

**Aanbeveling
van het Comité van Ministers
van de Benelux Economische Unie
inzake de minimumeisen voor de voornaamste
veterinaire sera en vaccins
op basis van smetstoffen van zoönosen
welke onder een controleregeling vallen,**

M (67) 18

Het Comité van Ministers van de Benelux Economische Unie,
Gelet op artikel 6 van het Unieverdrag en artikel 9 van de
Overgangsovereenkomst,

Overwegende dat het — in afwachting van de totstandkoming
van een meer algemene reglementering voor alle therapeutische
en profylactische produkten — noodzakelijk is thans reeds aan
sera en entstoffen voor veterinair gebruik bepaalde gemeen-
schappelijke eisen te stellen inzake zuiverheid, onschadelijk-
heid en doeltreffendheid,

Beveelt aan :

Enig artikel

Aan de Regeringen der drie Beneluxlanden wordt verzocht de
bepalingen van het aan deze Aanbeveling gehechte Reglement
betreffende de minimumeisen voor de voornaamste veterinaire
sera en vaccins op basis van smetstoffen van zoönosen, welke
onder een controleregeling vallen, uiterlijk op 1 januari 1968
toe te passen.

Gedaan te Brussel, op 22 september 1967.

De Voorzitter van het Comité van Ministers,
H.J. de KOSTER

Reglement
betreffende de minimumeisen voor de voornaamste
veterinaire sera en vaccins
op basis van smetstoffen van zoönosen
welke onder een controleregeling vallen,

M (67) 18, Bijlage

I. Zuiverheid

A. Behalve in de onder B en C genoemde gevallen mogen vaccins geen andere micro-organismen bevatten dan die, welke, al naargelang de nationale voorschriften, hetzij op het etiket van de ampul of fles zijn vermeld, hetzij de verwekkers zijn van de op dat etiket vermelde ziekte. Bij het controlerend onderzoek van vaccins dient het volgende in acht te worden genomen :

- a. Het onderzoek naar parasitaire bacteriën en schimmels met volgens de gebruikelijke microbiologische methoden worden verricht.
- b. Vaccins op basis van levend virus moeten bovendien worden onderzocht op de eventuele aanwezigheid van andere virus-sen.

B. In gevallen, waarin de bereiding van vaccins normaliter geen zuivere of steriele produkten vermag op te leveren, kan het microbiologisch onderzoek zich beperken tot het vaststellen van pathogene micro-organismen of micro-organismen die onder bepaalde omstandigheden pathoogen kunnen worden.

C. In gelyophiliseerde vaccins bestemd om per os of op de huid te worden toegediend is de eventuele aanwezigheid van enkele banale kiemen toelaatbaar (maximum 100 banale kiemen per ml gereconstitueerd vaccin).

D. De onder A bedoelde onderzoeken moeten worden uitgestrekt tot de verdunningsvloeistoffen waarmede gelyophiliseerde vaccins worden gesuspenseerd. Deze verdunningsvloeistoffen moeten steriel zijn.

E. De sera moeten steriel zijn.

II. Onschadelijkheid

A. Sera

Onschadelijkheidsproeven met sera behoeven niet noodzakelijkerwijs te worden genomen op de diersoorten waarvoor deze sera bestemd zijn. Als minimum kan worden volstaan met een proef op muizen of caviae, waarbij als volgt tewerk moet worden gegaan :

6 goed gezonde muizen met een gewicht van 16 g krijgen onderhuids 0,5 ml van het te controleren serum ingespoten ;

2 caviae met een gewicht van 350 à 400 g krijgen onderhuids 5 ml van het te controleren serum ingespoten.

Deze dieren worden gedurende 10 dagen dagelijks geobserveerd.

Gedurende deze periode mogen geen klinische symptomen worden waargenomen, verband houdende met de inspuiting van het serum.

B. Vaccins

Naast de proeven op laboratoriumdieren moeten proefnemingen worden gedaan op voor besmetting vatbare dieren, behorende tot de soorten waarvoor de vaccins bestemd zijn, behalve indien voor het verkrijgen van bevredigende en afdoende resultaten met laboratoriumdieren kan worden volstaan.

a. Geïnactiveerde vaccins

Na inspuiting van een adequate dosis vaccin mogen geen ernstige pathologische verschijnselen optreden.

Kleine plaatselijke reacties (oedeemverharding zonder abscesvorming of necrose) en koortsverschijnselen gedurende minder dan 48 uur die de algemene gezondheidstoestand niet te zeer beïnvloeden, zijn toegestaan.

In het speciale geval van geïnactiveerde rabiës-vaccins moet onderstaande controle worden toegepast :

1) *Vaccins van het type Fermi op basis van gedeeltelijk geïnactiveerd zenuwweefsel*

Naast de gebruikelijke steriliteitscontrole moet een onschadelijkheidsproef worden genomen conform de aanwijzingen inzake de residuele virulentie van het vervaardigde vaccin, welke zijn opgenomen in de 2^e uitgave van de « Techniques de laboratoire pour la rage » (monografie n^o 23 van de W.G.O.) waarvan de tekst is overgenomen in het Addendum, punt I.

Het gehalte wordt berekend volgens de REED- en de MUENCH-methode en moet meer bedragen dan 10^{-1} en minder dan 10^{-2} .

2) *Vaccins op basis van volledig geïnactiveerd zenuwweefsel*

Naast de gebruikelijke steriliteitscontrole moet een onschadelijkheidsproef worden genomen conform de in monografie n^o 23 van de W.G.O. beschreven wijze, waarvan de tekst is overgenomen in het Addendum, punt II.

b. « Levende » vaccins

Voor « levende » vaccins gelden de navolgende zeer gedetailleerde voorschriften :

1. *Antibrucellose-vaccin*

Twee caviae krijgen een intra-musculaire inspuiting met 1 ml vaccinemuulsie, bevattende 5 miljard Brucellae.

Gedurende een observatie van 10 dagen mogen zich geen ernstige pathologische verschijnselen voordoen.

De 11^{de} dag worden caviae gedood. De milt mag dan maximaal 500.000 Brucellae per gram bevatten, volgens telling op vast medium.

2. *Miltvuur-vaccin*

a. *Pasteur-vaccin*

De bacterie-stam moet zodanig zijn verzwakt, dat een onderhuidse inspuiting van een normale runderdosis vaccin door een

konijn van tenminste 1,5 kg goed wordt verdragen. Het dier moet gedurende 8 dagen worden geobserveerd.

b. *Sterne-vaccin*

Er wordt een suspensie bereid die 200.000.000 sporen per ml bevat.

6 caviae worden onderhuids ingespoten met 0,001 ml van deze suspensie, d.w.z. 200.000 sporen. Gedurende een observatieperiode van 10 dagen mogen slechts lichte locale reacties en geen algemene ziekteverschijnselen optreden. Verder kan ook nog de volgende methode worden toegepast : 2 schapen of 2 geiten worden elk subcutaan met 2 doses van het rundervaccin ingespoten (20 miljoen sporen).

Gedurende een observatieperiode van 10 dagen mogen geen ernstige locale of algemene reacties optreden.

3. *Rabiës-vaccin* (LEP-HEP)

Acht muizen van 20 g ontvangen een onderhuidse inspuiting met een hoeveelheid vaccin gelijk aan $1/6^{\circ}$ van de voor honden geldende dosis. De muizen worden gedurende tenminste 7 dagen geobserveerd. Tenminste 7 muizen moeten deze proef overleven zonder ziekteverschijnselen te vertonen.

4. Wat betreft de overige vaccins op basis van microben of levend virus, in verband waarmede veiligheidsmaatregelen genomen moeten worden, mag inspuiting van een normale dosis bij dieren, behorende tot de soorten waarvoor deze vaccins bestemd zijn, hoogstens slechts vage symptomen van de te bestrijden ziekte tot gevolg hebben.

Deze proeven op dieren, behorende tot de soorten waarvoor deze vaccins bestemd zijn, zijn slechts verplicht zolang zij niet kunnen vervangen worden door afdoende laboratoriummethoden.

III. Doeltreffendheid

A. Antibrucellose-vaccin B 19

12 caviae van 350 à 450 g krijgen een intramusculaire injectie met 1 ml vaccin, verdund tot 5 miljard kiemen per ml.

Na 9 weken worden zij op de proef gesteld met een intramusculaire injectie van 5.000 virulente *Brucellae* op 1 ml. Dezelfde injectie wordt toegediend aan 12 niet gevaccineerde caviae. Zes weken na de experimentele injectie worden alle caviae gedood.

De doeltreffendheid van een vaccin is voldoende te achten, wanneer in de milten van niet meer dan 6 van de 12 gevaccineerde caviae *Brucellae* worden aangetroffen, terwijl alle niet-gevaccineerde caviae moeten blijken geïnfecteerd te zijn.

B. Miltvuur-vaccin

Bij 8 caviae wordt onderhuids een dosis van 0,01 ml van de geconcentreerde sporensuspensie ingespoten (200 miljoen sporen per ml). Na 14 dagen worden de resistente caviae geïnfecteerd met een injectie van 0,1 ml van een reincultuur van de stam Pasteur II die $\pm$ 200 lethale doses bevat.

Meer dan de helft der gevaccineerde caviae moet resistent zijn.

C. Rabiës-vaccin

a. Efficiëntieproef met een geïnactiveerd antirabiës-vaccin

Het proefvirus is de CVS-stam.

De controle wordt verricht volgens de Habel-test (zie Addendum punt III).

b. Werkzaamheid van antirabiës-vaccins op basis van gewijzigd levend virus

1. *HEP* en *KELEV*

- a) De controle op muizen wordt verricht volgens de wijziging van de K. HABEL-test, welke van toepassing is op levende of verzwakte vaccins (zie Addendum punt IV).
- b) De controle op caviae wordt verricht volgens de KOPROWSKI-test (zie Addendum punt V).

2. *LEP*

De controle wordt verricht op caviae volgens de sub 1. a) bedoelde methode en eventueel op muizen.

I. Onderzoek op de restvirulentie van rabiësvaccins van het Fermi-type

Elke partij vaccin moet op muizen worden getest om de restvirulentie te bepalen. Deze test moet 9 dagen na de toevoeging van phenol worden uitgevoerd; in gevallen van uitzonderlijke spoed, kan vroeger worden begonnen maar niet eerder dan 2 dagen nadat de phenol is toegevoegd.

Het te onderzoeken vaccin wordt met laag toerental gecentrifugeerd en van de bovenstaande vloeistof de tienvoudige verdunningen 10^{-1} , 10^{-2} en 10^{-3} gemaakt met physiologische keukenzoutoplossing van pH 7. Van elke verdunning worden tenminste 5 muizen (bij voorkeur 10) intracerebraal geïnoculeerd met 0,03 ml. De drie groepen muizen worden 15 dagen geobserveerd en vanaf de derde dag wordt aantekening gehouden van de muizen met paralyse, die sterven.

II. Orschadelijkheidsproef van volledig geïnactiveerde zenuwweefselvaccins tegen rabiës

Op konijnen ⁽¹⁾ en op muizen wordt een onschadelijkheidstest uitgevoerd om de afwezigheid van levend virus in volledig geïnactiveerde vaccins te verifiëren. Deze test moet worden uitgevoerd op een representatief monster van elke partij vaccin in bulk.

Van elke diersoort worden voor elke proef tenminste twee exemplaren genomen. Elk konijn wordt intracerebraal geënt met tenminste 0,25 ml van het vaccin dat tenminste 5 % hersenweefsel bevat en elke muis (met een gewicht tussen 18 en 20 g) met tenminste 0,03 ml van hetzelfde vaccin. Alle controledieren worden tenminste veertien dagen in observatie gehouden. Gedurende deze periode mogen bij geen enkel dier rabiëssymptomen of symptomen van aantasting van het centrale zenuwstelsel worden waargenomen.

III. De Habel-test voor potentiebepaling van gedeeltelijk of volledig geïnactiveerde rabiësvaccins

a) *Muizen*

Er worden witte « Swiss » muizen gebruikt van 4-6 weken oud van uniform gewicht. Zij kunnen « at random » worden gebruikt onafhankelijk van geslacht, maar indien gewenst mogen ook muizen van één geslacht worden gebruikt.

b) *Immunisatie*

Het vaccin moet worden verdund tot 0,5 % emulsie van het oorspronkelijke natte gewicht der hersenen. Zestig muizen worden

(1) Wordt voor de bereiding van het vaccin een andere diersoort gebruikt dan moet de test worden verricht op die diersoort en op muizen.

met 0,25 ml intraperitoneaal gevaccineerd gedurende twee opeenvolgende weken, op maandag, woensdag en vrijdag, totaal dus zes doses. Dertig muizen moeten bij het begin der immunisatie als controles worden afgezonderd. Wanneer vaccins worden onderzocht afkomstig van ander materiaal dan hersenen, dient dit vaccin 1 op 10 te worden verdund voor de vaccinaties met 0,25 ml.

c) *Immunitetsbeproeving*

De beproeving wordt uitgevoerd op de 14^e dag na de eerste vaccinatie. Daartoe worden 2 ampullen van het standaardvirus (CVS) ontdooid en tot een 10^{-1} suspensie verdund. Dan worden verdere tienvoudige verdunningen gemaakt van 10^{-1} t/m 10^{-7} met gedestilleerd water, bevattende 2 % geïnactiveerd konijn- of paardeserum. Het is gewenst deze verdunningen gedurende het uitvoeren van de test in ijswater te houden om verlies van virus te voorkomen. Het is belangrijk bij het verdunnen van het virus voor elke verdunning en menging een nieuwe pipet te gebruiken.

Groepen van 10 van de gevaccineerde muizen worden dan met 0,03 ml intracerebraal besmet met de virusverdunningen 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} en 10^{-1} in de aangegeven volgorde. Er kan dan met één spuit en naald worden volstaan mits de spuit telkens enige malen wordt gewassen in de volgende verdunning.

Met een nieuwe spuit worden de controle-muizen besmet met de verdunning 10^{-7} , 10^{-6} en 10^{-5} ter bepaling van de LD_{50} . Indien het virus volledig actief is zullen deze drie verdunningen overlevingspercentages te zien geven van 100 % tot minder dan 50 %. Doen zich bij elk van de drie verdunningen enkele sterfgevallen voor, dan bewijst dit dat bij de verdunning van het virus fouten zijn gemaakt. Wil de potentietest van waarde zijn dan moet het 50% eindpunt in de controlegroep (de verdunning waarbij 50 % van de muizen sterft) groter zijn dan 10^{-5} .

Alle muizen worden 14 dagen dagelijks geobserveerd en slechts de muizen, welke na de vijfde dag sterven, worden beschouwd te zijn gestorven ten gevolge van rabiës. De muizen moeten dagelijks worden geobserveerd en de symptomen genoteerd. Muizen welke na 14 dagen nog leven maar duidelijke symptomen van rabiës vertonen moeten worden beschouwd als te zijn gestorven aan rabiës en in de berekening worden betrokken.

d) *Bepaling van mate van bescherming*

Van de groep gevaccineerde en controlemuizen worden de 50 % eindverdunningen berekend volgens de methode van Reed and Muench. Dit zijn de verdunningen waarbij theoretisch 50 % van de muizen sterven aan rabiës. Door de gevonden logaritme van het 50 % eindpunt van de controlegroep te verminderen met de gevon-

den logaritme van de gevaccineerde groep vindt men de logaritme van de « LD₅₀ bescherming ». Om aan minimumeisen te voldoen moet het verschil 3 bedragen (de log van 1000) waarmee wordt aangegeven dat het vaccin beschermt tegen 1000 LD₅₀.

IV. Wijziging van de techniek voor onderzoek bij levende of verzwakte vaccins

Indien het vaccinatieschema toediening van geleidelijke hogere doses vereist, zoals het geval was met het Pasteur-vaccin, moet de serie van 6 intra-peritoneale injecties met 0,25 ml van de 0,5 %-ige emulsie worden begonnen met het minst virulente vaccin en beëindigd met het meest virulente. Indien alle in het schema voorgeschreven doses gelijk zijn behoeven in de werkwijze geen wijzigingen te worden aangebracht.

*
**

V. Caviaproef voor het kippeëmbryovaccin

De proef bestaat uit intramusculaire enting van caviae met het kippeëmbryovaccin, drie weken later gevolgd door immuniteitsbeproeving van de dieren met « streetvirus » of virusfixe van rabiës.

a) *Caviae*

Het is wenselijk caviae te gebruiken, die bij het begin van de proef niet minder dan 350 gram wegen. Het gebruik van lichtere dieren moet worden ontraden.

b) *Immunisatie*

Van elke serie of subserie vaccin, waaruit de uiteindelijke bulk wordt samengesteld, worden 2 ampullen gereconstitueerd (zonder rekening te houden met het door de producent aanbevolen dosering) met steriel gedest. water, bevattende 2 % normaal paardeserum (3 ml van het verdunningsmiddel per hondedosis gedroogd vaccin). Voeg de twee doses gereconstitueerd vaccin bijeen, neem daarvan 1 hondedosis (3 ml) en voeg deze toe aan 17 ml gedest. water met 2 % paardeserum. Dit levert een 5 %-ige weefselsuspensie.

Tenminste 10 gezonde caviae worden gemerkt en geënt in de musculus gastrocnemius aan de binnenzijde van de poot zo dicht mogelijk bij de zenuw met 0,25 ml van het verdunde vaccin. Tegelijkertijd worden 5 of meer gezonde caviae gemerkt en als controles gehouden.

c) *Bereiding van het materiaal voor immuniteitsbeproeving*

1° *Stretrabiësvirus*

Volwassen honden worden geënt met 0,1 ml van een suspensie van geïnfecteerd hondespeekselklierweefsel hetwelk bevroren bij —70°C wordt bewaard.

De injectie wordt bilateraal in de kauwspieren toegediend met gebruikmaking van een 1 ml spuit en 0,90 mm $\times$ 25 mm naald. Wanneer de dieren na verschijnselen van rabiës sterven, of stervende worden gedood, wordt het speekselklierweefsel verwijderd; een klein stukje wordt met de schaar afgeknipt en afzonderlijk gehouden en de rest ingevroren in een petrischaal in een vrieskast bewaard bij -50° tot -70°C . Het afzonderlijk gehouden deel wordt in een mortier verijnd met voldoende physiologische keukenzoutoplossing waarin 10 % konijneserum, zodat een 10 %-ige gewichtssuspensie wordt verkregen. Deze suspensie wordt dan 1 minuut gecentrifugeerd met 1000 omwentelingen per minuut en de bovenstaande vloeistof gesepareerd. Hiervan worden tienvoudige verdunningen gemaakt in physiologische keukenzoutoplossing + 10 % normaal konijneserum en van de verdunningen Swiss albino muizen van 28-35 dagen oud intracerebraal geënt met 0,03 ml. Deze muizen worden dagelijks gedurende 21 dagen geobserveerd en het aantal doden dagelijks genoteerd. Na de observatieperiode wordt de DL_{50} titer van elk speekselkliermonster berekend.

Voor de bereiding van een grote viruspool worden dan alleen die klieren verwerkt waarvan de titer groter is dan $10^{-4,5}$. De klieren worden ontdooid, met de schaar in kleine stukjes geknipt en in een Waring blender gebracht. Toegevoegd wordt voldoende steriele physiologische keukenzoutoplossing + 10 % normaal konijneserum ter verkrijging van een 20 %-ige gewichtssuspensie. De Waring blender wordt slechts 2 à 3 minuten in beweging gebracht om verwarming van het materiaal te voorkomen. De blender wordt daarna in ijswater gedompeld tot goede koeling is bereikt en opnieuw 2 tot 3 minuten gedraaid. Dit procédé wordt 4 tot 5 maal herhaald en de uiteindelijke suspensie gefiltreerd door een laag gaas.

Het gefiltreerd materiaal wordt verdeeld in Pyrexglasampullen à 1 ml per ampul. De ampullen worden gesloten, in dunne laag bevroren in een koolzuur-alcoholmengsel en bewaard bij -50° tot -70°C .

2^o *Rabiës-virus-fixe*

Het « standard challenge virus » (C.V.S.) kan óók worden gebruikt voor immuniteitsbeproeving bij caviae.

Om de pathogeniteit van deze stam te verhogen bij intramusculaire toediening aan caviae, kunnen een paar intracerebrale passages op jonge caviae (150-200 g) worden uitgevoerd en materiaal van caviahersenen voor immuniteitsbeproeving worden gebruikt in plaats van materiaal van muizenhersenen.

d) *Immuniteitsbeproeving van de caviae*

Drie weken na de vaccinatie worden de gevaccineerde dieren en de controledieren intramusculair besmet met het streetvirus of virus fixe in de achterpoot waarin niet werd gevaccineerd.

De dosis bedraagt 0,5 ml van een verdunning van de virussuspensie welke één tweevoudige verdunning lager ligt dan die welke 100 % van de caviae doodde in een voortitratie; dus als 100 % van de caviae werden gedood met de verdunning 1:160 moet als verdunning in de potentietest 1:80 worden gebruikt.

e) *Interpretatie van het resultaat*

In onderstaande tabel wordt een voorbeeld gegeven van de behaalde resultaten met vaccins die de immunisatietest met goed gevolg hebben doorstaan. Hieruit blijkt dat in het betreffende laboratorium de deugdelijkheid van het vaccin is aangetoond bij honden en wel tegen een besmetting met straatvirus. Voorts blijkt dat in de meeste gevallen de honden tegen het testvirus (straatvirus) waren beschermd door een vaccinpreparaat die de caviae immuniseerde en dat bestond uit een 5 %-ige suspensie van kippeembryoweefsel. Zoals hierboven reeds opgemerkt moet het testvirus zo virulent zijn dat het de dood veroorzaakt van de meeste, zo niet van alle controledieren. Men heeft vastgesteld dat bij toepassing op muizen de DL_{50} titer van een zodanig virus tenminste 10^{-5,50} moet bedragen om bij de meeste controledieren de dood tot gevolg hebben.

Bij de proeven dienen 80 % van de controle-caviae te sterven aan rabiës en 70 % van de gevaccineerde caviae dienen de immuniteitsbeproeving te overleven zonder enige symptomen van rabiës. Deze test komt de natuurlijke omstandigheden zeer nabij en kan tamelijk eenvoudig worden uitgevoerd. Er is slechts één vaccinatie en één immuniteitsbeproeving voor nodig. Indien als testvirus stammen van op verschillende plaatsen geïsoleerd straatvirus worden gebruikt, kan de proef worden toegepast voor de potentiebepaling van uit de verschillende delen van de wereld afkomstige kippeembryovaccins tegenover de verschillende stammen van rabiësvirus.

Proeven die onlangs op caviae zijn genomen met grote hoeveelheden Flury LEP-vaccin bij gebruikmaking van het CVS-virus voor het testen der gevaccineerde dieren, hebben aangetoond dat de aldus verkregen resultaten vergelijkbaar zijn met die van intracerebrale titrage van het virus op muizen. De tussen de vierde en de tiende dag na inoculatie met de proefdoses waargenomen verlammingssymptomen stemmen overeen met de virulentietiter van het vaccin en kunnen derhalve de selectie van de werkzame bestanddelen vergemakkelijken.

RESULTATEN VAN DE POTENTIETEST VAN HET KIPPEEMBRYOVACCIN

Partij vaccin	DL ₅₀ titer muizen	Mortaliteit na intramusculaire inoculatie met straatvirus								
		Caviae							Honden	
		Geïmmuniseerd met onderstaande vaccinverduunningen: a)						niet ge- vacci- neerde controle- dieren	gevacci- neerd b)	niet ge- vacci- neerde controle- dieren
		1 : 5	1 : 20	1 : 80	1 : 320	1 : 1280	1 : 5120			
A	10 ^{-2,75}	0/8	0/9	0/6	0/10	0/8	—	10/10	0/5	3/6
B	10 ^{-2,85}	0/9	0/10	5/10	5/10	9/10	—	10/10	0/6 0/3	3/5 10/10
C	10 ^{-2,95}	0/8	0/8	2/7	6/8	—	—	10/10	0/9 0/6	8/9 6/10
D	10 ^{-3,00}	0/8	0/6	1/10	4/5	0/9	—	8/8	0/10	10/10
E	10 ^{-3,90}	—	—	1/4	1/6	4/5	0/4	8/9	0/6	18/25
F	10 ^{-5,00}	—	—	0/5	0/3	1/4	1/5	8/9	0/8	18/25
G	10 ^{-3,90}	—	3/15	—	—	—	—	13/16	0/7	3/5

a) In de gevallen A en D is 1 ml 5 %-ige weefselsuspensie geïnjecteerd ; in alle andere gevallen 0,5 ml. (Opmerking : Bij courante testen wordt thans 0,25 ml 5 %-ige weefselsuspensie gebruikt).

b) Bij de vaccinatie is 5 ml 20 %-ige weefselsuspensie gebruikt.