

UN NUEVO SISTEMA DE CULTIVO POR PERFUSION EN ESTRATOS CELULARES. II. SU APLICACION PARA LA PRODUCCION DE VACUNA VIRICA¹

G. F. Mann² y Julio de Mucha Macías³

Desde que se introdujeron las vacunas víricas preparadas mediante cultivo tisular, los científicos han tratado afanosamente de obtener sistemas más eficaces de proliferación en esos cultivos. El procedimiento original, es decir, cultivos monocelulares en frascos de Povitsky fijos, se emplea todavía de manera considerable pero se está sustituyendo poco a poco por métodos más efectivos, como el del tubo giratorio y el depósito de fermentación. En el presente artículo los autores describen con cierto detalle sus estudios con el recipiente de Mann de cultivo por perfusión. El mejoramiento con respecto al sistema de capas monocelulares fijas es muy notable. Por ejemplo, el recipiente de 5 m² permite obtener una superficie de proliferación equivalente a 100 frascos de Povitsky; un recipiente de cultivo rinde el equivalente a 300-500 frascos de Povitsky, puesto que el cultivo es más denso (en una proporción de tres a cinco veces mayor que en el método de frascos fijos). Para los casos en que se requiere más producción ya se dispone de recipientes hasta de 10 m² y pueden utilizarse en cultivos paralelos para obtener un rendimiento prácticamente ilimitado. Cuando esta producción se traduce en la preparación de vacuna, los resultados son muy estimulantes. Si prosiguen debidamente las investigaciones con estos recipientes, se logrará un gran avance en lo que se refiere a la necesidad mundial de vacunas víricas preparadas en cultivo tisular.

Introducción

En otra ocasión se informó sobre un nuevo sistema de cultivo por perfusión que pudiera satisfacer las necesidades de la producción de vacunas víricas en gran escala (1).

Los recipientes de cultivo de este sistema consisten en placas de vidrio, separadas por bandas de teflón y cerradas dentro de una caja abierta por los lados provista de orificios de admisión y salida. Se pueden construir recipientes con la superficie de proliferación deseada, dentro del margen de <0.01 a >10 m², con características operativas uniformes. Cuando se necesita una superficie de

proliferación superior a 10 m², se pueden utilizar en paralelo recipientes de múltiplos de 5 ó 10 m².

Los recipientes están conectados por una bomba para separar los reservorios del medio; todo el aparato funciona como un sistema cerrado, minimizando así el riesgo de contaminación.

Se había previsto que este sistema facilitaría la producción de células en densidades superiores al nivel normal de monoestratos desde que Kruse y Mediema (2), y otros investigadores demostraron que la densidad celular guardaba una relación directa con el volumen del medio utilizado.

Habida cuenta de las posibles ventajas de este sistema para la fabricación eficaz y en gran escala de vacunas, la OPS y el Gobierno de México (Secretaría de Salubridad y Asistencia) patrocinaron un proyecto para establecer el sistema en el Instituto Nacional de Virología de México.

¹ El primer artículo de esta serie se publicó en el *Boletín* de enero de 1973.

Se publicará en inglés en el *Bulletin of the Pan American Health Organization*, 1976.

² Científico, Oficina de Zona II, Organización Panamericana de la Salud, México, D.F., México.

³ Director, Departamento de Producción de Vacunas contra la Poliomielitis, Instituto Nacional de Virología, Secretaría de Salubridad y Asistencia, México, D.F., México.

En este informe se presentan los resultados de esta empresa desde 1973 hasta la fecha.

Trabajos experimentales

Para estudiar muchos parámetros del crecimiento celular y la producción de virus se han utilizado los recipientes de cultivo por perfusión, con una superficie de proliferación de 200 cm².

El sistema de ensayo seleccionado fue la producción de virus poliomielítico (LSc 2ab) en células diploides humanas.

Los resultados principales obtenidos en escala experimental fueron ensayados en escala de producción con recipientes de una superficie de 2.5 m².

Evaluación del diseño del recipiente de cultivo

En la fabricación, limpieza, montaje y esterilización de los recipientes de cultivo no surgió ninguna dificultad significativa.

Mediante pruebas estrictas con cultivos de células diploides humanas se comprobó que todos los componentes de los recipientes y sistemas operativos eran atóxicos.

Se ha demostrado que los recipientes montados y esterilizados retienen indefinidamente una presión de aire de 5 libras/pulgada cuadrada y mantienen la esterilidad de los medios de cultivo bacteriológicos y tisulares recirculados.

Se puede realizar satisfactoriamente el examen microscópico de células en las placas exteriores de ambos lados del recipiente. Cuando se utilizan objetivos de larga distancia, se pueden examinar varias capas celulares en cada lado del recipiente.

Mediante los recuentos con el microscopio de proyecciones de núcleos teñidos *in situ* se ha comprobado que la proliferación celular en ambos lados de las placas de los recipientes con placas múltiples se distribuye de manera uniforme sobre ellas así como de una a otra.

Empleo del recipiente de cultivo

Con el tipo de circulación ilustrada en la figura 1 se han elaborado sistemas operativos sencillos utilizando equipo experimental e industrial estándar.

Tanto para la multiplicación celular como para la producción de poliovirus, el medio de perfusión se reconstituye en los reservorios del medio.

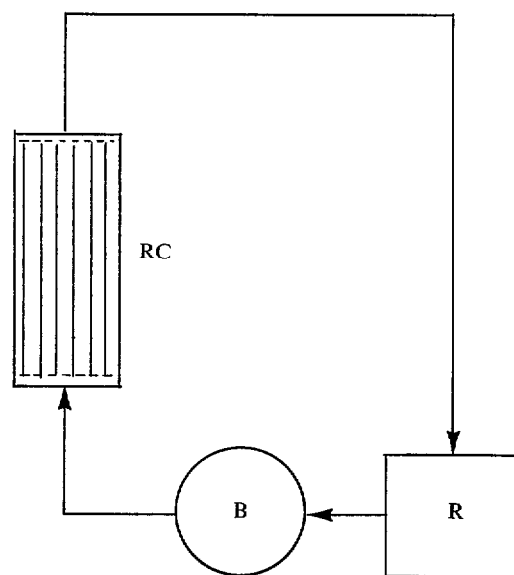
Los métodos operativos son los indicados en el proyecto de método de producción de vacuna (Apéndice).

Multiplicación de células diploides

Los estudios preliminares se realizaron utilizando la cepa WI-38 de célula diploide humana recibida del Dr. L. Hayflick. Sin embargo, en todos los estudios descritos en este trabajo se empleó la cepa MRC-5 obtenida del Dr. P. Jacobs, del Consejo de Investigaciones Médicas de Londres.

Para la multiplicación celular en todos los

FIGURA 1—Sistema básico de funcionamiento del recipiente de cultivo por perfusión en estudios de proliferación celular y producción de virus.



R = Reservorio.

B = Bomba.

RC = Recipiente de cultivo.

experimentos se utilizó el medio basal de Eagle (MBE) complementado con suero de feto de ternera. La suspensión celular obtenida de cultivos en frascos en la 27ª o 28ª duplicación celular se utilizó como inóculo para los cultivos paralelos en recipientes de perfusión y en frascos fijos. Los recuentos celulares se hicieron mediante la tinción de células fijas *in situ* y los de núcleos por microscopía de proyecciones. Se procedía sistemáticamente a los recuentos cada 18 horas (recuento de inóculo) y al final del período de proliferación, con otros más cuando se estudiaba la multiplicación celular (figura 2).

Las células inoculadas en recipientes de perfusión muestran una adhesión total al

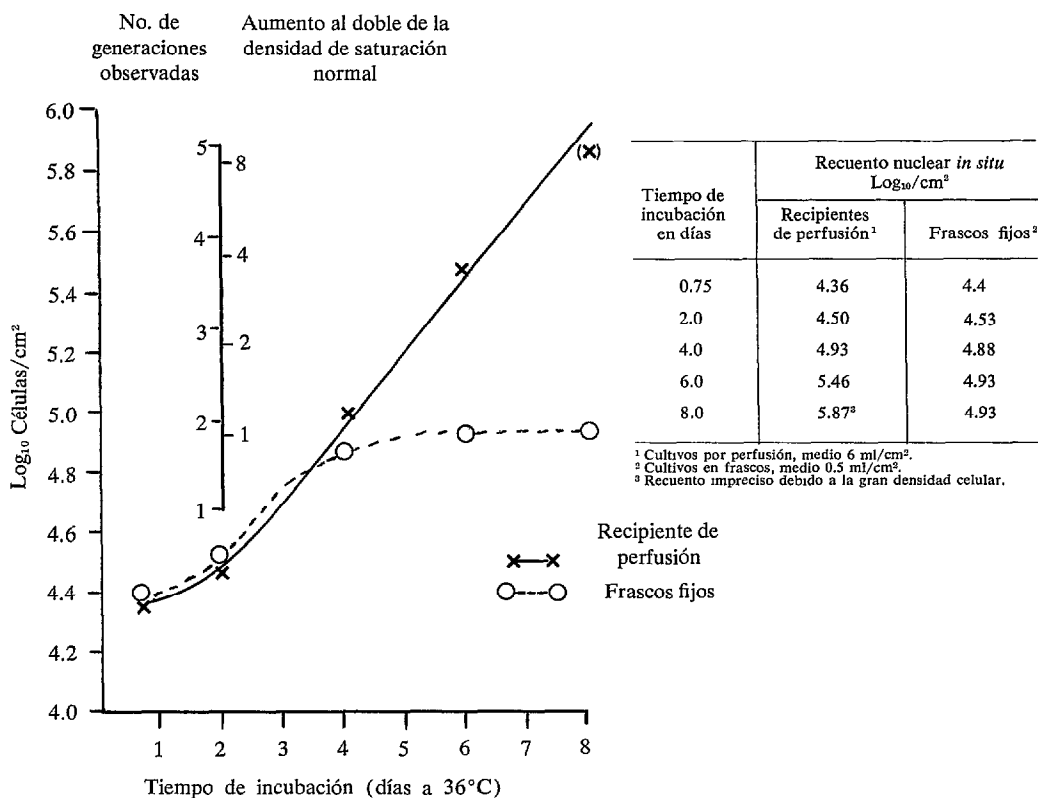
cabo de 30 minutos y, en una hora, se extienden sobre la superficie del vidrio.

Se ha demostrado que la fase de retraso de las células en cultivos por perfusión es del mismo orden de un inóculo celular equivalente en frascos.

El tiempo de generación de células en cultivos por perfusión (26–28 horas) es constante aun en densidades celulares elevadas y similar al observado en cultivos paralelos de baja densidad en frascos.

El volumen del medio limita la densidad de saturación de las células diploides en cultivos por perfusión de la misma manera que en los cultivos en frascos. Sin embargo, en el sistema de perfusión las dimensiones físicas del recipiente de cultivo no son las

FIGURA 2—Multiplicación de células diploides (MRC-5) en recipientes de perfusión y en frascos fijos.



Recuentos nucleares por microscopía de proyección después de fijar y teñir las células *in situ*.

que determinan el volumen, como ocurre en los frascos, sino la capacidad del reservorio, que es virtualmente ilimitada. Cuando se usan grandes volúmenes de medio, la multiplicación celular en los cultivos por perfusión continúa a una tasa logarítmica hasta llegar a sobrepasar el nivel en que se observan cultivos de capas múltiples, que contienen alrededor de 1×10^6 células/cm² (figura 2). Estos cultivos de capas múltiples se consideran inapropiados para producir vacuna de uso humano, porque puede ocurrir que el nivel de duplicación de la población celular no sea el mismo en todas las capas horizontales.

En la preparación de cultivos destinados a estudios de producción de virus, la densidad celular se limitó de 1.5 a 2.0×10^5 células/cm² equivalente a dos veces la densidad de saturación observada en los cultivos en frascos. Esto se logró definiendo el volumen de medio requerido, el inóculo y el tiempo de incubación. Estos cultivos son densos, pero no de capas múltiples, porque sólo se observan células yuxtapuestas en las estriaciones cruzadas en la extensión celular como ocurre en los cultivos en frascos. En todos los cultivos se observó la orientación típica de las células diploides.

Las células reproducidas por perfusión con el procedimiento mencionado subcultivadas luego en frascos, no han mostrado cambios cariológicos.

Propagación del virus de poliomiélitis (cepa Lsc 2ab)

La propagación de virus por perfusión en células MRC-5 se comparó con cultivos paralelos en frascos fijos manipulados con métodos tradicionales. En todos los experimentos se empleó el medio M199 como diluyente de siembra y medio de producción de virus. Como virus de siembra se utilizó una preparación de virus derivada de cultivos de células renales de mono *patas* al nivel SO+4 en concentraciones víricas finales de $10^{4.8}$ ó $10^{5.3}$ DICT₅₀/ml. Las titulaciones

de virus se realizaron con el sistema de célula Vero/microtítulo de sensibilidad similar al sistema HEp 2 C recomendado por el Dr. A. Sabin. Los métodos de cultivo por perfusión fueron, en general, los descritos en el proyecto de método de producción de vacuna (Apéndice). Todos los cultivos infectados se incubaron a 34.5°C.

En los trabajos preliminares se observó que el rendimiento era significativamente superior cuando se empleaba un régimen de recolección diaria ($+0.3 \log_{10}$), aunque a las 24 horas el rendimiento representaba una proporción insignificante del total. Se adoptó, por lo tanto, un régimen de recolección diaria en todos los experimentos ulteriores efectuándose la última dentro de las 96 horas.

En el cuadro 1 figuran algunos resultados típicos, y en el cuadro 2 se sintetizan los de varios experimentos.

Sobre la base de estos resultados se observará que el rendimiento medio de los recipientes de perfusión es $10^{2.83}$ DICT₅₀/célula, en comparación con un valor de $10^{2.27}$ DICT₅₀/célula en los grupos paralelos de control. Esta diferencia de $0.56 \log_{10}$ puede representar una ventaja inherente al sistema de perfusión o reflejar diferencias intrínsecas en los dos métodos.

El rendimiento por centímetro cuadrado refleja no solo la diferencia en rendimiento/célula, sino también la mayor densidad celular. En este caso el sistema de perfusión muestra una ventaja de $0.73 \log_{10}$ sobre el sistema de frascos cuando los valores medios son $10^{8.02}$ y $10^{7.29}$ DICT₅₀/cm², respectivamente.

En estos trabajos se hizo hincapié en la eficacia de la producción de virus (es decir, el rendimiento/célula) y no en los títulos elevados. No obstante, el rendimiento medio de $10^{8.02}$ DICT₅₀/cm², representa un título de $10^{7.84}$ DICT₅₀/ml, que es satisfactorio para la fabricación de vacuna.

Naturalmente, el número de dosis de vacuna por lote de producción dependerá de la superficie de proliferación utilizada, el

CUADRO 1—Producción de virus poliomielítico (Lsc 2ab) en cultivos por perfusión y en frascos fijos con células MRC-5. Algunos resultados experimentales típicos.

Experi- mento No.	Cultivos celulares			Cosecha		Rendimiento vírico Log ₁₀ DICT ₅₀			
	Tipo de recipiente de cultivo	Superficie de prolife- ración (cm ²)	Densidad celular (células/ cm ²)	Día posterior a la infec- ción	Volu- men (ml)	Por ml	Por recipiente	Por célula	Por cm ²
6	Perfusión	200	1.64×10^5	2	100	8.04	10.04	2.57	7.74
				3	100	7.48	9.48	2.01	7.18
				4	100	6.60	8.60	1.13	6.30
				2-4	300	(7.69)	10.17	2.70	7.87
	Frascos Falcon	75	0.79×10^5	2	20	6.98	8.28	1.55	6.40
				3	20	7.35	8.65	1.92	6.77
				4	20	6.98	8.28	1.55	6.40
				2-4	60	(7.14)	8.92	2.19	7.04
8	Perfusión	200	2.04×10^5	2	100	8.25	10.25	2.69	7.95
				3	100	7.50	9.50	1.94	7.20
				4	100	7.38	9.38	1.82	7.08
				2-4	300	7.89	10.37	2.81	8.07
	Frascos Falcon	75	0.96×10^5	2	20	7.25	8.55	1.73	6.67
				3	20	7.25	8.55	1.73	6.67
				4	20	7.50	8.80	1.98	6.92
				2-4	60	7.35	9.13	2.31	7.25

Las titulaciones de los experimentos se calcularon por referencia a un cultivo patrón. Los títulos de las combinaciones (días 2-4) se estimaron solamente en el experimento 6, pero se confirmaron por la titulación en el experimento 8.

CUADRO 2—Producción de virus poliomielítico (Lsc 2ab) en cultivos por perfusión y en frascos fijos con células MRC-5. Resumen de los resultados.

Recipiente de cultivo	Procedi- miento operativo	No. de resul- tados	Rendimiento vírico, Log ₁₀ DICT ₅₀					
			Por cm ² de superficie			Por célula		
			Media	Margen	Diferencia media	Media	Margen	Diferencia media
Perfusión	Medio recircu- lante Recolección diaria	12	8.02	7.75-8.35	+0.73	—	—	—
		(8)	—	—	—	2.83	2.62-3.10	+0.56
Frascos Falcon	Medio fijo Recolección diaria	7	7.29	7.04-7.61	-0.73	—	—	—
		(5)	—	—	—	2.27	2.19-2.32	-0.56

Solo se dispone de recuentos celulares exactos en 8/12 cultivos por perfusión y 5/7 grupos testigo en frascos. Todos los resultados se derivaron de los mismos experimentos paralelos.

CUADRO 3—Potencial de los recipientes de perfusión en escala de producción para la fabricación de vacuna (Lsc 2ab/células MRC).

Superficie del recipiente de perfusión (cm ²)	Rendimiento experimental Log ₁₀ DICT ₅₀ /cm ²		Rendimiento potencial de los recipientes de producción (dosis en millones)			
			10 ^{5.05} DICT ₅₀ /dosis ¹		10 ^{5.7} DICT ₅₀ /dosis ²	
	Media	Margen	Media	Margen	Media	Margen
12,500	8.02	7.75–8.35	1.48	0.79–3.16	2.63	1.41–5.62
25,000			2.96	1.58–6.32	5.26	2.82–11.24
50,000			5.92	3.16–12.64	10.52	5.64–22.48
100,000			11.84	6.32–25.28	21.04	11.28–44.96

¹ Evaluada como vacuna trivalente que contiene 5×10^5 , 3×10^5 y 1×10^5 DICT₅₀ de tipos 1, 2 y 3, respectivamente.

² Evaluada como vacuna monovalente que contiene 5×10^5 DICT₅₀ de tipo 1, solamente.

rendimiento y la formulación de la vacuna. En el supuesto del rendimiento experimental presentado en el cuadro 2, las cantidades de dosis se han calculado en función de dos formulaciones de vacuna dentro de un margen de superficie de crecimiento/lote. Esta información se presenta en el cuadro 3.

Ensayos en escala de producción

En el primer ensayo en escala de producción, empleando recipientes de una superficie de proliferación de 2.5 cm² que se puede considerar satisfactorio desde el punto de vista técnico, se obtuvo un rendimiento dentro del margen experimental ($10^{7.88}$ DICT₅₀/cm²). Este resultado se considera sumamente importante, pues confirma el diseño unificado y conceptos de operación del sistema en una escala de diferencia 125 veces mayor.

Actualmente se está procediendo al ensayo completo de material obtenido en los experimentos de producción.

Resumen

Este trabajo describe un nuevo sistema de cultivo por perfusión para producir polio-

virus atenuado en cultivos de células diploides.

Se comprobó que las características de crecimiento de las células diploides (MRC-5) eran normales en el sistema de perfusión. Se establecieron procedimientos de producción sistemática de cultivos celulares a una densidad celular de los cultivos dos veces mayor que la de los frascos fijos.

Se observó que el rendimiento de virus (Lsc 2ab) por célula y por unidad de superficie de proliferación celular, era significativamente superior en los cultivos por perfusión que los cultivos paralelos en frascos fijos, por un factor de tres y cinco, respectivamente. Utilizando recipientes de producción en pequeña escala se confirmó que el rendimiento se encontraba dentro del margen experimental.

A reserva de los resultados satisfactorios de las pruebas del virus producido, este sistema se podría utilizar para fabricar económicamente vacunas en gran escala. □

Agradecimiento

Los autores agradecen al Sr. Humberto González y a la Srta. Sonia Escutia la cooperación técnica que prestaron en la preparación de este trabajo.

REFERENCIAS

- (1) Mann, G. F. Establecimiento de un nuevo sistema de cultivo de células en capas perfundidas. I. Diseño y principios operativos. *Bol Of Sanit Panam* 74(1):48–53, 1973.
- (2) Kruse, P. F. y E. Mediema. Production and characterisation of multiple layered populations of animal cells. *J Cell Biol* 27:273–279, 1965.

APENDICE

Proyecto de método de fabricación de vacuna poliomielítica en cultivos por perfusión con células MRC-5

Fase	Operaciones en un área limpia de cultivo tisular	Muestras testigo	Notas
1.	Preparar inóculo celular a P25 por pase seriado de células de siembra en cultivos en frascos con métodos convencionales.	Prueba de esterilidad en cada pase.	Densidad del inóculo: $1.88-2.5 \times 10^4/\text{cm}^2$ Densidad de saturación: $0.75-1.0 \times 10^5/\text{cm}^2$ No. de generaciones=2
2.	Inocular células a P25 en un recipiente de cultivo por perfusión a un coeficiente de 1:4. Adsorber células en ambas caras de las placas interiores. Incubar a 36.5°C durante seis días, recirculando un volumen definido de medio de proliferación para obtener P28.	Cuentas de células de inóculo.	Densidad del inóculo: $1.88-2.5 \times 10^4/\text{cm}^2$ Densidad de saturación: $1.5-2 \times 10^5/\text{cm}^2$ No. de generaciones=3
3.	Retirar el medio de proliferación, suspender de nuevo las células mediante tratamiento de tripsina/versene y preparar un solo grupo de células en un medio de proliferación (P28).	Pruebas de esterilidad. Pruebas del medio agotado. Pruebas de células viables. Pruebas de células no viables. Verificación cariológica. Cultivos testigo en frascos o por perfusión.	
4.	Inocular células de P28 en recipientes de cultivo por perfusión a un coeficiente de 1:4 con respecto a la superficie en la fase 2. Adsorber las células como en la etapa 2 e incubarlas a 36.5°C durante 4 días, recirculando un volumen definido de medio de proliferación para obtener P30.		Densidad del inóculo: $3.8-5 \times 10^4/\text{cm}^2$ Densidad de saturación: $1.5-2 \times 10^5/\text{cm}^2$ No. de generaciones=2
5.	Retirar el medio de proliferación, lavar los cultivos mediante recirculación de un medio libre de suero, a fin de obtener un factor de dilución calculado para el suero bovino de 1:1 millones en la primera recolección.	Prueba de medio agotado. Prueba de esterilidad.	
6.	Retirar medio de lavado y llenar el recipiente con semilla de virus diluida en medio 199. Adsorber durante una hora a 34.5°C , redistribuyendo a ciertos intervalos para que todo el virus de siembra entre en contacto con las células. Comenzar la recirculación de medio 199 para obtener un volumen total de $0.5 \text{ ml}/\text{cm}^2$.	Titulación del virus de siembra. Pruebas de esterilidad.	En los estudios experimentales se utilizó virus de siembra $10^{1.7}$ DICT ₅₀ /célula, y la cosecha continúa una media de $10^{2.83}$ DICT ₅₀ /célula, lo que da un aumento del virus por un factor de $10^{0.13}$ ó $\times 1350$

APENDICE (Cont.)

Fase	Operaciones en un área limpia de cultivo tisular	Muestras testigo	Notas
7.	Cosechar el virus reemplazando el reservorio de medio 199 a intervalos de 24 horas, comenzando con el término de 22 ó 46 horas y continuando hasta las 24 horas. Retirar muestras de cosecha y almacenarlas a 4°C hasta los 4 días o a -45°C indefinidamente.	Titulaciones de virus. Pruebas de esterilidad.	Se sabe que la cosecha a las 24 horas contiene cantidades insignificantes de virus.
8.	Preparar una mezcla de las tres cosechas para obtener cosecha combinada que constituye también una suspensión a granel. Muestrear.	Todas las pruebas de cosecha de virus. Todas las pruebas de suspensión a granel.	
9.	Inmediatamente después del muestreo en la fase 8, filtrar la suspensión a granel, obtener muestras, distribuir en frascos y almacenar a -45°C, en la espera de los resultados de las pruebas.	Todas las pruebas de suspensiones a granel filtradas.	Solo se determinaría la consistencia en lotes presentados para pruebas de marcador y N.V. (neuro-virulencia).

Development of a new system for cell cultivation in perfused layered cultures. II. Application to virus vaccine manufacture (Summary)

The development of a new perfusion culture system for the production of attenuated poliomyelitis virus in cultures of diploid cells is described.

The growth characteristics of diploid cells (MRC-5) were found to be normal in the perfused system. Procedures for the routine production of cell cultures at twice the cell density of stationary bottle cultures were established.

The yield of virus (Lsc 2ab) per cell and per unit of cell growth surface area was observed

to be significantly higher in the perfused than in the parallel stationary bottle cultures by factors of three- and fivefold, respectively. Yield was confirmed, using small production-scale vessels, to be within the experimental range.

Subject to satisfactory results in the testing of the virus product, this system could be used for highly economic large-scale vaccine manufacture.

Um novo sistema de cultura de células em capas perfundidas. II. Sua aplicação para a produção de vacinas de vírus (Resumo)

Este trabalho descreve um novo sistema de cultura por perfusão, para produzir poliovírus atenuado em culturas de células diplóides.

Comprovou-se que as características de crescimento das células diplóides (MRC-5) eram normais no sistema de perfusão. Estabeleceram-se procedimentos de produção sistemática de culturas celulares a uma densidade celular das culturas duas vezes maior do que a dos frascos fixos.

Observou-se que o rendimento de vírus (Lsc 2ab) por célula e por unidade de superfície de

proliferação celular era significativamente superior nos cultivos por perfusão do que nas culturas paralelas em frascos fixos, por um fator de três e cinco, respectivamente. Com a utilização de recipientes de produção em pequena escala, confirmou-se que o rendimento se situava dentro da margem experimental.

Contanto que as provas do vírus produzido dêem resultados satisfatórios, poder-se-ia utilizar esse sistema para a fabricação econômica de vacinas em grande escala.

Un nouveau système de culture de cellules en couches perfusées. II. Son application pour produire des vaccins viraux (Résumé)

Le présent travail décrit un nouveau système de culture par perfusion pour produire un poliovirus atténué dans des cultures de cellules diploïdes.

On a constaté que les caractéristiques de croissance des cellules diploïdes (MRC-5) étaient normales dans le système de perfusion. On a établi des procédures de production systématique de cultures cellulaires à une densité cellulaire des cultures deux fois plus grande que celle des flacons fixes.

On a noté que le rendement de virus (Lsc

2ab) par cellule et par unité de superficie de prolifération cellulaire était sensiblement supérieur dans les cultures par perfusion que dans les cultures parallèles en flacons fixes dans un rapport de trois et cinq respectivement. En utilisant des récipients de production sur une petite échelle on a confirmé que le rendement restait dans les limites de l'expérience.

Sous réserve des résultats satisfaisants des épreuves du virus produit, ce système pourrait être utilisé pour fabriquer économiquement des vaccins sur une grande échelle.

VIGILANCIA DE LA VIRUELA

Hasta el 24 de marzo de 1976 se habían informado a la OMS 395 casos de viruela de los cuales 390 correspondían a Etiopía, que es actualmente el único país del mundo con viruela endémica. Los otros cinco casos se registraron en nómadas de Somalia que se habían infectado en Etiopía. Desde el 16 de octubre de 1975 no se han detectado casos en Asia.

El progreso en el descubrimiento y contención de los brotes de viruela en Etiopía ha sido constante, aunque no tan rápido como en otros países, debido principalmente a la configuración del terreno, al tamaño del país y la dotación limitada de personal. El número de aldeas infectadas disminuyó gradual e irregularmente de 91 en octubre a 52 en febrero, y el de casos de 394 a 152. Sin embargo, la situación ha mejorado considerablemente en las tres primeras semanas de marzo, durante las cuales se descubrieron solo 31 casos; muchos de ellos habían sido vacunados en el curso de las operaciones de contención, aunque no a tiempo para evitar el desarrollo de la enfermedad. En las tres últimas semanas solo se han descubierto cuatro nuevos brotes, con uno a tres casos cada uno. Al 20 de marzo existían 35 aldeas infectadas de las cuales solo 18 tenían casos activos.

[OSP, *Informe Epidemiológico Semanal*, Vol. 48, No. 16, 21 de abril de 1976.]