

Este informe recoge la opinión colectiva de un grupo internacional de especialistas y no representa necesariamente el criterio ni la política de la Organización Mundial de la Salud.

ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD

SERIE DE INFORMES TECNICOS

Nº 179

NORMAS PARA LAS SUSTANCIAS BIOLOGICAS

3. Normas para la Vacuna Antiamarílica

4. Normas para la Vacuna Anticolérica

Informe de un Grupo de Estudio

	Página
1. Consideraciones generales	3
2. Vacuna antiamarílica	5
3. Vacuna anticolérica	8
Anexo 1. Normas para la vacuna antiamarílica (Normas para las Sustancias Biológicas Nº 3)	13
Anexo 2. Normas para la vacuna anticolérica (Normas para las Sustancias Biológicas Nº 4)	35

ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD

PALAIS DES NATIONS

GINEBRA

1959

**GRUPO DE ESTUDIO
SOBRE NORMAS PARA LA VACUNA ANTIAMARILICA
Y PARA LA VACUNA ANTICOLERICA**

Ginebra, 1-6 de septiembre de 1958

Miembros :

- Dr. M. L. Ahuja, India House, Londres, Inglaterra
Dr. J. Gallut, Institut Pasteur, París, Francia
Dr. D. C. Lahiri, School of Tropical Medicine, Calcuta, India (*Relator para vacuna anticolerica*)
Dr. O. Maaløe, Statens Seruminstitut, Copenhague, Dinamarca (*Presidente*)
Dr. F. N. Macnamara, West African Council for Medical Research, Lagos, Nigeria (*Relator para vacuna antiamarilica*)
Dr. R. Panthier, Institut Pasteur, París, Francia
Dr. W. L. M. Perry, Pharmacology Laboratories, University New Buildings, Edimburgo, Escocia
Dra. Margaret Pittman, National Institutes of Health, Bethesda, Md., Estados Unidos de América (*Vicepresidente*)
Dr. V. L. Troitsky, Instituto de Epidemiología y Microbiología N. F. Gama-leya, Moscú, Unión Soviética
Dr. J. W. Wolff, Instituut voor Tropische Hygiene en Geographische Pathologie, Koninklijk Instituut voor de Tropen, Amsterdam, Países Bajos

Secretaría :

- Dr. N. Ansari, Médico del Servicio de Enfermedades Endemoepidémicas, OMS
Dr. B. K. Bhattacharya, Médico del Servicio de Patrones Biológicos, OMS
Dr. W. A. Collier, Instituut voor Tropische Hygiene en Geographische Pathologie, Koninklijk Instituut voor de Tropen, Amsterdam, Países Bajos (*Consultor*)
Dr. M. J. Freyche, Médico del Servicio de la Cuarentena Internacional, OMS
Dr. R. I. Hood, Jefe del Servicio de la Cuarentena Internacional, OMS
Dr. N. K. Jerne, Jefe del Servicio de Patrones Biológicos, OMS (*Secretario*)
Dr. J. A. Kerr, División de Enfermedades Transmisibles, Organización Panamericana de la Salud (Oficina Regional de la OMS para las Américas), Washington, D.C., Estados Unidos de América
Dr. P. Pollitzer, George Williams Hooper Foundation for Medical Research, University of California Medical Center, San Francisco, Calif., Estados Unidos de América (*Consultor*)
Sr. J. W. Wright, División de Saneamiento del Medio, OMS

PRINTED IN SWITZERLAND

NORMAS PARA LAS SUSTANCIAS BIOLOGICAS

3. Normas para la Vacuna Antiamarílica

4. Normas para la Vacuna Anticolérica

Informe de un Grupo de Estudio

El Grupo de Estudio sobre Normas para la Vacuna Antiamarílica y para la Vacuna Anticolérica se reunió en Ginebra del 1 al 6 de septiembre de 1958.

En nombre del Director General el Dr. P. Dorolle, Director General Adjunto de la Organización Mundial de la Salud, declaró abierta la reunión y dio la bienvenida a los miembros del Grupo.

El Director General Adjunto declaró que la reunión del Grupo de Estudio se había convocado con objeto de definir las condiciones que deben reunir las preparaciones de vacuna antiamarílica y de vacuna anticolérica para que se las pueda considerar como agentes profilácticos inocuos, seguros y eficaces. Si se consigue el fin propuesto, se habrá dado un paso decisivo para el proyecto de la OMS de publicar normas susceptibles de recomendación internacional y de fomentar la uniformidad de los métodos de preparación y ensayo y de las normas aplicables a las sustancias biológicas más importantes.

* * *

1. CONSIDERACIONES GENERALES

El Grupo de Estudio ha tomado nota del informe del Grupo de Estudio sobre Recomendación de Normas para las Sustancias Biológicas (1957)¹ y ha llegado a la conclusión de que las normas que se recomienden para la vacuna antiamarílica y para la vacuna anticolérica pueden ajustarse al esquema propuesto en aquel informe.

En el curso de sus deliberaciones sobre las normas que podrían ser objeto de recomendación internacional, el Grupo de Estudio ha examinado las Normas de la UNRRA para la Preparación y Ensayo de la Vacuna Antiamarílica, que fueron adoptadas en 1945 por el Comité Permanente de Sanidad de dicha Organización² y que hasta ahora han servido de base a la OMS para la aprobación de los laboratorios de preparación

¹ Secretaría de la OMS, documento de trabajo inédito WHO/BS/IR/27

² *Epidem. Inform. Bull.*, 1945, 1, 365

de esa sustancia, y el primer informe del Comité de Expertos en Vacuna Antiamarílica,¹ que contiene las propuestas de revisión de las normas de la UNRRA. El Grupo ha examinado también las Normas Generales para Establecimientos de Preparación y Laboratorios de Inspección, publicado en Normas para las Sustancias Biológicas N^o 1,² las disposiciones del Reglamento Sanitario Internacional acerca de la vacuna antiamarílica,³ las Normas para la Vacuna Antiamarílica establecidas por las autoridades sanitarias de los Estados Unidos de América⁴ y algunos documentos de trabajo.⁵

El Grupo de Estudio ha tenido en cuenta además las deliberaciones del Comité de Expertos en Patrones Biológicos⁶ acerca de la normalización de las vacunas, los antígenos y los sueros anticoléricos, las normas para la vacuna anticolérica adoptadas en diferentes países y los proyectos de normas aplicables a la vacuna antiamarílica y a la vacuna anticolérica, redactados por la Secretaría de la OMS.⁷

El Grupo de Estudio ha llegado a la conclusión de que las Normas Generales para Establecimientos de Preparación y Laboratorios de Inspección enunciadas en las Normas para las Sustancias Biológicas N^o 1² son aplicables a la preparación y la inspección de las vacunas contra la fiebre amarilla y contra el cólera, y de que las normas sobre vacuna antipolio-mielítica enunciadas en las Normas para las Sustancias Biológicas N^o 2⁸ podrían servir de modelo para la redacción de las relativas a las vacunas contra las dos enfermedades citadas.

Enterado de que las secciones de este último proyecto se dividían en una parte impresa en caracteres de mayor tamaño en la que se enuncian

¹ *Org. mund. Salud Ser. Inf. técn.*, 1957, 136

² *Org. mund. Salud Ser. Inf. técn.*, 1959, 178, anexo 1

³ Bonnel, P. H. (1956) *International regulation of yellow fever vaccination*. En: *Yellow fever vaccination*, Geneva, pág. 193. (*Organización Mundial de la Salud: Serie de Monografías N^o 30*). Existe también edición francesa. World Health Organization (1957) *International Sanitary Regulations* (Annotated ed.), Geneva, pág. 35

⁴ United States, Department of Health, Education and Welfare, National Institutes of Health, *Minimum requirements: yellow fever vaccine* (1^a revisión, 18 de mayo de 1949)

⁵ Gallut, J., documento de trabajo inédito WHO/BS/IR/47; Gallut, J., documento de trabajo inédito WHO/BS/IR/48; Lahiri, D. C., documento de trabajo inédito WHO/BS/IR/49; Macnamara, F. N., documento de trabajo inédito WHO/BS/IR/50; Secretaría de la OMS, documento de trabajo inédito WHO/BS/IR/51; Panthier, R., documento de trabajo inédito WHO/BS/IR/52; Lahiri, D. C., documento de trabajo inédito WHO/BS/IR/53; Secretaría de la OMS, documento de trabajo inédito WHO/BS/IR/54; Secretaría de la OMS, documento de trabajo inédito WHO/BS/IR/55; Unión Soviética, documento de trabajo inédito WHO/BS/IR/56; Kerr, J. A., documento de trabajo inédito WHO/BS/IR/57

⁶ *Org. mond. Santé Sér. Rapp. techn.; Wld Hlth Org. techn. Rep. Ser.*, 1954, 86, 7. *Org. mund. Salud Ser. Inf. técn.*, 1958, 147, 12

⁷ Documentos de trabajo inéditos WHO/BS/IR/51, WHO/BS/IR/54 y WHO/BS/IR/55

⁸ *Org. mund. Salud Ser. Inf. técn.*, 1959, 178, anexo 2

las normas definitivas y en otra de caracteres pequeños destinada a las advertencias y a los datos complementarios, el Grupo de Estudio conviene en que esa disposición tipográfica está en consonancia con la finalidad de las normas recomendadas, que es dar a las autoridades sanitarias que lo deseen la posibilidad de incorporar el texto de las normas definitivas, sin necesidad de modificarlo, a las respectivas reglamentaciones nacionales sobre la materia.

Fundándose en los mencionados documentos y teniendo presente la consideración expuesta, el Grupo de Estudio ha redactado los proyectos de normas para la vacuna antiamarílica y para la vacuna anticolérica (véanse los anexos I y II al presente documento).

2. VACUNA ANTIAMARÍLICA

2.1 Normas recomendadas para la vacuna antiamarílica

El Grupo de Estudio ha examinado detenidamente las recomendaciones formuladas en el primer informe del Comité de Expertos en Vacuna Anti-amarílica¹ y ha tomado nota de los siguientes párrafos de ese informe: «la elección de la cepa de virus que haya de utilizarse debe dejarse al buen criterio de las autoridades locales, que tomarán su decisión teniendo en cuenta la frecuencia de la fiebre amarilla en la localidad y la morbilidad resultante. El Comité ha convenido en que más vale practicar la vacunación en masa con vacunas de cualquiera de las dos cepas citadas que abstenerse de vacunar.» Aun reconociendo que esa opinión es acertada, el Grupo de Estudio ha sido del parecer de que, al establecer las normas, sólo debieran tenerse en cuenta las preparaciones que, a juzgar por los datos disponibles, reunieran las máximas condiciones de inocuidad y actividad. El Grupo de Estudio hace constar que, si bien en las normas se menciona un solo tipo de vacuna, eso no quiere decir que no haya otras que, en circunstancias especiales, puedan resultar útiles en las campañas de vacunación en masa.

El Grupo de Estudio ha llegado a la conclusión de que no procedía incluir en las normas ninguna de las vacunas conocidas que se administran por escarificación cutánea. Se funda esa conclusión en el peligro de reacciones postvacunales graves que presenta, especialmente en los niños, el uso de la llamada vacuna Dakar, cuya actividad antigénica está fuera de duda, y en las condiciones de antigenicidad poco satisfactorias de la vacuna para escarificación cutánea preparada con virus de la cepa 17D, que, en cambio, no se sabe que haya dado lugar a ninguna reacción grave. Se ha acordado en consecuencia que las normas (véase el anexo 1) serían exclusivamente aplicables a la vacuna antiamarílica para inoculación subcutánea.

¹ *Org. mund. Salud Ser. Inf. técn.*, 1957, 136

En opinión del Grupo de Estudio, la preparación de vacunas enteramente satisfactorias que puedan administrarse por escarificación cutánea es un asunto de la mayor importancia, pues permitiría reducir el costo de las campañas generales de inmunización y facilitaría las operaciones de vacunación. En consecuencia, el Grupo de Estudio recomienda a la OMS que siga colaborando activamente en los programas de investigación — varios de los cuales están ya en vías de ejecución — encaminados a facilitar la preparación de vacunas satisfactorias para escarificación cutánea. El Grupo de Estudio considera tan importante esta cuestión que ha preparado una serie de propuestas preliminares (anexo 1, apéndice 2, página 33) sobre las modificaciones que probablemente habría que introducir para que las normas para la vacuna antiamarílica puedan aplicarse a las vacunas para escarificación cutánea que reúnan las condiciones debidas. A juicio del Grupo, esas propuestas podrían ser una orientación útil para los investigadores dedicados al estudio del problema.

2.2 Necesidad de establecer un servicio consultivo central

En el curso de sus deliberaciones, el Grupo de Estudio ha llegado a la conclusión de que sería muy conveniente para los laboratorios de preparación de vacuna antiamarílica, para las autoridades sanitarias nacionales y para la OMS, que la Organización estableciera un servicio consultivo central y un grupo de consultores, como primer paso hacia la creación de un laboratorio internacional de referencia. Ese servicio central, reforzado con los necesarios servicios de laboratorio, podría contribuir al mejoramiento y a la coordinación de los actuales métodos de preparación e inspección de la vacuna antivariólica, que, según reconoce el Grupo de Estudio, dejan todavía mucho que desear. Será necesario seguir estudiando esos métodos (sección 2.4) para mejorar mediante revisiones periódicas las Normas para la Vacuna Antiamarílica.

Dada la dificultad de establecer entre los laboratorios de preparación un enlace adecuado en cuestiones técnicas de tanta complejidad, la creación de un servicio central consultivo sería muy bien recibida por numerosos países como un medio de intensificar el libre intercambio de informaciones. El servicio podría además orientar y estimular las investigaciones sobre la preparación de vacunas más perfeccionadas, en particular de una vacuna satisfactoria para escarificación cutánea.

2.3 Atribuciones de la OMS en relación con los certificados internacionales de vacunación contra la fiebre amarilla

Para que los certificados internacionales de vacunación contra la fiebre amarilla sean válidos, es necesario que la vacuna administrada haya sido aprobada por la OMS. Hasta la fecha, la OMS viene supeditando su aprobación al resultado satisfactorio de una investigación muy detenida

sobre el establecimiento preparador y sobre el preparado, cuya práctica se encomienda a laboratorios escogidos por la Organización y a miembros del Cuadro de Expertos de la OMS en Fiebre Amarilla. Una vez concedida, esa aprobación dura indefinidamente. Al deliberar sobre las normas que deberían recomendarse para la vacuna antiamarílica, el Grupo de Estudio ha llegado a la conclusión de que es indispensable encontrar un medio que permita a la OMS comprobar si la vacuna preparada por los laboratorios autorizados sigue siendo aceptable.

El Grupo de Estudio recomienda a la OMS que, a los efectos de la expedición de certificados internacionales válidos de vacunación contra la fiebre amarilla, no apruebe el uso de ninguna vacuna para inoculación subcutánea que no reúna todas las condiciones establecidas en las Normas para la Vacuna Antiamarílica (anexo 1). No siendo posible por ahora recomendar normas para las vacunas que se administran por escarificación cutánea, tampoco lo es establecer una base semejante para su aprobación.

A juicio del Grupo de Estudio, el servicio central consultivo de que antes se ha hecho mención (sección 2.2) podría también ser muy útil como medio de reunir los datos que necesite la OMS para las verificaciones ulteriores de la calidad de las vacunas preparadas por los laboratorios aprobados.

El Grupo de Estudio hace constar que las Normas para la Vacuna Antiamarílica (anexo 1) se han preparado con arreglo al modelo seguido por los otros Grupos de Estudio sobre Normas para las Sustancias Biológicas, con objeto de que puedan servir de base a las autoridades sanitarias de distintos países en la inspección de las operaciones de preparación de esa vacuna. El Grupo ha expresado la esperanza de que ese procedimiento permita en su día dar normas aplicables a todas las vacunas antiamarílicas que se preparen en el mundo. De momento, las atribuciones de la OMS respecto de esos preparados se limitan a la aprobación de las vacunas en relación con la expedición de certificados internacionales válidos de vacunación contra la fiebre amarilla, pero la creación de un servicio central consultivo que pudiera facilitar cepas de virus y reactivos uniformes permitiría a la Organización favorecer, si lo considerase oportuno, una regularidad en la preparación y en la calidad de vacunas muy superior a la que podría conseguirse con la simple aplicación de las Normas para la Vacuna Antiamarílica que se reproducen en el presente informe.

2.4 Recomendaciones relativas a la investigación

El Grupo de Estudio ha tomado nota de las recomendaciones formuladas acerca de los trabajos de investigación en el primer informe del Comité de Expertos en Vacuna Antiamarílica,¹ y del proyecto de emprender varios

¹ *Org. mund. Salud Ser. Inf. técn.*, 1957, 135

estudios en América del Sur sobre la vacunación por escarificación cutánea con preparados de cepa 17D.¹

Se ha convenido en que la importancia de los problemas que plantea ese método de vacunación justifica que se les dé preferencia en los programas de investigación y recomienda a la OMS que siga facilitando y fomentando los estudios sobre esa cuestión.

El Grupo recomienda además que se emprendan los siguientes trabajos :

a) un estudio comparativo sobre la influencia de distintos diluentes en el resultado de las pruebas de actividad, y

b) un estudio comparativo sobre la susceptibilidad de diferentes razas de ratones a la inoculación de virus vacunal ; otro sobre las variaciones de la susceptibilidad de los ratones de una misma raza en función de la edad, el peso, el estado de nutrición y la temperatura ambiente, y otro sobre la influencia del sitio en que se practica la inoculación intracerebral, de la profundidad de ésta y de las variaciones estacionales, sobre la respuesta de los ratones ;

y que se continuaran las investigaciones sobre :

c) la investigación y la valoración de los anticuerpos inmunes específicos de la fiebre amarilla en el hombre y en otros vertebrados de sangre caliente.

3. VACUNA ANTICOLÉRICA

3.1 Normas para la Vacuna Anticolérica

Al preparar las Normas para la Vacuna Anticolérica, el Grupo de Estudio ha convenido en redactarlas de manera que su aplicación quede limitada exclusivamente a las vacunas actualmente en uso, es decir, a las que consisten en una mezcla a partes aproximadamente iguales de suspensiones de microorganismos muertos de los tipos Ogawa e Inaba del *Vibrio cholerae*. En el anexo 2 al presente informe se reproduce el texto de las normas que se proponen para ese tipo de preparados.

Aun no tomando en consideración más que esa clase de vacunas, la diversidad de los métodos actualmente seguidos para su preparación es tan grande que resulta en extremo difícil establecer normas definitivas. Las cepas de *V. cholerae* usadas para la obtención de la vacuna, los métodos seguidos para cultivar y para matar los microorganismos y los sistemas de conservación de la vacuna varían, en efecto, considerablemente. A esas variaciones vienen a sumarse las diferencias en los métodos seguidos para determinar la virulencia de las cepas, el número total de bacterias, la toxicidad y, sobre todo, la actividad (véase la sección 3.2).

¹ Secretaría de la OMS, documento de trabajo inédito WHO/BS/IR/57

Esas diferencias de los métodos de preparación y de la naturaleza de las vacunas han obligado al Grupo de Estudio a redactar las normas dejando al buen criterio de los laboratorios nacionales de inspección muchos detalles de las especificaciones, con objeto de que puedan tenerse en cuenta los métodos seguidos en los establecimientos de preparación de los países respectivos. Ello no obstante, ha sido posible definir ciertas características que deben reunir todas las vacunas para que se las pueda considerar aceptables.

Respecto de la prueba de actividad, para llegar a ese resultado fue necesario idear un método completamente nuevo, que se describe en un apéndice a las Normas. No se sabe todavía si ese método podrá tener aplicación práctica, por lo que el Grupo de Estudio recomienda a la OMS que organice inmediatamente un estudio en colaboración acerca de su utilidad. La nueva técnica se funda en la comparación con las preparaciones internacionales de referencia y el Grupo de Estudio ha formulado ciertas recomendaciones sobre el particular para que las tenga en cuenta el próximo comité de expertos en patrones biológicos que se convoque (véase la sección 3.3).

La elección definitiva de una técnica entre las muchas disponibles y autorizadas en las normas que se proponen dependerá de la eficacia relativa verificada mediante ensayos clínicos de las diferentes vacunas que reúnan las condiciones exigidas en esas normas (sección 3.2). En las circunstancias actuales las normas cuya recomendación se propone podrían, a juicio del Grupo, contribuir a una solución provisional del problema, en espera de que se conozcan los resultados de esos ensayos.

3.2 Recomendación para un estudio internacional sobre la correlación entre los resultados de las pruebas de actividad en el laboratorio y la utilidad preventiva de las vacunas anticoléricas en la práctica

El Grupo hace constar que el estudio en colaboración sobre la nueva prueba de actividad (sección 3.1) tiene carácter exclusivamente preliminar del ensayo clínico, que es imprescindible para verificar si existe una correlación entre la eficacia profiláctica de la vacuna anticolérica y el resultado de las pruebas de actividad en el laboratorio.

El Grupo de Estudio ha tomado nota de que en varios países se estaba procurando asentar sobre bases más seguras la determinación de la actividad, conviene en que la colaboración internacional es no sólo factible sino conveniente en la fase actual de esas investigaciones y recomienda, en consecuencia, que se organice un estudio en el que deberían tomar parte varios laboratorios de distintos países que estuvieran aplicando métodos diferentes. Ese estudio internacional debería organizarse de manera que los datos obtenidos en los distintos laboratorios sean comparables. Conveniría ensayar varios lotes de vacuna, uno de ellos de una vacuna de

referencia (sección 3.3), por los métodos que se citan en las Normas para la Vacuna Anticolérica redactadas por el Grupo de Estudio (en caso de que el estudio en colaboración cuya inmediata organización se propone en la sección 3.1 demostrase su utilidad práctica), y por el método o los métodos de uso corriente en cada laboratorio. La determinación de la actividad, cualquiera que sea la técnica empleada, se practicará también con las vacunas internacionales de referencia, con objeto de valorar la actividad relativa de las preparaciones ensayadas. Los resultados que se obtuvieran en los distintos laboratorios participantes deberían someterse a una evaluación y a un estudio comparativo para que los lotes de vacuna objeto del estudio internacional se puedan clasificar con arreglo a su actividad biológica.

Paralelamente a los estudios de laboratorio convendría proceder a un ensayo práctico que permitiera comparar la actividad biológica de la vacuna, determinada en el laboratorio, con su eficacia profiláctica en el hombre. Fundándose en las evaluaciones preliminares de actividad practicadas en los laboratorios, se emprendería un estudio de experimentación clínica con tres lotes de actividad distinta de las vacunas ensayadas y, a ser posible, en una zona en la que haya epidemias de cólera todos los años. Este ensayo práctico permitiría determinar cuál de las pruebas de actividad guarda una relación más estrecha con la eficacia profiláctica de la vacuna en el hombre.

En consecuencia, el Grupo de Estudio recomienda a la OMS que tome las disposiciones necesarias para organizar el citado estudio internacional, para informarse de sus resultados y para evaluarlos. Si el ensayo clínico diera resultado satisfactorio, sería posible, por primera vez, establecer una clasificación adecuada de las vacunas contra el cólera, fundándose en una prueba de actividad en el laboratorio. Si así ocurriera, esa prueba podría usarse para determinar la importancia de distintos factores de interés para la preparación, la valoración y la conservación de las citadas vacunas.

3.3 Preparaciones Internacionales de Referencia

Considerando que el estudio propuesto sobre las pruebas de actividad en el laboratorio (sección 3.1) tendría por consecuencia una disminución considerable de las existencias de las Preparaciones Internacionales de Referencia, el Grupo de Estudio recomienda que el próximo Comité de Expertos en Patrones Biológicos proceda a la mayor brevedad a adquirir vacunas monoespecíficas contra el cólera en cantidades suficientes para sustituir las actuales Preparaciones Internacionales de Referencia. Convendría que las nuevas preparaciones se ensayaran también en el estudio en colaboración. El Grupo de Estudio propone también que, al mismo tiempo, se constituya una segunda reserva de preparados del mismo origen, tratados y almacenados de la manera más parecida que sea posible y en

cantidad suficiente para utilizarlos más adelante en el ensayo clínico propuesto. Así podría efectuarse una comparación directa entre el resultado de una misma vacuna en las pruebas de laboratorio y en la clínica. Sin embargo, el Grupo de Estudio hace constar que, si el acopio de nuevas preparaciones en las cantidades necesarias pudiese retrasar el comienzo del estudio en colaboración sobre los métodos de ensayo, sería preferible actuar sin demora. En ese caso, convendría que la obtención de las vacunas de referencia para el ensayo clínico y de las nuevas preparaciones internacionales de referencia se llevase a cabo en el mismo laboratorio y en condiciones tan parecidas como fuera posible.

El Grupo de Estudio pide por último al Comité de Expertos en Patrones Biológicos que vea si las existencias de Preparaciones Internacionales de Referencia de sueros aglutinantes monoespecíficos serían suficientes en el caso de que las Normas Recomendadas entrasen en vigor, y que adopte las medidas necesarias para su reposición si ésta fuera necesaria. También propone que el Comité de Expertos en Patrones Biológicos estudie la posibilidad de establecer una preparación internacional de referencia de suero O de *Vibrio cholerae* rugoso.



Anexo 1

NORMAS PARA LA VACUNA ANTIAMARILICA (NORMAS PARA LAS SUSTANCIAS BIOLÓGICAS Nº 3)

	Página
Consideraciones generales	13
Parte A. Normas de fabricación	
1. Definiciones	14
2. Normas generales de fabricación	16
3. Inspección de las operaciones de fabricación	17
4. Envase y recipientes	22
5. Inspección de la vacuna acabada	22
6. Registros	25
7. Muestras	25
8. Rotulación	26
9. Distribución y expedición	27
10. Almacenamiento y fecha de caducidad	27
Parte B. Normas para la inspección nacional	28
Apéndice 1. Protocolo resumido de la fabricación de vacuna antiamarilica	29
Apéndice 2. Modificaciones que probablemente deberán introducirse en las Normas para la Vacuna Antiamarilica formuladas en el anexo 1, con objeto de hacer extensiva su aplicación a las vacunas que se administren por escarificación cutánea	33

Consideraciones generales

La presente recomendación sobre normas aplicables a la vacuna anti-amarilica se refiere exclusivamente a los preparados que se administran por vía subcutánea. Ninguna de las vacunas disponibles para escarificación cutánea reúne las condiciones de inocuidad y de actividad enunciadas en este documento. Las recomendaciones que siguen se basan en los métodos y pruebas que se usan en la actualidad para verificar la inocuidad y la actividad de la vacuna y tendrán que ser objeto de ulteriores revisiones.

Cada una de las secciones siguientes constituye una recomendación. Las partes de cada sección que van impresas en caracteres de mayor tamaño se han redactado de manera que las administraciones sanitarias que lo deseen puedan usarlas como normas nacionales definitivas sin necesidad de introducir modificaciones. Las partes impresas en caracteres pequeños tratan de extremos sobre los cuales se ha juzgado conveniente hacer observaciones.

Convendría que los países que adopten estas normas como base de sus reglamentos nacionales sobre vacuna antiamarílica añadieran una disposición que permitiera introducir modificaciones de detalle en los métodos de preparación siempre que, a juicio de las autoridades nacionales de inspección y de la Organización Mundial de la Salud, la vacuna obtenida por los nuevos procedimientos no fuera inferior desde el punto de vista de la inocuidad y la actividad a la preparada con arreglo a las normas formuladas a continuación.

Los términos « servicio nacional de inspección » y « laboratorio nacional de inspección » se referirán siempre al país donde se fabrica la vacuna.

Parte A. Normas de fabricación

1. Definiciones

1.1 Denominación internacional y denominación común

La denominación internacional será *vaccinum febris flavae*. Como denominación común se usará la equivalente de la internacional en el idioma del país de origen.

La denominación internacional deberá reservarse para las vacunas que se ajusten a las normas que se formulan a continuación.

1.2 Definición descriptiva

Se entenderá por *vaccinum febris flavae* una preparación de virus de la fiebre amarilla viable y modificado, que se ajuste a todas las normas que se formulan a continuación.

1.3 Patrones o preparaciones internacionales de referencia y unidades internacionales

No habiéndose adoptado todavía patrones internacionales ni preparaciones internacionales de referencia de virus vacunal de la fiebre amarilla ni de sueros antiamarílicos, no se dispone de un término de comparación para establecer normas de actividad.

El Comité de Expertos de la OMS en Patrones Biológicos ha tomado medidas para establecer una preparación internacional de referencia de suero antiamarílico.^{1, 2}

El Statens Seruminstitut de Copenhague, Dinamarca,¹ tiene en depósito y distribuye por cuenta de la Organización Mundial de la Salud cierta cantidad de suero liofilizado, de personas no inmunes a la fiebre amarilla.

¹ *Org. mund. Salud Ser. Inf. técn.*, 1958, **147**, 18

² *Org. mund. Salud Ser. Inf. técn.*, 1959, **172**, 16

1.4 Terminología

Lote de siembra : Cantidad de virus de composición uniforme obtenida en una sola operación. En los establecimientos de preparación se entiende por *lote de siembra primaria* el que se usa para la inoculación en los tejidos destinados a la preparación de todos los *lotes de siembra secundaria*. Los *lotes de siembra secundaria* se obtienen sometiendo a un solo pase los lotes de siembra primaria y sirven para la inoculación de los tejidos destinados a la preparación de los *lotes de vacuna*. El procedimiento de obtención indicado recibe el nombre de *sistema de lotes de siembra*.

Lote de vacuna : Cantidad de vacuna acabada y definitivamente envasada que, a partir de alguna fase de la preparación, ha pasado por las mismas operaciones y cuya composición es, por tanto, uniforme.

Lote final : Lote o parte de un lote de vacuna uniforme en cuanto a sus probabilidades de haberse contaminado durante las operaciones de envase y deshidratación. Por tanto, el lote final debe haberse envasado en una sola sesión de trabajo y, si procede, haberse deshidratado de una sola vez.

Vacuna preparada : Vacuna lista para la administración.

Fecha de distribución : Fecha en que el establecimiento preparador distribuye una porción determinada de un lote de vacuna.

Fecha de caducidad : Fecha a partir de la cual no debe usarse la vacuna.

DL₅₀ en el ratón : Cantidad de virus que administrada en inoculación intracerebral produce encefalitis específicas y mortales en el 50 % de los ratones de una variedad muy susceptible y de edad comprendida entre 4 y 6 semanas.

Cepa neurotrópica francesa del virus de la fiebre amarilla : Cepa neuroadaptada del virus de la fiebre amarilla que comúnmente recibe ese nombre. Para obtenerla es necesario practicar muchos pases, y por lo menos los doscientos últimos por inoculación intracerebral en el ratón. La preparación madre del virus se obtiene con una suspensión al 10 % de cerebro de ratón adulto en suero no inmune de hombre o de mono sin diluir inactivado por el calor. La suspensión se clarifica por centrifugación, se liofiliza y se conserva a una temperatura inferior a -20°C . La preparación madre no debe contener menos de 100 000 DL₅₀ en el ratón por cada 0,03 ml de producto rehidratado.

Diluyente para virus de la fiebre amarilla : Solución al 0,75 % de albúmina de buey, fracción V, en un medio líquido isotónico, regulado mediante adición de una solución de fosfato a pH = 7,4 y formado de cloruro sódico y agua purificada con resinas cambiadoras de iones o por destilación en

vidrio. Puede usarse cualquier otro diluyente que, a juicio de las autoridades nacionales de inspección, permita obtener resultados equivalentes.

Suero inmune de referencia : Suero o mezcla de sueros liofilizados y tomados de uno o varios monos inmunizados por lo menos seis meses después de administrarles una sola inyección subcutánea de virus de la cepa neurotrópica francesa o de virus pantotrópico no modificado de la fiebre amarilla. El poder de neutralización de este suero se determinará mediante la prueba descrita en la sección 3.1.4.1 (página 19) por comparación con un suero inmune de referencia establecido al efecto o con la preparación internacional de referencia de suero antiamarílico inmune cuando la haya.

Inmune : Calificativo que se aplica a las personas o animales cuyos sueros dan resultado positivo en la prueba de neutralización del virus de la fiebre amarilla, que se describe en la sección 3.1.4.1 (página 19).

Suero de no inmune referencia : Suero o mezcla de sueros liofilizados de hombre o de mono cuya carencia de anticuerpos específicos de la fiebre amarilla se ha verificado mediante la prueba cuantitativa de neutralización del virus de la fiebre amarilla que se describe en la sección 3.1.4.1 (página 19), por comparación con un suero no inmune de referencia, establecido como el que se menciona en la sección 1.3 (página 14).

No inmune : Calificativo que se aplica a las personas o animales cuyos sueros dan resultado negativo en la prueba de neutralización del virus de la fiebre amarilla que se describe en la sección 3.1.4.1 (página 19).

2. Normas generales de fabricación

Los establecimientos dedicados a la preparación de vacuna antiamarílica se atenderán a las normas generales para los establecimientos de preparación enunciadas en las Normas para las Sustancias Biológicas N^o 1¹ y a las siguientes :

Todas las manipulaciones de cualquier virus o microorganismo distinto del empleado para la obtención de la vacuna se llevarán a cabo en locales completamente independientes, provistos de instalaciones y medios de limpieza y esterilización propios.

Los establecimientos de preparación someterán por escrito a la aprobación de las autoridades nacionales de inspección los métodos que hayan decidido adoptar para la obtención de la vacuna antiamarílica. No podrá introducirse en esos métodos modificación alguna que no haya recibido la aprobación de las citadas autoridades y de la Organización Mundial de la Salud.

¹ *Org. mund. Salud Ser. Inf. técn.*, 1959, 178, anexo 1

3. Inspección de las operaciones de fabricación

3.1 *Inspección de las materias primas*

3.1.1 *Cepas de virus*

Sólo se usarán cepas de virus modificado de la fiebre amarilla de un tipo que no sea transmisible de una persona a otra por la picadura de un insecto.

Se llevará un registro que permita identificar todas las cepas y subcepas usadas para la obtención de la vacuna. Las autoridades nacionales de inspección deberán comprobar que esas cepas y subcepas permiten preparar vacunas inmunógenas.

Deberán usarse virus que protejan contra la fiebre amarilla por un espacio de tiempo que empiece, a más tardar, a los nueve días de la vacunación y no termine antes de los seis años.

Las cepas de uso corriente que reúnen las condiciones establecidas en el presente documento son las denominadas cepas y subcepas 17D de virus de la fiebre amarilla, sometidas a un número de pases no inferior a 200 ni superior a 300 en tejido de embrión de pollo o de embrión de pollo en desarrollo. Mediante ensayos cuidadosamente practicados, se ha comprobado que la cepa 17D determina la formación de anticuerpos protectores contra la fiebre amarilla en la sangre de más del 95 % de las personas que antes de la vacunación carecían de esos anticuerpos.

Las muestras de lotes ensayados de siembra primaria o secundaria de virus de la cepa 17D que hagan falta para la constitución de un lote de siembra primaria destinado a la obtención de vacuna antiamarilica pueden pedirse a los laboratorios especializados directamente, o por conducto de la Organización Mundial de la Salud.*

3.1.2 *Tejidos para la obtención de virus*

El cultivo de los virus necesarios para la obtención de todos los lotes de siembra primaria o secundaria, y de todos los lotes de vacuna, se hará en tejido de embrión de pollo. Los lotes de siembra y los de vacuna no deberán contener ninguna proteína humana ni suero añadidos.

* Los siguientes laboratorios se han ofrecido a facilitar con ese objeto muestras de cepas : Instituto Oswaldo Cruz, Río de Janeiro, Brasil ; Instituto de Estudios Especiales « Carlos Finlay », Bogotá, Colombia ; The Wellcome Research Laboratories, Beckenham, Kent, Inglaterra ; Instituut voor Tropische Hygiene en Geographische Pathologie, Koninklijk Instituut voor Tropen, Amsterdam, Países Bajos ; Federal Laboratory Services, Lagos, Nigeria ; Division of Biologics Standards, National Institutes of Health, Bethesda, Md., Estados Unidos de América.

El método de obtención que se emplee deberá ser en lo esencial el que se describe en las publicaciones correspondientes.¹

Las colonias o granjas avícolas de donde procedan los huevos usados para los cultivos deben estar exentas de microorganismos patógenos susceptibles de ser transmitidos al hombre por la vía de administración de la vacuna.

3.1.3 Sistema de lotes de siembra

La preparación de la vacuna se basará en el sistema de lotes de siembra. Se prepararán lotes de siembra primaria y secundaria.

Inmediatamente después de la recogida y el tratamiento, todos los lotes de siembra se deshidratarán en su recipiente definitivo por congelación en alto vacío y se conservarán en las condiciones óptimas para la estabilidad de cada cepa de virus. Los lotes de siembra deshidratados se conservarán a una temperatura inferior a -50°C . Si por cualquier causa no se va a deshidratar el lote de siembra, habrá que conservarlo a una temperatura constantemente inferior a -70°C .

Los lotes de siembra primaria se deshidratarán de manera que su contenido de agua, determinado por el método del pentóxido de fósforo, sea inferior al 1,0 %.

Es preferible que el grado de humedad de los lotes de siembra deshidratados sea inferior a 0,5 %.

El material que vaya a inocularse en los tejidos usados para la obtención de los lotes de vacuna deberá prepararse con un lote de siembra secundario. El diluyente que se use para la rehidratación o la disolución del virus del lote de siembra no deberá contener ninguna proteína humana ni suero añadidos.

Con el sistema de lotes de siembra se tiene la seguridad de que el virus de la vacuna ha sufrido un solo pase a partir de un lote de siembra de inocuidad verificado mediante todas las pruebas prescritas.

3.1.4 Prueba de inocuidad en el mono de los lotes de siembra primaria y secundaria

Después de introducidos en sus recipientes definitivos, los lotes de siembra primaria y secundaria deberán dar resultado satisfactorio en una

¹ Fox, J. P., Kossobudzki, S. L. y Fonseca da Cunha, J. (1943) *Amer. J. Hyg.*, **38**, 113; Hargett, M. V. y Burruss, H. W. (1945) *Amer. J. trop. Med.*, **25**, 19; Hargett, M. V., Burruss, H. W. y Donovan, A. (1943) *Publ. Hlth Rep. (Wash.)*, **58**, 505; Panthier, R. (1956) *Bull. Soc. Path. exot.* **49**, 616; Penna, H. A. (1956) En: *Yellow Fever Vaccination*, Geneva, pág. 67 (*Organización Mundial de la Salud: Serie de Monografías*, N^o 30) Existe también edición francesa; Smith, H. H. (1951) En: Strode, G. K., ed. *Yellow Fever*, McGraw-Hill, New York, pág. 612; Theiler, M. y Smith, H. H. (1937) *J. exp. Med.*, **65**, 767

prueba practicada en el mono, con objeto de determinar su viscerotropismo y su neurotropismo.

Para esta prueba se utilizarán monos de la especie *Macaca mulatta* (*Macacus rhesus*) o de otra de susceptibilidad y reactividad iguales. Antes de inocularles el virus de siembra, se comprobará que no son inmunes a la enfermedad ni hijos de una mona de inmunidad conocida, que están sanos y que no han sufrido previamente ninguna inoculación por vía intracerebral o intrarraquídea. No han debido sufrir ninguna inoculación con virus neurotrópicos o con antígenos afines a los de la fiebre amarilla. En cada prueba se emplearán 10 monos como mínimo. La dosis de prueba tendrá un volumen de 0,25 ml y una actividad de 5000 DL₅₀ en el ratón, evaluada por el método que se describe en la sección 5.4 (página 24). La inoculación se hará en el lóbulo frontal y los animales se tendrán en observación durante 30 días por lo menos.

3.1.4.1 *Viscerotropismo*

En lo que respecta al viscerotropismo (indicado por la cantidad de virus presente en la sangre), las condiciones que deben exigirse son las siguientes :

A los dos, a los cuatro y a los seis días de la inoculación se tomará suero de cada uno de los monos inoculados y se administrará por inyección intracerebral en porciones de 0,03 ml, sin diluir y en dos o más diluciones de razón 10, a grupos de 6 ratones como mínimo de las mismas características que los usados para la prueba de actividad que se describe en la sección 5.4 (página 24). Deberá comprobarse la presencia de virus por lo menos en una muestra de 0,03 ml de suero de nueve o más monos, pero la actividad del suero no deberá exceder nunca de 500 DL₅₀ ratón por 0,03 ml y sólo en un caso podrá haber más de 100 DL₅₀ ratón en esta misma cantidad de suero.

Se extraerá el cerebro a uno o a varios de los ratones que se hayan inoculado con una de esas muestras positivas de suero y que presenten síntomas de encefalitis específica, y se desleirá en 9 veces su peso de diluyente para virus de la fiebre amarilla. Después de centrifugar la suspensión a unas 2000 revoluciones por minuto durante 10 minutos, el líquido que sobrenada se someterá a la prueba de identificación descrita en la sección 5.1 (página 21).

Para dar como suficiente la cantidad de anticuerpos neutralizantes del virus contenidos en el suero, se seguirá el criterio siguiente :

El número de monos de prueba que no hayan adquirido inmunidad en los 30 días siguientes a la administración de la dosis de prueba no podrá exceder de un 10 %. La presencia de inmunidad se determinará

sometiendo el suero de los animales a la siguiente prueba de neutralización del virus de la fiebre amarilla :

Después de rehidratar el contenido de dos o más recipientes de virus de la cepa neurotrópica francesa, se mezcla con una cantidad de disolvente para virus de la fiebre amarilla igual a 10 veces el volumen inicial de la suspensión de virus en los recipientes. La mezcla se deja en reposo a la temperatura ambiente durante 15 minutos. A continuación se prepara con el mismo disolvente la dilución de virus que haya de usarse en la prueba. Esta dilución se hará de manera que, después de añadirse un volumen igual de suero no inmune y de incubarla a 37°C durante una hora, la mezcla de suero y virus resultante contenga aproximadamente 100 DL₅₀ ratón por 0,03 ml. Seguidamente se mezclan las muestras de cada suero de mono que vaya a ensayarse con un volumen igual de la dilución de prueba del virus, cuidando que ninguna mezcla de suero y virus esté a la temperatura ambiente más de 15 minutos antes de la incubación. Las mezclas de suero y virus se incubarán al baño de María a 37°C durante una hora y se enfriarán después en un baño de agua helada.

Los ratones, que deberán estar sanos, ser de edades comprendidas entre 4 y 6 semanas y de una variedad muy susceptible a la inoculación intracerebral de virus de la fiebre amarilla, se repartirán al azar en grupos de seis animales como mínimo para la inoculación de prueba y de doce, por lo menos, para los grupos testigo.

Se administrarán por inoculación intracerebral 0,03 ml de cada mezcla de suero y virus a 6 ratones como mínimo previamente anestesiados con éter. Las inoculaciones empezarán inmediatamente después de la incubación de las mezclas de suero y virus y se efectuarán con la mayor rapidez posible. Los ratones se tendrán en observación durante 10 días. Sólo se tomarán en consideración para el recuento los animales muertos después del tercer día y cuya muerte pueda atribuirse específicamente a la inoculación. Se considerará que un suero ha dado resultado positivo en la prueba de neutralización del virus de la fiebre amarilla si sobreviven más de los dos tercios de los ratones y si la valoración demuestra que la dosis de prueba del virus contiene más de 50 DL₅₀. El resultado se considerará negativo cuando sobreviva menos de la tercera parte de los ratones y cuando la valoración demuestre que la dosis de prueba contiene menos de 200 DL₅₀. Todos los sueros que den resultados distintos de los dos que se indican volverán a ensayarse tantas veces como sea necesario.

Simultáneamente a la prueba descrita, se efectuarán las dos verificaciones siguientes :

Una determinación de la DL₅₀ con cinco o más diluciones decimales sucesivas del virus mezcladas a partes iguales con suero no inmune de referencia. Las mezclas se incubarán y se inyectarán a ratones del modo antes explicado, pero usando grupos de 12 ratones por lo menos para cada

mezcla, y preparando diluciones en número suficiente para que la mortalidad resultante en los grupos vaya de 0 a 100 %.

Se hará una determinación de la especificidad del virus por valoración de la actividad de un suero inmune de referencia. Para esta valoración se preparan series de seis o más diluciones de razón 4 del suero inmune de referencia en suero no inmune de referencia sin diluir y se añade a cada serie un volumen igual de la dilución de prueba del virus. Las mezclas de suero y virus se incuban y se inyectan a ratones en la forma antes descrita pero usando grupos de 12 ratones como mínimo para cada mezcla, y haciendo diluciones en número suficiente para que la mortalidad resultante en los grupos vaya de 0 a 100 %. El resultado de esta determinación de actividad se comparará con el poder de neutralización conocido del suero inmune de referencia previamente establecido al efecto.

3.1.4.2 *Neurotropismo*

En lo que se refiere al neurotropismo — indicado por la frecuencia de manifestaciones clínicas de encefalitis o por el porcentaje de mortalidad — las condiciones que deben exigirse son las siguientes :

No deberá haber más de un 20 % de monos que presenten síntomas de parálisis o trastornos del equilibrio debidos a encefalitis, vaya ésta seguida o no de la muerte del animal.

El comienzo y la duración de la reacción febril, así como los síntomas y el resultado del examen anatomopatológico, no deben indicar ninguna modificación de las propiedades del virus.¹

3.1.5 *Prueba de esterilidad de los lotes de siembra primaria y secundaria*

Todos los lotes finales de virus de siembra una vez introducidos en sus recipientes definitivos deberán dar resultados satisfactorios en la prueba que se describe en la sección 5.2 (página 23).

3.1.6 *Prueba de inocuidad en el cobayo de los lotes de siembra primaria y secundaria*

Todos los lotes de siembra deben pasar la prueba que se describe en la sección 5.3 (página 24).

3.2 *Precauciones que deben tomarse en la fabricación*

La preparación de vacuna antiamarílica se hará con arreglo a las normas generales enunciadas en la sección 3 de la parte A de las Normas para las Sustancias Biológicas N° 1.²

¹ Fox, J. P. y Penna, H. A. (1943) *Amer. J. Hyg.*, **38**, 152

² *Org. mund. Salud Ser. Inf. técn.*, 1959, **178**, anexo 1

3.3 *Recogida y tratamiento del producto a granel antes de la deshidratación*

Los embriones de pollo inoculados con virus deben estar vivos y con aspecto normal cuando se recojan. La edad de los embriones recogidos se contará a partir de la primera introducción del huevo en la incubadora y no deberá exceder de doce días.

El uso de las cabezas de los embriones para la preparación de la pulpa se deja al criterio del fabricante. No se dan normas sobre la cantidad de disolvente que puede añadirse a la pulpa de embrión o a la suspensión de virus, pero deben observarse las establecidas acerca del contenido de proteína humana y de suero añadido y de la cantidad de nitrógeno proteínico presente en la vacuna acabada y preparada.

4. **Envase y recipientes**

Además de las normas referentes al envase y a los recipientes que se enuncian en la sección 4 de la parte A de las Normas Generales para los Establecimientos de Preparación y Laboratorios de Inspección (Normas para las Sustancias Biológicas N^o 1),¹ se observarán las siguientes :

Los envases definitivos de la vacuna serán de vidrio neutro de calidad superior, en particular por lo que se refiere a la resistencia a los cambios de temperatura y a los golpes.

Antes del envase y otra vez durante la desecación se verá si los recipientes presentan grietas por donde pudiera salirse su contenido y se desecharán todos los envases defectuosos.

Los envases de vacuna acabada se cerrarán a la lámpara.

Lo antes posible después de la recogida la vacuna se desechará por el mismo procedimiento que los lotes de siembra primaria. Si la desecación no se hace como es debido, se corre el riesgo de que el producto se deteriore rápidamente, incluso a 0°C.

Antes de cerrar los envases se practicará en su interior el vacío o se llenarán de nitrógeno seco.

Pueden utilizarse recipientes de una sola dosis o de varias.

5. **Inspección de la vacuna acabada**

5.1 *Prueba de identificación*

La prueba de identificación se practicará por el procedimiento que a continuación se indica, con el contenido de uno o más envases definitivos de cada lote de vacuna, después de reconstituir ésta siguiendo las instruc-

¹ *Org. mund. Salud Ser. Inf. técn.*, 1959, **178**, anexo 1

ciones del fabricante para la obtención de la vacuna preparada para la administración al hombre.

Con la vacuna preparada se hacen diluciones sucesivas de razón 5 como máximo, usando el diluyente para virus de la fiebre amarilla, y se mezclan partes alícuotas de cada dilución de virus con volúmenes iguales de suero inmune de referencia. Otras partes alícuotas de cada dilución se mezclan con volúmenes iguales de suero no inmune de referencia. Después de la incubación a 37°C, cada mezcla de suero y virus se inyecta a un grupo de seis ratones por lo menos, en la forma indicada para la prueba de neutralización del virus de la fiebre amarilla que se describe en la sección 3.1.4.1 (página 19). Todos los ratones inoculados se observarán a diario durante 21 días y se anotarán todas las muertes que se produzcan en los grupos, pero sólo se tendrán en cuenta las que se consideren específicamente debidas a una infección de virus de la fiebre amarilla. Los ratones en los que la parálisis se presente el 21º día se contarán como supervivientes. La dilución de virus que, según los cálculos, deba producir una mortalidad del 50 % después de mezclada con suero no inmune deberá ser superior al décuplo de la que produzca esa misma mortalidad del 50 % una vez mezclada con suero inmune.

5.2 Prueba de esterilidad

El contenido de todos los envases de cada lote final deberá dar resultados satisfactorios en la siguiente prueba de esterilidad bacteriológica :

Tómense al azar muestras del contenido de los envases definitivos de cada lote final. Pruébese su esterilidad bacteriológica, procurando que en estas muestras esté representado todo el contenido extraído del depósito de vacuna a granel. Se ensayarán por lo menos diez envases de cada lote de envasado. Para el ensayo se tomará como mínimo 1,0 ml de cada envase o todo el contenido de éste si es menor de esa cantidad. Las muestras de vacuna se sembrarán en medio líquido con tioglicolato o en cualquier otro medio igualmente apropiado para el crecimiento de microorganismos aerobios y anaerobios, y en el medio de Sabouraud usado para el cultivo de levaduras y hongos. Los medios así sembrados para la demostración de bacterias deben ser incubados a 30°-32°C durante una semana por lo menos ; también se los puede dividir en dos grupos, uno de los cuales se incubará a 35°-37°C y el otro a una temperatura comprendida entre 15° y 22°C durante una semana como mínimo. Los medios de cultivo para la demostración de levaduras y hongos se deben incubar a 20°-25°C durante un periodo mínimo de dos semanas. Si en cualquiera de los cultivos aparece una proliferación de microorganismos, se podrá repetir la prueba con el mismo número de envases. Si se encuentra un mismo tipo de microorganismo en más de una prueba, se desechará el lote final, pero no se autorizará

el uso de ningún lote a menos que en la prueba definitiva no se hayan encontrado microorganismos en ningún cultivo.

En todas las fases de la preparación el producto debe ser estéril, excepto en lo que se refiere al virus de la fiebre amarilla.

Las normas generales de esterilidad de las sustancias biológicas se publicarán en: Normas para las Sustancias Biológicas N^o 6.

5.3 *Prueba de inocuidad en el cobayo*

Inyéctese por vía intraperitoneal a dos cobayos normales de peso comprendido entre 300 y 500 gramos el equivalente de 8 a 10 dosis clínicas de cada lote de vacuna. Los animales deben seguir en buen estado de salud durante 21 días. Si los dos cobayos presentan reacciones se desechará todo el lote de vacuna y si sólo las presenta uno, se repetirá la prueba con tres animales. Si en esta repetición alguno de los tres animales presenta reacciones, se desechará el lote.

5.4 *Prueba de actividad (para determinar el contenido de virus activo en la vacuna)*

Se practicará esta prueba, en la forma que a continuación se indica, con el contenido de tres envases definitivos de cada lote de vacuna, que se tomarán al azar y se ensayarán por separado.

Se obtendrá la vacuna preparada para la administración al hombre con la cantidad y clase de disolvente recomendadas por el establecimiento preparador (véase la sección 8, página 26).

Antes de diluir la vacuna preparada debe dejársela en reposo durante veinte minutos a una temperatura comprendida entre 20 y 30°C.

A continuación se harán diluciones decimales sucesivas de la vacuna preparada, usando disolvente para virus de la fiebre amarilla.

Se administrarán, en inoculación intracerebral, 0,03 ml de cada dilución de vacuna a ratones de una variedad muy susceptible y de edad comprendida entre cuatro y seis semanas, previamente anestesiados con éter. Para cada dilución se usará un grupo de seis ratones como mínimo. Las diluciones se prepararán en número suficiente para que la mortalidad resultante en los grupos vaya de 0 a 100 %.

La inoculación se iniciará inmediatamente después de preparar las diluciones.

Se anotarán todas las muertes sobrevenidas durante un periodo de observación de 21 días, pero sólo se tomarán en consideración para el recuento los animales supervivientes y los que hayan muerto a consecuencia

de una infección típica de virus de la fiebre amarilla. Los ratones en los que la parálisis se presente el 21º día se contarán como supervivientes. La determinación de la actividad de la vacuna preparada debe dar un resultado no inferior a 1000 DL₅₀ ratón por cada dosis individual recomendada por el fabricante para la administración al hombre. (Véase la sección 8, página 25.)

Si el contenido de alguno de los tres envases ensayados diera resultado negativo en la prueba, se desechará el lote de vacuna. Si entre los valores de la actividad obtenidos para los tres recipientes el mayor fuera más de 300 veces más grande que el menor, se ensayarán siete envases más en la forma indicada, y si alguno de ellos no diera resultado satisfactorio en la prueba, se desechará el lote de vacuna.

La actividad de cada lote de vacuna que haya dado resultados satisfactorios en esta prueba, se expresará por la media geométrica de los valores obtenidos en DL₅₀ ratón por dosis clínica.

5.5 Contenido de nitrógeno proteínico

Ninguna dosis clínica de vacuna preparada debe contener más de 0,25 mg de nitrógeno proteínico.

6. Registros

Además de las normas enunciadas en la sección 6 de la parte A de las Normas Generales para Fábricas y Laboratorios de Inspección (Normas para las Sustancias Biológicas N° 1),¹ se observarán las siguientes:

Se llevarán registros de todos los lotes de siembra y de todos los lotes de vacuna preparados en cada establecimiento cualquiera que haya sido el resultado de las pruebas de inocuidad y de actividad.

Los registros se llevarán con arreglo a un modelo aprobado al efecto por las autoridades nacionales de inspección.

Convendría llevar tres clases de registros: *a*) para los lotes de siembra primaria, *b*) para los lotes de siembra secundaria, y *c*) para los lotes de vacuna. En cada uno de esos grupos los lotes se numerarán consecutivamente, método que es de recomendar porque permite comprobar más fácilmente la uniformidad de todos los lotes preparados (véase el apéndice 1).

7. Muestras

Además de las normas enunciadas en la sección 7 de la parte A de las Normas Generales para Fábricas y Laboratorios de Inspección

¹ *Org. mund. Salud Ser. Inf. técn.*, 1959, 178, anexo 1

(Normas para las Sustancias Biológicas N^o 1),¹ se observarán las siguientes :

Además de las muestras de lotes de vacuna, los laboratorios preparadores conservarán muestras de todos los lotes de siembra, en las mismas condiciones que el resto de esos lotes, hasta la fecha de caducidad de todos los lotes de vacuna que se hayan preparado con ellos.

8. Rotulación

En los rótulos impresos directamente sobre los envases o en las etiquetas pegadas a éstos se harán constar, por lo menos, las indicaciones siguientes :

Razón social y dirección del establecimiento preparador, abreviados si es necesario ;

las palabras *vaccinum febris flavae*, la denominación común del preparado o ambas cosas ;

el número del lote de vacuna ;

la fecha de caducidad del preparado.

Además de esas indicaciones, se harán constar en el rótulo de cada envase, en las etiquetas de las cajas de uno o varios envases o en el prospecto que acompañe a éstos, los siguientes datos complementarios :

Declaración de que la vacuna reúne las condiciones establecidas en el presente documento ;

las palabras « vacuna de virus vivo de la fiebre amarilla preparada en... », seguidas de la indicación del tejido en que se ha cultivado el virus ;

las condiciones recomendadas para el almacenamiento y el transporte del preparado (si a juicio del establecimiento preparador el transporte a una temperatura superior a la recomendada puede ser perjudicial para la actividad de la vacuna, se hará constar así) ;

la clase y cantidad de disolvente que debe usarse para reconstituir la vacuna ;

la dosis individual recomendada y la vía de administración (por inyección subcutánea) ;

la advertencia : « la dosis es idéntica para las personas de todas las edades » ;

las instrucciones para la administración y la advertencia de que la

¹ *Org. mund. Salud Ser. Inf. técn.*, 1959, **178**, anexo 1

vacuna preparada no puede usarse después de transcurrida una hora desde el momento en que se abre el envase.

También puede advertirse que la vacuna preparada se debe conservar a una temperatura próxima a 0°C. En el prospecto se harán constar además las contraindicaciones de la vacunación y las reacciones que ésta puede producir.

Las normas que anteceden tienen carácter provisional y se han enunciado en espera de que se formulen las normas generales de rotulación aplicables a todas las sustancias biológicas.

9. Distribución y expedición

Se observarán las normas enunciadas en la sección 9 de la parte A de las Normas Generales para Fábricas y Laboratorios de Inspección (Normas para las Sustancias Biológicas N° 1).¹

10. Almacenamiento y fecha de caducidad

10.1 Condiciones de almacenamiento

Hasta el momento de la distribución por el establecimiento preparador todas las vacunas se conservarán a una temperatura constantemente inferior a -5°C.

A ser posible, el almacenamiento debe hacerse a una temperatura inferior a -25°C pero, teniendo en cuenta que la conservación a esa temperatura de productos insuficientemente deshidratados puede impedir la deterioración que se produciría a temperaturas superiores, deben guardarse siempre algunas ampollas a una temperatura más alta con objeto de apreciar la estabilidad del preparado a las temperaturas a que puede estar expuesto después de la expedición.

El establecimiento preparador indicará las condiciones de almacenamiento y transporte que deben observarse para que la vacuna preparada se ajuste a las normas de actividad hasta la fecha de caducidad que figure en el rótulo.

La vacuna distribuida debe conservarse de ordinario a una temperatura inferior a 4°C, pero pueden permitirse temperaturas superiores durante un corto espacio de tiempo. Ello no obstante, si la temperatura de conservación está comprendida entre 0 y 4°C, la vacuna puede perder una parte considerable de su actividad en el espacio de un año.² Por eso, si hay que conservar la vacuna a esa temperatura durante más de tres meses, su grado de actividad inicial debe ser bastante alto para ajustarse a las normas enunciadas en la presente sección.

¹ *Org. mund. Salud Ser. Inf. técn.*, 1959, **178**, anexo 1

² Burruss, H. W. y Hargett, M. V. (1947) *Publ. Hlth Rep. (Wash.)*, **62**, 940; Fox, J. P. y Gard, S. (1940) *Am. J. Trop. Med.*, **20**, 447; Hahn, R. G. y Bugher, J. C. (1953) *J. Immunol.*, **70**, 352

10.2 *Fecha de caducidad*

La fecha de caducidad de la vacuna no debe ser posterior en más de 18 meses a la fecha de la última prueba de actividad que haya dado resultados satisfactorios, entendiéndose por fecha de la prueba de actividad la de inoculación de la vacuna a los animales de experimentación. La fecha de caducidad no podrá tampoco ser posterior en más de 12 meses a la de expedición de la vacuna por el establecimiento preparador.

Parte B. Normas para la inspección nacional

1. Normas generales

Se observarán las normas generales para laboratorios de inspección enunciadas en la parte B de las Normas Generales para Fábricas y Laboratorios de Inspección (Normas para las Sustancias Biológicas N^o 1).¹

¹ *Org. mund. Salud Ser. Inf. técn.*, 1959, 178, anexo 1

Apéndice 1

PROTOCOLO RESUMIDO DE LA FABRICACIÓN DE VACUNA ANTIAMARÍLICA

A. LOTE DE SIEMBRA PRIMARIA O SECUNDARIA

Razón social y dirección del laboratorio preparador

Número de referencia del lote en el registro del laboratorio

Fecha en que se terminó la preparación

Indíquese si el lote de siembra reúne las condiciones recomendadas

Datos sobre las operaciones de preparación

1. Clase de virus con que se han inoculado los tejidos usados en la preparación del lote :
 - a) cepa y subcepa
 - b) número de pases
 - c) origen y número de referencia
 - d) observaciones
2. Fecha de la recogida
3. Número de envases llenados
4. Condiciones de almacenamiento

Datos sobre las pruebas de inocuidad

1. *Prueba de inocuidad en el mono*
 - a) fecha en que se inoculó a los monos
 - b) dilución del lote de siembra rehidratado que se ha usado para la inoculación
 - c) Determinación del título del material utilizado para la inoculación (prueba en el ratón)

<i>Dilución en que se ha inoculado el virus</i>	<i>Tasa de mortalidad (TM) (Número de ratones/número total de ratones)</i>	<i>Promedio del periodo de supervivencia (PPS) de los ratones muertos en la prueba *</i>
1		
1 : 10		
1 : 10 ²		
1 : 10 ³		
1 : 10 ⁴		
1 : 10 ⁵		
Dilución mediana calculada		Número de DL ₅₀ ratón administradas a cada mono

* Calcúlese sumando el número de días que han sobrevivido, a contar desde el de la inoculación, todos los ratones muertos de encefalitis específica del cuarto al 21° día después de sta, y dividiendo la suma por el número de ratones muertos.

d) Datos sobre los monos

Mono	Peso kg	Días transcurridos hasta la aparición del virus en el suero	Título máximo del virus en el suero	Parálisis *	Muerte *	Aparición de la inmunidad *
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						

* Poner «sí» o «no»

- e) Prueba de identificación Fecha de la prueba
- (i) Título de la mezcla de suero inmune y virus
- (ii) Título de la mezcla de suero no inmune y virus

2. Prueba de esterilidad Fecha de la prueba

- a) Número de envases examinados
- b) Número de envases contaminados
- c) Observaciones

3. Prueba de inocuidad en el cobayo Fecha de la prueba

- a) Número de animales inyectados
- b) Número de animales que presentaron reacción
- c) Observaciones

4. Otras pruebas de inocuidad

5. Humedad de las ampollas Fecha de la prueba

- a) Método de determinación empleado
- b) Número de ampollas examinadas
- c) Porcentaje de humedad determinado
- d) No se realizó la prueba

6. Observaciones

Firma del Director del laboratorio preparador Fecha

Observaciones del inspector

Firma del inspector Fecha

B. LOTE DE VACUNA

Razón social y dirección del laboratorio preparador
 Número de referencia del lote en el registro del laboratorio
 Fecha en que se terminó la deshidratación
 Indíquese si el lote de vacuna reúne las condiciones recomen-
 dadas

Datos sobre las operaciones de preparación

1. Clase de virus con que se han inoculado los tejidos usados en la preparación del lote:
 - a) cepa y subcepa
 - b) número de pases
 - c) lugar de origen y número de referencia del lote de siembra secundaria
2. Fecha de la recogida
3. Fecha de la desecación
4. Envases (indíquese si se ha practicado el vacío o se han llenado con nitrógeno seco)
5. Número de envases llenados
6. Dosis clínica recomendada
7. Dilución de las preparaciones de tejidos o extractos usados para cultivar el virus y presentes en la vacuna preparada

Datos sobre las pruebas de actividad

Fecha de la prueba

Tasa de mortalidad (TM) y promedio del periodo de supervivencia (PPS) en los ratones inoculados con vacuna rehidratada a las diluciones que se indican :

Número de la ampolla	Sin diluir		1:10		1:10 ²		1:10 ³		1:10 ⁴		1:10 ⁵	
	TM	PPS	TM	PPS	TM	PPS	TM	PPS	TM	PPS	TM	PPS
1												
2												
3												

Número de la ampolla	Título	Número de DL ₅₀ ratón por dosis clínica	Media geométrica de las DL ₅₀ ratón por dosis clínica
1	
2		
3		

Indíquese, a ser posible, la disminución de actividad consiguiente a la desecación de la vacuna

Datos sobre las pruebas de inocuidad

1. *Prueba de esterilidad del lote de vacuna a granel* Fecha de la prueba

.....

2. *Prueba de esterilidad* Fecha de la prueba

a) número de lotes finales examinados

b) número de envases examinados por lote

c) número de envases contaminados

d) observaciones

3. *Prueba de inocuidad en el cobayo* Fecha de la prueba

a) número de animales inyectados

b) número de animales que presentaron reacción

c) observaciones

4. *Prueba de identificación* Fecha de la prueba

a) título de la mezcla de suero inmune y virus

b) título de la mezcla de suero no inmune y virus

c) Observaciones

5. *Contenido en nitrógeno proteínico* Fecha de la prueba

.....

6. *Observaciones*

Firma del Director del
laboratorio preparador

Fecha

.....

Observaciones del inspector

Fecha

Firma del inspector

.....

Apéndice 2

Modificaciones que probablemente deberán introducirse en las Normas para la Vacuna Antiamarílica formuladas en el anexo 1, con objeto de hacer extensiva su aplicación a las vacunas que se administren por escarificación cutánea

Las vacunas antiamarílicas para escarificación cutánea tendrán que reunir, en general, las mismas condiciones que los preparados que se administran por inyección subcutánea.

Sin embargo, convendría introducir algunas modificaciones, como las siguientes :

a) Es posible que además de las cepas derivadas de la 17 D haya otras que den resultado satisfactorio.

b) Los lotes de siembra y los lotes de vacuna se podrían cultivar en tejidos o en animales distintos del embrión de pollo. Los animales de que se obtengan estos tejidos tendrán que estar exentos de gérmenes patógenos que puedan transmitir enfermedades al hombre por escarificación cutánea. Sería necesario establecer pruebas de carácter no específico para investigar la presencia de gérmenes patógenos en las colonias de animales, y pruebas especiales para la identificación de determinados gérmenes.

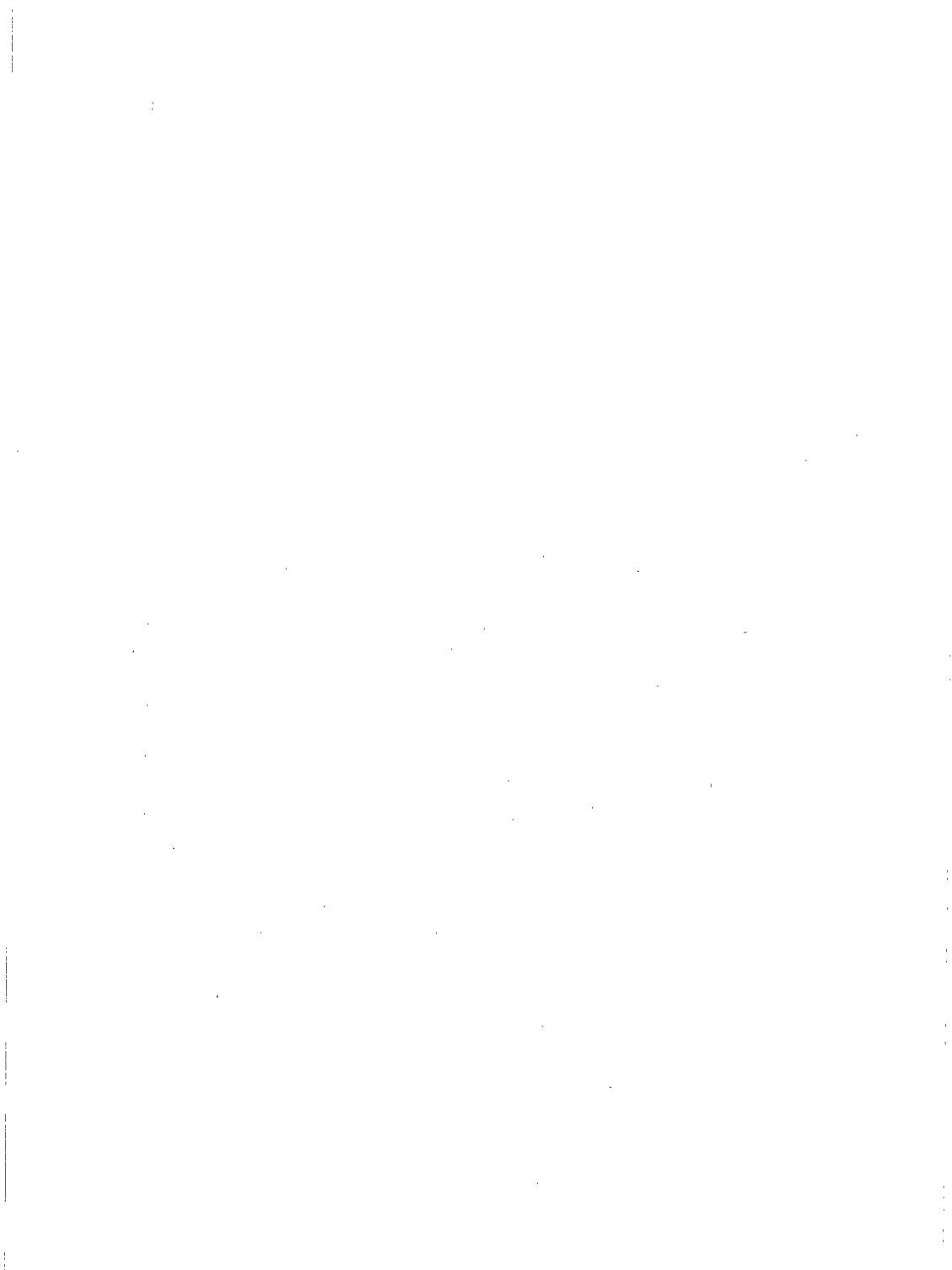
c) Podría ser necesario introducir modificaciones de detalle en la preparación de la vacuna para la prueba de actividad.

d) La *vacuna preparada* para la escarificación cutánea tendría que contener más de 500 000 DL₅₀ por ml.

e) No sería necesario establecer ninguna norma acerca del contenido de nitrógeno proteínico de la vacuna preparada.

f) En el prospecto que acompañara a la vacuna habría que indicar las especies animales y la clase de tejido usados para cultivar el virus.

g) Habría que modificar algunos detalles de los modelos de protocolos resumidos de producción.



Anexo 2

NORMAS PARA LA VACUNA ANTICOLÉRICA (NORMAS PARA LAS SUSTANCIAS BIOLÓGICAS N° 4)

	Página
Consideraciones generales	35
Parte A. Normas de fabricación	
1. Definiciones	36
2. Normas generales de fabricación	38
3. Inspección de las operaciones de fabricación	38
4. Envase y recipientes	42
5. Inspección de la vacuna acabada	43
6. Registros	45
7. Muestras	45
8. Rotulación	46
9. Distribución y expedición	46
10. Almacenamiento y fecha de caducidad	46
Parte B. Normas para la inspección nacional	
1. Normas generales	47
2. Pruebas que deben aplicar los laboratorios nacionales de inspección del país productor de la vacuna	47
3. Licencia de circulación y certificado de inspección	47
4. Prueba de vacunación anterior a la distribución del preparado	48
Apéndice. Pruebas de actividad propuestas	48

Consideraciones generales

Resulta difícil recomendar normas internacionales para la vacuna anticolérica por la diversidad de los métodos de preparación y de ensayo seguidos en los países. Las principales variaciones se refieren a las cepas usadas para la obtención de la vacuna, y sobre todo a su grado de virulencia, a los métodos seguidos para matar los vibriones, a los agentes de conservación de la vacuna, a la concentración de vibriones en la vacuna acabada y a las pruebas de valoración de su actividad biológica. Las recomendaciones que siguen se basan en los métodos actualmente usados y será necesario revisarlas ulteriormente.

Cada una de las secciones siguientes constituye una recomendación. Las partes de cada sección que van impresas en caracteres de mayor tamaño se han redactado de manera que las administraciones sanitarias que lo deseen puedan usarlas como normas nacionales definitivas sin necesidad de introducir modificaciones. Las partes impresas en caracteres pequeños

tratan de extremos sobre los cuales se ha juzgado conveniente hacer observaciones.

Convendría que los países que adopten estas normas como base de sus reglamentos nacionales sobre vacuna anticolérica, añadieran una disposición que permitiera introducir modificaciones de detalle en los métodos de preparación siempre que, a juicio de las autoridades nacionales de inspección, la vacuna obtenida por los nuevos procedimientos no fuera inferior desde el punto de vista de la inocuidad y la actividad a la preparada con arreglo a las normas que se formulan a continuación. En esos casos, la decisión adoptada debe ponerse en conocimiento de la Organización Mundial de la Salud.

Los términos «servicio nacional de inspección» y «laboratorios nacionales de inspección» se referirán siempre al país en el que se fabrica la vacuna.

Parte A. Normas de fabricación

1. Definiciones

1.1 *Denominación internacional y denominación común*

La denominación internacional será *vaccinum cholerae*. Como denominación común se usará la equivalente de la internacional en el idioma del país de origen.

La denominación internacional debe reservarse para las vacunas que reúnan las condiciones que se formulan más adelante.

1.2 *Definición descriptiva*

Se entenderá por *vaccinum cholerae* una suspensión acuosa de *Vibrio cholerae* de los tipos Inaba y Ogawa, en partes aproximadamente iguales, cultivado en un medio idóneo y muertos por un procedimiento adecuado. La preparación deberá reunir todas las normas que se formulan más adelante.

La preparación puede contener agentes de conservación y coadyuvantes adecuados y puede expendirse en forma liofilizada.

1.3 *Patrones o preparaciones internacionales de referencia y unidades internacionales*

Las siguientes Preparaciones Internacionales de Referencia de antígenos del cólera y de vacunas y sueros anticoléricos se

establecieron en 1953,¹ pero no se han fijado las unidades internacionales de ninguna de ellas.

Preparación Internacional de Referencia de Antígeno del Cólera (Inaba):

en ampollas de unos 100 mg de antígeno desecado

Preparación Internacional de Referencia de Antígeno del Cólera (Ogawa):

en ampollas de unos 100 mg de antígeno desecado

Preparación Internacional de Referencia de Vacuna Anticolérica (Inaba):

en ampollas de 20 mg de vacuna desecada ($1,6 \times 10^{10}$ microorganismos por ampolla)

Preparación Internacional de Referencia de Vacuna Anticolérica (Ogawa):

en ampollas de 20 mg de vacuna desecada ($1,6 \times 10^{10}$ microorganismos por ampolla)

Preparación Internacional de Referencia de Suero Anticolérico Aglutinante (Inaba):

en ampollas de 0,6 ml de suero monoespecífico

Preparación Internacional de Referencia de Suero Anticolérico Aglutinante (Ogawa):

en ampollas de 0,6 ml de suero monoespecífico

Preparación Internacional de Referencia de Opacidad (establecida también en 1953)¹:

en ampollas de 20 ml de una suspensión acuosa de partículas de vidrio Pyrex de tamaño aproximadamente igual que las bacterias. La opacidad de esa suspensión corresponde por definición a 10 unidades internacionales de opacidad por ml, y a partir de ella pueden obtenerse por dilución suspensiones de menor número de unidades internacionales de opacidad.

Todas las preparaciones internacionales de referencia citadas se conservan en el Laboratorio Internacional de Patrones Biológicos del Statens Seruminstitut de Copenhague (Dinamarca), que distribuye gratuitamente muestras a los laboratorios nacionales de patrones biológicos que las soliciten. Las preparaciones internacionales de referencia se destinan al calibrado de preparaciones nacionales de referencia. Estas últimas pueden usarse en sustitución de las internacionales en todos los casos en que así se indica en las normas que se formulan más adelante.

Un Comité de Expertos en Patrones Biológicos² pidió al Statens Seruminstitut que adquiriera lo antes posible cantidades suficientes de vacuna anticolérica monoespecífica para sustituir las actuales preparaciones internacionales de referencia y para utilizarlas más adelante en ensayos prácticos.

¹ *Org. mond. Santé Sér. Rapp. techn.*, 1954, **86**, 7; *Wld Hlth Org. Techn. Rep. Ser.*, 1954, **86**, 7

² *Org. mund. Salud Ser. Inf. técn.*, 1959, **172**, 13

Se están adoptando medidas para sustituir las actuales preparaciones internacionales de referencia de sueros anticoléricos aglutinantes, y para establecer una Preparación Internacional de Referencia de Suero Anticolérico O Rugoso.

2. Normas generales de fabricación

Además de las normas generales de preparación enunciadas en las Normas para las Sustancias Biológicas N^o 1,¹ los establecimientos dedicados a la preparación de vacuna anticolérica deberán observar las siguientes:

Los establecimientos preparadores someterán por escrito a la aprobación de las autoridades nacionales de inspección los métodos que hayan decidido adoptar para la obtención de las vacunas anticoléricas. No podrá introducirse en esos métodos modificación alguna que no haya recibido la aprobación de las citadas autoridades.

3. Inspección de las operaciones de fabricación

3.1 Inspección de las materias primas

3.1.1 Cepas de *Vibrio cholerae*

Se usará una mezcla de cepas de *Vibrio cholerae* de los tipos Inaba y Ogawa que desde el punto de vista de los caracteres morfológicos, de cultivo, bioquímicos, hemolíticos, serológicos y patógenos de dicho vibrión en la fase lisa de su desarrollo reúnan las condiciones que a continuación se indican. Podrá emplearse cualquier cepa que reúna las condiciones establecidas en la presente sección y que permita obtener una vacuna conforme a las de las demás secciones en este documento.

a) Caracteres morfológicos: Tómense frotis de los cultivos de las cepas elegidas después de incubados a 37°C por espacio de 18 a 24 horas en un medio nutritivo adecuado y ajustado a pH 8,0 aproximadamente, tíñanse por el método de Gram y examínense al microscopio. Los vibriones deben aparecer como bastoncitos Gramnegativos, ligeramente curvos, de tamaño y forma regulares.

b) Condiciones de cultivo: Las cepas elegidas se cultivarán en agar nutritivo ajustado a pH 8,0 aproximadamente. El medio de cultivo puede contener sales biliares en proporción de 0,5%. Al cabo de 18 a 24 horas de incubación las colonias deben ser lisas, translúcidas y de aspecto típico.

c) Caracteres bioquímicos: Las cepas que se elijan se cultivarán en una serie de medios a base de agua y peptona, que contengan los distintos azúcares necesarios para la identificación del *Vibrio cholerae*. Al cabo de

¹ *Org. mund. Salud Ser. Inf. técn.*, 1959, 178, anexo 1

18 a 24 horas de incubación se observarán las reacciones producidas. Se considerará que una cepa es adecuada si provoca la fermentación de la manosa y la sacarosa con producción de ácido pero no de gas, y sin dar lugar a la fermentación de la arabinosa.

d) Propiedades hemolíticas: Las cepas elegidas se incubarán a 37°C durante 24 horas en caldo nutritivo ajustado a pH 8,0 aproximadamente y se mezclarán después cuidadosamente a partes iguales varias porciones de este cultivo y una suspensión al 5% de eritrocitos de carnero. Las mezclas se incubarán a 37°C durante dos horas y se dejarán en reposo en el frigorífico durante una noche. El resultado debe indicar que las cepas no son hemolíticas.

e) Caracteres serológicos: Las cepas elegidas deben presentar una aglutinación específica en presencia del antisuero O grupo 1 no diferencial del cólera. Una suspensión de vibriones coléricos vivos valorada por el método de aglutinación en portaobjeto en comparación con las Preparaciones Internacionales de Referencia de Suero Anticolérico Aglutinante, Inaba y Ogawa, o con las preparaciones nacionales de referencia correspondientes, no debe presentar en cada caso un título de aglutinación inferior a 1:100. Si la misma suspensión de microorganismos vivos se ensaya con suero anticolérico O rugoso, no debe producirse aglutinación.

f) Estabilidad en suspensión: Una suspensión en solución salina fisiológica de las cepas previamente incubadas a 37°C por espacio de 18 a 24 horas en agar nutritivo ajustado a pH 8,0, aproximadamente, debe conservar su estabilidad por lo menos durante cinco horas a la indicada temperatura.

g) Patogenicidad: La virulencia de las cepas elegidas se determinará administrando en inyección intraperitoneal a cobayos de 200 a 500 gramos de peso suspensiones acuosas de cultivos incubados a 37°C por espacio de 3 a 5 horas. El número de microorganismos inyectados se determinará en la forma que se describe en la sección 3.3.7 (página 41). Las cepas deben ser bastante virulentas para que 4×10^9 microorganismos como máximo produzcan la muerte del cobayo antes de transcurridas 72 horas desde el momento de la inyección.

La virulencia de las cepas elegidas debería determinarse además en una variedad de ratones muy susceptibles a la enfermedad. Con ese objeto, los vibriones deben cultivarse a 37°C por espacio de 3 a 5 horas para que la mayoría de ellos estén en la fase de multiplicación logarítmica. Se evitará preparar una suspensión de vibriones en mucina. La susceptibilidad de los ratones varía mucho de unas especies a otras y el número de microorganismos necesario para producir la muerte de un animal dependerá por tanto de la clase de ratones de que se disponga en el laboratorio.

Las cepas de vibriones pueden conservarse por liofilización, pero convendría usar, además de las cepas conservadas por

ese procedimiento, una o varias aisladas durante una epidemia de cólera reciente. Las muestras de cepas recién aisladas de *Vibrio cholerae* pueden solicitarse de los laboratorios especializados,* directamente o por conducto de la Organización Mundial de la Salud.

3.1.2 Medio de cultivo para la obtención de vibriones

El medio usado para el cultivo de los vibriones puede ser indistintamente sólido o líquido.

Si se usa un medio líquido que haya de formar parte de la vacuna acabada, es imprescindible que esté exento de ingredientes que puedan producir reacciones tóxicas o alérgicas en el hombre.

3.2 Precauciones que deben tomarse en la fabricación

La preparación de la vacuna anticolérica se hará con sujeción a las normas generales enunciadas en la sección 3 de la parte A de las Normas Generales para Fábricas y Laboratorios de Inspección (Normas para las Sustancias Biológicas N^o 1).¹

3.3 Inspección de los preparados monovalentes

3.3.1 Duración del cultivo

Los microorganismos se cultivarán a 37°C durante el periodo de tiempo que decidan las autoridades nacionales de inspección a propuesta del laboratorio preparador.

3.3.2 Inspección de la pureza

Inmediatamente antes de matar los microorganismos se comprobará la pureza de los cultivos tomando muestras de los frascos y examinándolas por ver si reúnen las condiciones morfológicas y de cultivo indicadas en los incisos *a*) y *b*) de la sección 3.1.1 (página 38).

3.3.3 Procedimiento para matar los vibriones recogidos

Después de tomar las muestras para la comprobación de la pureza se matarán los vibriones coléricos por el procedimiento que decidan las

* Los siguientes laboratorios se han ofrecido a facilitar con ese objeto muestras de cepas: The Wellcome Research Laboratories, Beckenham, Kent, Inglaterra; Institut Pasteur, París, Francia; Calcutta School of Tropical Medicine, Calcutta, India; Central Research Laboratory, Kasauli, Punjab, India; Haffkine Institute, Bombay, India; Department of Microbiology, University of Chicago, Ill., Estados Unidos; Walter Reed Army Institute of Research, Washington, D. C., Estados Unidos.

¹ *Org. mund. Salud Ser. Inf. técn.*, 1959, 178, anexo 1

autoridades nacionales de inspección a propuesta del laboratorio preparador.

3.3.4 *Verificación del procedimiento para matar los vibriones*

Siempre que el laboratorio preparador decida usar un nuevo agente para matar los vibriones, cambie de cepa de *Vibrio cholerae*, o modifique otras condiciones importantes, se practicará una prueba comparativa de la aglutinabilidad de los microorganismos antes y después de matarlos determinando el título de las preparaciones internacionales de referencia de sueros anticoléricos aglutinantes Inaba y Ogawa o de las preparaciones nacionales de referencia equivalentes. Si los títulos resultantes con los microorganismos muertos son la cuarta parte o menos que los obtenidos con los microorganismos vivos, no podrá usarse el nuevo procedimiento.

3.3.5 *Verificación del paso de la variedad lisa a la rugosa y de la estabilidad de la suspensión*

Una vez recogidos los microorganismos del cultivo se tomarán sendas muestras al azar, de una misma suspensión, antes y después de matar los vibriones, con objeto de determinar la aglutinabilidad de éstos en presencia de suero anticolérico O rugoso y la estabilidad de la suspensión en solución salina fisiológica, por los procedimientos descritos en los incisos e) y f) de la sección 3.1.1 (página 39). Si los vibriones se aglutinan con el suero anticolérico O rugoso o si forman una suspensión inestable, no se podrán usar para la obtención de la vacuna.

Se basa esta recomendación en el hecho, sistemáticamente observado, de que las preparaciones que contienen elementos rugosos y las que forman suspensiones salinas inestables no protegen satisfactoriamente a los animales de experimentación.

3.3.6 *Prueba de esterilidad*

Las suspensiones de vibriones coléricos muertos deben ser estériles. Para comprobar que lo son, se practicará en una muestra de 10 ml como mínimo y dividida en 10 o más porciones, tomada de cada preparado monovalente a granel, la prueba de esterilidad descrita en la sección 5.2 (página 43).

3.3.7 *Determinación de la concentración de vibriones por mililitro de producto monovalente a granel*

La concentración de los vibriones en el preparado monovalente a granel se determinará antes de transcurridas 24 horas desde la recogida y antes de añadir un agente conservador. El número de microorganismos se calculará

por recuento en una cámara apropiada o comparando la opacidad del producto con la de la preparación internacional de referencia de opacidad, o con la de una preparación nacional de referencia equivalente.

Si el recuento de los vibriones o la determinación de la opacidad de la suspensión se hacen después de transcurrido el plazo que se indica, el cálculo de la concentración inicial de los microorganismos, puede dar un resultado falso.

Si el laboratorio preparador prefiere practicar exclusivamente las determinaciones de opacidad, debe haber determinado de antemano mediante los oportunos experimentos la correlación que hay entre los resultados del recuento de los microorganismos de una suspensión y el grado de opacidad correspondiente en las condiciones particulares del establecimiento.

3.3.8 *Almacenamiento de los preparados monovalentes a granel*

Cuando los vibriones se hayan matado con formol, las suspensiones brutas no se guardarán más de un mes sin diluirlas o sin separar o neutralizar el formol. La temperatura de almacenamiento debe ser inferior a 10°C.

3.4 *Inspección del preparado divalente a granel*

3.4.1 *Preparación*

El preparado divalente se preparará mezclando, en las proporciones adecuadas, los preparados monovalentes a granel de los tipos Inaba y Ogawa. Si es necesario se harán diluciones en suero fisiológico regulado de manera que el pH no sea inferior a 6,8 ni superior a 7,4, con objeto de que la vacuna divalente contenga como mínimo 2×10^9 vibriones por ml de tipo Inaba e igual cantidad de microorganismos de tipo Ogawa.

Es preferible que la vacuna tenga la máxima concentración de vibriones compatible con las normas de inocuidad.

3.4.2 *Agentes químicos añadidos para matar los vibriones y para conservar el preparado*

Si toda la vacuna a granel o parte de ella va a envasarse en recipientes de varias dosis, se añadirá un agente de conservación apropiado a los preparados monovalentes o al divalente. Sólo se empleará con este objeto una sustancia que, a juicio de las autoridades nacionales de inspección, no modifique la antigenicidad ni la inocuidad del preparado.

Todos los agentes químicos que se usen para matar los vibriones y para conservar el preparado deberán reunir las condiciones establecidas en la Farmacopea Internacional o en la nacional.

4. Envase y recipientes

Se observarán las normas sobre envase y recipientes enunciadas en la sección 4 de la parte A, de las Normas Generales para Fábricas y Laboratorios de Inspección (Normas para las Sustancias Biológicas N° 1).¹

Pueden usarse envases de una sola dosis y de varias.

5. Inspección de la vacuna acabada

5.1 Prueba de identificación

Se practicará una prueba específica de identificación usando, por lo menos, un envase definitivo de cada lote de vacuna y los sueros anticólicos aglutinantes de referencia Inaba y Ogawa. Los dos sueros mono-específicos deberán aglutinar parcialmente los microorganismos de la vacuna, conforme se indica en el inciso e) de la sección 3.1.1 (página 39).

Si se usa suero anticólico O del grupo 1 no diferencial, la aglutinación de los microorganismos debe ser completa y el líquido que sobrenada debe ser transparente.

5.2 Pruebas de esterilidad

El contenido de todos los envases de cada lote final debe dar resultados satisfactorios en la siguiente prueba de esterilidad :

Se tomarán muestras al azar del contenido de los envases definitivos de cada lote final, comprobando su esterilidad. Las muestras se escogerán de manera que sean representativas de todo el contenido extraído del depósito de la vacuna a granel. Se usarán por lo menos diez envases de cada lote final, y se ensayará todo el contenido de los envases si su cabida es de 1,0 ml o menor y por lo menos 1,0 ml de cada envase si éstos son de mayor capacidad.

Las muestras de vacuna se sembrarán en un medio líquido con tioglicolato o en cualquier otro medio igualmente apropiado para el crecimiento de los microorganismos aerobios y anaerobios, y en medio de Sabouraud o en otro de similar eficacia para el cultivo de levaduras y hongos, de manera que la dilución final del preparado en el medio de cultivo sea tal que quede anulada la actividad bacteriostática del agente conservador. El medio sembrado para la demostración de bacterias se debe incubar a 30°-32°C durante una semana por lo menos. También se puede dividir en dos partes, una de las cuales se incubará a 35°-37°C y otra a una temperatura de 15° a 22°C durante una semana como mínimo. El medio

¹ *Org. mund. Salud Ser. Inf. técn.*, 1959, **178**, anexo 1

cultivado para la demostración de levaduras y hongos debe incubarse a 20°-25°C durante dos semanas por lo menos. La prueba podrá hacerse por otros procedimientos si, a juicio de las autoridades nacionales de inspección, son tan eficaces como el indicado.

Las normas generales de esterilidad para los preparados biológicos se formularán en Normas para las Sustancias Biológicas N^o 6.

5.3 *Pruebas de inocuidad*

5.3.1 *Prueba para verificar la ausencia de toxicidad anormal*

La ausencia de toxicidad de la vacuna definitivamente envasada se comprobará mediante pruebas en el cobayo y en el ratón.

Esas pruebas se harán inyectando por vía parenteral a dos o más cobayos de peso comprendido entre 250 y 300 g una cantidad de vacuna equivalente a cinco dosis clínicas, o a ratones de 15 a 20 g de peso el equivalente de media dosis clínica. Los animales deben tenerse en observación durante siete días como mínimo y no deben presentar en ese tiempo síntomas de enfermedad que puedan atribuirse a la vacuna inyectada.

5.3.2 *Prueba para verificar la ausencia de toxicidad anormal debida al fenol*

Si en la preparación de la vacuna se ha usado fenol se administrarán por inyección subcutánea 0,5 ml de vacuna a tres o más ratones blancos de 15 a 20 g de peso. Si después de la inyección uno o varios de los ratones presentan una reacción caracterizada por temblores y espasmos que dure más de 30 minutos se repetirá la prueba con doble número de animales. Si en la segunda prueba vuelven a presentarse reacciones, se desechará la vacuna.

Conviene practicar la autopsia para confirmar la causa de la muerte o de la enfermedad de los animales que se usen para las pruebas descritas en las secciones 5.3.1 y 5.3.2.

5.4 *Pruebas de actividad*

La vacuna definitivamente envasada deberá dar resultados satisfactorios en dos pruebas de actividad, una de protección activa en el animal y otra de aglutinación. Las autoridades nacionales de inspección decidirán los métodos que deban seguirse para practicar estas pruebas.

En el apéndice (página 48) se proponen métodos detallados para esas dos pruebas de actividad antigénica. Los citados métodos se incorporarán a esta sección sin modificación o con los cambios necesarios tan pronto como se haya comprobado su utilidad mediante un estudio internacional en colaboración.

5.5 *Concentración de hidrogeniones*

El pH de la vacuna terminada no será inferior a 6,8 ni superior a 7,4.

5.6 *Homogeneidad de la suspensión*

Se desecharán todos los envases en los que se observen posos, a menos que al agitar el envase desaparezcan y el contenido de éste vuelva a tomar el aspecto de una suspensión fina y homogénea.

Las vacunas que contengan aglomeraciones de microorganismos o partículas sólidas procedentes del medio de cultivo no son adecuadas para la administración al hombre.

6. Registros

Además de las normas enunciadas en la sección 6 de la parte A, de las Normas Generales para Fábricas y Laboratorios de Inspección (Normas para las Sustancias Biológicas N° 1),¹ se observará la siguiente :

Los caracteres morfológicos de las cepas empleadas en la vacuna, sus condiciones de cultivo, sus propiedades bioquímicas, serológicas y patógenas, los detalles de la preparación, todas las fases de ésta y los resultados de las pruebas de inspección practicadas en las fases intermedias y con la vacuna acabada se harán constar en los oportunos protocolos, que se someterán a la aprobación de las autoridades nacionales de inspección.

7. Muestras

Se observarán las normas enunciadas en la sección 7 de la parte A, de las Normas Generales para Fábricas y Laboratorios de Inspección (Normas para las Sustancias Biológicas N° 1).¹

Se enviarán al laboratorio nacional de inspección muestras en cantidad suficiente para que puedan repetirse todas las pruebas.

Esas muestras se conservarán a una temperatura comprendida entre 2° y 5°C.

Las muestras necesarias para la inspección en las fases intermedias de la preparación suelen ser de unos 50 ml de la suspensión de microorganismos vivos de tipo Inaba y Ogawa y del mismo volumen para la de microorganismos muertos. Las cantidades necesarias para la repetición de todas las pruebas de la vacuna acabada suelen ser mayores. Para estas pruebas pueden hacer falta hasta 200 ml de cada lote de vacuna definitivamente envasada.

¹ *Org. mund. Salud Ser. Inf. técn.*, 1959, **178**. anexo 1

Como en caso de accidente, contaminación, dificultades técnicas, etc, puede ser necesario repetir alguna de las pruebas recomendadas, conviene que el establecimiento preparador conserve muestras suplementarias.

8. Rotulación

En los rótulos impresos directamente sobre los envases o en las etiquetas pegadas a éstos se harán constar, por lo menos, las siguientes indicaciones :

La razón social y la dirección del establecimiento preparador ;
las palabras *vaccinum cholerae*, la denominación común del preparado, o ambas cosas ;
el número del lote de vacuna y, en su caso, el de la licencia de circulación del lote expedida por las autoridades nacionales de inspección ;
la fecha de caducidad.

Además de esas indicaciones, se harán constar en el rótulo de cada envase, en las etiquetas de las cajas de uno o varios envases o en el prospecto que acompañe a éstos los siguientes datos complementarios :

Declaración de que la vacuna reúne las condiciones establecidas en el presente documento ;
la naturaleza de la preparación y los métodos seguidos para matar los vibriones ;
la naturaleza y la cantidad de agentes de conservación y, en su caso, la cantidad de formaldehído sin neutralizar ;
las condiciones recomendadas para el almacenamiento y el transporte (si a juicio del establecimiento preparador el transporte a una temperatura superior a la recomendada pueda ser perjudicial para la actividad de la vacuna, se hará constar así) ;
la dosis individual recomendada y la vía de administración.

Conviene además especificar en el prospecto las contraindicaciones y las posibles reacciones consecutivas a la vacunación.

Las normas que anteceden tienen carácter provisional y se han enunciado en espera de que se publiquen normas generales de titulación aplicables a todas las sustancias biológicas.

9. Distribución y expedición

Se observarán las normas enunciadas en la sección 9 de la parte A de las Normas Generales para Fábricas y Laboratorios de Inspección (Normas para las Sustancias Biológicas N^o 1).¹

¹ *Org. mund. Salud Ser. Inf. técn.*, 1959, 178, anexo 1

10. Almacenamiento y fecha de caducidad

10.1 Condiciones de almacenamiento

El establecimiento preparador indicará las condiciones de almacenamiento y transporte que deben observarse para que la vacuna se ajuste a las normas de actividad hasta la fecha de caducidad que figure en el rótulo.

A ser posible, la vacuna se conservará a una temperatura comprendida entre 2 y 5°C, o por lo menos se guardará en un sitio fresco y oscuro.

10.2 Fecha de caducidad

La fecha de caducidad de la vacuna no debe ser posterior en más de dos años a la fecha de la última prueba satisfactoria de actividad, entendiéndose por tal la de inoculación de la vacuna a los animales de experimentación.

La vacuna debe reunir las condiciones establecidas en la sección 5 hasta la fecha de caducidad. No debe usarse ninguna vacuna líquida que lleve preparada más de dos años. Si el establecimiento preparador o las autoridades nacionales de inspección así lo acuerdan, podrá fijarse un plazo de utilización más corto.

Parte B. Normas para la inspección nacional

1. Normas generales

Se observarán las normas generales para laboratorios de inspección enunciadas en la parte B de las Normas para las Sustancias Biológicas N° 1.¹

2. Pruebas que deben aplicar los laboratorios nacionales de inspección del país productor de la vacuna

Los laboratorios nacionales de inspección del país que prepara la vacuna deben aplicar las pruebas descritas en la parte B, sección 3.2 de las Normas para las Sustancias Biológicas N° 1.¹

3. Licencia de circulación y certificado de inspección

No se autorizará la circulación de ningún lote de vacuna que no reúna las condiciones que se han establecido en la parte A.

¹ *Org. mund. Salud Ser. Inf. técn.*, 1959, 178, anexo 1

El funcionario competente del laboratorio nacional de inspección extenderá a petición del establecimiento preparador un certificado en que acredite si el lote de vacuna ha sido preparado con arreglo a todas las normas nacionales, y las establecidas en el presente documento. En ese certificado constará además la fecha de la última prueba de actividad practicada con resultado satisfactorio, el número del lote, el de la licencia de circulación y el que figure en las etiquetas de los envases. Se acompañará al certificado copia de la licencia de circulación expedida por el servicio nacional competente.

El certificado tiene la finalidad de facilitar el intercambio de sustancias biológicas entre los países.

4. Prueba de vacunación anterior a la distribución del preparado

No es posible todavía establecer pruebas de laboratorio que permitan asegurar que un lote de vacuna no ha de provocar reacciones en el hombre. Se aconseja a las autoridades sanitarias nacionales que, salvo en caso de urgencia, los lotes de vacuna se guarden seis semanas y que transcurrido ese tiempo se empiece por vacunar con ellos a un grupo de cinco personas como mínimo, que se ofrezcan voluntariamente a la prueba. Después de ésta, se autorizará el uso del lote para la vacunación general, si no se ha observado ninguna reacción anormal.

Apéndice

Pruebas de actividad propuestas *

5.4.1 Prueba de protección activa en el animal

Se practicará esta prueba comparando la eficacia profiláctica de la vacuna definitivamente envasada con la de dos vacunas monovalentes de referencia de los tipos Ogawa e Inaba respectivamente. Las vacunas de referencia serán suspensiones en 16 ml de solución salina fisiológica de todo el contenido (16×10^9 microorganismos) de las ampollas de la Preparación Internacional de Referencia de vacuna anticolérica, o suspensiones equivalentes de las preparaciones nacionales de referencia de vacunas monovalentes.

* Pruebas que se proponen para la determinación de la actividad antigénica de la vacuna anticolérica. La descripción de estas pruebas se incorporará, con las modificaciones a que hubiere lugar, al texto de la sección 5.4 de la parte A de las Normas para la Vacuna Anticolérica, después de un estudio internacional en colaboración sobre su utilidad.

Para la prueba se usarán como mínimo 60 animales repartidos al azar en 4 grupos iguales ; a los animales del primero y del segundo grupo se les inocularán por vía subcutánea volúmenes iguales de la vacuna definitivamente envasada, a los del tercer grupo se les administrará la misma cantidad de la vacuna de referencia de tipo Ogawa, y a los del cuarto, de la vacuna de referencia de tipo Inaba. Aunque es preferible administrar a cada animal la dosis total inmunizante en una sola inyección, pueden hacerse dos o tres inyecciones debidamente espaciadas si ello fuera necesario para obtener un grado suficiente de inmunidad. Los animales de cada grupo pueden dividirse en dos o tres subgrupos de manera que las dosis totales inmunizantes administradas a los animales de cada subgrupo formen una progresión geométrica de razón 5 ó 10, siempre que el sistema de dosificación elegido se aplique por igual a los cuatro grupos principales.

Cuando haya transcurrido un tiempo adecuado desde la última inyección de vacuna se administrará por vía intraperitoneal a cada animal de los grupos primero y tercero una misma dosis letal de vibriones coléricos de tipo Ogawa mezclados o no con mucina o con cualquier otra sustancia que aumente su virulencia. La operación se repetirá con todos los animales de los grupos segundo y cuarto usando vibriones de tipo Inaba.

Todos los animales se tendrán en observación durante las 72 horas siguientes a la inyección de prueba.

De todos los animales de los grupos primero y tercero deben sobrevivir por lo menos cinco y morir por lo menos otros cinco de resultas de la inoculación de vibriones de tipo Ogawa. Lo mismo deberá suceder en los grupos segundo y cuarto después de la inoculación de vibriones de tipo Inaba.

Se considerará que la vacuna ha dado resultados satisfactorios en la parte de la prueba practicada con vibriones de tipo Ogawa si el número de supervivientes del primer grupo es igual o mayor que el del tercero. En la parte de la prueba referente al tipo Inaba el resultado de la vacuna se considerará satisfactorio si el número de supervivientes del segundo grupo es igual o mayor que el del cuarto.

Si los resultados son negativos en las dos partes de la prueba, se desechará la vacuna ; si sólo lo son en una parte, ésta se repetirá dos veces y la vacuna se desechará si el resultado vuelve a ser negativo en cualquiera de las dos repeticiones.

Para la prueba de protección activa pueden emplearse ratones de unas cuatro semanas de edad o cobayos de peso comprendido entre 200 y 250 g. En cualquier caso no se usarán más que animales sanos de variedades muy susceptibles a la inoculación intraperitoneal de vibriones coléricos vivos.

Las dosis inmunizantes, los intervalos de tiempo entre las inyecciones y las condiciones de la inoculación de prueba serán las que escojan los

establecimientos preparadores con el visto bueno de las autoridades nacionales de inspección.

Los vibriones coléricos que se empleen para la inyección de prueba deben ser de suficiente virulencia y de cepas distintas de las usadas en las vacunas.

La virulencia de los vibriones coléricos vivos se puede exaltar mediante suspensión en una solución al 5 % de mucina en agua destilada, o por otro método apropiado. En cualquier caso es preferible usar cultivos jóvenes en proliferación que presenten la máxima virulencia natural; la mayoría de las veces basta una incubación de 3 a 5 horas a 37°C en un medio nutritivo para conseguir este resultado. La dosis adecuada, lo mismo en el caso del tipo Ogawa que en el del tipo Inaba, será la que produzca la muerte del 50 % aproximadamente de los animales inmunizados con las preparaciones de referencia.

Conviene usar como testigos animales sin inmunizar con objeto de comprobar la virulencia de los microorganismos de la inyección de prueba.

5.4.2 Prueba de aglutinación

Se practicará esta prueba comparando la aglutinabilidad de la vacuna definitivamente envasada y la de una vacuna de referencia en sueros monoespecíficos de referencia. La vacuna de referencia puede ser una mezcla a partes iguales de las Preparaciones Internacionales de Referencia de vacuna anticolérica de los tipos Ogawa e Inaba, obtenida suspendiendo el contenido total de las ampollas de dichas preparaciones en 4 ml de solución salina fisiológica a la que se haya añadido el mismo agente de conservación que a la vacuna definitivamente envasada, o una suspensión equivalente de una preparación nacional de referencia de vacuna anticolérica. Como sueros monoespecíficos de referencia se usarán las Preparaciones Internacionales de Referencia de sueros anticoléricos aglutinantes de los tipos Ogawa e Inaba o los sueros nacionales monoespecíficos de referencia correspondientes.

Por *cada uno* de los sueros monoespecíficos de referencia se prepararán dos series de diluciones de razón 2 distribuidas en nueve tubos de ensayo. La primera serie de tubos contendrá 0,5 ml de diluciones sucesivas de suero empezando por la de 1 : 10 y terminando por la 1 : 2560, y la segunda 0,5 ml de las diluciones de suero que empiezan en 1 : 80 y terminan en 1 : 20 480. Al contenido de cada tubo de la primera serie se agregarán 0,5 ml de la vacuna definitivamente envasada y a cada uno de la segunda 0,5 ml de la vacuna de referencia. Si algún laboratorio prefiere utilizar para la prueba una concentración inferior de vibriones, se podrán diluir la vacuna en ensayo y la de referencia en la misma proporción.

Se considerará que la vacuna ha dado resultados satisfactorios en la parte de la prueba practicada con vibriones de tipo Ogawa cuando al comparar las dos series de tubos de suero monoespecífico de referencia de dicho tipo,

el grado de aglutinación en cada uno de los tubos de la vacuna ensayada resulta ser igual o mayor que en los tubos de vacuna de referencia.

Se considerará que la vacuna ha dado resultado satisfactorio en la parte de la prueba practicada con vibriones de tipo Inaba cuando al comparar las dos series de tubos de suero monoespecífico de referencia de dicho tipo, el grado de aglutinación en cada uno de los tubos de la vacuna ensayada resulte ser igual o mayor que en los tubos de vacuna de referencia.

Si los resultados son negativos en las dos partes de la prueba se desechará la vacuna ; si sólo lo son en una parte, ésta se repetirá dos veces y la vacuna se desechará si el resultado vuelve a ser negativo en cualquiera de las dos repeticiones.

No se sigue una práctica uniforme en la elección de la temperatura óptima de aglutinación y del tiempo que deben dejarse los tubos en reacción, por lo que cada laboratorio podrá adoptar las condiciones que considere más convenientes. Así, por ejemplo, en unos laboratorios la incubación dura 2 horas a 37°C, en otros 18 horas a 55°C, en otros 2 horas a 55°C seguidas de refrigeración en una nevera durante 22 horas, y en otros 4 horas a 52°C seguidas de refrigeración en un lugar frío durante toda una noche.

