboratory Techniques in Rabies, Ginebra, 1965, 128.
- Atanasiu, P. y Fuenzalida ,E. , El suero antirrábico, Salud Pública de México, 16 , 1974, 465.
- Oropeza, R.M., G. García-Perez y S. Calderón, Un método de preparación de suero antirrábico empleando toxoide tetánico y gel de aluminio como adyuvante, Rev. Inv. Salud Pública (México), 32 , 1972, 195.

APENDICE I
PRUEBAS BIOLÓGICAS

1.0 IDENTIDAD

Se lleva a cabo en las cepas, así como en producto terminado.

1.1 Características Macroscópicas del Desarrollo Bacteriano

En la mayoría de las bacterias que se emplean en la fabricación de vacunas, el aspecto de las colonias es característico; esto hace posible una identificación macroscópica de los cultivos, desechándose aquellos en que el desarrollo no es típico.

1.2 Morfología Microscópica y Características Tintoreales

Consiste en realizar un frote que se tiñe según las propiedades del microorganismo. La técnica más usada es la Gram, aunque también se usan otras como la de Ziehl-Neelsen para bacterias ácido-alcohol resistentes. Se observa al microscopio para comprobar morfología, tamaño y propiedades tintoreales.

1.3 Reacciones Antígeno-Anticuerpo

1.3.1 Inmunoprecipitación

Se emplea para verificar la especie de que proceden los sueros in munes. Se realiza por lo menos en un frasco o ampolleta del pro ducto terminado ya etiquetado de cada lote. Se puede emplear la técnica de precipitación en capilar o por doble difusión en placa de agar. En el primer caso en un capilar se mezcla la muestra - con el suero antiespecie en volúmenes iguales, se inserta el capi lar en un bloque de plastilina y se deja 24 h a temperatura ambien te, al cabo de este tiempo se observará la formación de una colum na de precipitado en la parte inferior del tubo. Para la doble difusión en placa se emplea una caja de Petri o de plástico dese- chable en la que se vacía gel de agarosa fundido, a manera de fo^r mar una capa de 3 mm de espesor. Cuando el agar solidifica se - practican cortes circulares a una distancia de aproximadamente -- 4 mm. Se retiran los cilindros de agar de los cortes y los pozos así obtenidos se llenan uno con el suero antiespecie y el otro con la muestra problema. Se tapa la caja y se deja 24 h al cabo de las cuales si el suero inmune y la especie de que procede el sue- ro corresponden se formará una banda de inmunoprecipitado en- tre los dos pozos, simultáneamente se corre una muestra de suero control positivo.

1.3.2 Aglutinación

Se emplea en vacunas bacterianas; por ejemplo, antisalmonella y - anticólera. En las reacciones de aglutinación al entrar en con- tacto el antígeno con el anticuerpo se forman agregados observa-

bles a simple vista. La técnica en placa consiste en mezclar una gota de la suspensión problema con una gota del suero específico de alto título y se observa si hay aglutinación; las reacciones pueden realizarse también en tubos de ensaye, en ocasiones es necesario incubar a 37°C para acelerar la reacción. La identificación positiva presentará aglutinación.

1.3.3 Seroneutralización

Esta prueba se lleva a cabo en las vacunas virales por ejemplo en la antirrábica, antipoliomiélfica, antisarampionosa, así como en los sueros antialacrán, anticrotálico y antibotrópico. Se hace reaccionar el antígeno con el anticuerpo y para comprobar si se efectuó la neutralización se inoculan animales o cultivos sensibles. Por ejemplo en la prueba de identidad de virus rábico se mezcla una alícuota de la suspensión del virus con suero normal y otra alícuota con suero antirrábico de alto título, las mezclas se dejan reaccionar a 37°C durante 90 minutos y se inoculan 0.03 ml a ratones de 13 a 15 g, la identificación es positiva si en un período de 21 días los ratones del primer lote mueren de rabia y los del segundo sobreviven.

1.3.4 Reacciones de Fijación del Complemento

Se emplea fundamentalmente en vacunas virales; se mezcla el antígeno con el anticuerpo conocido correspondiente y se adiciona com

plemento, se incuba 30 minutos a 37°C y 18 h a 5°C enseguida se -
adicionan glóbulos rojos de carnero y hemolisina anticarnero tam-
bién titulada.

Si no hay hemólisis la identificación es positiva pues al reaccio-
nar el antígeno y el anticuerpo fijaron al complemento inhibiendo
la hemólisis. Si se presenta hemólisis la identificación es ne-
gativa.

1.3.5 Hemaglutinación

Algunos virus tienen la capacidad de provocar la aglutinación de
eritrocitos de diferentes especies, ésto permite identificar tales
virus y además determinar la potencia de éstos.

Entre los que provocan dicha reacción están:

Sarampión que aglutina eritrocitos de mono Macacus rhesus

Rubeola que aglutina eritrocitos de aves

Influenza que aglutina eritrocitos de aves y humanos

Se mezcla un volumen de la suspensión del virus con un volumen i-
gual de glóbulos rojos al 1%, la mezcla se incuba a temperatura -
ambiente por una hora. La prueba se considerará positiva si se
produce hemaglutinación apreciable a simple vista.

2.0 PUREZA

Esta prueba se realiza en varias fases de la fabricación de la va-
cuna; en las cepas, en producto intermedio y en producto terminado

envasado, ya que su objetivo es verificar la ausencia de contaminantes.

Se realizan tinciones por el método apropiado según las características del microorganismo, así como siembras en medios pobres - para el microorganismo constituyente de la vacuna o de preferencia que inhiban su desarrollo pero no el de los contaminantes; por ejemplo, para la prueba de pureza durante la producción del toxoide tetánico se hacen frotos del desarrollo y se tiñen, deberán observarse bacilos Gram positivos no esporulados, además se siembran muestras del desarrollo en medio de gelosa-sangre y soya-triptica sa-agar que se incuban 7 días a 35°C en aerobiosis, con lo que se inhibe el desarrollo de Cl. tetani y en medio de Sabouraud que se incuba 7 días de 18 a 22°C.

2.1 Criterio de Aceptación (para el ejemplo)

En la tinción solo deberá observarse la morfología y características tintoriales de los microorganismos de la vacuna. En los cultivos, no deberá haber desarrollo.

3.0 PRUEBA DE INACTIVACION

Es importante diferenciar las pruebas de esterilidad de las de inactivación designadas también como pruebas de viabilidad.

En las pruebas de esterilidad se investigan virus, bacterias y hongos viables que pudieran estar presentes en el producto como -

resultado de una contaminación ambiental o del animal del que proceden, estas pruebas se realizan en todos los productos biológicos; en tanto que las pruebas de viabilidad solo se llevan a cabo en vacunas constituidas por microorganismos inactivados y tiene como fin verificar que el producto no contiene microorganismos vivos.

3.1 Pruebas de Inactivación en Vacunas Bacterianas

Se realiza en las vacunas antisalmonella, anticólera y antipertussis. Se toma una muestra del producto inmediatamente después del proceso de inactivación antes de la adición del conservador, cuando esto es posible. Se siembra en el mismo medio que se usó para la producción, se incuban en las mismas condiciones y durante el mismo período empleado para la obtención del desarrollo bacteriano.

3.1.1 Criterio de Aceptación

No se debe obtener evidencia de desarrollo bacteriano; en caso contrario se repite el proceso de inactivación, se vuelve a realizar la prueba de viabilidad y solo hasta que no se obtenga desarrollo el resultado se considera satisfactorio.

3.2 Prueba de Inactivación en Vacunas Virales

Se lleva a cabo en las vacunas antirrábica, antipoliomiélfica --

(tipo Salk) y anti-influenza.

Puede realizarse en dos formas dependiendo de la vacuna de que se trate; inoculando embriones de pollo o animales susceptibles al virus con el máximo volumen que toleren de acuerdo con la vía que se emplea, o bien inoculando muestras representativas en cultivo de células susceptibles.

3.2.1 Criterio de Aceptación

Si los animales o los embriones no muestran signos de la infección y mucho menos mueren y en los cultivos de células no se observa efecto citopático, el producto se acepta. Si no es así se repite el proceso de inactivación y se vuelve a realizar la prueba de viabilidad hasta que el resultado sea satisfactorio.

4.0 PRUEBA DE TOXICIDAD

Se realiza en exotoxinas bacterianas por ejemplo tetánica, diftérica, botulínica, así como en las ponzoñas de alacrán y de víboras. La potencia de estas toxinas y ponzoñas se expresa en Dosis Mínima Letal (DML); o en Dosis Letal 50% (DL₅₀); las pruebas de toxicidad no indican el grado de antigenicidad que tiene la toxina pero con prueba la existencia de ésta. También se expresan los resultados en Dosis Letal mas (DL+) que se define como la mínima cantidad de toxina que mezclada con una UI o fracción de antitoxina, todavía es capaz de causar la muerte de un animal determinado en un -

tiempo establecido para cada caso. El cálculo de la DL+ se describe en detalle en 9.3.

4.1 Dosis Mínima Letal (DML)

Se define como la mínima cantidad de toxina o ponzoña que inyectada por una vía establecida causa la muerte de un animal susceptible, de un peso determinado, en un período de tiempo especificado. Por ejemplo en el caso de la toxina tetánica la DML se obtiene inoculando diluciones crecientes de la toxina a lotes de ratones - de 18 a 20 g por vía intramuscular, se mantiene a los animales - en observación 72 h y se leen los resultados.

La máxima dilución en que murieron los animales inoculados se corrige mediante el factor de tiempo transcurrido desde la inoculación hasta la muerte del animal y así se obtiene la cantidad de - DML presentes en el problema.

4.2 Dosis Letal 50% (DL₅₀)

Se define como la mínima cantidad de toxina o ponzoña que inyectada por una vía establecida causa la muerte del 50% de un lote de animales susceptibles, con un peso determinado y en un período de tiempo específico. Por ejemplo en el caso de la ponzoña de alacrán se inoculan ratones de 18 a 20 g por vía endovenosa, se mantienen los animales en observación durante 24h y el número de muertes y sobrevivientes se usa para calcular la DL₅₀ por el método -

de Reed-Muench.

5.0 PRUEBA DE ATOXICIDAD

Se lleva a cabo en los toxoides diftérico y tetánico. Esta prueba garantiza que la exotoxina bacteriana se ha transformado completamente a toxoide y se realiza en estos productos al término del período de detoxificación. Para realizarla se inoculan cuyes de 300 a 400 g que reciben 5 ml del toxoide por vía subcutánea y se tienen en observación durante 21 días para el toxoide tetánico y 30 días para el toxoide diftérico.

5.1 Criterio de Aceptación

Durante este período los animales no deben mostrar signos de intoxicación o muerte, en caso de que se presentaran, se prolonga el período de detoxificación del producto y se repite la prueba siendo satisfactoria únicamente en el caso que los animales no presenten signos de intoxicación y mucho menos mueran. Al término de la prueba se somete a los animales a necropsia y no deberán presentar evidencia de la acción de las toxinas.

6.0 ESTERILIDAD

Estrictamente esterilidad es ausencia total de microorganismos viables, pero cuando se trata de vacunas constituidas por virus o

bacterias vivos, por ejemplo la vacuna BCG, se refiere a ausencia de microorganismos viables extraños a la vacuna. Las pruebas, según el caso comprenden esterilidad bacteriana, micótica o viral.

6.1 Esterilidad Bacteriana y Micótica

Se realizan en todos los biológicos tanto durante el proceso de fabricación como en el producto terminado envasado.

6.1.1 Medios de Cultivo

La elección del medio de cultivo para estas pruebas es importante, éste debe permitir el desarrollo óptimo de los microorganismos que puedan estar presentes por contaminación ambiental durante el proceso de manufactura. Las propiedades nutritivas se comprobarán - empleando en cada prueba testigos positivos: Se siembran un mínimo de cuatro tubos con el medio utilizado para la prueba, empleando el mismo volumen del biológico en estudio y dos de ellos se siembran además con 0.1 ml de una suspensión de un cultivo de 20 h de S. aureus conteniendo 1 000 microorganismos/ml y los dos tubos restantes se siembran con 0.1 ml de una suspensión de B. subtilis o de Cl. sporogenes, conteniendo 1 000 esporas viables/ml. Los cuatro tubos se incuban de 30 a 32°C siete días como mínimo.

Por lo menos dos tubos con el medio utilizado para la prueba de esterilidad micótica se siembran con el mismo volumen del biológico en estudio y 0.1 ml de una suspensión de un cultivo de 20 h de ---

Candida albicans y se incuban de 20 a 25 °C por dos días. Todos los tubos testigo deberán mostrar desarrollo microbiano.

Para bacterias en general el óptimo es el medio fluido con tioglicolato de sodio (USP) que permite el desarrollo de aerobios, microaerófilos y anaerobios. Para bacterias y hongos es adecuado el medio triptícase-soya-agar y para hongos y levaduras el medio óptimo es el de Sabouraud líquido (USP), también se usa el medio de extracto de malta y el de agar-extracto de malta.

6.1.2 Muestras

El criterio sobre el muestreo es muy variable pero se recomienda para producto terminado envasado, tomar el equivalente a la raíz cuadrada del total de unidades del lote, pero nunca menos de 5 muestras. Para producto intermedio o terminado a granel se tomarán 5 ml de uno o varios recipientes. En todos los casos la proporción Inóculo/medio de cultivo será 1/25 así la cantidad de medio será suficiente para que la muestra no lo diluya alterando sus propiedades nutritivas, cuando el producto contenga bacteriostáticos, el volumen del medio deberá ser suficiente para diluir al conservador y evitar así su interferencia, por ejemplo, cuando la muestra contenga timerosal al 0.01% se usarán 36 ml del medio/ml de muestra. Se pueden añadir agentes que inactiven el bacteriostático, siempre que no influyan en el desarrollo de contaminantes; el fenol en las concentraciones utilizadas no interfiere con el desarrollo en los medios con tioglicolato de sodio y el de Sabouraud líquido

El timerosal tampoco interfiere cuando se emplea el medio con tio-glicolato pero inhibe el crecimiento de C. albicans en medio de Sa bouraud.

6.1.3 Temperaturas de Incubación

Para bacterias se recomiendan dos temperaturas distintas que serán de 15 a 22°C y de 35 a 37°C. Cuando ésto no sea posible se incubarán de 30 a 32°C.

Para hongos y levaduras, la temperatura será de 18 a 22°C. El tiempo de incubación y observación mínimo es de 7 días.

Cuando hay agentes bacteriostáticos se prolonga la incubación hasta 14 días y para hongos será de 14 a 21 días.

6.1.4 Criterio de Aceptación

Si no se presenta desarrollo de contaminantes el producto se acepta; si hay desarrollo en tres o más tubos se rechaza; si son menos de tres se repite la prueba con igual número de muestras, si en esta segunda prueba no hay desarrollo, se acepta, si hay desarrollo en un tubo y es diferente al de la primera siembra, se hará una tercera prueba en la que no debe haber desarrollo en ningún tubo, si se presenta desarrollo aunque sea en uno solo, se rechazará el producto.

El único biológico en que se permiten contaminantes es la vacuna -

antivariólica obtenida en la dermis de animales vivos, pero el número máximo de contaminantes será de 500 microorganismos/ml y se comprobará la ausencia de patógenos.

6.2 Esterilidad Viral

Se realiza en todas las vacunas constituidas por microorganismos vivos atenuados que se obtienen en cultivos tisulares, tanto en los cultivos de tejido y de embrión de pollo, como durante el proceso de producción y en producto terminado a granel.

6.2.1 Fuentes de Contaminación

Los virus contaminantes pueden provenir de los animales, de los órganos que se emplean para la preparación de los cultivos tisulares o bien de los embriones de pollo.

6.2.2 Prueba de Esterilidad Viral en los Cultivos Tisulares

Para esta prueba se deja sin inocular con el virus, un número de frascos con cultivo tisular que se incuba en las mismas condiciones que los inoculados y mientras estos últimos se procesan o mantienen congelados, los de control se observan para buscar daño celular provocado por virus contaminantes (efecto citopático). También se toman alícuotas de los medios de crecimiento y mantenimiento que se siembran en cultivos tisulares o se inoculan en animales sensi-

bles a los posibles virus contaminantes. Para la investigación de virus que producen hemadsorción, se adicionan a la monocapa celular eritrocitos provenientes de una especie susceptible. Cuando se emplean embriones se deberá certificar su procedencia y además se harán pruebas para detectar el virus de la leucosis aviaria usando el método de Rubin. Cuando las células provienen de riñón de mono, se deberá investigar cualquier contaminación con virus B o SV₄₀.

6.2.3 Prueba de Seroneutralización

Se realiza en las suspensiones virales. Se toman alícuotas y se neutralizan con el suero específico para el virus contenido en la vacuna, se siembra en el mismo tipo de células utilizado para la producción, o se inoculan embriones de pollo; también se pueden sembrar alícuotas de la suspensión del virus sin neutralizar en medios resistentes a éste pero no a los contaminantes. Cuando se prueban mezclas, se recomienda hacer la investigación en cada suspensión individual y posteriormente la mezcla.

6.2.4 Criterio de Aceptación

En virus semilla y producto terminado no se acepta ninguna contaminación; en producto intermedio se puede emplear ultracentrifugación con gradientes de densidad de cloruro de cesio, para purificar la suspensión. En vacunas contaminadas con virus SV₄₀, se procede a

la fotoinactivación. En las pruebas realizadas a los cultivos de tejidos, si se aprecia contaminación en los frascos de control, se desechará el lote del producto que se mantiene congelado.

7.0 PIROGENOS

Los pirógenos son producto de naturaleza lipopolisacárido resultantes del metabolismo bacteriano, que al ser introducido al organismo por vía parenteral provocan incremento de la temperatura. Esta prueba se realiza en sueros y diluyentes de productos liofilizados. Se emplean conejos adultos de 1.5 Kg o más, que se mantienen una semana a dieta normal y se toma la temperatura rectal durante tres días antes de la prueba, si entre una y otra lectura hay variaciones de más de 1°C o si la temperatura es superior a 39.8°C , los animales se desechan. A cuatro conejos se les retira el alimento 6 h antes de la prueba y solo se les deja agua, una hora antes se inmovilizan y 30 minutos después de inmovilizados se les toma la temperatura rectal, en el momento de la prueba a tres se les inyecta; 10 ml/Kg si es solución salina o agua inyectable o 2 ml/Kg si es suero, en la vena marginal de la oreja, todo el material que se usa debe estar libre de pirógenos para lo que se somete a 250°C por 30 minutos; el cuarto conejo se emplea como control. Se leen las temperaturas cada 60 minutos durante tres horas. En el caso de los sueros no se deben utilizar los mismos animales dos veces porque pueden alergizarse y esto ocasionar un aumento de la temperatura.

7.1 Criterio de Aceptación

El incremento máximo para cada conejo no será mayor de 0.6°C y la suma de los incrementos máximos en los tres conejos no exederá a 1.4°C ; si no es así, se repite la prueba en 5 conejos, la suma de los incrementos máximos en los 8 conejos no exederá de 3.7°C si no es así se considera pirogénico el producto y se rechaza, o en el caso de los sueros se procede a la filtración para la eliminación de los pirógenos, se repite la prueba y si el resultado es satisfactorio el producto se acepta.

8.0 PRUEBA DE INOCUIDAD

Se lleva a cabo en todas las vacunas y sueros y comprueba la ausencia de toxicidad en los diferentes componentes del producto. Para la prueba se emplean ratones de 18 a 20 g y cuyes de 350 g, se administran 0.5 y 5 ml respectivamente, por vía intraperitoneal y se observan de 7 a 15 días.

8.1 Criterio de Aceptación

Durante este período, los animales no mostrarán signos de intoxicación ni habrá muertos, si alguno muriera se hará la necropsia para determinar la causa y se repite la prueba. Si no muere ningún animal se acepta el producto, si alguno muere se rechaza.

9.0 PRUEBAS DE POTENCIA

Las pruebas de potencia pueden dividirse en varias categorías:

- Cuenta indirecta de bacterias o de partículas infecciosas viables (9.1)
- Dosis infectiva para cultivo de tejidos al 50% (DICT₅₀) (9.2)
- Capacidad de hemaglutinación (9.3)
- Poder de neutralización (9.4)
- Límite de floculación (9.5)
- Cuantificación de anticuerpos en animales inmunizados (9.6)
- Prueba de protección al ratón (9.7)

9.1 Cuenta Indirecta de Bacterias o de Partículas Infecciosas Viables

Estas pruebas no miden la antigenicidad del producto, sino como el nombre lo indica, la cantidad de microorganismos viables presentes en él. Existen en cada caso límites de aceptación que garantizan que al aplicar el biológico, se va a producir la multiplicación de los microorganismos que contiene la vacuna provocando así una respuesta inmunológica adecuada.

9.1.1 Vacunas Constituidas por Bacterias Vivas

Cuenta indirecta en placa

La única de empleo actual es la antituberculosa (BCG); para determinar el número de microorganismos viables, se prepara una suspen-

sión con agua estéril que contenga 0.5 mg de microorganismos/ml; se siembra 0.1 ml de esta suspensión en medio sólido de Sauton, se incuba 4 semanas a 37°C y se cuenta el número de colonias que deberá estar dentro de los límites especificados.

Este tipo de cuentas bacterianas tienen un factor de error debido a que una colonia no necesariamente tuvo como origen una bacteria aislada sino, especialmente en el caso de Mycobacterium, un acúmulo de microorganismos puede dar origen a una colonia.

Determinación del consumo de oxígeno

Es preferible en el caso de BCG emplear el método de consumo de oxígeno, utilizando para ello el respirómetro de Warburg. En esta prueba se mide el metabolismo bacteriano por las reacciones de óxido-reducción y los gases que se absorben o liberan. El aparato consta de un manómetro graduado en microlitros, un matraz de incubación y un baño de agua a temperatura controlada.

Antes de la prueba, se equilibra el manómetro en ambas ramas, se marca la altura a que llega, se coloca una porción del cultivo en el matraz y se incuba en el baño por un tiempo adecuado; se ajusta luego el manómetro hasta que una de las ramas quede a la misma altura inicial; en la otra rama se lee el volumen de gas liberado o absorbido por el cultivo, éste se relaciona al contenido teórico de microorganismos por medio de unas tablas obtenidas experimentalmente. (Ver esquema I)

9.1.2 Cuenta de Partículas Infecciosas Viables en Vacunas Constituidas por Virus Vivos Atenuados

9.1.2.1 Unidades Formadoras de Placas (UFP)

Esta prueba se realiza en vacuna antivariólica y en la investigación del factor de resistencia a la infección en la vacuna antiserpionosa. Para esta prueba se preparan cajas de Roux con cultivos en monocapas de células susceptibles. Estos cultivos se inoculan con diluciones seriadas de la suspensión viral en estudio, - se estratifica sobre las células una capa de agar adicionado de un colorante vital (rojo neutro), se incuba y en las zonas donde hubo destrucción celular por las partículas virales, se aprecian halos decolorados (placas).

Bajo condiciones controladas, cada partícula infecciosa, dará lugar a una placa. Se cuenta el número de placas y se multiplica - por la dilución para calcular las UFP/ml de suspensión viral.

9.1.2.2 Unidades Pustulizantes (UP)

Se realiza únicamente en la vacuna antivariólica. Para la prueba se inoculan diluciones de la vacuna problema y de una vacuna de referencia en la membrana corioalantoidea de embriones de pollo o en la dermis de un conejo. Después de un tiempo de incubación adecuado se cuenta el número de pústulas formadas en la membrana corioalantoidea del embrión o en la dermis del conejo; se multiplica el resultado de la vacuna de referencia con el del problema para - calcular la potencia de éste último.

9.2 Dosis Infecciosa para Cultivos de Tejidos al 50% (DICT₅₀)

Se realiza en las siguientes vacunas virales; antipoliomiélfica, antisarampionosa y antirrubeola.

Es la cantidad de partículas virales que produce efectos citopáticos en el 50% de un lote de tubos con cultivos de células susceptibles. Para esta prueba se inoculan diluciones de la vacuna a un mínimo de 5 tubos con cultivos de células por dilución, se incuban y se observa el efecto citopático, para determinar la dilución en que la mitad de los cultivos presentan daños (DICT₅₀), realizando el cálculo de ésta por el método de Reed-Muench.

9.3 Capacidad de Hemaglutinación

Se realiza en la vacuna anti-Influenza para determinar el título del virus por su capacidad de aglutinar a los glóbulos rojos de pollo, se lleva a cabo paralelamente con una suspensión de virus de referencia y los resultados se expresan en unidades de aglutinación (CCA) (Chicken Cell Agglutination).

Se preparan diluciones seriadas de las suspensiones virales en incrementos de dos y a 0.3 ml de cada dilución, se les agrega un volumen igual de glóbulos rojos de pollo, lavados y ajustados al 1%, las mezclas se incuban a temperatura ambiente por 1 h y la máxima dilución que produce aglutinación positiva se considera el título del virus. Este valor se relaciona con el factor de dilución y el volumen empleado y así se calculan las unidades CCA presentes.

9.4 Poder de Neutralización

Se utiliza para determinar la potencia de los sueros antiponzoñosos y de las antitoxinas tetánica y diftérica, se realiza la misma técnica que se describe en 9.6 para la cuantificación de estas antitoxinas en el suero de los cuyes inmunizados con los toxoides, solo que las diluciones de las muestras serán mayores porque los títulos presentes en el producto purificado y concentrado tanto de origen equino como humano son mucho más elevados.

En los sueros antiponzoñosos se preparan diluciones seriadas del suero crudo o bien del producto terminado a granel que se mezclan con la ponzoña respectiva titulada en DL_{50} . Las mezclas se dejan 1 h a temperatura ambiente para que se lleve a cabo la neutralización y se inyectan ratones de 18 a 20 g por vía intravenosa, que se mantienen en observación durante 2 h, del número de muertes y sobrevivientes se calcula la Dosis Efectiva Media (DE_{50}) por el método de Reed-Muench que se relaciona con el número de DL_{50} contenidas en la ponzoña para determinar el poder de neutralización del suero sin diluir.

9.5 Límite de Flocculación

Se realiza para determinar la cantidad de antitoxinas diftérica o tetánica en plasma crudo, empleando un toxoide cuyo valor en Lf se conoce, o bien con antitoxinas valoradas se determinan las unidades flocculantes en toxinas y toxoides en las distintas fases del proce

so de producción. Por ejemplo, en el caso del toxoide diftérico se prueban diluciones seriadas de éste frente a un volumen constante de antitoxina diftérica que contenga 50 Lf/ml. La mezcla se incuba a 37°C y en el tubo donde se equivalen el antígeno y el anticuerpo la reacción ocurre en primer término. Multiplicando 50 por el factor de dilución del toxoide se tendrá el número de unidades Lf contenidas en el producto.

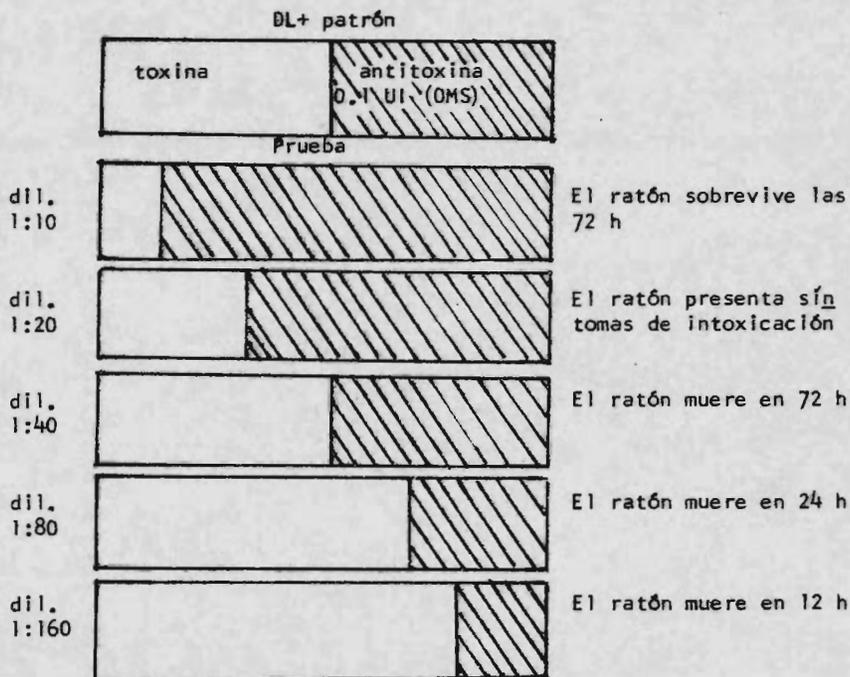
9.6 Cuantificación de Anticuerpos en Animales Inmunizados

Se realiza en los toxoides tetánico y diftérico; se inoculan cuyes de 500 g con media dosis total humana del toxoide, seis semanas después, se sangran haciéndose una mezcla de alícuotas de los sueros y en ésta se determinan las UI/ml del suero.

La prueba se hace en base de la DL+, que se define, para la toxina tetánica como la mínima cantidad de toxina que mezclada con 0.1 UI de antitoxina patrón, produce la muerte de un ratón de 18 a 20 g - en 72 h'.

Se preparan diluciones seriadas del suero que se mezclan con una DL+. La mezcla se deja reposar 60 minutos a temperatura ambiente, al abrigo de la luz y se inoculan ratones de 18 a 22 g. Los animales se tienen en observación durante 72 h registrando las muertes que ocurran. La máxima dilución en la que mueran los ratones en 72 h contendrá 0.1 UI de antitoxina, multiplicando este valor por el factor de dilución, se obtendrán las UI contenidas en 1 ml de la mezcla de los sueros de los cuyes inmunizados; para que la prue

ba sea satisfactoria este valor será por lo menos de 2UI/ml.



El cálculo final para saber las UI de antitoxina en el suero del -
cuyo será:

La dilución 1:40 equivale a 0.025 ml del suero original

$$\begin{array}{r}
 0.1 \text{ UI} \dots\dots\dots 0.025 \text{ ml} \\
 X \dots\dots\dots 1.0 \text{ ml} \\
 X = 4.0 \text{ UI/ml}
 \end{array}$$

Como el límite permitido son 2 UI/ml y este suero tiene 4 UI/ml el
producto se acepta.

9.7 Prueba de Protección al Ratón

Esta prueba se realiza en vacuna antirrábica, antipertusis, anticó

lera y antisalmonella. Consiste en inmunizar los animales con diluciones de la vacuna, dejarlos el tiempo adecuado para obtener una respuesta inmunológica adecuada e inyectarles el microorganismo vivo y virulento, se someten a observación durante un período también establecido y de los resultados de muertes y sobrevivientes - se calcula la Dosis Efectiva Media (DE_{50}) usando el método de Reed Muench u otro método estadístico apropiado. Simultáneamente se realiza la prueba con una vacuna de referencia para establecer la relación de potencia entre ésta y la o las vacunas en estudio.

Un ejemplo de esta prueba es la determinación de la potencia en vacuna antirrábica por el método N.I.H.

Animales de prueba: Ratones blancos del mismo sexo de 11 a 15 g.

Suspensión de prueba: El N.I.H. distribuye una suspensión del virus rábico liofilizado. Esta ampollita se rehidrata y se diluye al 5% p/v en agua con 2% de suero de bovino y se inyectan ratones de 11 a 15 g con 0.03 ml por vía intracerebral, cuando se presenta parálisis o muerte, se les extrae el cerebro y se prepara una suspensión al 20% p/v en agua con 2% de suero de bovino que se conserva repartida en alícuotas a -70°C .

Inmunización de los animales: Se preparan tres o más diluciones en incrementos de 5 con solución de Sörentsen de la vacuna de referencia y la vacuna en estudio. Se inoculan 0.5 ml por vía intraperitoneal utilizando 20 animales por dilución, a los 7 días de iniciada la inmunización se aplica una segunda dosis. Además se deja sin inocular un lote testigo de por lo menos 40 animales que se mantienen en las mismas condiciones que los inmuni

zados.

Dosis de prueba: La dosis de prueba se aplica a los 14 días de iniciada la inmunización; se centrifuga la suspensión del virus de prueba a 1000 G por 15 minutos y el sobrenadante se diluye 1:5 (Concentración final 10^{-2}). A partir de ésta se preparan diluciones de 10^{-3} hasta 10^{-8} . De la dilución 10^{-5} se inyectan -- 0.03 ml por vía intracerebral a cada uno de los ratones inmunizados tanto con la vacuna en estudio como con la de referencia y 10 ratones del lote testigo. A las 72 h se ajustan los lotes de animales inmunizados a 16 por dilución, desechando incluso los que hayan muerto en este período ya que su muerte se debe al traumatismo de la inyección. De las diluciones 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} se inoculan 10 ratones con cada una; de los resultados obtenidos en estos animales se calcula la Dosis Letal Media (DL_{50}) de la cepa de prueba.

Se observan los animales durante 14 días más anotando las muertes por rabia. Al término de este período se consideran como muertos los animales que presenten parálisis o convulsiones.

Con estos datos se calcula el valor antigénico de las vacunas usando el método de Reed-Muench. El lote testigo inoculado con la dilución 10^{-5} (dosis de prueba) deberá mostrar un mínimo del 80% de mortalidad.

METODO DE REED-MUENCH

La Dosis Efectiva Media (DE_{50}) se define para la vacuna antirrábica como la mínima cantidad de tejido cerebral que protege al 50% de los ratones y deja sin protección al otro 50%. Para calcular los

totales acumulados en el método de Reed-Muench se considera que los animales protegidos por una dosis menor de vacuna lo estarían también por una dosis mayor, y los que murieron a pesar de recibir una dosis mayor de vacuna también hubieran muerto de recibir una menor.

Cálculo de la DE₅₀

Vacuna de Referencia

Vac.T.C. al 1%	mg de T.C.	# de ra tones	S	M	TOTALES ACUMULADOS		% muer tes	
					S	M		
1:5	2.0	16	10	6	19	6	25	6/25=24
1:25	0.4	16	8	8	9	14	23	14/23=61
1:125	0.08	16	1	15	1	29	30	29/30=96

$$\text{Log del fac} = \frac{\% \text{ de mortalidad superior al } 50\% - 50}{\% \text{ de mortalidad superior al } 50\% - \% \text{ de mortalidad inferior al } 50\%} \times \text{Log del fac-} \\ \text{tor del } 50\% \quad \text{tor de dil.}$$

DE₅₀ = antilog del factor X cantidad de tejido cerebral en que
del 50% murió mas del 50%

Cálculos:

$$\frac{61 - 50}{61 - 24} \times \log 5 = 0.2973 \times 0.699 = 0.208$$

$$\text{Antilogaritmo } 0.208 = 1.61$$

$$1.61 \times 0.4 = 0.644 \text{ mg} = \text{DE}_{50}$$

Vacuna en Estudio

Vac.T.C. al 1%	mg de T.C.	# de ra tones	S	M	TOTALES ACUMULADOS		% muer tes	
					S	M		
1:5	2.0	16	13	3	27	3	30	3/30=10
1:25	0.4	16	10	6	14	9	23	9/23=39
1:125	0.08	16	4	12	4	21	25	21/25=84

Cálculos:

$$\frac{84 - 50}{84 - 39} \times \log 5 = 0.755 \times 0.699 = 0.527$$

$$\text{antilog } 0.5277 = 3.37$$

$$3.37 \times 0.08 = 0.2696 \text{ mg} = \text{DE}_{50}$$

El valor antigénico de la vacuna está dado por el cociente entre -
la vacuna de referencia y la vacuna en estudio:

$$\frac{0.644}{0.2696} = 2.38$$

Lo que indica que la vacuna en estudio es 2.38 veces más potente -
que la de referencia, como el límite de aceptación es de 0.8 veces
la vacuna se acepta.

Cálculo de la DL₅₀

Para calcular los totales acumulados, se considera que los anima-
les que murieron a mayores diluciones del virus también hubieran
muerto con las diluciones menores.

dil. del virus	# de ra- tones	S	M	TALES ACUMULADOS		% muertes
				S	M	
-5						
10 ⁻⁶	10	0	10	0	17	17/17=100
10 ⁻⁷	10	6	4	6	7	7/13= 53
10 ⁻⁸	10	7	3	13	3	3/16= 18.7
10	10	10	0	23	0	0/23= 0

$$\text{Cálculos: } \frac{53 - 50}{53 - 18.7} \times \log 10 = 0.0869 \times 1.0 = 0.0869$$

\log de la DL₅₀ = \log denominador de la dil. donde + 0.0869
la mortalidad fué superior al 50%

$$\log \text{DL}_{50} = 6.0 + 0.0869 = 6.0869$$

Por lo tanto 0.03 ml de la suspensión contienen 1 222 000 DL₅₀

Como se aplicó la dilución 10⁻⁵ en la determinación de la DE₅₀; se a
plicó una suspensión que contenía:

$$\frac{1\,222\,000}{100\,000} = 12.22 \text{ DL}_{50} \text{ en } 0.03 \text{ ml (dosis para cada ratón)}$$

Para que la prueba de protección al ratón sea válida, el número -
de DL₅₀ administrada a cada animal deberá ser por lo menos de 4.0

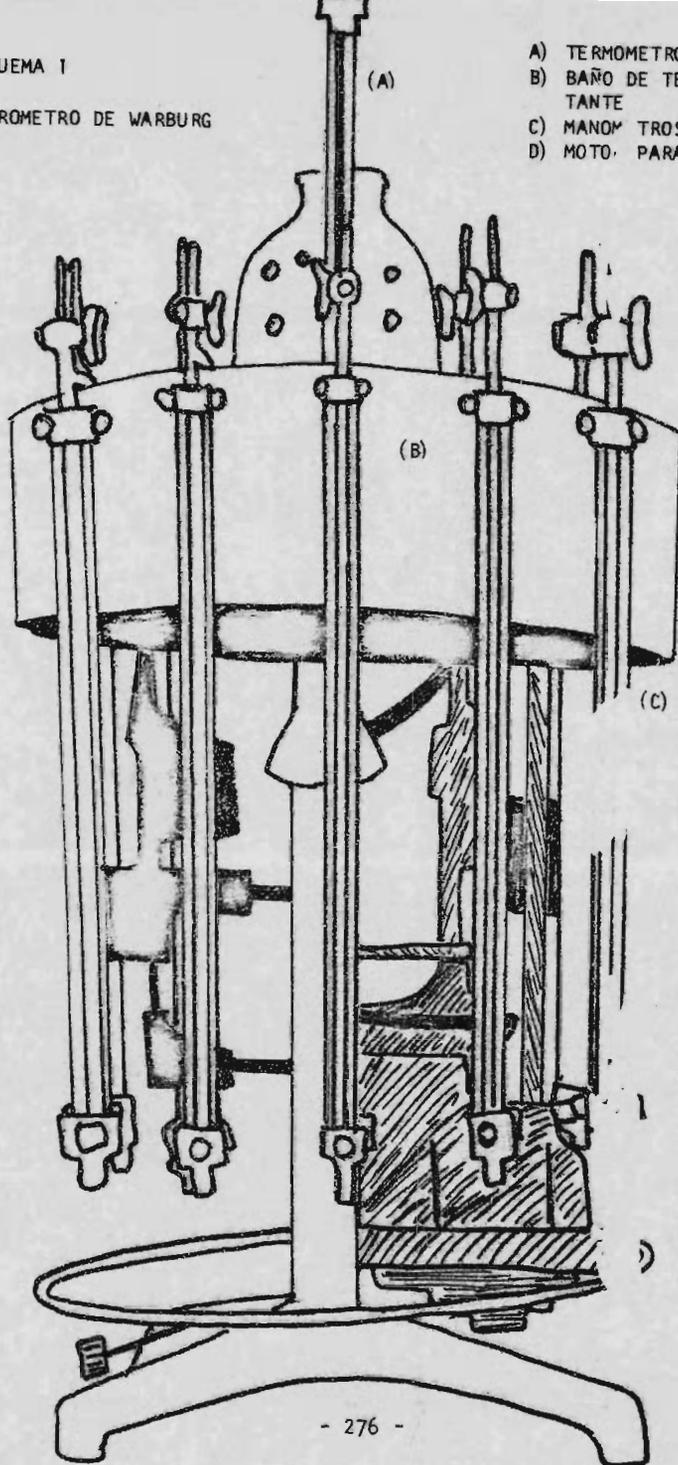
y como en este caso se han aplicado 12.8, los resultados obtenidos en la prueba se consideran válidos.

B I B L I O G R A F I A

- Organización Mundial de la Salud, 1960, Serie de informes técnicos, 200^o Informe, 3.
- Code of Federal Regulations, 1977, part 600 to 1299, U.S.A. -- Government printing office, Washington, 4.
- Organización Mundial de la Salud, 1967, Laboratories techniques in rabies, Ginebra.

ESQUEMA I
RESPIROMETRO DE WARBURG

- A) TERMOMETRO
- B) BAÑO DE TEMPERATURA CONS
TANTE
- C) MANDOS TROS
- D) MOTO PARA AGITACION

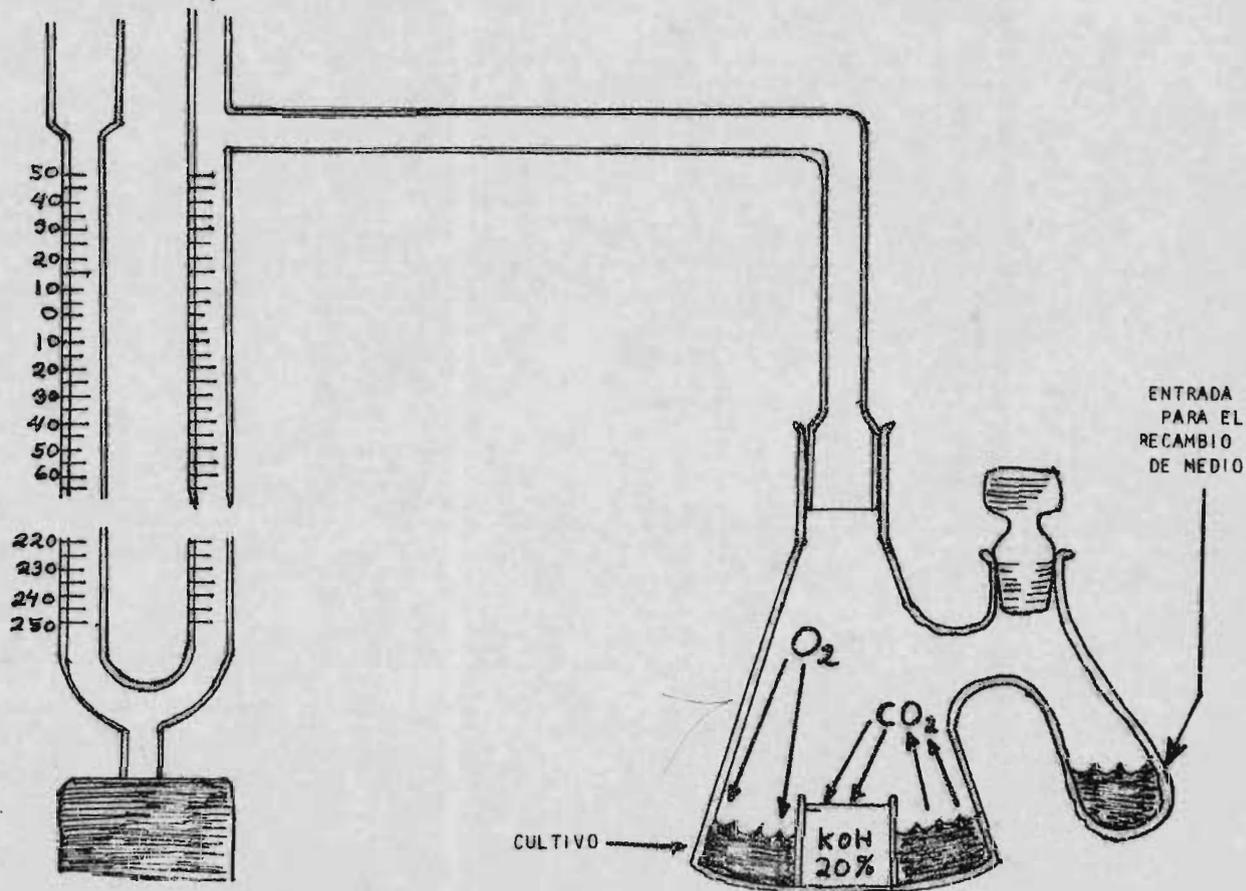


HACIA LA LLAVE
DE CERRADO

ESQUEMA 1-A

COLOCACION DE LA MUESTRA

- 277 -



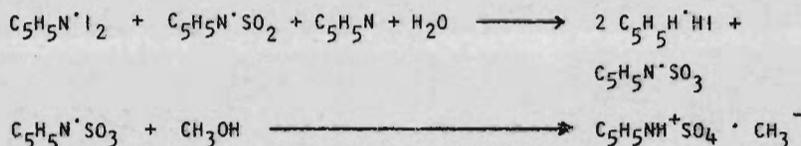
APENDICE II
PRUEBAS QUIMICAS

1.0 HUMEDAD RESIDUAL (POR EL METODO DIRECTO DE KARL-FISHER)

Se realiza en sueros y vacunas que se presentan liofilizados y como control intermedio en vacuna BCG.

1.1 Fundamento del Método

El reactivo de Karl-Fisher es una mezcla de yodo, dióxido de azufre y piridina, la cual en presencia de metanol reacciona en forma específica con el agua. La reacción que se lleva a cabo es la siguiente:



Cuando se consume toda el agua presente, el yodo libre da una coloración amarillo-paja, y al mismo tiempo varían los potenciales de oxidación-reducción de la mezcla. El punto final se puede detectar -- por el color amarillo paja que desarrolla o bien potenciométricamente empleando el aparato de Karl-Fisher que consiste en un recipiente hermético, con agitación magnética, conectado a dos buretas automáticas y un par de electrodos de platino conectados a un microamperímetro que detecta la variación de corriente ocasionada por el exceso de reactivo presente cuando se consume toda el agua de la mezcla.

1.2 Valoración del Reactivo

Como la mezcla de reactivo de Karl-Fisher es inestable a la luz y a la humedad, deben valorarse inmediatamente antes de usarla. La -- FNEUM (4a. Edición) recomienda el siguiente método:

En el recipiente de titulación perfectamente seco se colocan de 30 a 50 ml de metanol anhidro y se titulan hasta que el microamperímetro registre una intensidad de corriente de 40 a 60 microamperes y se mantenga sobre este valor durante 30 segundos (punto final de la titulación).

El volumen de reactivo gastado no debe ser mayor de 5 a 10 ml y de no ser así, se empleará metanol mas seco o reactivo de Karl-Fisher - recientemente preparado.

Se pesan de 100 a 150 mg de tartrato de sodio ($C_4H_4Na_2O_6 \cdot H_2O$) que es una sal no higroscópica, muy estable. Se colocan en el metanol -- neutralizado, se agita hasta disolución y se titulan con el reacti-vo hasta el punto final.

Se calcula el equivalente de mg de agua/ ml de reactivo como sigue:

$$\text{Factor} = \frac{0.1566 \text{ (peso de tartrato en mg)}}{\text{volumen de reactivo gastado en ml}}$$

1.3 Técnica

Se pesa una cantidad de muestra suficiente para tener de 10 a 50 mg de agua y se coloca en el recipiente de titulación que contiene me-tanol previamente neutralizado, y se titula reproduciendo las condi-ciones utilizadas para la valoración del reactivo.

Se calcula el % de agua que contiene el producto como sigue:

$$\% \text{ de agua} = \frac{\text{Vol. de reactivo gastado en ml} \times \text{factor} \times 100}{\text{Peso de la muestra en mg}}$$

1.4 Límite de Aceptación

Para vacunas constituidas por microorganismos vivos liofilizados, - la humedad no debe ser menor del 1% ni mayor del 3%.

Para sueros que se presentan liofilizados no debe ser mayor del 2%.

Para vacuna BCG no hay límite establecido.

2.0 SÓLIDOS TOTALES

Se realiza en sueros en el producto terminado a granel.

2.1 Técnica

Se pesan 1 ó 2 ml de muestra en una cápsula de porcelana que previamente se lleva a peso constante a 105°C, la muestra se deja evaporar a 37°C hasta sequedad y se somete posteriormente a 105°C hasta peso constante.

$$\% \text{ sólidos totales} = \frac{\text{Peso de la muestra seca}}{\text{Peso inicial de la muestra}} \times 100$$

2.2 Límite de Aceptación

No más de 20% de sólidos totales en sueros homólogos y heterólogos

como producto terminado a granel.

3.0 SOLUBILIDAD

Se realiza en sueros y vacunas que se presentan liofilizados, en el producto terminado envasado.

3.1 Técnica

Se extrae el disolvente con una jeringa de capacidad apropiada y se introduce en el frasco ampula que contiene el liofilizado; se agita durante uno o dos minutos, se extrae la solución o suspensión resultante con una jeringa que tenga aguja de 21X25 y eliminando las burbujas se deposita el volumen extraído en una probeta con capacidad adecuada.

3.2 Límite de aceptación

El producto liofilizado no debe requerir de más de 1 a 2 minutos de agitación para que se obtenga una solución clara o una suspensión homogénea según sea el caso.

El volumen extraído debe corresponder al indicado en el marbete.

4.0 pH

Se determina en la mayoría de las vacunas, así como en todos los sueros y diluyentes para productos liofilizados, tanto en el proceso de

4.0 pH para la mayoría de las vacunas, todos los sueros, diluyentes y prod. liofilizados tanto en proceso de

preparación como en el producto terminado a granel.

4.1 Técnica

Se determina potenciométricamente.

4.2 Límite de Aceptación

En vacunas es de 7.2 a 7.4

En sueros es de 6.0 a 7.4, evitando el pH de 7.0 en el que se pueden desnaturalizar las proteínas.

En diluyentes es de 5.6 a 7.4

5.0 ELECTROFORESIS

Se realiza en sueros homólogos para determinar que proteínas se van eliminando durante las etapas de los procesos de purificación, así como en el producto terminado a granel.

5.1 Fundamento del Método

La electroforesis es un método de análisis basado en la migración, en un campo eléctrico, de partículas cargadas. La movilidad de las partículas es función de su carga eléctrica neta y de la fuerza iónica, viscosidad y pH del medio; también influye el voltaje, amperaje y el tiempo que se aplican, por lo que controlando estas variables

se puede obtener una separación adecuada de las moléculas, las cuales migrarán hacia el electrodo con carga opuesta a la suya. La movilidad electroforética se expresa en $\text{cm}^2/\text{volts}/\text{segundos}$.

5.2 Aparato

El aparato de electroforesis consta de una cámara, de una fuente de corriente directa y de un densitómetro. La cámara está formada por dos recipientes, que se llenan de amortiguador, en donde se encuentran los electrodos; en la parte central hay un puente para colocar el material de soporte que puede ser tiras de acetato de celulosa, de papel filtro o de gel de acrilamida. (Figura 1)

5.3 Desarrollo de la Electroforesis

Las tiras de acetato de celulosa se conservan sumergidas en metanol al 40% por lo que previamente deben lavarse, para eliminar todo vestigio del alcohol que pudiera desnaturalizar las proteínas, con solución amortiguadora de acetato-beronal pH 8.6, fuerza iónica 0.05, que es la misma que se va a usar en la cámara de electroforesis. Las tiras se secan entre dos hojas de papel filtro y se colocan sobre el soporte. Se deja unos minutos para que se estabilice y con una micropipeta se depositan, de 3 a 5 microlitros de la muestra a analizar a una distancia apropiada en el extremo catódico. Se hace pasar una corriente de intensidad y potencial adecuados según la marca del aparato, lo que también determina el tiempo de corrimiento.

Después de la separación electroforética se sumergen las tiras en una solución colorante (rojo de Ponceau o negro de amido B 10), se elimina el exceso de colorante y el retenido en las tiras se mide en el densitómetro para poder elaborar la gráfica correspondiente. Hay aparatos que llevan a cabo la graficación en forma automática.

5.4 Criterio de Aceptación

En las muestras correspondientes a inmunoglobulinas purificadas, solo deberán aparecer las bandas correspondientes a las gamma globulinas.

En las muestras de suero crudo deberán aparecer las bandas correspondientes a los componentes del suero; albúmina, alfa-1, alfa-2, beta, fibrinógeno, componente T (éste solo en las antitoxinas de origen equino), gamma globulinas, etc.

6.0 INMUNOELECTROFORESIS

Este método se emplea para el control de donadores y como prueba de pureza en producto purificado terminado a granel.

6.1 Fundamento del Método

La inmunolectroforesis se basa en los mismos principios de la electroforesis combinados con la reacción antígeno-anticuerpo.

6.2 Aparato

(Ver 5.2)

6.3 Desarrollo de la Inmunolectroforesis

Se pueden utilizar tiras de acetato de celulosa o bien placas de gel de agarosa al 1.0 - 1.5% disuelta en amortiguador de acetato-beronal pH 8.5 y fuerza iónica 0.05 .

Las placas se preparan colocando sobre portaobjetos perfectamente limpios y desengrasados 2.5 ml del gel fundido. La superficie donde se colocan los portaobjetos debe estar perfectamente nivelada.

Una vez que ha solidificado el gel se practican dos cortes separados 3 mm entre si, en la parte central del portaobjetos, a lo largo de éste y a una distancia de 10 mm de los extremos; y dos cortes circulares de 2 mm de diámetro a 30 mm de uno de los extremos y a 3 mm de los cortes anteriores.

Se elimina el gel de los cortes circulares y en los pozos así obtenidos se deposita; En uno 3 microlitros de un suero estandar y en el otro un volumen igual de la muestra problema, se coloca la placa en el puente del aparato de electroforesis y en cada uno de los extremos del portaobjetos se coloca una tira de papel filtro Wathman No.1 de 2.5 cm de ancho y de largo suficiente para que el otro extremo de la tira de papel quede perfectamente sumergido en el amortiguador de la cámara y se hace pasar una corriente de potencial e intensidad adecuados según la marca del aparato.

Para saber si ya se obtuvo un corrimiento adecuado de las proteínas, se coloca en cualquiera de los doz pozos después de poner el suero, un microlitro de un colorante de arrastre (azul de bromofenol), y cuando se observa que la mancha de colorante se encuentra a unos 10 a 20 mm del pozo, se sabe que la separación de los componentes es ya adecuada. Se desmonta el aparato, se saca la placa y eliminando el gel de agar contenido entre los cortes longitudinales se obtiene un canal que se llena con el suero antiespecie poli o monovalente correspondiente. Se deja la placa en una cámara húmeda durante 20 h como máximo para que se lleve a cabo la difusión de las proteínas separadas por la electroforesis (antígeno) y el suero que se colocó en el canal (anticuerpo). Al cabo de este tiempo se formarán bandas de precipitación correspondientes a cada sistema antígeno-anticuerpo. Si se desea intensificar las bandas de inmunoprecipitado se pueden teñir, y si se emplean tiras de acetato de celulosa forzosamente deben teñir para observarlas (Figura 11).

6.4 Criterios de Aceptación

En sueros purificados solo deben aparecer las líneas de precipitación correspondientes a las inmunoglobulinas.

En el suero de donadores los resultados deben ser sensiblemente semejantes al estandar.

7.0 ALUMINIO

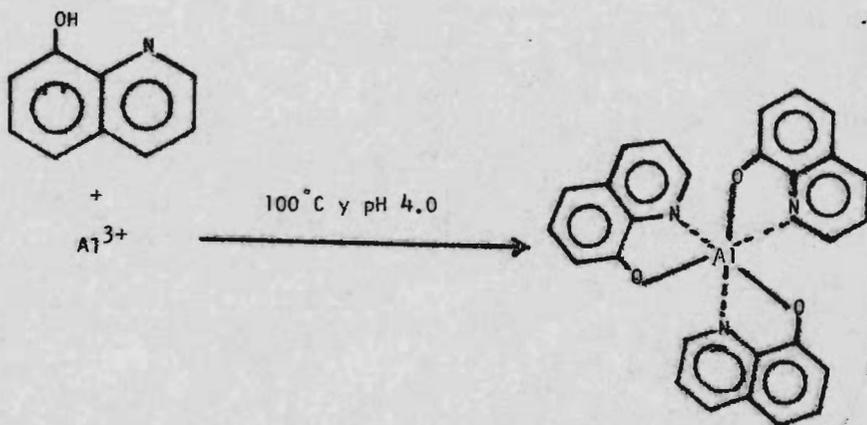
Se determina en los toxoides que llevan como adyuvante fosfato de aluminio (Toxoides adsorbidos).

7.1 Método Gravimétrico

7.1.1 Fundamento del Método

El método se basa en la formación de un quelato insoluble entre el aluminio y la 8-hidroxiquinolina. El pH de precipitación máxima del quelato es de 4.0 y se logra con un amortiguador de ácido acético con acetatos que se obtiene al adicionar acetato de amonio a la reacción pues la 8-hidroxiquinolina se encuentra disuelta en ácido acético. Para que la reacción sea completa es necesaria una temperatura de 100 a 104°C.

La reacción que se lleva a cabo es la siguiente:



7.1.2 Técnica

Se toman 2 muestras de 20 ml del toxoide, se adiciona a cada una 20 ml de ácido clorhídrico 1 Mol/litro , se agita y se deja en reposo - hasta que aclare diluyendo a 120 ml con agua destilada. Se filtra y se adicionan 20 ml de una mezcla 1:10 de agua con 8-hidroxiquinolina al 2.5% en ácido acético y 12 ml de acetato de amonio al 40%. Se calienta a ebullición, se enfría y filtra a través de un crisol - de Gooch con capa de asbesto previamente tarado. El precipitado se lava con agua destilada, secándose a 105°C hasta peso constante.

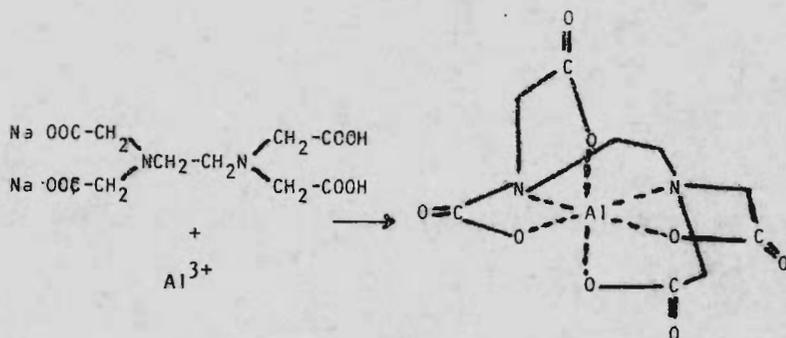
$$\% \text{Al}^{3+} = \frac{\text{peso del pp} \times \text{factor}}{\text{Volumen de la muestra}} \quad \text{Factor} = \frac{\text{Al}^{3+}}{\text{Al}(\text{C}_9\text{H}_6\text{NO})_3} = 0.0588$$

7.2 Método Volumétrico

7.2.1 Fundamento del Método

El método consiste en la digestión de la materia orgánica de la muestra con mezcla sulfonítrica y enseguida la reacción del aluminio con el EDTA a un pH de 4.0 que evita la interferencia de otros iones y a una temperatura de 100°C; posteriormente el exceso de EDTA se titula con sulfato de cobre usando como indicador piridilazonaftol que a pH de 4.0 reacciona con el Cu^{2+} mas lentamente que el EDTA lo que permite detectar el punto en el que el sulfato de cobre consumió todo el EDTA libre en la mezcla.

La reacción que se lleva a cabo es la siguiente:



7.2.2 Preparación de la Muestra

Se colocan 2 ml de la muestra en un matraz de digestión, se adicionan 1 ml de ácido sulfúrico, 6 gotas de ácido nítrico y una o dos perlas de vidrio para regular la ebullición, se calienta hasta que se producen vapores densos y se continúa calentando y goteando ácido nítrico hasta que la solución sea clara, se deja enfriar y se neutraliza con hidróxido de sodio al 10% usando dos gotas de anaranjado de metilo como indicador.

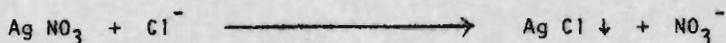
La solución amortiguadora de acetatos pH 4.0 se prepara, disolviendo 68 g de acetato de sodio y 38.5 g de acetato de amonio en 500 ml de agua y adicionando 125 ml de ácido acético glacial.

7.2.3 Valoración

Se transfiere la muestra digerida a un matraz Erlenmeyer lavando el matraz de digestión con 25 ml de agua destilada, se reúne el agua de lavado con la muestra, se adicionan 25 ml de EDTA disódico 0.02 Mol/litro, 10 ml de solución amortiguadora de acetatos y 5 gotas de piri

ce la precipitación por efecto del ión común.

La reacción que se lleva a cabo es la siguiente:



8.2 Técnica

Se pesan 10 ml de la muestra diluyéndolos con agua a 50 ml, se acidula la solución con ácido nítrico 1:10 y manteniendo la mezcla en baño de agua hirviendo, se precipita el ión Cl^- adicionando una solución de nitrato de plata al 10% gota a gota, se agita hasta que el precipitado esté aglomerado y la solución sobrenadante sea clara, se comprueba que la precipitación fue completa dejando resbalar por la pared del vaso una gota de nitrato de plata (la solución no debe enturbiarse al entrar en contacto con la gota). Se deja reposar en baño de agua caliente y en la oscuridad durante una hora. Se filtra a través de un crisol Gooch con capa de asbesto previamente tarado, se lava el precipitado con agua caliente acidulada con ácido nítrico hasta que dé reacción negativa al ión plata (a una gota de la solución de lavado se le adiciona una gota de ácido clorhídrico 1:10 y no deberá enturbiarse) se seca el precipitado a 105°C hasta peso constante.

$$\% \text{Cl}^- = \frac{\text{peso del pp X factor}}{\text{peso de la muestra}}$$

$$\text{Factor} = \frac{\text{PM} (\text{Cl}^-)}{\text{PM} (\text{AgCl})} = 0.2474$$

8.3 Límite de Aceptación

Sueros 0.6 a 0.9%

Vacunas 0.3%

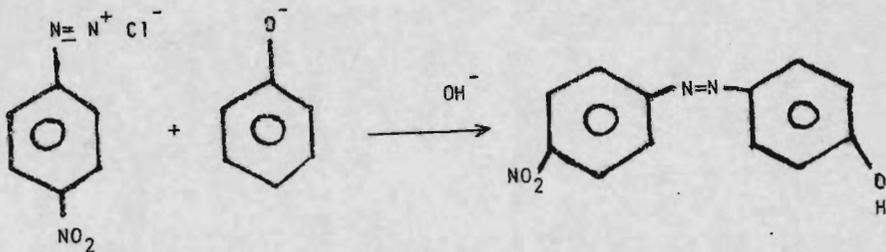
Solventes de liofilizados (Solución salina isotónica) 0.9%

9.0 FENOL Y CRESOL

Se determina en vacunas que contienen fenol o cresol como conservador y en sueros que se presentan líquidos.

9.1 Fundamento del Método

El método se basa en la formación del azocompuesto de la sal de diazonio de la p-nitroanilina con el fenol o el cresol. Para que la reacción se lleve a cabo es necesario un pH alcalino que se logra adicionando a la reacción acetato de sodio-carbonato de sodio ya que así se logra la solubilización del compuesto fenólico para poder formar el azocompuesto estable que da una coloración rojo-violeta a la solución.



dilazonaftol al 0.1% en alcohol como indicador, se hierve durante -- tres minutos y se titula la solución en caliente con sulfato de cobre 0.02 Mol/litro hasta coloración rojo púrpura. Se titula una muestra de 25 ml de EDTA disódico 0.02 Mol/litro de la misma manera que el - problema.

$$\boxed{\text{Vol. gastado para el blanco}} - \boxed{\text{Vol. gastado para el problema}} \times 0.5396 = \text{mg de Al}^{3+}$$

7.3 Límite de Aceptación

Se recomienda un máximo de 0.85 mg de Al³⁺ por dosis individual del producto.

8.0 CLORUROS

Se determina en vacunas, sueros y en algunos diluyentes para liofilizados.

8.1 Fundamento del Método

El método se basa en la formación de un precipitado de cloruro de -- plata en medio ácido, esta precipitación se realiza en caliente lo - que permite formar cristales pequeños y evita el englobamiento de o- tros componentes de la mezcla, lo que alteraría los resultados. Se pueden presentar problemas debido a la inestabilidad de la sales de plata a la luz por lo que es necesario proteger el precipitado usan- do material de vidrio especial (actínico). El ácido nítrico favore

9.2 Preparación de la Curva Estándar

Se preparan diluciones de fenol que contengan 50, 80, 100, 120 y -- 150 $\mu\text{g/ml}$ y se tratan de la misma manera que la muestra (9.4).

9.3 Preparación de la Muestra

Se diluye 1 ml de la muestra con 30 ml de agua, se precipitan las -- proteínas usando ácido tricloroacético al 5% y se afora a 50 ml con agua, se deja reposar 30 minutos y se filtra.

El reactivo (sal de diazonio) se prepara mezclando 10 ml de solución al 0.3% de p-nitroanilina en ácido clorhídrico al 8% recientemente - preparado y 0.3 ml de nitrito de sodio al 10%.

9.4 Desarrollo de Color

A 1 ml del filtrado o de la soluciones estándar se le adicionan; 1 ml de goma arábica al 1%, 1 ml de solución saturada de acetato de sodio, 1 ml del reactivo (9.3) y 2 ml de carbonato de sodio al 10% (para tener un pH de 11), la mezcla se agita, se afora a 50 ml y se deja reposar 10 minutos.

Se leen los estándares y el problema a 550 nm ajustando a cero el aparato con un blanco preparado de igual manera pero substituyendo el problema por 1 ml de agua destilada.

Con las lecturas de los estándares se traza una curva de calibración de la que se interpola la lectura del problema.

9.5 Límite de Aceptación

Fenol 0.5%

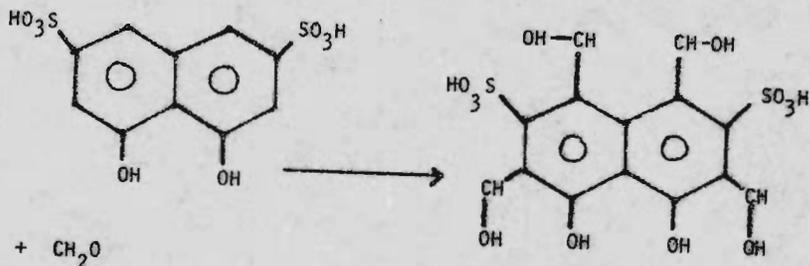
Cresol 0.3%

10.0 FORMOL RESIDUAL

Se determina en vacunas y toxoides que hayan sido inactivados con -- formol.

10.1 Fundamento del Método

El método se basa en la formación de un compuesto polimérico entre - el formaldehído y el ácido cromotrópico en medio ácido, lo que provo - ca una variación en el color de la mezcla que se detecta espectrofo - tométicamente. Es importante el agua de la reacción ya que una -- cantidad muy alta diluye el ácido sulfúrico y detiene la formación - del polímero. La reacción que se lleva a cabo es la siguiente:



10.2 Preparación de la Curva Estándar

Se preparan diluciones de formaldehído que contengan 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 1.2, 1.5 y 2.0 mg/ml y se tratan como se indica en (10.3)

10.3 Desarrollo del Color

A 1 ml del problema o de las soluciones estándar se le adiciona 1.5 ml de solución reactivo de ácido cromotrópico (60 mg de ácido cromotrópico se disuelven en 2 ml de agua y se afora a 20 ml con ácido sulfúrico concentrado), se agita y afora a 10 ml con ácido sulfúrico concentrado. Se mantiene por 15 minutos en baño de agua caliente, enfriando enseguida en hielo.

Se leen los estándares y el problema a 515 nm ajustando a 100% con un blanco preparado de igual manera pero substituyendo el problema por 1 ml de agua destilada.

Con las lecturas de los estándares se traza una curva de calibración de la que se interpola la lectura del problema.

10.4 Límite de Aceptación

En toxoides; no más del 0.1%

En vacunas; no más del 0.02%

11.0 PROTEINAS TOTALES

Se realiza en vacunas, sueros y toxoides en producto terminado a granel y envasado.

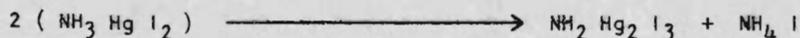
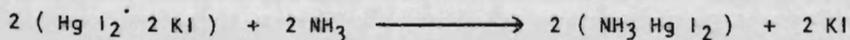
11.1 Método de Nesslerización de Koch y McMeekin

Se realiza en vacuna pertussis, antisalmonella, antirrábica, anticólera y en toxoides tetánico y diftérico.

11.1.1 Fundamento del Método

Cuando se adiciona yoduro de mercurio y potasio en solución alcalina a una sal de amonio, la alcalinidad provoca la liberación de amoníaco y éste reacciona con el yoduro de mercurio y potasio para dar un complejo de color amarillo. Este complejo no es muy estable en solución y después de un tiempo precipita en forma de coloide por lo que la lectura deberá realizarse en un tiempo controlado.

La reacción que se lleva a cabo es la siguiente:



11.1.2 Preparación de la Curva Estándar

Se preparan diluciones de sulfato de amonio que contengan 20, 100, 200, 300, 400, 500, 700 y 1000 μg de nitrógeno /ml y se tratan de la misma manera que el problema (11.1.3).

11.1.3 Preparación de la Muestra

11.1.3 Se coloca en un tubo de digestión una muestra que contenga de 20 a 300 µg de nitrógeno proteico ó 1 ml de las soluciones estándar y se le adicionan 0.5 ml de ácido sulfúrico concentrado, y una perla de vidrio para regular la ebullición, se calienta a la llama de un mechero hasta que se desprendan vapores densos, se enfría y adiciona a cada tubo 2 gotas de peróxido de hidrógeno al 30% continuando con el calentamiento hasta que la solución sea clara. Se suspende el calentamiento y se dejan enfriar los tubos antes de llevar a cabo el desarrollo de color.

11.1.4 Desarrollo de Color

Se diluye la muestra fría a 35 ml con agua destilada y se adiciona a cada tubo 15 ml de reactivo de Messler agitando inmediatamente, se deja reposar la mezcla durante 30 minutos y se leen los estándares y el problema a 440 nm ajustando a cero el aparato con un blanco preparado de la misma manera pero substituyendo el problema por 1 ml de agua destilada.

Con las lecturas de los estándares se traza una curva de calibración de la que se interpola la lectura del problema.

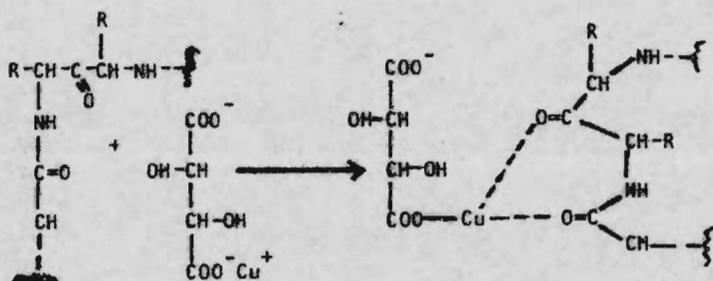
11.2 Método de Bluret

Este método se usa para determinación directa de proteínas en sueros.

11.2.1 Fundamento del Método

En sueros no es necesaria la digestión de la muestra pues las prote_ nas se encuentran en solución y no formando estructuras.

El método de Biuret se basa en la formación de un complejo de color rojo-violeta de estructura semejante a la de un quelato entre el cobre del tartrato cúprico y el carbonilo del enlace peptídico (Higuchi y Brochmann, *Pharmaceutical Analysis*, 1961). Para que la reacción sea completa es necesario tener un medio alcalino que permita formar la sal de los ácidos terminales y mantener el carbonilo estable. La reacción que se lleva a cabo es la siguiente:



11.2.2 Preparación de la Curva Estándar

Se preparan diluciones de sulfato de amonio que contengan 30, 40, 50, 60, 70, 90 y 100 μg de nitrógeno /ml y se tratan de igual manera que el problema (11.2.3).

11.2.3 Desarrollo de Color

Se adicionan 2.5 ml del reactivo de Biuret a 0.1 ml del suero problema o de las diluciones estándar, se deja reposar 15 minutos en la oscuridad; se diluye a 10 ml con agua destilada y se leen los estándares y el problema a 540 nm ajustando el cero del aparato con un blanco preparado de la misma manera pero substituyendo el problema por 0.1 ml de agua destilada.

Con las lecturas de los estándares se traza una curva de calibración de la que se interpola la lectura del problema.

11.3 Límite de Aceptación

El contenido de nitrógeno para la vacuna anticolérica y antitifoídica es de 0.05 mg/ml.

Para el componente pertussis es de 0.03 mg/ml.

Para los sueros homólogos y heterólogos es de 200 µg/ml.

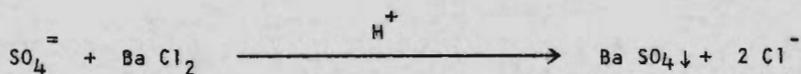
Para toxoides no hay límite establecido.

12.0 SULFATOS

Se realiza en antitoxinas y toxoides en los que se haya usado la precipitación con sulfatos para purificarlos.

12.1 Fundamento del Método

El método consiste en la precipitación de los iones $\text{SO}_4^{=}$ al hacerlos reaccionar con una sal de bario (Ba Cl_2) para formar el Ba SO_4 , la precipitación se favorece por la adición de un ión común (ácido clorhídrico). La reacción que se lleva a cabo es la siguiente:



12.2 Técnica

Se pesan 10 ml de la muestra y se diluyen a 50 ml con agua destilada, adicionando 5 ml de ácido clorhídrico concentrado, se calienta a ebullición y se agrega lentamente solución al 4% de cloruro de bario hasta tener un exceso. Se hierve durante unos minutos y se coloca en baño de agua caliente durante 1 h sin hervir. El precipitado se filtra a través de un crisol Gooch con capa de asbesto previamente tarado y se lava con agua caliente hasta que al adicionar ácido sulfúrico diluido al agua de lavado no se produzca precipitado (reacción de bario negativa). El crisol se seca a 105°C y posteriormente se calcina en mufla hasta peso constante.

$$\% \text{ Sulfatos} = \frac{\text{peso del pp} \times \text{factor} \times 100}{\text{peso de la muestra}}$$

$$\text{Factor} = \frac{\text{P.M.} (\text{SO}_4^{=})}{\text{P.M.} (\text{Ba SO}_4)}$$

$$\text{Factor} = 0.4115$$

12.3 Límite de Aceptación

No más de 0.1%

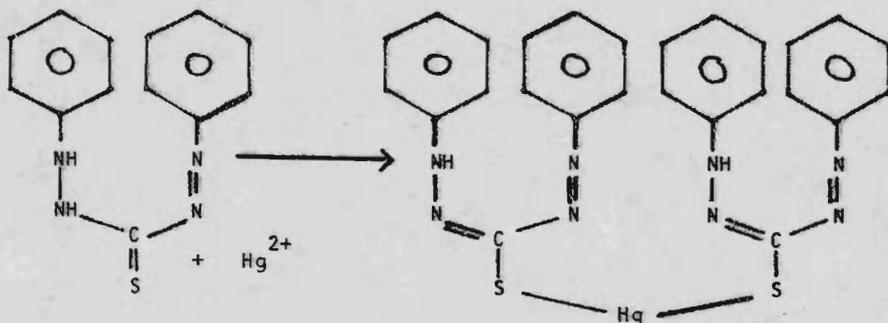
13.0 TÍMEROSAL

Se determina en vacunas, sueros y toxoides que contengan este conservador.

13.1 Fundamento del Método

El método se basa en la reacción del mercurio del timerosal con ditizona en solución clorofórmica. Para que se lleve a cabo la reacción es necesario liberar el mercurio por digestión de la materia orgánica con mezcla sulfonítrica, posteriormente se destruye el ácido nítrico residual con hidroxilamina y entonces es posible extraer el mercurio de la reacción con solución de ditizona y posteriormente se lee la ditizona que no reaccionó utilizando un espectrofotómetro.

La reacción que se lleva a cabo es la siguiente:



13.2 Preparación de la Curva Estándar

Se preparan diluciones de timerosal que contengan 6, 12, 15 y 18 μg de Hg /ml y se tratan de la misma manera que la muestra (13.3).

13.3 Preparación de la Muestra

Como la mayoría de los biológicos contienen 0.01% de timerosal que - corresponde aproximadamente a 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, la muestra debe diluirse 1:4 para tener la cantidad adecuada para la sensibilidad de éste método que es de 6 a 18 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Se mezclan 1 ml de la muestra diluida o de los estándares, 1 ml de agua y 2 ml de una mezcla de ácido sulfúrico-ácido nítrico (1:1), se adiciona una perla de vidrio al tubo y se digiere durante 20 minutos. Se deja enfriar y se adicionan 10 ml de agua y 2 ml de clorhidrato - de hidroxilamina al 50%, se hierve durante 1 minuto y se enfría.

Se prepara un blanco con 2 ml de agua que se trata de igual manera.

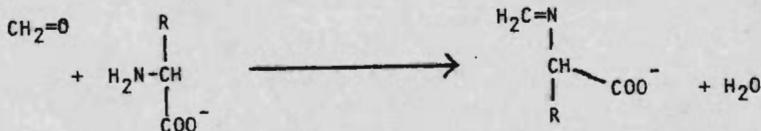
13.4 Técnica

Las mezclas se transfieren cuantitativamente a embudos de separación de 125 ml aforados a 80 ml, se adiciona agua hasta el aforo y se extrae con 10 ml de ditizona al 0.001% recientemente diluida (la solución concentrada de ditizona se prepara al 0.007% en cloroformo y se conserva en frasco oscuro en refrigeración. Para su empleo se diluye 1:7 en cloroformo), se agita energicamente la mezcla y después de

FOLIO EQUIVOCADO: PASE
A LA SIGUIENTE HOJA

la toxina con formol y posteriormente retitular el exceso de formol con otra base (hidróxido de sodio).

La reacción que se lleva a cabo es la siguiente:



14.2 Técnica

A una muestra de 25 ml de la toxina clarificada se le ajusta el pH a 7.0 con ácido clorhídrico o hidróxido de sodio 0.1 Mol/litro y se adicionan 50 ml de formalina al 37% a la que previamente se le ajusta el pH a 9.0, se agita y se titula lentamente el exceso de formalina con hidróxido de sodio 0.1 Mol/litro hasta pH 9.0 usando un electrodo de Calomel para detectar el punto final de la titulación. Se calcula el % a que debe quedar el formol en la toxina por medio de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ formol} = (\text{Vol. gastado de Na OH}) (0.4) (\text{Alícuota}) - 2$$

14.3 Límite de Aceptación

No hay límite establecido

equilibrar la presión se coloca un algodón seco en la punta del embudo y se recoge la capa clorofórmica directamente en las celdillas -- del espectrofotómetro.

Se leen los estándares, el problema y el blanco a 490 nm ajustando a cero el aparato con cloroformo, se resta el valor obtenido del blanco a cada una de las lecturas.

Con los valores corregidos de los estándares se traza una curva de - calibración y en esta se interpola la lectura corregida del problema. Con este valor se calcula la cantidad de timerosal en la muestra por medio de la siguiente relación:

$$\text{Timerosal en la muestra} = \frac{49,55 \times 10000}{\text{Valor obtenido de la curva } (\mu\text{g de Hg/ml})}$$

13.5 Límite de Aceptación

No más del 0.01%

14.0 CALCULO DE NITROGENO AMINO (TITULACION DE SØRENSEN)

Esta prueba se realiza exclusivamente en la producción de toxoide -- diftérico para calcular el % de formalina a adicionar para detoxificar la toxina.

14.1 Fundamento del Método

El método consiste en bloquear los grupos amino de las proteínas de

B I B L I O G R A F I A

- Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos, 1974, 4a. Ed. Secretaría de Salubridad y Asistencia, México.
- Code of Federal Regulations, 1977, part 600 to 1299, U.S.A. Government printing office, Washington, 40.
- British Pharmacopeia, 1973, Department of Health and Social Security, Londres.
- Farmacopea Oficial de la República Italiana, 1972, 8a. Ed., Vol 1, Ministerio de Sanidad, Roma.
- Farmacopea Francesa, 1965, 8a. Ed., Ministerio de la Salud Pública, París.
- Cámara Nacional de la Industria de Laboratorios Químico Farmacéuticos, Fármacos, 1973, Ed. Muñoz S.A., México, 14.
- The Merck Index, 9a. Ed., 1976, Merck and Co. INC, U.S.A.
- Campbell, D.H., J.S. Garvey, N.E. Cremer, D.H. Sussdorf, Methods in Immunology, 1963, W.A. Benjamin INC, U.S.A., 53.
- K. A. Connors, A Textbook of Pharmaceutical Analysis, 1975, 2a. Edición, John Wiley and Sons, INC., U.S.A.

- Higuchi, T. y E. Brochmann-Hanssen, Pharmaceutical Analysis, 1961, Interscience Publishers, U.S.A.

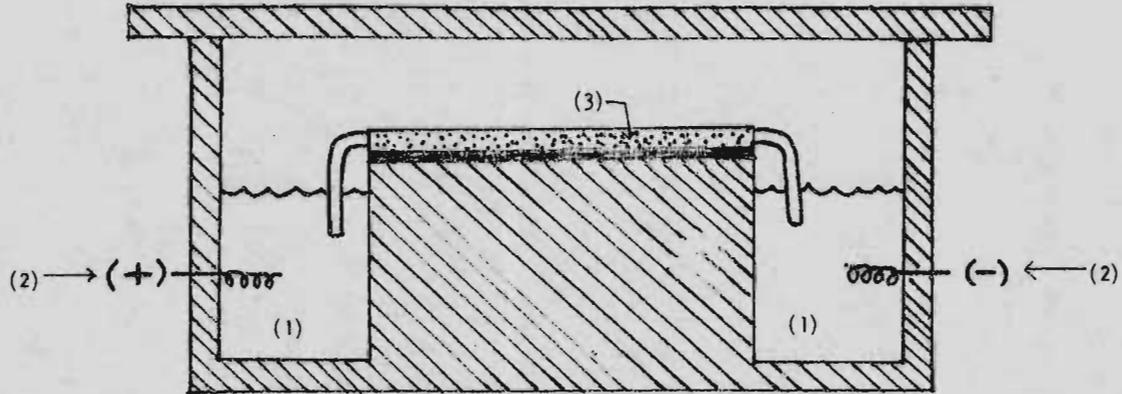
- Kolthoff, I.M. y E.B. Sandell, Textbook of Quantitative Inorganic Analysis, 1959, 3a. Ed. , The MacMillan Co., U.S.A.

- Meloan, C.E. y R.M. Kiser, Problemas y Experimentos de Análisis Instrumental, 1973, Ed. Reverté Mexicana S.A., México, 5.

- Ray U. Brumblay, Análisis Cuantitativo, 1969, C.E.C.S.A., México, 69.

- Información proporcionada en el Instituto Nacional de Higiene, -- S.S.A. , 1979.

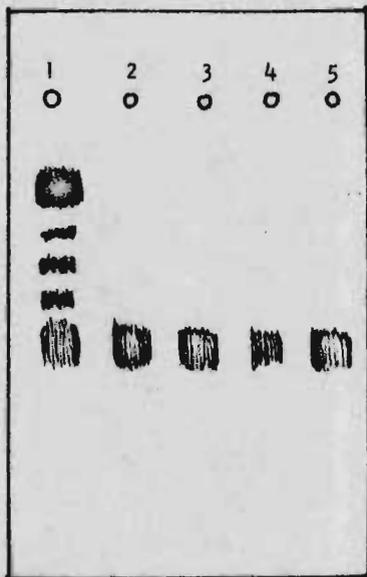
FIGURA I



ESQUEMA DE UNA CAMARA PARA ELECTROFORESIS

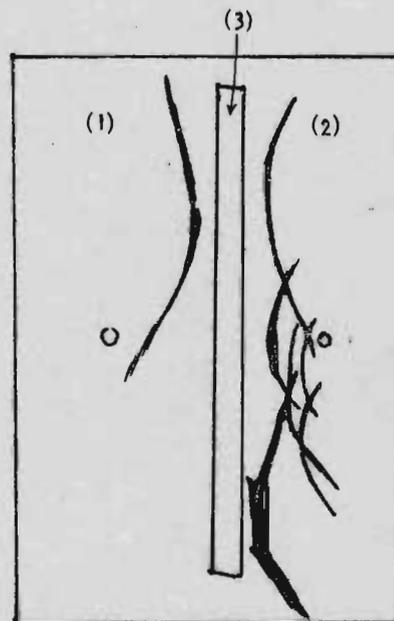
- 1) AMORTIGUADOR
- 2) ELECTRODOS
- 3) PLACA SOPORTE

FIGURA 11



ELECTROFORESIS

- 1) SUERO NORMAL
- 2,3,4,5) SUERO PURIFICADO



INMUNOELECTROFORESIS

- 1) SUERO PURIFICADO
- 2) SUERO NORMAL
- 3) CANAL PARA COLOCAR EL SUERO ANTIHUMANO