

PROGRAMA DE ADIESTRAMIENTO
EN SALUD ANIMAL PARA AMERICA LATINA

**Producción, control de
calidad y uso de vacunas
con adyuvante oleoso
contra la fiebre aftosa**



ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD



ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD



BANCO INTERAMERICANO DE DESARROLLO

© Organización Panamericana de la Salud, 1987

ISBN: 92 75 32014 4

Las publicaciones de la Organización Panamericana de la Salud están acogidas a la protección prevista por las disposiciones del Protocolo 2 de la Convención Universal de Derechos de Autor. Las entidades interesadas en reproducir o traducir en todo o en parte alguna publicación de la OPS deberán solicitar la oportuna autorización del Servicio Editorial, Organización Panamericana de la Salud, Washington, D.C. La Organización dará a estas solicitudes consideración muy favorable.

Las denominaciones empleadas en esta publicación y la forma en que aparecen presentados los datos que contiene no implican, de parte de la Secretaría de la Organización Panamericana de la Salud, juicio alguno sobre la condición jurídica de ninguno de los países, territorios, ciudades o zonas citados o de sus autoridades, ni respecto de la delimitación de sus fronteras.

La mención de determinadas sociedades mercantiles o del nombre comercial de ciertos productos no implica que la Organización Panamericana de la Salud los apruebe o recomiende con preferencia a otros análogos.

De las opiniones expresadas en la presente publicación responden únicamente los autores.

PREFACIO

Al establecer la meta de "Salud para Todos en el Año 2000", la Organización Mundial de la Salud y en particular la Organización Panamericana de la Salud y los países de la región americana adquirieron el compromiso de propiciar las condiciones para que todos los hombres y mujeres alcancen un grado de salud que les permita llevar una vida social y económicamente productiva. Esta meta no solamente involucra el fortalecimiento y promoción de los servicios de salud, sino que además es indispensable para la integración con otros sectores, a fin de alcanzar los objetivos de aliviar la pobreza de los pueblos del continente.

Las actividades de salud animal están íntimamente ligadas con la salud humana porque comparten las metas de proteger, fomentar y mejorar la salud para el bienestar de los seres humanos.

Esta estrecha relación se deriva de los sufrimientos humanos y de la mortalidad causadas por las principales zoonosis (las enfermedades que los animales transmiten a los seres humanos) incluyendo la Fiebre aftosa, y las pérdidas económicas y sociales ocasionadas por estas enfermedades. Además, el hombre depende del animal para su desarrollo socio-económico.

La industria pecuaria, entonces, adquiere una relevante importancia en nuestros países. Esto se deriva del hecho de que ella proporciona una fuente de proteína, como la carne y la leche, indispensables para la nutrición de la población que cada vez está más consciente de estas necesidades. Asimismo, su importancia radica en el gran potencial que tiene para proporcionar oportunidades de trabajo a diversos niveles. También, a través de la comercialización de los productos ganaderos, se obtendrán fuentes económicas adicionales de ingreso, necesarios para el desarrollo integral de los países.

Se está observando que la creciente población del mundo consume cada vez más proteína a un ritmo más acelerado que el de su producción, creándose así una crisis proteica que requiere una pronta atención por parte de los organismos de salud y agricultura de los gobiernos.

En el transcurso de los años, los Gobiernos Miembros de la Organización Panamericana de la Salud han reconocido la estrecha vinculación entre salud animal y salud humana incorporando la salud pública veterinaria en sus programas generales de cooperación técnica en las Américas, mediante la colaboración especial del sector salud y del agrícola.

América Latina posee un extraordinario potencial para el desarrollo de la ganadería, afirmándose que existen más de 500 millones de hectáreas de tierras aptas para su producción. Sin embargo, existen múltiples factores que limitan la producción y productividad de los rebaños y el uso adecuado de la tierra productiva. En este sentido, la capacitación de recursos humanos para administrar el potencial pecuario se torna en una inminente necesidad. Así, la Organización Panamericana de la Salud y el Banco Interamericano de Desarrollo, a través de un Programa de Adiestramiento en Salud Animal para América Latina (PROASA), dieron inicio a este proceso mediante la capacitación de profesionales, que una vez debidamente capacitados, constituirán la masa crítica para instrumentalizar un proceso continuo de capacitación en sus países.

Este proceso se complementa ahora con estos manuales de referencia, basados en los materiales didácticos utilizados para los cursos que se realizaron durante el programa. La información en ellos contenida es sumamente importante, debido a ser muy limitada su disponibilidad en el idioma español y por incluir información de los propios países. La finalidad promordial de estos manuales es facilitar el proceso de institucionalización de la capacitación en los diferentes países, y así lograr una mayor amplitud en la transferencia de tecnología que este Programa se ha propuesto.

Por estos motivos, tengo el agrado de hacer la presentación de esta serie de manuales que representan el acopio de conocimientos y experiencias profesionales latinoamericanas en el campo de la comunicación social, cuarentena, administración de programas, epidemiología e inmunización contra la Fiebre aftosa. Espero que dichos manuales repercutan positivamente en la búsqueda de soluciones para los problemas de la salud pública veterinaria y salud animal, contribuyendo así a la salud y bienestar de los habitantes de las Américas.

Carlyle Guerra de Macedo
Director

PROGRAMA DE ADIESTRAMIENTO EN SALUD ANIMAL PARA AMERICA LATINA (PROASA)

Antecedentes

La ganadería en las Américas constituye un importante sector de la economía agropecuaria, no sólo como fuente de alimento para la población, sino que también representa para muchos países una de las principales fuentes de divisas, debido a los grandes volúmenes de carne y subproductos de la misma que se exportan. Si bien existen muchos factores que limitan la producción de alimentos de origen animal, se considera que las enfermedades constituyen uno de los principales obstáculos para incrementar la producción ganadera por unidad, especialmente cuando se trabaja con razas especializadas y de buen caudal genético. A pesar de los esfuerzos realizados por países e instituciones regionales e internacionales en el campo de la sanidad agropecuaria en América Latina, la magnitud del problema y el tiempo que se requiere para obtener mejores rendimientos hacen que la situación deba ser atendida con prioridad, con base en los estudios y evaluaciones que han señalado las principales insuficiencias en los servicios veterinarios de los países.

La significación económica y social de los problemas vinculados a la Sanidad Animal en América Latina ha originado acciones de cierta amplitud en el campo de la cooperación financiera y técnica a la región, principalmente por parte del Banco Interamericano de Desarrollo (BID), la Organización Panamericana de la Salud (OPS) y el Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria (OIRSA) que han sido pioneros en este campo. Estos esfuerzos se encaminan hacia cuatro objetivos principales: a) prevenir la introducción de enfermedades exóticas a sus territorios; b) controlar aquellas enfermedades que son de carácter endémico en los países; c) erradicar aquellas enfermedades para las cuales la tecnología moderna haya encontrado los medios adecuados para su eliminación; y d) mejorar el nivel del manejo higiénico-sanitario de los hatos.

En 1976, los Ministros de Agricultura y de Salud de Colombia presentaron una solicitud para un Proyecto Subregional en Salud Pública y Salud Animal para los países del Grupo Andino. Durante la Segunda

Reunión de Ministros de Agricultura del Grupo Andino se recomendó a la Junta del Acuerdo de Cartagena (JUNAC) que coordinara la reformulación del proyecto. En octubre de 1978, la JUNAC convocó la Primera Reunión de Expertos Gubernamentales sobre Sanidad Animal con el fin de reformular el proyecto el cual fue presentado al Banco por conducto del Ministro de Agricultura del Ecuador. Separadamente en febrero de 1975, el Director del OIRSA envió al Banco una solicitud de cooperación técnica para la ejecución de un Programa de Adiestramiento de Inspectores de Cuarentena Agropecuaria en los países que geográficamente forman el OIRSA. En forma separada de las dos solicitudes mencionadas, en junio de 1978 el Director de la OPS envió para la consideración del Banco un "Proyecto sobre la Transmisión Tecnológica y Evaluación de la Aplicación Masiva de Vacuna de Coadyuvante Oleoso contra la Fiebre aftosa". En octubre de 1979, dada la importancia del problema de la sanidad animal para el desarrollo de la región, la Administración del Banco decidió atender estas solicitudes e incluir las propuestas en un programa único.

El programa abarcaría dos subprogramas de adiestramiento: (1) uno para profesionales y (2) otro para técnicos y paratécnicos. El primero cubriría el adiestramiento en (a) vacuna antiaftosa en adyuvante oleoso, (b) administración de programas de salud animal, (c) vigilancia epidemiológica, (d) comunicación social y (e) cuarentena animal. El segundo subprograma consistiría en cursos de carácter subregional para inspectores de cuarentena agropecuaria a nivel de puertos, aeropuertos y fronteras.

El Subprograma 1 de adiestramiento de profesionales sería ejecutado por la Organización Panamericana de la Salud (OPS) y el Subprograma 2 de adiestramiento de técnicos y paratécnicos sería efectuado por el Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria (OIRSA).

Objetivos

Los objetivos generales del Programa de Adiestramiento de Salud Animal para América Latina (PROASA) eran:

1. Fortalecer la capacidad y eficiencia de los recursos humanos necesarios para complementar los programas de salud animal a mediano y largo plazo de los países miembros.

2. Fortalecer el funcionamiento de las estructuras de defensa sanitaria en la región, de manera que se pueda llevar a cabo el desarrollo de sistemas de salud animal en los países miembros concordantes con la política de integración de la región.

3. Contribuir a la consolidación de las unidades permanentes de adiestramiento técnico-profesional en la región, que permitan actualizar la capacitación de los recursos humanos en forma continua.

Los objetivos específicos incluían lo siguiente:

A. El adiestramiento de personal profesional de los Países Beneficiarios que lo requieran, a fin de:

(1) Transferir la tecnología de la producción, control de calidad y aplicación sistemática de la vacuna antiaftosa de adyuvante oleoso a profesionales involucrados en actividades de vacunación, y

(2) Mejorar la capacidad de dicho personal en la administración de campañas sanitarias, sistemas de vigilancia epidemiológica, comunicación social y cuarentena animal.

B. El fortalecimiento de las instituciones de enseñanza existentes en la región, a través del desarrollo de los eventos de adiestramiento, para asegurar la capacitación en forma permanente y continua de los recursos humanos.

Descripción del programa

El Programa de Adiestramiento en Salud Animal para América Latina, denominado PROASA, fue de carácter regional, ejecutado por la Organización Panamericana de la Salud, la Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud para las Américas (OPS/OMS), con la participación del Banco Interamericano de Desarrollo, y de los Países Beneficiarios.

El Presidente del Banco y el Director de la OPS firmaron un convenio en el día 24 de septiembre de 1981 sobre la utilización de recursos no reembolsables de cooperación técnica del Banco para la realización del Programa. El monto de la contribución del Banco fue de EUA \$ 1 860.000.

La organización, dirección, coordinación, administración y supervisión de las actividades estuvieron a cargo del Programa de Salud Pública Veterinaria de la OPS. A fin de orientar, programar y evaluar las actividades del programa se constituyó un Comité de Programación y Evaluación (CPE), integrado por el Banco, la OPS y el OIRSA. La OPS hizo los arreglos necesarios con los Países Beneficiarios a fin de que éstos participaran activamente en las actividades de adiestramiento. Con aquellos países seleccionados como sedes de los cursos, la OPS firmó los acuerdos correspondientes basados en los términos de referencia señalados en el Convenio entre el Banco y la OPS, detallando específicamente los aportes de recursos humanos, instalaciones, equipo, etc., que brindaría el respectivo país; de esta manera se procuró asegurar la ins-

titucionalización y continuación de la capacitación en forma continua en esos países.

Con la contribución del Banco se contrataron tres (3) consultores a tiempo completo (equivalente a 106 meses/hombre) como Directores Regionales del Programa: uno con sede en Lima, Perú; uno con sede en México; y otro con sede en Río de Janeiro.

Participaron en el programa 35 funcionarios del Programa de Salud Pública Veterinaria, incluyendo los de sus dos Centros especializados (Centro Panamericano de Fiebre Aftosa en Río de Janeiro, Brazil y Centro Panamericano de Zoonosis en Buenos Aires, Argentina) equivalente a 209.0 meses/especialistas, en la coordinación e instrucción de los cursos y seminarios. También se contrataron con la contribución del Banco, 17 consultores a corto plazo, equivalente a 12.3 meses/hombre, para preparar materiales didácticos y actuar como instructores.

La ejecución del Programa consistió en lo siguiente: actividades preparatorias (del 24 de septiembre de 1981 hasta el 24 de enero de 1982), realización de los cursos y seminarios (del 24 de enero de 1982 hasta el 30 de junio de 1985), y elaboración e impresión de los manuales (del 1 de julio de 1985 hasta el 24 de septiembre de 1986).

Actividades del programa

Durante la ejecución del Programa se realizaron un total de 30 cursos y 2 seminarios en 13 países. El Cuadro 1 muestra los temas de adiestramiento, número de cursos realizados y duración de cada uno. La duración total de los eventos fue equivalente a 154 semanas/cursos (38.5 meses/cursos), ejecutados dentro del plazo de 36 meses. En el Cuadro 2 aparece el cronograma de los cursos y seminarios.

Se adiestró un total de 772 profesionales, la mayoría médicos veterinarios, procedentes de 21 países de América Latina. En el Cuadro 3 se resume el número de profesionales adiestrados por país y área de especialidad. El número actual de participantes en los cursos excedió cerca del 29 por ciento de lo programado en el Convenio, el que era de 600. Los participantes adicionales fueron costeados por la OPS. Este incremento fue posible debido a la utilización óptima de los recursos disponibles y no perjudicó la buena marcha de los cursos.

Una de las actividades más significativas del Programa ha sido la preparación de material didáctico. Algunos de los temas del adiestramiento fueron expuestos por primera vez en forma práctica y aplicada, utilizando para tal fin datos e información existentes en los países de América Latina. Se produjo este material no solamente para las ayudas

audiovisuales, que apoyaron el adiestramiento, sino que además se elaboraron fascículos y módulos que facilitaron el aprendizaje auto-tutorial. De este modo los participantes adiestrados en los cursos pueden llevar a cabo en sus instituciones nacionales el adiestramiento de otros profesionales. En esta forma se ha estado instrumentando el efecto multiplicador del programa y la institucionalización de las actividades de adiestramiento.

Estos materiales se editaron con el objeto de constituir la presente serie de manuales. La serie de manuales consiste en 9 tomos, cubriendo los siguientes temas:

- A. Cuarentena Animal
- B. Vigilancia Epidemiológica
- C. Administración de Programas de Salud Animal
- D. Comunicación Social
- E. Producción y Control de Vacuna en Adyuvante Oleoso

Se espera que estos manuales sirvan como texto de referencia en cursos similares.

Programa de Salud Pública Veterinaria
Organización Panamericana de la Salud
Washington, D.C.
24 de Abril de 1986

Producción, control de calidad y uso de vacunas

CUADRO 3

Número de participantes programados y adiestrados por país y área de especialidad

PAIS	CURSOS A*								TOTAL
	COMUNICACION SOCIAL	ADMINISTRACION	VIGILANCIA EPIDEMIOLOGICA	CUARENTENA ANIMAL	PRODUCCION Y CONTROL VACUNA OLEOSA	VACUNACION SISTEMATICA	SUB-TOTAL	SEMINARIO EVALUACION	
Argentina	5	8	20	3	3	46	85	3	88
	5	5	14	3	1	40	68	3	71
Bolivia	6	3	3	3	0	25	40	3	43
	4	4	3	3	1	20	35	2	37
Brasil	20	2	22	8	2	86	140	5	145
	20	0	20	10	1	60	111	4	115
Chile	6	5	7	3	0	2	23	2	25
	5	5	5	3	0	0	18	2	20
Colombia	13	5	4	3	1	24	50	3	53
	4	4	2	3	1	20	34	2	36
Costa Rica	0	11	3	3	0	0	17	0	17
	0	3	3	2	0	0	8	0	8
Cuba	0	1	0	0	0	0	1	0	1
	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ecuador	4	4	17	3	2	29	59	3	62
	4	4	8	3	2	20	41	2	43
El Salvador	0	3	5	2	0	0	10	0	10
	0	3	3	2	0	0	8	0	8
Guyana	0	0	0	0	0	0	0	1	1
	0	0	0	0	0	0	0	2	2
Guatemala	1	2	5	2	0	0	10	0	10
	0	3	3	2	0	0	8	0	8

Programa de Adiestramiento en Salud Animal

Haití	1	0	0	1	0	0	2	0	2
	1	1	1	1	0	0	4	0	4
Honduras	0	3	3	2	0	0	8	0	8
	0	3	3	2	0	0	8	0	8
México	16	19	11	4	0	0	50	0	50
	17	17	8	6	0	0	48	0	48
Nicaragua	0	3	5	2	0	0	10	0	10
	0	3	3	2	0	0	8	0	8
Panamá	0	5	10	2	0	0	17	0	17
	0	5	5	2	0	0	12	0	12
Paraguay	5	5	10	4	1	25	50	4	54
	5	5	8	2	1	20	41	2	43
Perú	5	14	6	3	3	25	56	3	59
	4	4	4	3	2	20	37	2	39
Rep. Dominicana	2	4	2	2	0	0	8	0	8
	2	2	2	2	0	0	8	0	8
Uruguay	4	11	4	1	2	31	53	3	56
	5	5	4	2	1	20	37	2	39
Venezuela	1	1	5	14	3	26	50	3	53
	4	4	3	8	2	20	41	2	43
Total	89	109	142	65	17	319	739	33	772
	80	80	102	61	12	240	575	25	600

A* = Adiestrados
P = Programados

**PROGRAMA DE ADIESTRAMIENTO EN SALUD ANIMAL
PARA AMERICA LATINA (PROASA)**

Coordinación general

DR. MARIO V. FERNANDES
Coordinador, Programa de Salud Pública Veterinaria
Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la
Salud
Washington, D.C., EUA

DR. PRIMO V. ARAMBULO III
Asesor Regional en Salud Pública Veterinaria
Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la
Salud
Washington, D.C. EUA

DR. ALFONSO RUIZ M.
Coordinador Regional de PROASA
Programa de Salud Pública Veterinaria
Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la
Salud
México, D.F., México

DR. OSCAR GALVEZ G.
Coordinador Regional de PROASA
Programa de Salud Pública Veterinaria
Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la
Salud
Lima, Perú

DR. DANIEL ABARACON
Coordinador Regional de PROASA
Programa de Salud Pública Veterinaria-Centro Panamericano de Fiebre
Aftosa
Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la
Salud
Río de Janeiro. Brasil

Banco Interamericano de Desarrollo (BID)

SR. FRANK J. MARESCA
Jefe, División Cooperación Técnica I

ING. AGR. GREGORIO BELTRAN
División Cooperación Técnica I

DR. JOSE KOHOUT
División Cooperación Técnica I

ING. AGR. CESAR CAINELLI
Jefe, Sección de Ganadería, División de Desarrollo Agropecuario y
Forestal

DR. ABRAHAM A. ARCE
Sección de Ganadería, División de Desarrollo Agropecuario y Forestal

DR. ENRIQUE E. TORRES
Sección de Ganadería, División de Desarrollo Agropecuario y Forestal

CONTENIDO

1. Introducción
2. Estructuración del Curso de producción, control de calidad y uso de vacunas con adyuvante oleoso contra la Fiebre aftosa

I. ASPECTOS GENERALES

3. Aspectos generales sobre la Fiebre aftosa
4. Perjuicios económicos
5. Formas de lucha
6. Inmunidad por medio de vacunas
7. Vacunas de virus vivos atenuados contra la Fiebre aftosa
8. Vacunas inactivadas contra la Fiebre aftosa
9. Uso de las vacunas con adyuvante oleoso en América del Sur

II. METODOLOGIA DE PRODUCCION DE VACUNAS CON ADYUVANTE OLEOSO

10. Requerimientos básicos en un laboratorio de producción de vacunas contra la Fiebre aftosa
11. Lavado, preparación y esterilización de material
12. Unidad de producción por medio de cultivo
13. Unidad de mantenimiento de células-banco de células
14. Cultivos celulares para replicación industrial de virus. Producción de suspensiones víricas para vacunas
15. Inactivación
16. Formulación de la vacuna con adyuvante oleoso

III. CONTROLES DE PROCESO Y PRODUCTO FINAL

17. Controles de proceso
18. Controles de producto final

ANEXOS

- Anexo 1. Infección de cultivos celulares BHK con mycoplasma
- Anexo 2. Titulación del virus de la Fiebre aftosa
- Anexo 3. Seroprotección
- Anexo 4. Banco de sueros
- Anexo 5. Control de calidad de la vacuna anti-aftosa con adyuvante oleoso

Anexo 6. Directivas para control oficial de calidad de vacunas
contra la Fiebre aftosa con adyuvante oleoso y
directivas convencionales para la mayor duración
de la inmunidad

AUTORES

Dr. DANIEL ABARACON
Dr. ALBINO ALONSO FERNANDEZ
Dr. VICENTE ASTUDILLO
Dr. HORACIO BARAHONA
Dr. RAUL CASAS OLASCOAGA
Dr. EDUARDO R. CENTENO
Dr. JAIME ESTUPIÑAN
Dr. ALDO C. GAGGERO
Dr. HOMERO GIACOMETTI VIERA
Dr. IVO GOMES
Dr. JULIO MESQUITA
Dr. FELIX J. ROSENBERG
Dr. MAGNUS SAEL SÖNDAHL
Dr. JUAN ZAPATEL

Programa de Salud Pública Veterinaria
Centro Panamericano de Fiebre Aftosa
Organización Panamericana de la Salud
Río de Janeiro, Brasil

I. INTRODUCCION

En el año 1981, el Banco Interamericano de Desarrollo (BID) y la Organización Panamericana de la Salud (OPS) suscribieron un convenio de cooperación técnica, con fondos no reembolsables del BID, que se denominó Programa de Adiestramiento de Profesionales Latinoamericanos en Sanidad Animal (PROASA).

El Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (CPFA) ya había desarrollado un intenso programa de investigación sobre vacunas con adyuvante oleoso que tenían la característica de inducir una inmunidad más sólida y de más larga duración que las vacunas convencionales. Esas investigaciones permitieron conocer a nivel de laboratorio y de campo los beneficios derivados de esa superioridad de la vacuna antiaftosa con adyuvante oleoso, tanto para su uso en regiones de difícil manejo de los ganados por razones geográficas, climáticas y de infraestructura, como los beneficios económicos derivados de la menor frecuencia de vacunación requerida.

Debido a esas razones, uno de los objetivos específicos del programa fue la transferencia de la tecnología de producción, control de calidad y aplicación sistemática de la vacuna antiaftosa con adyuvante oleoso a profesionales dedicados a las actividades de lucha contra la Fiebre aftosa.

El Subprograma I de vacunas oleosas del PROASA desarrolló las siguientes actividades:

Un seminario de divulgación de los mecanismos estratégicos, tácticos y operativos para el uso de la vacuna con adyuvante oleoso en los programas de lucha contra la Fiebre aftosa en América del Sur. La duración fue de una semana y participaron 11 jefes de los programas nacionales de lucha contra la Fiebre aftosa.

Dos cursos sobre producción y control de vacunas con adyuvante oleoso. La duración de cada curso fue de seis semanas y participaron un total de 16 profesionales.

Doce cursos sobre el uso de la vacuna antiaftosa con adyuvante oleoso en los programas de control de la enfermedad. Cada curso tuvo una duración de tres semanas y participaron 308 veterinarios de nivel nacional y regional responsables por la ejecución de los programas de lucha contra la Fiebre aftosa. Estos cursos se realizaron en la Argentina.

Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador, Paraguay, Perú, Uruguay y Venezuela.

Un seminario al final del programa sobre la evaluación del uso de vacunas con adyuvante oleoso en los programas de lucha contra la Fiebre aftosa en América del Sur. Este seminario tuvo una duración de dos semanas y en él participaron los directores de programas de lucha contra la Fiebre aftosa en América del Sur.

Todas las actividades previstas en el programa inicial fueron realizadas y los informes correspondientes a cada uno fueron producidos oportunamente.

El Capítulo I consiste en una síntesis general de los aspectos relacionados con perjuicios económicos causados por la Fiebre aftosa, formas de lucha, inmunización y tipos de vacuna disponibles.

El Capítulo II expone clara y detalladamente la metodología para elaboración de vacunas con adyuvante oleoso contra la Fiebre aftosa.

El Capítulo III, como complemento de la producción del biológico, describe los controles requeridos para las vacunas con adyuvante oleoso.

Se incluyen algunos anexos aclaratorios de técnicas de laboratorio necesarias para la implementación de la tecnología en los laboratorios que así lo deseen.

2. ESTRUCTURACION DEL CURSO DE PRODUCCION, CONTROL DE CALIDAD Y USO DE VACUNAS CON ADYUVANTE OLEOSO CONTRA LA FIEBRE AFTOSA

La presente sección tiene el propósito de ilustrar a los técnicos sobre la forma en que fueron estructurados los cursos de producción y control de vacunas con adyuvante oleoso contra la Fiebre aftosa, del Programa de Adiestramiento en Salud Animal para América Latina.

Objetivos del curso

General

Divulgar la tecnología y capacitar médicos veterinarios de laboratorios de producción y control de vacuna antiaftosa de América del Sur, sobre el proceso de elaboración y control de calidad de vacuna antiaftosa con adyuvante oleoso.

Específicos

Al terminar el curso, los participantes estarán en la capacidad de:

- a) Conocer las técnicas de producción de vacuna con adyuvante oleoso.
- b) Conocer los componentes de la vacuna antiaftosa de adyuvante oleoso, los métodos de preparación y control de calidad de éstos, los equipos necesarios para su preparación y las fuentes de suministros.
- c) Conocer, realizar e interpretar las pruebas de control de calidad y eficacia de las vacunas antiaftosa con adyuvante oleoso y las normas de aceptación.
- d) Conocer la metodología para el desarrollo a nivel de laboratorio y evaluación a nivel de campo de las vacunas antiaftosa con adyuvante oleoso.

Perfil del participante

El participante a los cursos de producción y control de vacunas antiaftosa con adyuvante oleoso deberá reunir los siguientes requisitos:

- Médico veterinario graduado.
- Actualmente trabajando en un laboratorio oficial o privado de producción de vacuna antiaftosa en América del Sur.
- Experiencia mínima de dos años en procesos de producción y control de calidad de vacuna antiaftosa.

Duración

El curso de producción y control de vacuna con adyuvante oleoso contra la Fiebre aftosa fue concebido para una duración de 6 semanas, correspondiendo a un total de 240 horas de trabajo.

Organización y metodología

De acuerdo con la metodología de adiestramiento en servicio, los participantes se incorporan a las actividades de la planta piloto de producción de vacunas del CPFA bajo la orientación de los profesionales de la planta y supervisión de un consultor.

La actividad de control de calidad es desarrollada en la unidad de diagnóstico y control de calidad del CPFA y en un laboratorio oficial de control de Brasil.

Como complemento didáctico se entrega a cada participante material bibliográfico de referencia.

Contenido

El curso consiste fundamentalmente en tres unidades; como se indica a continuación:

	Tema	Horas
Unidad 1	Aspectos básicos	40
Unidad 2	Producción de vacunas	120
Unidad 3	Control de vacunas	80

Los Aspectos componentes de cada unidad son:

Unidad 1

- Aspectos generales de virología y estadística.

- Aspectos físico-químicos aplicables a la producción de las vacunas con adyuvante oleoso.
- Aspectos inmunológicos aplicables a las vacunas de adyuvante oleoso.
- Aspectos históricos del desarrollo de las vacunas de adyuvante oleoso.

Unidad 2: Producción de vacunas

- Producción de antígeno
- Inactivación de antígeno
- Concentración de antígeno
- Preparación de adyuvantes
- Preparación de emulsiones
- Control de calidad y estabilidad de las emulsiones
- Elaboración de vacunas de adyuvante oleoso
- Manejo de equipos
- Problemas de producción de vacunas de adyuvante oleoso
- Manejo de vacunas de adyuvante oleoso
- Control de calidad de materias primas

Unidad 3: Control de calidad y eficacia

- Controles de elaboración (título infeccioso y de fijación de complemento del antígeno).
- Controles físico-químicos
- Pruebas de inocuidad y estabilidad
- Pruebas de esterilidad
- Pruebas de determinación de la masa antigénica
- Pruebas de potencia en bovinos, cerdos y cobayos
- Pruebas de seroprotección y seroneutralización
- Normas y legislación de control de vacunas de adyuvante oleoso

Cronograma de actividades

A continuación se detalla el programa de actividades seguido por el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa para la ejecución del Curso de Producción y Control de Vacuna contra la Fiebre Aftosa con adyuvante oleoso.

Actividad

Día 1	Mañana	Recepción de los becarios. Acto inaugural.
	Tarde	Conceptos generales sobre vacunas. Visita general a las instalaciones del CPFA. Explicación de su cometido y funcionamiento. Distribución de ropas de laboratorio y adjudicación de armarios a cada becario.
Día 2	Mañana	Vacunas contra la Fiebre aftosa. Continuación. Vacunas con adyuvante oleoso.
	Tarde	Conceptos generales de inmunología. Patogenia e inmunología de la Fiebre aftosa.
Día 3	Mañana	Virología general. Virus aftoso en particular.
	Tarde	Conceptos de estadística aplicados a laboratorio.
Día 4	Mañana	Conceptos epidemiológicos relacionados con la estrategia del uso de la vacuna contra la Fiebre aftosa con adyuvante oleoso.
	Tarde	Emulsiones. Teoría y práctica.
Día 5	Mañana	Formulación de vacunas contra la Fiebre aftosa con adyuvante oleoso. Controles físico-químicos y bacteriológicos. Control de estabilidad. Rotura de emulsión.
	Tarde	Control biológico en cobayos. Vacunación en cobayos.
Día 6	Mañana	Métodos modernos en desarrollo para la producción industrial de inmunógenos. Ingeniería genética y síntesis química. Proyección práctica. Ventajas y limitaciones. Determinación de masa antigénica en suspensiones víricas. Integridad de proteínas capsidales. <i>Práctica:</i> Test de Berlin. Uso de aceites y emulsificantes puros e impuros para demostración. <i>Proyecto industrial:</i> Estudio de mercado. Viabilidad económica. Selección y construcción de la planta. Equipo. Producción experimental.

Actividad

Día 7	Mañana	Banco de células. Líneas celulares. Medios de cultivo.
		<i>Proyecto industrial:</i> Servicios y utilidades. Agua. Vapor-aire-vacío. Gas-ventilación-efluencia. Incinerador.
Día 8	Mañana	Esterilización de tanques de emulsificación. Preparación de material, frascos, etc. Filtración de aceites. Mezcla suspensiones víricas.
	Tarde	Instalación de utilidades, proceso, eléctrica, equipos de producción. Mantenimiento de la planta y equipos. Ensayo con los alumnos del diseño esquemático de una planta industrial de producción de vacunas antiaftosa con adyuvante oleoso.
Día 9	Mañana	Formulación de vacunas con adyuvante oleoso. Vacunas oleosas de emulsión doble. Emulsiones experimentales. Controles.
	Tarde	Administración de laboratorios de producción de vacunas.
Día 10	Mañana	Proceso suero bovino para medio de cultivo. Inactivación del suero. Filtración. Tratamiento con PEG.
	Tarde	Observación de ratones. Test de Berlin. Diseño experimental con especial referencia a ensayos de vacunas.
Día 11	Mañana	<i>Trabajos prácticos:</i> Formulación de vacuna con adyuvante oleoso. Filtros esterilizantes, diversos tipos, preparación y uso. Conceptos sobre diversos métodos de filtración.
	Tarde	Vacunas de virus vivo atenuado. Su significación en Fiebre aftosa. Proceso de suspensiones víricas para vacunas inactivadas. Métodos de concentración de suspensiones víricas Al(OH) ₃ -PEG-Ultrafiltración.
Día 12	Mañana	Vacunas con adyuvante oleoso con virus adsorbido sobre Al(OH) ₃ . Aspectos teóricos y prácticos.

Actividad

	Tarde	Inactivación de virus. Conceptos. Inactivantes. Aspectos teóricos y prácticos.
Día 13	Mañana	Revisión general de lo actuado.
	Tarde	Demostración de instalación y equipos del área de virus de la planta piloto. Demostración y discusión sobre procesos de producción de virus en cultivos celulares en suspensión, en frascos, en tanques y en botellas roller. Equipos y proceso de inactivación. Controles de no infectividad.
Día 14	Mañana	Virus aftoso. Clasificación. Estructura. Morfogénesis. Caracterización del virus por <i>fingerprint</i> .
	Tarde	Lectura final de Prueba de Berlin. Producción industrial de células y virus en botellas roller y en tanques. Inicio pruebas de inocuidad. Titulación de virus.
Día 15	Mañana y tarde	Continuación producción industrial de células y virus. Concentración de virus por ultrafiltración. Equipo, proceso y controles.
Día 16	Mañana	Caracterización de virus aftoso. <i>Fingerprint</i> y electroenfocado.
	Tarde	Continuación producción industrial de células y virus. Inactivación de virus en frascos y tanques. Continuación de pruebas de inocuidad.
Día 17	Mañana	Continuación caracterización de virus por " <i>Fingerprint</i> " y electroenfocado.
	Tarde	Controles celulares. Cultivos celulares en frascos por los alumnos. Lecturas y titulación de virus.
Día 18	Mañana	Anticuerpos monoclonales. Preparación de semillas de virus. Controles completos de la producción. Inocuidad. Lectura titulaciones de virus, etcétera. Conceptos y desarrollo de inactivantes de primer orden.
	Tarde	Revisión general de trabajos área de virus.

Actividad

Día 19	Mañana	Control de calidad de la vacuna antiaftosa. Preparación de virus para comprobación.
	Tarde	FC ₅₀ . Teoría y práctica.
Día 20	Mañana	Visita Departamento de Investigaciones. Acompañar trabajos prácticos de " <i>fingerprint</i> " y electroenfocado. Discusión de resultados obtenidos con cepas actuantes en América del Sur.
	Tarde	Selección y pruebas en bovinos.
Día 21	Mañana	Índice de seroprotección. Teoría y práctica. Expectativas porcentuales de protección.
	Tarde	Seroneutralización.
Día 22	Mañana	Técnicas ELISA e IDGA.
	Tarde	Descarga de virus a los cobayos vacunados con vacuna oleosa el día 5. Discusión de la prueba. Práctica de inoculación hecha por los becarios. Técnicas de fijación del complemento. Tipificación y subtipificación de virus. Titulación de virus por fijación del complemento. Teoría y práctica.
Día 23	Mañana	Pruebas IC y DPC ₅₀ .
	Tarde	Lectura cobayos DPC ₅₀ .
	Noche	Viaje Río de Janeiro/Campinas.
Día 24	Mañana y tarde	Visita Laboratorios LARA/Campinas. Producción de vacunas con adyuvante oleoso. Técnica industrial.
	Noche	Viaje Campinas/Porto Alegre.
Día 25	Mañana	Visita al Laboratorio IRFA, productor industrial de vacunas. Discusión general con sus técnicos.
	Tarde	Visita Laboratorios LARA/Porto Alegre. Seminario sobre metodología y técnicas de control oficial de vacunas.
Día 26	Mañana y tarde	Lectura prueba DPB ₅₀ en el galpón.

Actividad

	Noche	Viaje Porto Alegre/Río de Janeiro.
Día 27	Mañana	Cálculo e interpretación de resultados de pruebas de control. Microtécnicas para titulación de virus y seroneutralización.
	Tarde	Discusión general sobre control de calidad de vacunas antiaftosa.
Día 28	Mañana	Simulación en la computadora de los resultados aleatorios que se obtendrían en diferentes pruebas de una misma vacuna. Los ensayos se hicieron con vacunas de diferente potencial de protección expresado en porcentaje de protección frente a la generalización podal y también en DPB_{50} , usando diluciones con un intervalo de 0,6.
	Tarde	Revisión general sobre vacuna oleosa. Aclaración de dudas presentadas por los alumnos.
Día 29	Mañana	Revisión general del curso. Portadores de virus (presentación y audiovisual). Experimentos con carpinchos. Lesiones de Fiebre aftosa (película).
	Tarde	Redacción informes de los alumnos.
Día 30	Mañana	Continúa revisión general del curso. Se atienden consultas y pedidos de los alumnos referentes a material y bibliografía.
	Tarde	Entrega de los informes de los becarios. Clausura del curso y entrega de certificados.

Evaluaciones

Para evaluar el aprovechamiento de los participantes y la metodología se realizan evaluaciones periódicas sobre los aspectos teóricos y prácticos dictados.

I. Aspectos generales

3. ASPECTOS GENERALES SOBRE LA FIEBRE AFTOSA

3.1. Introducción

La Fiebre aftosa (FA) es una enfermedad infecciosa muy contagiosa que afecta en forma natural a las especies animales biunguladas domésticas y salvajes.

El agente etiológico es un Aftovirus de la familia Picornaviridae (nombre derivado de su pequeño tamaño: pico, y de poseer ácido ribonucleico: ARN), y está dotado de gran poder infeccioso y alta variabilidad.

La FA es una enfermedad vesicular que puede muchas veces ser confundida con otras enfermedades vesiculares causadas por agentes etiológicos diferentes que producen cuadros clínicos parecidos (Cuadro 1).

CUADRO 1
Clasificación de los virus de las enfermedades vesiculares

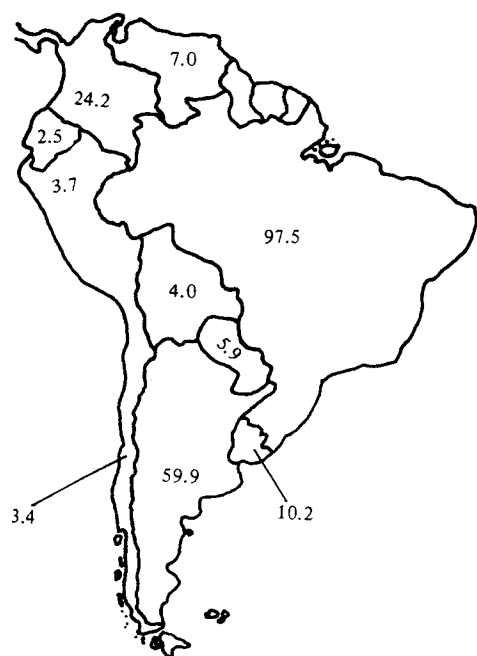
<i>Enfermedad</i>	<i>Acido nucleico</i>	<i>Familia</i>	<i>Género</i>	<i>Simetría</i>
Fiebre aftosa	ARN	Picornaviridae	Aftovirus	Cúbica-s/e
Estomatitis vesicular	ARN	Rhabdoviridae	Vesiculovirus	Helicoidal-s/e
Exantema vesicular	ARN	Picornaviridae	Calicivirus	Cúbica-s/e
Enfermedad vesicular del cerdo	ARN	Picornaviridae	Enterovirus	Cúbica-s/e

La FA es conocida en Europa desde comienzos del siglo XVI y fue introducida en América del Sur en la década 1860-1870. Primero fueron afectados los países del Cono Sur, pero casi un siglo después, en el decenio 1950-1960, se difundió a Venezuela, Colombia y Ecuador. Hasta el momento, de los países de América del Sur afectados, solamente Chile consiguió erradicar la enfermedad, siendo declarado país libre desde 1981 (22).

La población bovina de América del Sur está estimada en 220 millones de cabezas (Figura 1) de donde se desprende la importancia econó-

mica de la enfermedad. Por otro lado se debe tener presente que cuando la enfermedad ataca la hacienda bovina, otras especies animales de gran importancia económica, como los cerdos, ovinos y caprinos también pueden enfermar (2).

FIGURA 1
Población bovina en América del Sur
(En millones)



4. PERJUICIOS ECONOMICOS

Las pérdidas producidas por la enfermedad pueden ser directas, pérdida de carne, leche, abortos, muertes, etc., o indirectas por los problemas que crea en la comercialización de carnes.

Una vaca preñada se estima que si enferma de Fiebre aftosa tiene una posibilidad de 20 por ciento de abortar y si está en lactación de perder en media 15 por ciento de su producción anual, fuera de las compli-

caciones que se asocian como mastitis no producida por el virus aftoso, pero sí facilitada por las lesiones en la ubre y tetas que sirven de puerta de entrada para los agentes causales. Bovinos de engorde pierden en media 15 por ciento de su peso y sufren un atraso de 3 meses para equipararse a los animales sanos (31, 35).

En términos generales se puede decir que las pérdidas físicas producidas por la FA en bovinos que enferman en áreas donde se lleva a cabo una vacunación extensiva son menores que en áreas donde no se vacuna, y también son menores las secuelas de la misma: cojera, lesiones cardíacas, etcétera.

En criaderos de cerdos, en general no vacunados, las pérdidas físicas son enormes, por la alta incidencia de abortos y muertes sobre todo en cerdos lactantes y jóvenes.

En ovinos y caprinos la magnitud de las pérdidas es muy variable, yendo desde simples cojeras hasta altos índices de abortos y muertes de recién nacidos. Por otro lado, se ha demostrado que en ciertos casos la especie ovina, por la lenta evolución del contagio, es responsable por el mantenimiento de la infección en campos donde hubo un brote epidémico.

Se considera que el mayor perjuicio económico de la enfermedad es de tipo indirecto y se presenta en el mercado internacional de productos de origen animal, carne, leche y derivados. Los países libres de la enfermedad, que son los importadores de mayor potencia, imponen severas restricciones a los productos de origen animal de países donde existe FA. Esas restricciones que reducen las transacciones y castigan los precios se han extendido a un gran número de productos de origen animal.

La Federación Rural de Uruguay calcula que ese país junto con Argentina y Brasil pierden un mínimo de 170 millones de dólares al año en la comercialización de productos pecuarios, considerando sólo el mercado de Estados Unidos de América y Canadá (35).

5. FORMAS DE LUCHA

Para que se desencadene la enfermedad es necesario que se produzca un desequilibrio entre los componentes fundamentales que forman la cadena epidemiológica, a saber: agente etiológico, huésped susceptible y medio ambiente.

Para influir sobre la conducta de la enfermedad y controlarla con éxito, el hombre debe actuar sobre los tres elementos, eliminando las fuentes del agente etiológico, modificando las condiciones ambientales

y estableciendo barreras de inmunidad activa por medio de vacunaciones de la población susceptible.

Solamente a este último aspecto y en particular a la vacuna anti-aftosa, nos referiremos a continuación.

6. INMUNIDAD POR MEDIO DE VACUNAS

¿Qué es una vacuna? El concepto de vacuna surge del concepto de inmunidad. Fue observado durante siglos que determinadas enfermedades, por ejemplo, Fiebre tifoidea, daban a los enfermos que sobrevivían un estado de particular resistencia cuando se presentaban nuevos brotes de la enfermedad. Las causas de esa resistencia no eran conocidas.

A fines del siglo XVIII, el médico inglés Jenner observó que los ordeñadores que habían sido afectados con la viruela bovina no contraían la viruela humana. Basado en esa observación decidió, en 1796, inocular un niño con el virus de la viruela bovina y después de un tiempo lo reinoculó con virus de viruela humana sin que se produjera la enfermedad. Esa fue la primera vacunación hecha por el hombre, y de la cual se derivó el nombre genérico de vacunación para este tipo de tratamiento preventivo.

Muchos años después (1880) Pasteur encontró en forma casual que aves inoculadas previamente con cultivos de *Pasteurella aviseptica* envejecidos no volvían a enfermar al ser reinoculadas con cultivos jóvenes que producían enfermedad en otras aves.

Poco después (1890) Von Behring y Kitasato demostraron que el grado de protección para la difteria y el tétano dependía de la presencia en la sangre de sustancias que denominaron "anticuerpos". Quedaron establecidos desde ese tiempo los conceptos básicos de inmunidad y vacunación.

Volviendo a la interrogante inicial, ¿qué es una vacuna?, diremos que una vacuna es un elemento biológico que posee en su composición el agente de la enfermedad o parte del mismo en forma atenuada, inactivada o muerta, incapaces de producir la enfermedad clínica, pero que al ser reconocidas por el organismo inducirán a éste a desarrollar una respuesta inmunitaria específica (2). Otras sustancias colaboran para potencializar la respuesta (ver Adyuvantes de la Inmunidad).

Si el agente etiológico, bacteria o virus se encuentra solamente atenuado, multiplicará respectivamente dentro del organismo animal estimulando de esa forma la respuesta inmunitaria.

Si por el contrario es bacteria y se encuentra muerta o si es virus y se encuentra inactivado, actuarán solamente por la presencia de su masa

antigénica para estimular la respuesta inmunitaria.

En la lucha contra la FA se han utilizado ambos tipos de vacunas como veremos a continuación.

7. VACUNAS DE VIRUS VIVOS ATENUADOS CONTRA LA FIEBRE AFTOSA

Las vacunas con virus vivos atenuados que han producido excelente resultado contra enfermedades como la Poliomiélitis, Viruela, Newcastle, etcétera, no han sido igualmente exitosas en el caso de la FA. En este tipo de vacunas el virus no es inactivado, es decir que mantiene su capacidad de replicación, su infecciosidad y su poder inmunizante, mientras que su capacidad de producir lesiones específicas debe estar ausente. La modificación o atenuación del virus se logra generalmente por pasaje del virus por cultivos celulares o especies animales como embriones de pollo, pollitos de un día, conejos jóvenes, ratones lactantes, etcétera. La replicación industrial del virus para producción de vacunas puede ser hecha en ratones lactantes o cultivos celulares.

Al aplicarse la vacuna el virus replica dentro del organismo del huésped sin producir enfermedad pero induciendo un estado de inmunidad. En animales con cierto nivel de anticuerpos el virus vivo atenuado puede ser neutralizado y su replicación masiva es inhibida. La masa de virus inoculada (masa antigénica) no es por sí sola suficiente para conferir una inmunidad adecuada.

En vacunas contra la FA se encontró que el grado de atenuación adecuado para bovinos adultos con antecedentes de vacunación es diferente del grado requerido para animales susceptibles, pudiendo producirse en estos últimos cuadros clínicos de la enfermedad.

Por otro lado, cuando bovinos vacunados con vacuna de virus vivo atenuado eliminan este virus, el mismo puede causar enfermedad en porcinos con peligro de reversión de virulencia de la cepa. Por esas razones y también por la persistencia del virus en ganglios y nódulos linfáticos, causando problemas a la exportación de carnes, las vacunas de virus vivo atenuados han sido abandonadas en casi todos los países, con excepción de Venezuela (Cuadro 2).

8. VACUNAS INACTIVADAS CONTRA LA FIEBRE AFTOSA

Las vacunas inactivadas constituyen una de las armas más importantes en la lucha contra la FA y en los primeros años de combate fue casi el

CUADRO 2

Producción de vacuna antiiftosa en América del Sur, 1975-1982
(en millones de dosis por países y por año)

País	Lab.	1975	1976	1977	1978	1979	1980	1981	1982
ARGENTINA	11	170 500	224 000	148 600	125 284	140 991	182 404	169 594	137 566
BOLIVIA		200	67				676	245	
BRASIL	11	219 600	262 200	263 700	196 241	184 208	224 107	219 062	269 582
COLOMBIA	1	28 900	23 200	24 600	24 700	20 046	32 700	26 997	24 687
CHILE		30							
ECUADOR	1	1 800	2 300	1 700	1 934	1 625	1 391	501	551
PARAGUAY	2	10 100	13 800	11 700	11 544	12 810	11 895	1 715	1 932
PERU	1	3 700	4 000	4 100	2 770	3 182	1 640	10 412	15 629
URUGUAY	4	42 500	50 800	45 900	45 442	39 197	51 506		1 726
VENEZUELA	1	12 100	10 100	10 600	11 392	10 668	12 394	44 720	34 327
TOTAL	32	489 430	590 467	510 900	419 307	412 727	519 150	485 445	496 716

1. Para atender situaciones de emergencia.
- Sin información.

FUENTE: Informes de los países a la COSALFA, 1983.

único recurso utilizado en América del Sur.

La producción sudamericana de vacunas inactivadas fue de casi 500 millones de dosis en el año de 1982 (Cuadro 2) (2, 20).

Las primeras tentativas de producir una vacuna inactivada contra la FA fueron realizadas en Francia, por Vallée, Carré y Rinjard, entre 1922 y 1930, usando virus de la FA tratado por formalina al 0,5 por ciento y a 20°C de temperatura. En 1936 Schmidt (52), en Dinamarca, produjo una vacuna contra la FA por adsorción de virus sobre hidróxido de aluminio. Los dos experimentos resultaron válidos y promisorios pero no consistentes, pues a veces las vacunas resultaban infectantes.

En 1938, Waldman y colaboradores (59), trabajando en la isla de Riems, hicieron una feliz asociación de los dos métodos y produjeron una vacuna inactivada eficaz contra la FA usando virus replicado *in vivo* en epitelio lingual de bovino, adsorbido sobre hidróxido de aluminio a pH 9,5 e inactivado por acción de la formalina a 0,05 por ciento a la temperatura de 25°C durante 48 horas. Esta fue la primera vacuna inactivada inocua y eficaz contra la FA y quedó conocida como vacuna de Schmidt-Waldmann.

La formulación Schmidt-Waldmann fue luego mejorada por Torres (56) quien logró reducir el volumen de las dosis sin afectar la eficacia de la vacuna.

En la producción de una vacuna inactivada contra la FA se deben considerar cuatro fases esenciales para la obtención de un producto final eficiente:

- producción de un antígeno inmunogénico,
- correcta inactivación,
- uso de buenos adyuvantes,
- controles sobre todas las etapas del proceso y sobre el producto final.

Trataremos por orden cada una de esas partes.

8.1. Producción de un antígeno inmunogénico

La cepa de virus a ser usada como inmunógeno en la vacuna inactivada contra la FA debe ser inmunológicamente eficiente y representativa de la realidad epizootiológica en el área donde será usada. Periódicamente se debe verificar que las cepas de virus contenidas en las vacunas den protección real frente a las cepas de virus actuantes en el campo.

Cuando aparece alguna cepa de virus que produce enfermedad en animales vacunados, se debe estudiar inmediatamente el riesgo que esta cepa significa. Una forma muy eficiente, usada en el Centro Paname-

ricano de Fiebre Aftosa (CPFA), consiste en tener "banco de sueros" extraídos de sangre de animales que han sido vacunados o revacunados con vacunas conteniendo las cepas normales de producción en esa área. Cuando se aísla una cepa de virus que se desea estudiar, se hacen pruebas de seroprotección (27) (Anexo 4) usando como virus de descarga la cepa recientemente aislada y se observa en qué medida los anticuerpos contenidos en los sueros del "banco" protegen contra la misma. Si la protección es buena, no hay motivo de alarma y no se debe pensar en sustitución de cepas. Si la protección demostrada por los sueros de los animales vacunados y sobre todo revacunados es deficiente, se debe pensar en que la nueva cepa debe ser incorporada a la vacuna.

Toda cepa de virus destinada a producción de vacunas debe ser estable durante el proceso de replicación viral, proceso industrial de la suspensión vírica e inactivación, y también debe ser estable durante la conservación de la vacuna a 4°C.

El virus de la FA posee en su genoma la información genética para su replicación, pero carece de los mecanismos enzimáticos de síntesis para la misma, debiendo usar para ello la célula animal viva y susceptible.

El inmunógeno, denominado en términos industriales "el antígeno", consiste en el propio virus de FA replicado en substratos especiales y luego inactivados.

En las vacunas tipo Schmidt-Waldmann y de Torres, el virus era replicado en epitelio lingual de bovinos *in vivo* por inoculación del virus en la lengua de los animales en la víspera de su sacrificio en los mataderos. En el momento del sacrificio se recogía el epitelio. El inmunógeno producido era de excelente calidad pero implicaba el gran riesgo de manejar el virus fuera del laboratorio y así el peligro de escape de virus era enorme. También existía el riesgo de contaminación accidental por otras cepas de virus de la FA presente en animales contaminados, así como la posibilidad de que el virus se fuera modificando por pasajes sucesivos en animales parcialmente inmunes. Por todas esas razones, el método ha sido abandonado.

En 1947, Frenkel (29), culminando una larga serie de trabajos pioneros sobre la replicación del virus en tejidos animales *in vitro*, publicó la técnica de producción de antígenos en explantados de epitelio lingual de bovinos, mantenidos en sobre vida artificial en el laboratorio durante 24 a 48 horas después de la muerte del animal. Esta técnica ofrece la ventaja de que el virus es manipulado sólo dentro del laboratorio, con lo que se reduce el riesgo de escape de virus.

La técnica de Frenkel es hoy en día ampliamente usada en la producción industrial de vacunas en países como Holanda, Francia, Argen-

tina, Uruguay, etcétera. Del punto de vista industrial presenta el problema de que la producción de vacunas depende del funcionamiento de los mataderos, y en ciertos países la matanza de ganado tiene un carácter temporero.

El advenimiento de técnicas de cultivos celulares propiamente dicho y su utilización en la replicación del virus de la FA (12, 53) en el año 1955, significó un enorme progreso, tanto para el estudio como para la replicación industrial del virus. Al principio eran cultivos primarios extraídos de tejidos animales, en general riñones de terneros y cerdos jóvenes. Posteriormente fueron substituidos por líneas celulares establecidas, con posibilidad de multiplicación continua.

Mowat y colaboradores (48) descubrieron que una línea de células fibroblásticas de riñón de hamster lactante, línea BHK21 Clon 13 ("baby hamster kidney cell") descrita en 1962 por McPherson y Stoker (41) de la Universidad de Glasgow, era susceptible al virus de la FA. Esta línea celular fue la que tuvo mayor desarrollo industrial. Crece bien en monocamada, adherida a la pared interna del recipiente, sea un frasco estático o rolante (57, 58) donde forma multicapas mucho más densas que las obtenidas con los cultivos primarios, y es posible producir en esas células virus mucho más concentrados. En 1963 Capstick (18) adaptó la línea BHK21 Clon 13 a multiplicarse en cultivos en suspensión.

La gran ventaja de las técnicas que usan cultivos celulares es que el laboratorio productor puede planear su producción en forma independiente del trabajo en mataderos. En Europa, algunos laboratorios producen vacunas antiaftosa para cerdos, usando líneas celulares de origen porcino, particularmente de la línea IBRS-2 (50).

En el pasado se usaron otros métodos de replicación industrial de virus. En Brasil tuvo mucha aceptación la técnica de replicación viral de conejos lactantes (1) pero hoy ha caído en desuso. Salvo excepciones, en América del Sur se usan las técnicas de replicación viral en cultivos celulares de células BHK21 adaptadas a crecer en suspensión y cultivadas en botellas rolantes o en tanques de acero inoxidable, o la técnica de Frenkel (Cuadro 3).

Una vez producida la replicación viral sobre el substrato celular, se adiciona cloroformo a razón de 0,6 a 1,0 por ciento p/v y se somete la suspensión vírica a una fuerte agitación para lograr el máximo contacto del virus con el cloroformo. Luego se procede a la separación de los restos del substrato celular por centrifugación o clarificación a través de placas clarificantes o tierra de diatomeas. En esa forma se obtiene una suspensión vírica limpida de la cual se toman muestras para contro-

les de pureza bacteriológica, pH, título infectante y fijación del complemento.

La suspensión vírica debe ser bacteriológicamente pura en controles hechos sobre los medios bacteriológicos habituales, el pH debe estar entre 7,4 y 7,7, la prueba de fijación del complemento debe indicar la pureza del tipo de virus, y el título fijador y la infectividad deben estar dentro de los límites previamente establecidos (ver Capítulo III, puntos 17.2 y 17.3).

Si la suspensión vírica alcanza los niveles establecidos, se procede a su inactivación.

NUEVAS TÉCNICAS DE PRODUCCIÓN DEL AGENTE INMUNOGENO

Antes de pasar al capítulo inactivación nos debemos referir a las nuevas técnicas de producción del inmunógeno que están siendo desarrolladas y con las cuales ya se han obtenido resultados parciales. En estas técnicas, el inmunógeno en lugar de ser el virión o virus de la fiebre aftosa completo es solamente una fracción inmunizante del mismo. En trabajos realizados por Brown (17) y Bachrach (13) se demostró que la fracción más inmunizante del virus de la FA está radicada en un polipéptido estructural de su cápside, denominado VP1. Dentro de esta proteína un pequeño segmento constituye el determinante antigénico. Esto fue demostrado hace varios años, pero sólo últimamente se consiguió determinar la secuencia y distribución espacial de los aminoácidos que componen el VP1. Actualmente es posible producir esta proteína por 2 técnicas: ingeniería genética y síntesis proteica.

En la ingeniería genética se usa el ácido ribonucleico (ARN) del virus, del cual por acción de una enzima restrictiva se corta el segmento que codifica la síntesis del VP1. Con la obtención de este segmento y por acción de otra enzima, una transcriptasa reversa, se obtiene un segmento del ácido desoxi-ribonucleico (ADN) complementario llamado ADNc. Mediante el uso de enzimas especiales se inserta este ADNc en el material genético (Plásmido) de una bacteria *Escherichia coli* Cepa K12, que así es informada genéticamente para producir la proteína vírica. El cultivo de bacterias es fácil y de esa manera se pueden producir grandes cantidades de proteínas VP1. Hasta ahora los resultados obtenidos en la producción de vacunas con estos antígenos han tenido éxitos parcialmente limitados a la cepa del virus A12, cepa antigua que no se encuentra más en la naturaleza (38). El VP1 de la cepa A12 emulsificado en adyuvante incompleto de Freund ha inducido una protección adecuada en bovinos que recibieron dos dosis de la vacuna.

CUADRO 3.
Producción de vacuna antiáfosa en América del Sur, 1983

País	Núm. lab. Empresa prod.	Sistema de producción	Inactivante	Potencial anual-dosis	Vacuna en millones de dosis			Exigencias control
					Producida	Controlada	Aprobada	
ARGENTINA	10 Privada	65% Frenkel 35% C. Celular	60% formol 40% 1er. orden	2×10^8	177.000	100%	177.000	$\geq 3,0$ DPB ₅₀
BRASIL	9 Privada	100% C. Celular	100% 1er. orden	3×10^8	285.000	100%	253.000	$\geq 2,0$ IC $\geq 3,0$ DPB ₅₀
COLOMBIA	1 Mixta	100% C. Celular	100% 1er. orden	4×10^7	27.000	100%	27.000	$\geq 2,0$ DPB ₅₀
ECUADOR	1 Estatal	100% Frenkel	100% 1er. orden	2×10^6	1.600	100%	1.600	$\geq 2,0$ ISP
PARAGUAY	2 Privada	30% Frenkel 70% C. Celular	30% formol 70% 1er. orden	2×10^7	13.000	100%	13.000	$\geq 2,0$ ISP
PERU	1 Estatal	100% Frenkel	100% 1er. orden	4×10^6	3.000	100%	3.000	$\geq 2,0$ IC
URUGUAY	4 Privada	50% Frenkel 50% C. Celular	50% formol 50% 1er. orden	5×10^7	43.000	100%	43.000	$\geq 1,8$ IK $\geq 2,5$ IC $\geq 1,5$ NT $\geq 2,5$ ISP
VENEZUELA ²	1 Estatal	C. Lact. V.V.M.	-	$1,5 \times 10^7$	12.000	2	12.000	

1 Inactivante cuya cinética de inactivación es de 1er. orden.
2 Toda la vacuna usada en América del Sur es inactivada con adyuvantes de hidróxido de aluminio y saponina. Venezuela usa el virus vivo modificado (VVM) o atenuado.

DPB₅₀ Dosis protectora bovino 50%.

IC Índice C' en cobayos.

IK Índice K en bovinos.

NT Neutralización en tubos.

La otra técnica de producción de antígeno es la síntesis proteica propiamente dicha. Esta técnica permite producir el segmento peptídico de mayor poder inmunogénico y que va del aminoácido 141 al 160 del VP1, que consta de 213 aminoácidos. Ya se demostró que este segmento sintético posee la configuración adecuada y que conjugado con un soporte especial, la hemocianina extraída de un caracol y con la adición de un adyuvante puede inducir una respuesta inmunitaria en animales de laboratorio (15).

Tanto el sistema de síntesis proteica como el de ingeniería genética tiene la ventaja de trabajar con fracciones no infectantes del virus por lo que no se requiere el proceso de inactivación y el antígeno es tan estable que no necesita de manejo cuidadoso y de la cadena de frío inevitable con las vacunas convencionales. Sin embargo tiene la desventaja de que su capacidad inmunogénica es mucho menor que la que posee el virión intacto de la FA.

Sobre el futuro industrial de estas técnicas en desarrollo, actualmente en manos de pocas compañías detentoras de la tecnología, nada se puede afirmar, aunque no se debe olvidar algunos resultados positivos ya obtenidos.

El comportamiento de esas vacunas en el campo y su eficacia frente al desafío que significa la variabilidad del virus de la FA, es otra interrogante que solamente el tiempo podrá responder. Será necesaria una continua vigilancia epidemiológica y el estudio y caracterización de las cepas de los virus actuantes en el campo. Las cepas que demuestren importancia epidemiológica deberán ser sometidas a los procesos correspondientes para que sus fracciones inmunogénicas sean incorporadas a las vacunas de bioingeniería o de síntesis peptídica.

8.2. Inactivación del virus

Inactivación del virus significa la supresión de su poder de replicación, por acción sobre su genoma de agentes químicos o físicos o ambos a la vez. El cápside proteico por el contrario debe ser preservado intacto, ya que en él se encuentran los determinantes antigénicos.

El primer agente inactivante usado fue la formalina, ya ensayada por Vallée, Carré y Rinjard y aún hoy usada, sobre todo por los productores de vacuna que usan el método de Frenkel. Sin embargo, la mayor parte de la producción mundial de vacuna se hace usando los llamados inactivantes de primer orden.

Un inactivante de primer orden es aquel que presenta una cinética de inactivación constante durante todo el proceso de inactivación, sin

ser afectada por el tiempo ni por los componentes del medio. En la Figura 2 se puede ver que la línea de regresión es una recta, a diferencia de lo que se observa en la Figura 3, donde la línea de regresión comienza recta para después formar una curva hacia el final del proceso de inactivación. Esa derivación de la recta denominada "efecto de cola" hace imposible predecir en un momento dado de la inactivación cuándo se producirá la inactivación total. En cambio con inactivantes de primer orden, por su tipo de inactivación lineal, se puede predecir el momento en que el virus será completamente inactivado.

Cualquiera que sea el tipo de inactivante usado, el proceso de inactivación se realiza siempre en un recipiente grande, tanque de inactivación, libre de todo espacio muerto o fondo de saco, y donde toda la masa vírica bajo agitación es sometida a la acción química del inactivante, a una temperatura constante previamente establecida durante todo el proceso que suele durar de 24 a 48 horas. Es corriente entre los productores que usan formalina (ver 15.2) no tomar la muestra para el control de inactivación o de no infectividad hasta algunos días después de terminar el proceso de inactivación propiamente dicho. Cuando se usa inactivantes de primer orden la muestra se puede tomar en seguida.

La inactivación del virus puede hacerse sobre la suspensión vírica antes o después del agregado de ciertas sustancias adyuvantes como el hidróxido de aluminio o la saponina. Cuando se usa adyuvante oleoso, la suspensión vírica debe ser inactivada antes de ser emulsificada.

Entre los inactivantes de primer orden los más importantes son acetileiminina (AEI), Brown y colaboradores 1963 (16), glicilaldehído (GDA), Martinsen 1964 (42) y, sobre todo, etilenimina binaria (BEI), Bahnmann 1974 (14) desarrollada en el CPFA y su efecto fue ensayado por Abaracón y colaboradores en 1979 (6) sobre suspensiones víricas producidas por diferentes procedimientos industriales, virus de Frenkel, virus replicado sobre conejos lactantes y virus replicados sobre cultivos celulares de células BHK, tanto de botellas roller como de suspensión.

CONTROL DE INACTIVACION O DE NO INFECTIVIDAD DEL VIRUS

Una vez completada la inactivación se toma una muestra de la suspensión vírica que debe ser fiel representante de un total homogéneo. Toda la suspensión vírica debe ser contenida en un recipiente único, sin fondos de saco y bajo agitación. El volumen de la muestra debe ser suficientemente grande para poder efectuar todos los controles bacteriológicos y físico-químicos, y de no infectividad (ver 17.1 y 17.5). El volumen de

FIGURA 2
Inactivación del virus de la Fiebre aftosa,
subtipo A₂₄ a 37°C por BEI, EI o AEI

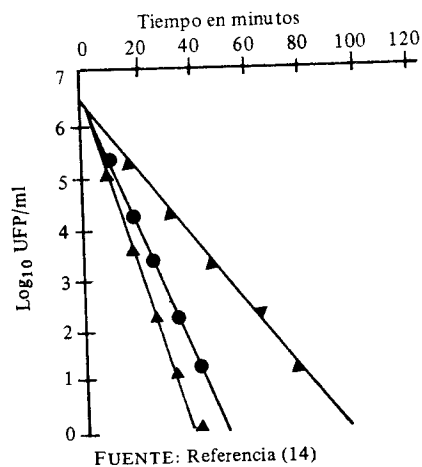
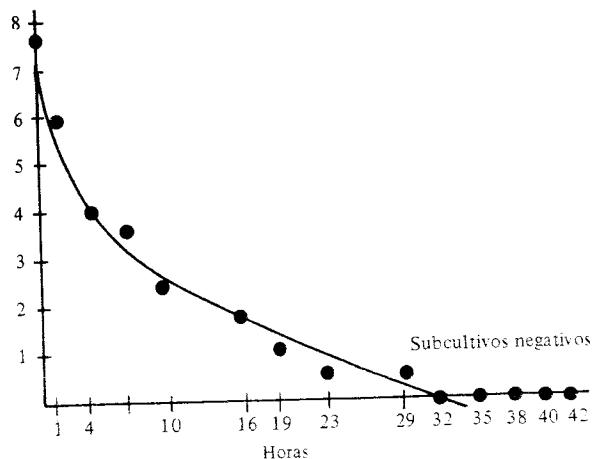


FIGURA 3
Inactivación por formaldehído del virus de la
Fiebre aftosa Tipo A



FUENTE: Fontaine, J. et al. "Influence of inactivating agents on the virion conservation", *Europ. Conf. Control FMD. Mig Techn. Group*, Amsterdam, 22 al 24 de octubre de 1974.

suspensión vírica inactivada que entrará en la prueba de no infectividad propiamente dicha debe ser siempre superior al volumen correspondiente a una dosis de vacuna para bovinos. El sustrato en el cual se ensayará la eventual presencia de virus activo debe ser de la mayor sensibilidad: inoculación intradérmica en epitelio lingual de bovinos vírgenes, ratones lactantes por vía intraperitoneal o intramuscular, o cultivos de células de alta sensibilidad.

La prueba sobre bovinos vírgenes es de gran valor, siempre que se usen no menos de 5 bovinos y 20 inoculaciones por animal, pero tiene la limitante derivada de la dificultad de obtener los animales, el costo elevado y la limitada cantidad de material de prueba que se puede inocular: 0,1 ml por punto de inoculación del cual sólo una parte quedará retenida. Si se usan ratones lactantes se deben usar más de 100 unidades, para que por lo menos 100 sobrevivan al final de la prueba. También tiene la limitante de la cantidad de inóculo, no más de 0,1 ml por animal. Cualquier animal que muere debe ser procesado y vuelto a inocular para establecer si la muerte fue debida a virus aftoso u otra causa.

Si en cualquiera de los dos sistemas no se observa acción de virus aftoso y se tienen 10 observaciones negativas, la prueba es válida pero se debe tener en cuenta 2 factores:

- a) es un ensayo hecho sólo sobre una muestra pequeña, de cuyo resultado se induce cuál sería el comportamiento del total,
- b) 100 observaciones negativas, sin ninguna observación positiva sólo da indicación con un grado de probabilidad $P = 95$ por ciento, que no más de un 3,0 por ciento de muestras podrían ser positivas, o con $P = 99$ por ciento de que no más de 4,5 por ciento de muestras podrían ser positivas.

Es conveniente hacer más de una prueba de no infectividad con cada vacuna. Por otra parte, toda prueba biológica que sólo da probabilidades, será tanto más válida cuando, partida tras partida, dé siempre resultados negativos, lo que da confianza en el procedimiento de inactivación y en la prueba de no infectividad en sí. El valor del conjunto de pruebas todas negativas en el contexto de un sistema coherente de producción es muy superior al valor de cada prueba aisladamente.

La prueba que usa cultivos celulares de células susceptibles ofrece dos ventajas de la mayor importancia.

- a) se pueden usar inóculos mucho mayores, 5 a 10 ml de suspensión vírica por botella (25 a 50 ml por conjunto de 5 botellas).
- b) introduce el concepto de pases seriados cada 48 horas.

Una característica de los virus parcialmente inactivados es que demoran en demostrar una acción citopatogénica y podrían ser neutralizados por la acidez del metabolismo celular. En cambio si son cultiva-

dos durante 48 horas y luego subcultivados, si el virus no estuviera totalmente inactivado, la acción citopatogénica se hará evidente en el 2o. y 3er. pase.

Si luego de 3 pases seriados no se ha observado acción citopática, se toma una muestra del líquido de cultivo y se somete a prueba de fijación del complemento. Si es negativa, se considera que la muestra de virus está inactivada.

Varias veces se ha observado que muestras parcialmente inactivadas han dado resultado negativo en pruebas sobre ratones lactantes y han demostrado presencia de virus activo residual que se evidencia en el 2o. pase en cultivos celulares (ver 17.5).

8.3. Adyuvantes de la inmunidad

Adyuvante es por definición una substancia que, en forma inespecífica, potencia en intensidad y duración la respuesta inmunitaria para el antígeno al cual está asociado en la formulación de la vacuna.

Los adyuvantes no deben ser inmunogénicos, es decir, no deben estimular una respuesta inmunitaria contra sí mismos, y no deben producir reacciones indeseables de consideración en el organismo del sujeto receptor de la vacuna. Hay una gran variedad de adyuvantes, con diferentes propiedades. Es frecuente que los adyuvantes sean clasificados como *adyuvantes inertes*, que retienen al antígeno y lo liberan lentamente, como el $Al(OH)_3$, Freund incompleto, alumbres, fosfatos, etcétera, y *adyuvantes dinámicos*, que actúan directamente sobre las células responsables de la respuesta inmunitaria, como las endotoxinas bacterianas, saponina, sulfato de dextrano, etcétera. Si ejercen mayor acción sobre los linfocitos B, como los lipopolisacáridos, se les denomina adyuvante B, si la acción es mayor sobre los linfocitos T, como las mycobacterias y derivados, sulfato de befilo, polinucleótidos de doble cadena, etcétera, se denominan adyuvantes T.

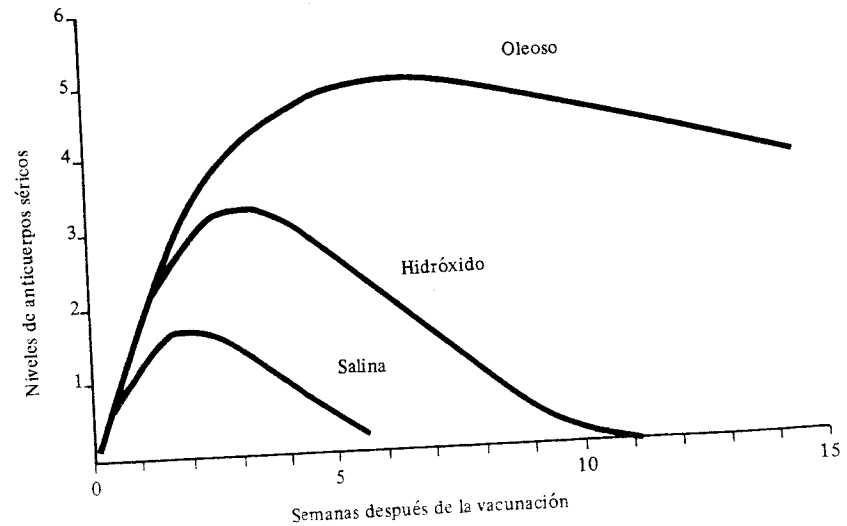
Hay adyuvantes que estimulan más la respuesta de anticuerpos y otros más la respuesta de inmunidad mediada por células. Los primeros son indicados para vacunas contra enterovirus, adenovirus, virus de la FA, etcétera, y los segundos para enfermedades del grupo Pox, Herpes, Tuberculosis, etcétera. La acción de los adyuvantes se ejerce sobre el antígeno o sobre el sistema inmunitario. En el primer caso actúa sobre la liberación lenta del antígeno en el punto de inoculación, forma de presentación, insolubilización, etcétera. En el segundo caso actúan sobre activación de macrófagos, acción sobre los linfocitos B y T, etcétera.

El adyuvante de Freund (30) puede ser completo o incompleto. El

adyuvante de Freund completo, con *Mycobacterium tuberculosis*, es un adyuvante estático y dinámico a la vez, con fuerte acción sobre la respuesta humoral y sobre la inmunidad mediada por células. El adyuvante de Freund incompleto, como se usa en vacunas contra la FA, es un adyuvante estático con fuerte acción sobre la respuesta humoral y duración de la inmunidad.

En algunos casos la acción del adyuvante es imprescindible para que se produzca respuesta inmunitaria. Los monos *Aotus* sólo resisten el desafío de inoculación con *Plasmodium falciparum*, cuando el inmunógeno es aplicado con adyuvante. En vacunas contra la FA, si no se usara adyuvantes la inmunidad sería de bajísima y muy corta duración. En estas vacunas también la utilización de adyuvantes es prácticamente imprescindible (Figura 4).

FIGURA 4.
Influencia de los adyuvantes en la respuesta inmunitaria frente a la vacuna antiaftosa



En los últimos años han aparecido nuevos adyuvantes que están siendo ensayados con bastante éxito en diversas formulaciones. Mere-

cen mención los derivados de muramyl dipeptide, que es una fracción de *M. tuberculosis*, un amino lípido desarrollado por la firma Pfizer, CP20961 ya ensayado en FA por Knudsen (39), y los liposomas, compuestos por esferas concéntricas de fosfolípidos que reciben el antígeno en fase acuosa y dan al mismo una forma de presentación al organismo muy adecuada para ciertos inmunógenos.

En vacunas contra la FA los adyuvantes más usados han sido el hidróxido de aluminio, Schmidt, 1936 (52), y la saponina, Espinet, 1951 (28). El hidróxido de aluminio es un coloide anfótero, con punto isoeléctrico entre pH 9,2 y 9,4, se considera un adyuvante inerte, y actúa principalmente por concentración del virus, acción de depósito, formación de granuloma y liberación lenta del antígeno. La saponina es un adyuvante dinámico que induce una intensa respuesta de anticuerpos. En la preparación de vacunas en América del Sur ambos son muy usados en forma asociada.

Los mejores resultados en producción de vacunas antiaftosa han sido logrados mediante el uso de adyuvante incompleto de Freund (16). El uso en vacunas contra la FA de adyuvante incompleto de Freund, comúnmente referido como "vacunas oleosas" fue descrito por primera vez en 1963 por Cunliffe y Graves, de Plum Island Animal Disease Center (PIADC) E.U.A. (26, 36) y después por McKercher y col. en 1967 (43, 44, 45, 46, 47), sobre todo en ensayos en la especie porcina. En esta especie la vacuna con adyuvante oleoso induce una adecuada protección que la vacuna acuosa o de hidróxido de aluminio con o sin saponina, no es capaz de conferir.

El verdadero desarrollo de la vacuna con adyuvante oleoso para bovinos, a nivel experimental, piloto e industrial fue realizado por el CPFA (19, 21, 24). Actualmente hay en América del Sur aproximadamente 4 millones de cabezas de ganado vacunadas regularmente con este tipo de vacuna producida por el CPFA, en programas piloto, demostrativos y en áreas estratégicas en el año 1984.

En Brasil, además de la Planta Piloto de producción de vacunas del CPFA, ya fueron instaladas dos plantas para la producción específica de este tipo de vacunas: la unidad del Laboratorio Nacional de Referencia Animal da Secretaría Nacional da Defesa Agropecuaria del Ministerio da Agricultura en Campinas, Sao Paulo, que en 1984 produjo 5 millones de dosis trivalentes para bovinos, y el Instituto de Pesquisas Veterinarias Desidério Finamor, perteneciente a la Secretaría de Agricultura de Río Grande do Sul, que comenzó sus actividades en 1984. Por otra parte, casi todas las plantas industriales de producción de vacunas de Brasil han instalado su equipo para producción de vacunas con

adyuvante oleoso, y dos de ellas ya han hecho registro oficial de sus vacunas.

Otras plantas destinadas a la producción de vacunas con adyuvante oleoso están siendo implementadas en diversos países de América del Sur (Argentina, Perú, Ecuador, Venezuela).

En la vacuna contra la FA con adyuvante oleoso el antígeno o fase acuosa debe ser dispersado finamente en el seno de la fase oleosa. El antígeno puede ser también adsorbido sobre hidróxido de aluminio y luego emulsificado (3).

La vacuna es una emulsión agua-en-aceite en la cual el antígeno constituye la fase interna o dispersa y el adyuvante oleoso (óleo mineral 90 por ciento, emulsificante 10 por ciento) la fase externa o continua.

Para obtener una emulsión estable, el antígeno debe ser adicionado lentamente sobre la fase oleosa sometida a fuerte agitación. En esta forma se obtiene una mezcla grosera, en que las gotas del antígeno son relativamente grandes y si se dejara estática tendría tendencia a separar. La mezcla es inmediatamente sometida a una acción mecánica intensa en aparatos emulsificadores especiales, con lo que se obtiene una emulsión estable (ver 16.1 y 16.4). Para la obtención de una emulsión estable se debe usar aceite mineral¹ y emulsificante² correctos (4). Toda vacuna emulsificada debe ser sometida a controles de: tipo de emulsión, estabilidad en prueba de centrifuga y por conservación a diferentes temperaturas, conductividad, etcétera.

Para cerdos se usa una formulación llamada emulsión doble, tal como fue descrita por Herbert (37). En esta formulación la emulsión primaria es dispersada en el seno de otra fase acuosa, compuesta por una solución salina tamponada conteniendo 2,0 por ciento de un emulsificante del tipo hidrofílico, Tween 80, con un H.L.B. = 15,0. De esta forma la formulación toma una consistencia acuosa, su manejo es más fácil y produce menos reacción local al ser aplicada en porcinos, que son particularmente sensibles a los aceites minerales. Es de interés resaltar que la parte inmunológicamente activa de la vacuna está formada por las gotas de emulsión primaria agua-en-aceite dispersas y no por la fase acuosa externa (véase 16.4).

¹ Mareol 52 ESSO SAF - CEDEX 2 - 92093 PARIS LA DEFENSE.

² Montanide 888 - Octodocenoato de anhidromannitol, HLB = 5,0 SIPPIC - Société d'Exploitation de Produits pour les Industries Chimiques, 70 Champs Élysées - 95008 Paris, France.

RESPUESTA INMUNITARIA A LAS VACUNAS CON ADYUVANTE OLEOSO

Es generalmente aceptado que el adyuvante oleoso estimula la respuesta inmunitaria por varios mecanismos. En primer término se forma un granuloma en el punto de inoculación. A ese granuloma son atraídas las células de defensa de primera línea del organismo, polimorfonucleares, histiocitos y sobre todo los macrófagos, de gran importancia en la reacción inmunitaria. El antígeno contenido en ese granuloma es liberado lentamente y en pequeñas cantidades, lo que favorece la respuesta del organismo.

Por otro lado, parte de esa vacuna migra por vía linfática, y se forman múltiples depósitos de microgotas de vacuna oleosa en los órganos linfoides, donde se organizan nuevos focos de estímulo inmunitario.

La respuesta inducida por las vacunas con adyuvante oleoso es de más larga duración que la que se logra con las vacunas de hidróxido de aluminio y saponina.

En los Cuadros 4 y 5 se compara la inmunidad producida por dos tipos de vacunas con adyuvante oleoso frente a vacunas convencionales de hidróxido de aluminio y saponina. Es de notar que las vacunas de hidróxido de aluminio y saponina tienen tres veces más contenido antigénico. La inmunidad es expresada por expectativas porcentuales de protección (EPP) según Gomes y Astudillo (33). Ambas vacunas dan valores elevados a los 30 días posvacunación (DPV) pero a los 90 y 120 DPV la vacuna de adyuvante oleoso da valores significativamente más altos.

El Cuadro 6 da resultados frente a la descarga de virus de dos vacunas, siendo una de tipo oleoso y otra de tipo hidróxido de aluminio saponina. En este caso también la vacuna de hidróxido de aluminio y saponina tenía tres veces más antígeno.

El Cuadro 7 presenta la protección conferida por la vacuna de adyuvante oleoso sobre un lote de bovinos adultos que fueron vacunados varias veces, pero la descarga de virus fue hecha 13 meses después de la última vacunación. Solamente un bovino generalizó quedando los 29 restantes totalmente protegidos.

La vacuna de adyuvante oleoso induce una inmunidad superior también en animales jóvenes (8). lo que posibilita una mejor protección de todo el rebaño pecuario, sobre todo en las fajas etarias más bajas, donde se suelen presentar los mayores problemas. En las Figuras 5 y 6 se observa el comportamiento de animales vacunados por primera vez a los 9-12 meses de edad y revacunados a los 3 y 4 meses, respectivamente con dos vacunas de tipo oleoso, siendo una de virus absorbida sobre

CUADRO 4.

Inmunidad producida por dos tipos de vacuna antiaftosa oleosa frente a vacuna de hidróxido de aluminio y saponina.
Vacunación: 23-04-80

Vacuna	Dilución	Días posvacunación					
		0 ₁ Campos		A ₂₄ Cruzeiro		C ₃ Indaial	
		30	90	30	90	30	90
TE 1/80 ^a Oleosa clásica 5,0 ml	1/1	98*	93	99	99	97	99
TE 2/80 ^b Oleosa con hidróxido 2,0 ml	1/1	97	91	99	99	92	95
TE 3/80 ^c Hidróxido seponina 5,0 ml	1/1	98	58	96	85	83	46

^a 50% fase acuosa - 50% fase oleosa - contenido vírico trivalente 2,5 ml, dosis 5,0 ml.

^b 33,3% fase acuosa con hidróxido - 66,6% fase oleosa - contenido vírico trivalente 2,5 ml, dosis 2,0 ml.

^c Vacuna hidróxido saponinada - contenido vírico trivalente 7,5 ml, dosis 5,0 ml.

* Expectativas porcentuales de protección (Gomes y Astudillo).

FUENTE: Trabajos experimentales CPFA.

Ref.: Abaracón, *et al.* - Boletín CPFA, 45-46, 1982.

hidróxido de aluminio y la otra no. Ambas vacunas poseían el mismo contenido vírico.

En cuanto al tiempo necesario para el establecimiento de la inmunidad, la vacuna de tipo oleoso es algo más lenta en los animales primovacunados. Mientras la vacuna de hidróxido de aluminio y saponina llega al máximo de la respuesta en 18-21 días, la vacuna oleosa induce una respuesta similar a los 26-30 días.

En los animales revacunados, es decir la respuesta "booster" es igualmente rápida en ambos tipos de vacunas. En el Cuadro 8 se presenta la respuesta de índices de seroprotección observada en un lote de bovinos al ser revacunados con vacuna de adyuvante oleoso.

La inmunidad conferida por la vacuna de adyuvante oleoso en porcinos es muy superior a la obtenida con las vacunas convencionales. Para esta especie es más conveniente el uso de vacunas oleosas formuladas

CUADRO 5.

Inmunidad producida por dos tipos de vacuna antiaftosa oleosa frente a vacuna de hidróxido de aluminio y saponina.
Vacunación: 12-05-81

Vacuna	O ₁ Campos		A ₂₄ Cruzeiro		C ₃ Indaial	
	30	120	30	120	30	120
TE 1/81 Oleosa clásica ^a 5,0 ml	99*	77	96	94	95	83
TE 7/81 Oleosa con hidróxido ^b 3,0 ml	99	85	95	95	97	91
TE 2/81 Hidróxido 3,0 ml	97	50	97	61	99	61

^a 50% fase acuosa - 50% fase oleosa - contenido vírico trivalente 2,5 ml/dosis 5,0 ml.

^b 33,3% fase acuosa - 66,6% fase oleosa - contenido vírico trivalente 2,5 ml - dosis 3,0 ml.

^c vacuna hidróxido saponinada - contenido vírico trivalente 7,5 ml - dosis 5,0 ml.

* Expectativas porcentuales de protección en bovinos (Gomes y Astudillo).

FUENTE: Trabajos experimentales CPIA (sin publicar).

en la forma de emulsión doble. El Cuadro 9 muestra el resultado obtenido con la vacuna usada pura y diluida con diluyente inerte sobre un grupo de cerdos de dos meses de edad, y el Cuadro 10 muestra la respuesta de cerdos vacunados con vacuna con adyuvante oleoso de emulsión doble e inoculados con el virus O₁ Campos.

En cuanto al comportamiento de la vacuna en el campo, se han realizado ensayos muy bien controlados en diversas áreas geográficas. Mencionaremos dos de ellos realizados en Bagé, Río Grande do Sul, Brasil y en Hipólito Irigoyen, Buenos Aires, Argentina, en que grupos de bovinos similares fueron vacunados con vacunas de adyuvante oleoso y con vacunas de tipo convencional. En ambos casos hubo el desafío de epidemia de FA, y resultados muy favorables para las vacunas de adyuvante oleoso (Cuadros 11 y 12).

CUADRO 6.

Ensayo comparativo de potencia de una vacuna oleosa y otra hidroxidosaponinada, a los 360 días posvacunación

Vacuna	R E S U L T A D O S								
	Vacunados	Protegidos	Lesiones en lengua	Lesiones en pata				Testigos	generalizados
				1p.	2p.	3p.	4p.		
Oleosa INTA 3	15	10	13	3	1	-	1	5	5
Hidróxido-saponinada HS 145	13	2	13	1	1	5	4		

FUENTE: Scholein Rivenson. Rev. Med. (Bs. As) Vol. 63, núm. 5, 1982 (Ref. 51).

8.4. Control de producción

El control de producción de la vacuna es una constante durante todo el proceso. Comienza con el control de toda la materia prima utilizada. La adquisición de materia prima, aminoácidos, vitaminas, sales, aceite mineral y emulsificantes, etcétera, debe ser hecha en partidas tales que aseguren una producción de varios meses.

Los medios destinados al crecimiento celular deben ser ensayados en cultivos pequeños, en donde la droga recién adquirida constituya el único elemento nuevo de la formulación. Sólo después de aprobado debe pasar a la producción industrial.

Un elemento que no se puede obtener en grandes cantidades y que requiere ensayos continuos es el suero bovino. Cada vez que se obtiene una partida de suero bovino, se debe procesar y con una muestra hacer por lo menos 3 cultivos celulares sucesivos frente a una partida de suero ya aprobada. En ese experimento comparativo sólo puede haber una variable, el propio suero bovino. Si al fin de esos tres o más cultivos el crecimiento celular fue tan bueno frente a un suero como a otro, se da por aprobado el suero en estudio. Si el cultivo fue deficiente cuando se usó el suero en estudio se elimina la partida de suero (ver 12.9).

Otras drogas como el aceite mineral y emulsificante deben ser ensayadas en cuanto a su toxicidad (ver 16.3).

El control bacteriológico es también una constante en todo momento de la producción. El proceso de producción de vacunas debe ser bacteriológicamente estéril en todas sus etapas y también el producto final (ver 17.1).

CUADRO 7.

Respuesta de bovinos expuestos^a a virus O_1 un año después de recibir vacuna con adyuvante oleoso. Valença, Brasil

Núm. Bovinos	Antes de la descarga					Descarga Lesiones
	Microneutralización ^b			ISPC ^c		
	C Ind.	A Bagé	C Venc.	O_1	O_1	
651	≥ 3,2	3,2	≥ 3,5	≥ 3,6	3,7	Neg.
652	≥ 3,6	≥ 3,5	2,9	3,3	2,2	L
653	≥ 3,6	≥ 3,5	3,3	3,2	4,9	Neg.
654	≥ 3,6	≥ 3,5	≥ 3,6	≥ 3,6	> 4,5	Neg.
655	3,3	≥ 3,6	3,0	≥ 3,5	2,1	Neg.
656	≥ 3,6	≥ 3,6	3,2	≥ 3,5	4,8	Neg.
657	≥ 3,5	3,2	3,2	2,7	4,8	Neg.
658	3,3	≥ 3,5	2,7	3,2	2,8	T
659	≥ 3,6	3,3	3,2	≥ 3,5	3,0	Neg.
660	≥ 3,6	2,9	2,9	3,3	> 4,5	Neg.
661	≥ 3,5	≥ 3,6	3,0	3,3	2,5	T
662	≥ 3,6	≥ 3,6	≥ 3,5	≥ 3,6	4,0	Neg.
663	≥ 3,6	≥ 3,6	≥ 3,6	≥ 3,6	> 4,5	Neg.
664	≥ 3,6	≥ 3,6	≥ 3,5	≥ 3,6	> 4,5	Neg.
665	≥ 3,5	3,3	≥ 3,5	2,9	2,0	Neg.
666	≥ 3,6	≥ 3,6	≥ 3,6	≥ 3,6	4,7	Neg.
667	2,7	2,7	2,3	2,6	1,0	T4F
668	≥ 3,6	≥ 3,6	2,9	≥ 3,5	> 4,3	Neg.
669	≥ 3,6	≥ 3,5	2,9	≥ 3,5	> 4,3	Neg.
670	≥ 3,6	≥ 3,5	≥ 3,6	≥ 3,5	> 4,3	Neg.
671	3,3	2,9	3,2	3,0	3,3	Neg.
672	≥ 3,6	≥ 3,5	≥ 3,6	3,3	> 4,3	Neg.
673	≥ 3,6	≥ 3,5	3,0	3,3	3,6	Neg.
674	≥ 3,5	≥ 3,5	2,7	3,3	2,7	T
675	≥ 3,6	≥ 3,5	3,0	≥ 3,5	4,7	Neg.
676	3,3	2,9	2,4	2,6	1,5	T
677	≥ 3,6	3,3	2,4	3,0	1,5	T
678	≥ 3,6	3,3	≥ 3,5	≥ 3,6	> 4,3	Neg.
679	3,3	≥ 3,6	3,3	3,2	3,0	Neg.
680	≥ 3,5	≥ 3,5	≥ 3,5	3,3	1,9	Neg.

^a Exposición por vía intradermolingual con 10^4 DI₅₀ de O_1 Campos.

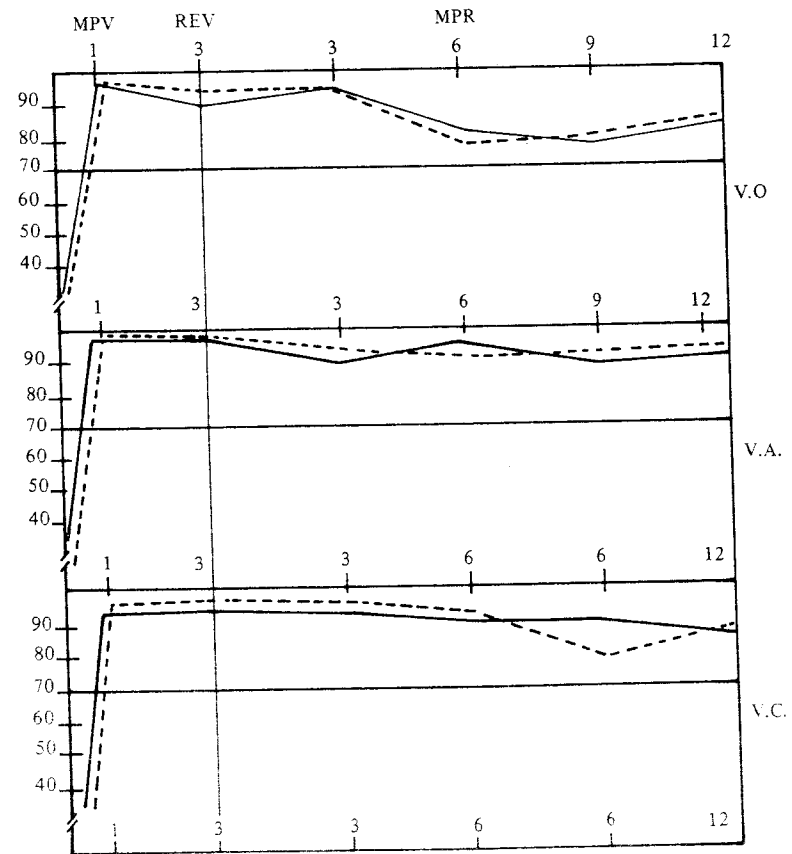
^b Índice de neutralización por microtécnica.

^c Índice de seroprotección. Cunha (27).

FUENTE: Ivo Gomes y otros (34).

FIGURA 5.

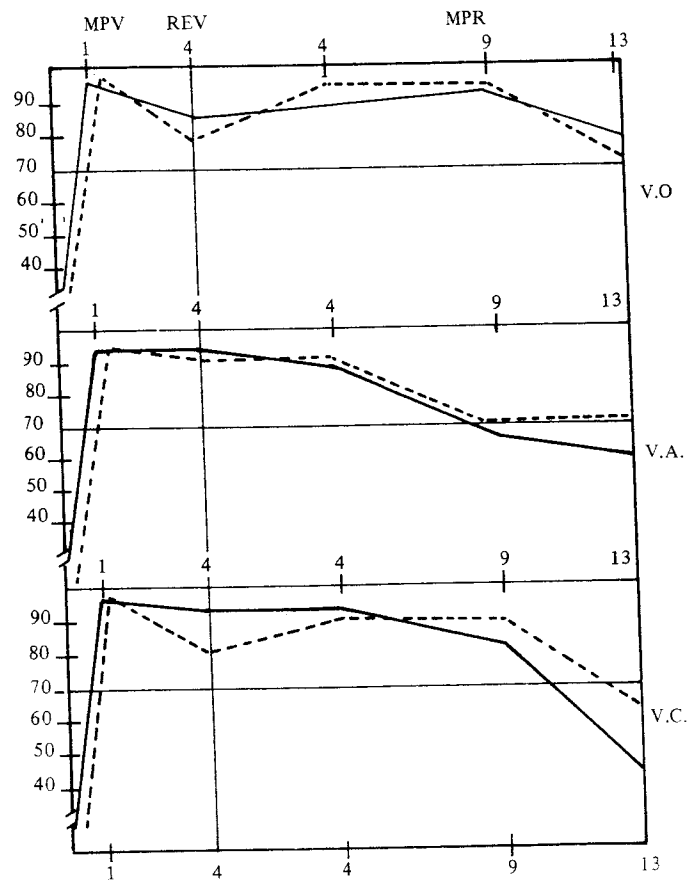
Expectativas porcentuales de protección (EPP) (33) en bovinos de 9 a 12 meses de edad vacunados y revacunados a los 90 días, con vacunas oleosas con antígeno adsorbido o no con $Al(OH)_3$



— Vacuna con antígeno adsorbido con $Al(OH)_3$.
 Fase acuosa + oleosa = 0,7 + 1,3 - Dosis 2,0 ml.
 - - - - - Vacuna control fase acuosa + oleosa = 1 + 1 - Dosis 5 0 ml.
 MPV - Meses posvacunación.
 MPR - Meses posrevacunación.
 FUENTE: Abdoucon et al. (33).

FIGURA 6.

Expectativas porcentuales de protección (EPP) (33)
en bovinos de 9 a 12 meses de edad vacunados y revacunados a los 90 días,
con vacunas oleosas con antígeno adsorbido o no con $Al(OH)_3$



Vacuna con antígeno adsorbido con $Al(OH)_3$.

Fase acuosa + oleosa = 1 + 2 Dosis 3,0 ml.

Vacuna control Fase acuosa + oleosa = 1 + 1 - Dosis 5,0 ml.

MPV - Meses posvacunación.

MPR - Meses posrevacunación.

FUENTE: Abaracón *et al.* Boletín CPFA 45-46: 43, 1982.

CUADRO 8.

Vacuna oleosa. Respuesta anaméctica en bovinos

Virus	Días posrevacunación				
	0	2	4	6	10
O ₁	1,8 ^a	1,9	2,4	4,3	5,0
A ₂₄	2,5	2,8	3,4	4,4	5,0
C ₃	1,3	1,4	1,4	4,5	5,0

^a Índice de seroprotección en ratones lactantes.

Media aritmética.

Número de bovinos: 30

FUENTE: Ivo Gomes y otros (35).

CUADRO 9.

Vacuna oleosa en porcinos.
Serie 160-Doble Emulsión-Dosis 3,0 ml I.P.

Diluciones Dil. Inerte	Virus 0
1:1	16/16 ^a
1:3	5/8
1:9	4/8
1:27	4/8
Controles	0/6

^a Protegidos sobre total.

10,2 DP₅₀S.

FUENTE: Trabajos experimentales CPFA.

CUADRO 10.

Respuesta de cerdos vacunados con vacuna de Fiebre aftosa con adyuvante oleoso en forma de emulsión doble e inoculados con el virus 0₁ Campos

Dilución de la vacuna	Suero Núm.	30 días postvacunación			15 días postinoculación		
		ISP	TMN	Lesiones	ISP	TMN	VIA
1/1	36	≥ 5,3	≥ 3,5	Neg.	≥ 4,9	≥ 3,5	-
	37	≥ 5,3	≥ 3,5	Neg.	≥ 4,9	3,5	-
	38	≥ 5,3	≥ 3,6	Neg.	≥ 4,9	≥ 4,2	-
	39	≥ 5,3	≥ 3,5	Neg.	≥ 4,9	≥ 3,5	-
	40	≥ 5,3	≥ 3,5	Neg.	≥ 4,9	2,9	-
	41	≥ 5,3	≥ 3,6	Neg.	≥ 4,9	2,7	-
	42	≥ 5,3	3,2	Neg.	≥ 4,9	≥ 3,5	-
1/3	43	4,4	3,0	Neg.	≥ 4,9	≥ 3,5	+
	44	≥ 5,3	3,3	Neg.	≥ 4,9	≥ 3,6	+
	45	2,0	3,2	1 P	≥ 4,9	≥ 3,6	-
	46	≥ 5,3	≥ 3,5	2 P	≥ 4,9	≥ 4,5	+
	47	3,8	3,3	2 P	≥ 4,9	≥ 4,8	+
	48	≥ 5,2	≥ 3,8	Neg.	≥ 4,9	≥ 4,8	-
	49	≥ 5,2	≥ 3,6	Neg.	≥ 4,9	2,9	-
50	1,0	3,2	Neg.	3,9	3,2	-	
1/9	51	1,5	3,0	Neg.	4,4	3,5	X
	52	≤ 0,8	3,0	Neg.	≥ 4,8	3,8	+
	53	2,9	≥ 3,6	Neg.	≥ 5,8	3,2	-
	54	0,9	2,6	Neg.	≥ 4,8	≥ 3,6	-
	55	≥ 5,2	3,2	Neg.	≥ 5,8	≥ 3,9	-
	56	1,5	2,4	1 P	≥ 5,8	2,6	+
	57	1,8	3,2	Neg.	≥ 4,8	≥ 3,6	-
	58	≥ 5,2	3,3	Neg.	≥ 5,8	3,5	-
1/27	59	3,4	2,3	2 P	≥ 5,8	3,3	+
	60	0,4	1,8	Neg.	≥ 4,8	2,9	-
	61	0,4	1,8	Neg.	≥ 4,8	3,2	-
	62	0,2	2,1	2 P	≥ 5,8	≥ 3,5	+
	63	0,9	2,4	4 P	≥ 5,8	≥ 3,6	+
	64	0,6	2,6	1 P	≥ 5,8	≥ 3,5	+

+ = Positivo.

- = Negativo.

ISP = Índice de seroprotección.

TMN = Título de microneutralización.

P = Patas.

FUENTE: Vacuna antiaftosa con adyuvante oleoso para cerdos. Ivo Gomes *et al.* Boletín CPFA 35-36:19-25, 1979.

CUADRO 11.

Morbilidad por Fiebre aftosa en el área de Bagé, RS, Brasil en la epidemia de 1980, según tipo de vacunas usadas

Sistema de vacunación	P o b l a c i ó n			Tasa de morbilidad	
	Existente	Expuesta	Afectada	Exist. (1 000)	Exp.(100)
Hidróxido ^a	220.532	30.780	9.958	45	32
Oleosa ^b	240.616	17.164	1.546	6	9

^a Vacunación cada 4 meses.^b Vacunación cada 6 meses de los animales jóvenes hasta 6 meses de edad y anual de los bovinos adultos.FUENTE: Dora, J. F. *et al.* Epidemia de fiebre aftosa en Bagé, RS, Brasil, 1980 Evaluación de dos sistemas de vacunación. Bol. CPFA 49-50: 3-9, 1984.

CUADRO 12.

Plan Hipólito Irigoyen, Argentina
(bovinos 160 000; ovinos 26 000; porcinos 12 000)
5 años de observación

V a c u n a	Núm. de focos por año ^a	Morbilidad 1 000 ^b
Hidróxido-saponinada ^c	18,13%	55,6
Oleosa ^d	4,9%	6,0

^a Núm. de establecimientos con focos/núm. de establecimientos vacunados.^b Núm. de enfermos/1 000 vacunados.^c Vacunación cada 4 meses.^d Vacunación cada 6 meses.FUENTE: Gimeno E. J. Gaggiano, C. H. *et al.* Aplicación experimental a campo de vacuna oleosa en la República Argentina. JUA. AD Fièvre Aphteuse. 16e. Conférence. Documents de travail. 183-186, 14-17 Sept., 1982.

CONTROL DE PRODUCTO FINAL

El producto final, es decir la vacuna antiaftosa, es sometida a controles en dos niveles: a) controles a cargo del productor y b) controles a cargo del organismo oficial de control de cada país.

Control a cargo del productor

El productor debe realizar controles completos de proceso y de producción final (ver 17.1, 17.4, 17.6 y 18.1).

También debe realizar controles de potencia de cada partida producida. Consideramos particularmente indicada la prueba que establece la dosis protectora 50 por ciento en cobayos frente a todas las valencias de la vacuna. No es una prueba cara y al ser una prueba en donde la vacuna se usa diluida permite conocer el punto final de protección dado por la vacuna para cada valencia. Esta información es de gran valor para el productor que podrá observar la evolución del poder inmunogénico de las sucesivas partidas de su vacuna (ver 18.1.5).

Otra prueba del mayor interés para el productor y que debe ser hecha siempre que sea posible, pero por lo menos varias veces cada año, es la prueba de seroprotección en la que se usan bovinos sin antecedentes de FA o vacunación y ratones lactantes para detección de anticuerpos (27) (ver Anexo 3). Esta prueba permite evaluar la inmunidad conferida por la vacuna a corto y a largo plazo y también permite observar la inmunidad frente a la revacunación. Por último, si la vacuna se usa diluida, se obtendrá una buena información de la potencia final del producto.

Es importante que el productor lleve un registro de los resultados obtenidos, para poder comparar las producciones sucesivas a través del tiempo, y detectar la tendencia en los resultados que indique precozmente cualquier desvío antigénico de las cepas en uso.

Controles a cargo del organismo oficial de control

Los controles a cargo del organismo oficial de control dependerán de los reglamentos vigentes en cada país. Muchas veces, los controles oficiales son prueba de eficacia que establecen un umbral mínimo de aceptación de vacunas. Las vacunas que superan ese umbral son autorizadas para comercialización y las que no lo alcanzan no son aprobadas. Otras veces son pruebas de potencia hechas sobre bovinos frente a una valencia de la vacuna (ver Anexos 5 y 6).

Se debe considerar que por un lado éstas son pruebas finales, a las que el productor sólo debe llegar después de haber realizado pruebas preliminares, y por otra que nunca darán al productor la información del comportamiento de cada valencia de la vacuna, ni de las tendencias que se vayan insinuando en el comportamiento inmunogénico de la vacuna (23).

9. USO DE LAS VACUNAS CON ADYUVANTE OLEOSO EN AMERICA DEL SUR

El manejo y cuidados requeridos por la vacuna antiaftosa con adyuvante oleoso son los mismos que para la vacuna convencional de hidróxido de aluminio y saponina. El transporte y uso debe ser rápido, y debe usarse la misma cadena de frío, cámaras frigoríficas, cajas térmicas refrigeradas, etcétera.

La vía de aplicación en el bovino es de preferencia la intramuscular profunda en el tercio superior del pescuezo. No debe usarse la vía intramuscular en músculos nobles, glúteos, etcétera. Puede ser usada la vía subcutánea, pero en algunos casos se producen reacciones locales duraderas que afectan la estética del animal.

La vacuna antiaftosa con adyuvante oleoso induce una inmunidad más intensa y de mayor duración que la vacuna convencional. Por otra parte es superior para inmunizar animales jóvenes. Esto permite ampliar los plazos de vacunación de 4 a 6 meses en cualquier área y condiciones, y en animales adultos después de los 2 años de edad y haber recibido varias vacunaciones se puede llegar a un esquema de vacunación anual. Esto disminuye el costo de la vacunación (11).

En la situación actual en que la producción de vacuna con adyuvante oleoso es todavía limitada, y dada su superioridad debe ser usada de acuerdo con ciertas normas de estrategias (55).

En la novena reunión de la Comisión Sudamericana para la Lucha contra la Fiebre Aftosa (COSALFA) fue aprobado el documento "Política y Estrategia del Combate de la Fiebre aftosa en Sudamérica para la década 1981-1990" (25) que establece las metas para el control y erradicación de la FA en el Continente. En ese documento se considera la reorganización de las estrategias de combate, con base en estudios de regionalización epidemiológica de la enfermedad (44). También se resalta la necesidad de incorporar a los programas vacunas de mayor poder inmunizante.

Del 31 de mayo al 4 de junio de 1982 se realizó en Río de Janeiro, Brasil, el Seminario de Divulgación de los Mecanismos Técnicos y Operativos para el Uso de la Vacuna con Adyuvante Oleoso en los Programas de Lucha contra la Fiebre aftosa en América del Sur. A este seminario concurren todos los jefes de Programa de Sanidad Animal de los países de América del Sur, y fue el primer evento internacional en el marco del PROASA, del Convenio BID/OPS (54).

En el seminario se concluyó que los órganos oficiales deben orientar el uso de la vacuna con adyuvante oleoso sobre todo para las áreas de mayor importancia epidemiológica, como las áreas endémicas primarias.

y en los convenios de frontera donde el movimiento de los animales representa un alto riesgo de difusión de la enfermedad entre los países. Estos temas, incluyendo un diagnóstico de situación en los varios países sudamericanos, son discutidos por Augé de Mello (10).

Los resultados obtenidos con la vacuna con adyuvante oleoso en el cerdo, sobre todo usando la formulación de doble emulsión son altamente satisfactorios (7, 9) en franca contraposición con los resultados que se obtienen con la vacuna de tipo hidróxido de aluminio-saponina, discutidos por Lucam (40).

Debido al corto ciclo de vida del cerdo para abasto, así como la relativa facilidad de aislamiento de los criaderos industriales, en la estrategia de lucha contra la Fiebre aftosa en América del Sur, no se aconseja la vacunación sistemática universal del cerdo. La FA del cerdo se considera una consecuencia directa de la FA bovina, y como tal la vacunación del cerdo estará indicada en momentos o áreas de alto riesgo. En experimentos realizados por el CPFA se ha demostrado que los cerdos de abasto pueden ser protegidos por toda su vida industrial con una sola dosis de vacuna oleosa aplicada a los lechones en el momento del destete y los reproductores con una vacunación cada 6 meses (9). Algunos ensayos parecen indicar que esos intervalos podrían ser mayores (32). La primera dosis puede ser aplicada a los lechones de dos meses de edad por vía intraperitoneal y las dosis sucesivas a los reproductores por vía intramuscular profunda.

En cuanto a la vacunación de ovinos, experimentos también realizados por el CPFA demostraron que una dosis de vacuna con adyuvante oleoso, aplicada por vía intraperitoneal, confiere una inmunidad sólida por más de 12 meses (5).

II. Metodología de producción de vacunas con adyuvante oleoso

ANTECEDENTES

La producción de vacuna con adyuvante oleoso puede realizarse con antígenos producidos por diversos métodos, tales como cultivos celulares en botellas roller, cultivos celulares en suspensión, por el método de Frankel, o tal vez en el futuro por las nuevas tecnologías de síntesis proteica o ingeniería genética (ver Aspectos Generales). Es comprensible que las construcciones, equipos, controles y hasta las medidas de seguridad requeridas sean en gran medida diferentes.

El proceso que seguirá después de la obtención del inmunógeno, sea a partir de virus inactivado o a partir de fracciones inmunogénicas no infectantes del virus será el mismo, cualquiera que sea la tecnología de su producción.

Este capítulo se refiere a la tecnología de producción y control usada en el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (CPFA), tal como fuera transmitida en los Cursos de Producción y Control de Vacuna contra la Fiebre aftosa patrocinados por el Programa de Adiestramiento en Salud Animal (PROASA), en los meses de octubre-noviembre de 1982 y 1983.

La producción de la suspensión vírica para vacuna es hecha por replicación del virus de la Fiebre Aftosa (FA) sobre cultivos de células BHK21 clon 13, adaptadas a crecimiento en suspensión y cultivadas ya sea en tanques de cultivos o en botellas rolantes.

La inactivación del virus es hecha mediante el uso de etileneimina binaria (BEI) (ver 8.2). Esta tecnología de producción es, por otra parte, la misma seguida por la casi totalidad de los laboratorios que producen vacuna con adyuvante oleoso.

10. REQUERIMIENTOS BASICOS EN UN LABORATORIO DE PRODUCCION DE VACUNAS CONTRA LA FIEBRE AFTOSA

Una vez que se ha tomado la decisión política, se ha estudiado la viabilidad económica de consumo o mercado, y se ha definido el proceso in-

dustrial, se debe considerar dónde montar el laboratorio.

10.1. Ubicación

La ubicación geográfica del laboratorio es de gran importancia, desde el doble punto de vista: operacional y de seguridad.

ASPECTO OPERACIONAL

Es fundamental contar con los siguientes servicios esenciales:

- Servicio de energía eléctrica con abastecimiento continuo y de potencia suficiente para los requerimientos de los equipos.
- Agua de buena calidad y en cantidad suficiente, sea de la red central o captada en pozos o ríos. El agua tiene la mayor importancia para el éxito de los cultivos y el volumen de agua necesario es elevado; como ejemplo diremos que una planta que produzca 2 millones de dosis por mes, consumirá en media 80 a 120 mil litros de agua por día.
- Red telefónica, de preferencia con conexión automática para todo el país.
- Proximidad a los medios de transporte: ferroviario, rodoviario y aéreo. Esto es de gran importancia para obtener rápida asistencia técnica para los equipos de producción y para:

Recepción de insumos. Materia prima nacional e importada, suero bovino, raciones para animales del bioterio, frascos para vacunas, cajas térmicas y paquetes refrigerantes para despacho de vacunas, aceite combustible para el generador de vapor y de electricidad, etc. Algunos de estos insumos pueden recibirse en cantidades suficientes para muchos meses de producción, pero otros, por su naturaleza, como el suero bovino y raciones, o por su volumen como el aceite combustible, las cajas térmicas y frascos de envase deben recibirse a intervalos más breves, en la medida que se van usando.

Despacho de vacunas. Considerando el carácter delicado del producto, su volumen grande que es además aumentado por el embalaje especial que requiere, y la temperatura baja a que debe mantenerse hasta el momento de su aplicación, resulta obvia la importancia que reviste el fácil acceso a todas las vías de comunicación.

Aspecto de seguridad biológica. Del punto de vista de seguridad biológica es también muy importante la ubicación geográfica del laboratorio. En primer término se debe considerar si se trata de área endémica, esporádica, libre, o en vías de ser declarada libre de FA. En segundo

término, si el laboratorio está emplazado en un área urbana o rural; proximidad de animales susceptibles, destino de las aguas servidas, etcétera.

Un laboratorio instalado en área rural o semi rural, área libre o en vías de erradicación de la Fiebre aftosa, debe contar con la máxima seguridad biológica, contando con filtración absoluta del aire y esterilización total de toda el agua servida y desperdicios.

10.2. Construcciones

Una primera división debe establecerse entre la dirección administrativa, con sus departamentos de personal, contable y ventas, y el departamento de producción.

Todo laboratorio de producción de vacunas debe contar con varios sectores independientes, a saber: laboratorio de producción propiamente dicho, central de servicios, almacén de depósito de insumos y piezas de reposición, etc., taller mecánico, lavandería, tratamiento de aguas servidas, bioterio de animales pequeños, construcción independiente para inoculación de los mismos, y campo experimental para animales grandes.

LABORATORIO DE PRODUCCION

El laboratorio de producción debe tener una superficie que permita un fácil desplazamiento del personal y equipo, y una capacidad de almacenamiento suficiente y cómoda para el producto en proceso y el producto final. En este sentido se debe tener presente que las pruebas privadas de control de vacunas y luego la aprobación oficial de cada partida producida llevarán en media 90 a 100 días y que la distribución de la vacuna tiene en general un carácter de zafra. De esta forma, siendo continua la producción, se demorará la liberación de la vacuna para atender a su distribución, se requerirá una gran capacidad de almacenamiento del producto final que es la vacuna lista.

Dependiendo de la técnica de producción también el producto intermedio, virus inactivado, podrá ser almacenado durante un período de prueba lo que aumenta aún más los requerimientos de cámaras a 4°C. Para este subproducto es preferible disponer de una cámara independiente.

División de áreas. Cualquiera que sea la forma que se dé a las construcciones el laboratorio siempre deberá estar dividido en dos sectores:

a) área donde no se maneja virus activo o "área limpia", y b) área donde se maneja virus activo o "área de virus", cada área debe ser operada por personal totalmente diferente, que entrará y saldrá del laboratorio a través de vestuarios separados.

— "Área limpia"— En esta área se realizan los trabajos de comienzo de proceso, producción de medio de cultivo, mantenimiento celular, producción de cultivos celulares, y la parte final de proceso, es decir, recepción de virus inactivado, formulación de vacunas y envase de la misma. Este sector debe contar con la mayor capacidad de cámara a 4°C.

— "Área de virus"— En esta área se realiza la producción de cultivos celulares en forma industrial para la replicación viral, y la producción de las suspensiones víricas y su inactivación. Después de controlada la total inactivación del virus, el mismo se pasa por circuito cerrado al área limpia para formulación de la vacuna. Cualquier otro material que salga del área de virus lo hará a través del autoclave.

La Figura 7 esquematiza la distribución de los sectores esenciales en todo laboratorio de producción. El esquema no está hecho en escala. Sólo indica los sectores con que debe contar la unidad y su independencia.

CENTRAL DE SERVICIOS

Dependiendo del diseño del laboratorio, los servicios se agruparán en diversas formas. Puede ser una construcción independiente enfrente al laboratorio de producción que cuenta con todos los equipos o sólo una parte de ellos. Los otros equipos pueden estar en un sobre-techo arriba del laboratorio.

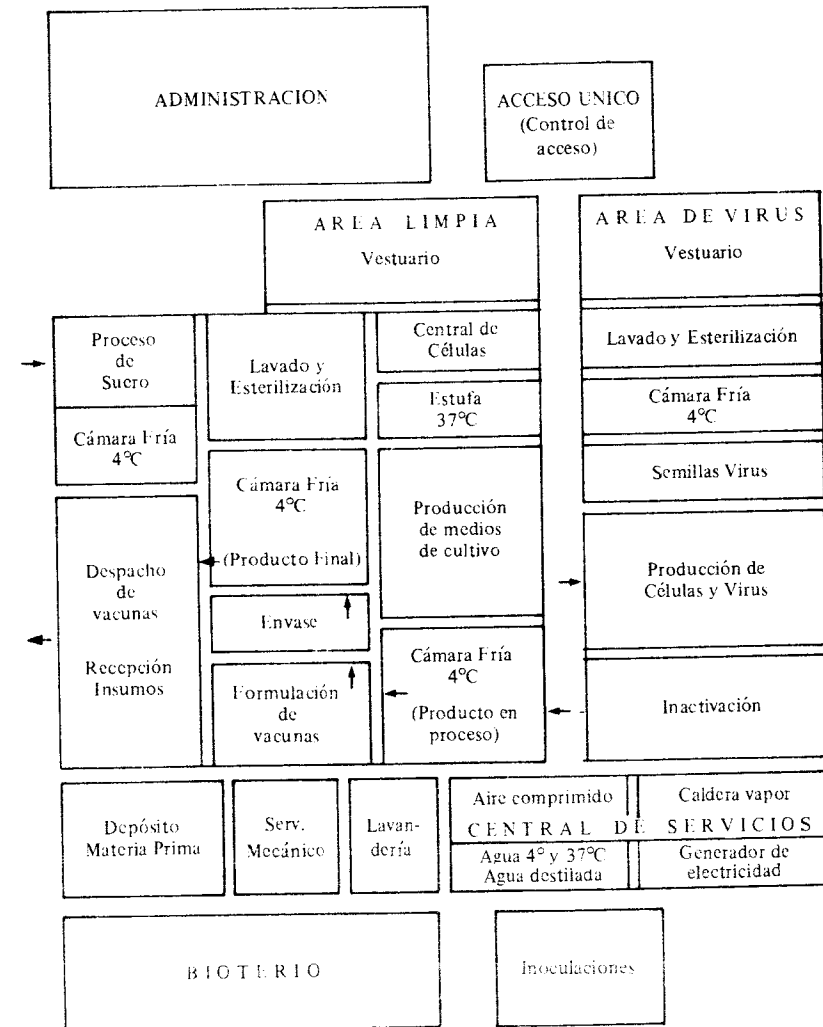
De cualquier manera los servicios básicos imprescindibles serán:

- Central de aire comprimido, de preferencia compresores tipo libre de aceite.
- Central de agua refrigerada.
- Central de agua a 37°C.
- Unidad generadora de vapor.
- Unidad generadora de energía eléctrica para emergencias (grupo electrógeno).
- Unidad de tratamiento de agua, deionización, destilación, ósmosis reversa.

— Unidad de aire acondicionado, con presiones diferenciales para las áreas libres y contaminadas. Es ideal que posean filtros absolutos o la salida.

Unidad de tratamiento de aguas servidas. El agua que sale del laboratorio puede llevar virus vivo que debe ser destruido por tratamiento

FIGURA 7
Sectores que componen un laboratorio de producción de vacunas



especial. El tratamiento puede ser térmico, en general por inyección directa de vapor o químico por ácidos y luego neutralizado por álcalis. En todos los casos será necesario contar con cisternas o cámaras de depósito para detener el agua durante el tratamiento.

BIOTERIO

El bioterio deberá proveer al laboratorio los cobayos y ratones lactantes suficientes para probar todas sus partidas de producción de vacuna normales y algunas experimentales.

Cada partida trivalente de vacuna insumirá en media 84 cobayos de 500 gramos.

En una prueba de vacuna trivalente sobre 16 bovinos con evaluación de anticuerpos por seroprotección en ratones lactantes, se usarán 2 664 ratones lactantes de 6-8 días de edad.

UNIDADES DE PRUEBAS DE VACUNAS EN COBAYOS Y RATONES

La vacunación de cobayos y la descarga de virus en cobayos y ratones lactantes en pruebas de vacunas debe ser hecha en una unidad dotada de las mismas condiciones de seguridad que el área contaminada del laboratorio. Además debe contar con un horno incinerador para quemar todos los animales inoculados, camas, sobra de raciones y todo el material que deba salir de la unidad.

CAMPO EXPERIMENTAL PARA ANIMALES

Es muy conveniente que el laboratorio disponga de un campo experimental para ensayos en animales grandes y medianos, vacunación de los mismos, estudio de reacciones locales, etc., excluyendo el uso de virus vivo. Si el laboratorio no dispone de este campo debe tener acceso a algún establecimiento rural donde pueda vacunar animales para estudio de inmunidad a través de su respuesta de anticuerpos, estudio de reacciones locales, estudio de algunas drogas nuevas, adyuvantes, etcétera.

11. LAVADO, PREPARACION Y ESTERILIZACION DE MATERIAL

11.1. Consideraciones generales

Debido a las exigencias especiales del material de vidrio, destinado a cultivos celulares, es aconsejable que se manipule aparte de los materiales usados por otros laboratorios.

Si el material procede de otras áreas infectadas debe ser previamente descontaminado y luego sometido al tratamiento que se detalla más adelante.

El personal debe usar ropas especiales de trabajo. En caso de utilizar sustancias corrosivas se recomienda el uso de guantes y delantales de goma. La utilización de guantes de asbesto es recomendable para el manejo de hornos y autoclaves.

LAVADO

En líneas generales, los pasos para un buen lavado del material de cultivos celulares son los siguientes:

- a) Dejar en contacto por inmersión con un detergente de buena calidad y de fácil remoción, por un período mínimo de 12 horas. El detergente, polvo o líquido, es usado en una concentración de 1,0 por ciento generalmente, salvo otras instrucciones del fabricante.
- b) Escurrir el detergente y cepillar bajo agua corriente para eliminar detritus celulares. Se deben usar cepillos apropiados a las dimensiones de los materiales a lavar. Tener cuidado que los cepillos estén en buenas condiciones para no rayar el vidrio.
- c) Enjuagar con agua corriente varias veces para eliminar el detergente. En algunos casos es conveniente enjuagar con agua caliente.
- d) Enjuagar cinco veces con agua deionizada.
- e) Eliminar el agua de exceso, invirtiendo el material sobre una superficie limpia.
- f) Secar en horno a 150°C. Los tapones y otros materiales de goma pueden ser secados en estufa a 37°C.
- g) El material se mantiene libre de polvo hasta el momento de su preparación y esterilización.
- h) El detergente debe ser cambiado una vez por semana o cuando se observa que está sucio, lo que dependerá de la frecuencia de uso.
- i) Los materiales nuevos se dejan sumergidos en detergente al 2,0 por ciento durante 3-4 días.

j) Los tapones de goma, las tapas de rosca, los tubos de goma y de acero pueden ser tratados en igual forma.

k) Las pipetas deben ser lavadas en lavadores automáticos, siendo enjuagadas con agua deionizada antes de ser secadas en el horno.

l) Las jeringas corrientes y las automáticas deben ser lavadas individualmente y comprobadas en su funcionamiento antes de ser preparadas y esterilizadas. Especial cuidado debe tomarse en el lavado de filtros Seitz y Millipore (ver 12.14).

PREPARACION

La forma de preparar el material tiene gran importancia sobre la facilidad de su empleo posterior y sobre el mantenimiento de la esterilidad por mayor tiempo. En general, las partes abiertas son cubiertas con papel de aluminio de una espesura de 0.04 mm, y luego se coloca papel Kraft simple o doble según el caso y se amarra con cordel.

a) El material a preparar debe estar siempre seco y frío.

b) Las pipetas pueden ser envueltas individualmente en papel Kraft o bien, colocadas en cilindros especiales de acero inoxidable.

c) Los tubos de cultivo también son colocados en tarros especiales en forma invertida.

d) Los tapones de goma y las tapas de rosca deben ser colocadas en frascos de boca ancha o bien en placas de Petri. El método de preparación depende en gran parte de la calidad de la goma y de su resistencia a la esterilización por calor.

e) Los embudos, jeringas y otros materiales especiales deben ser preparados en tal forma que puedan ser manipulados fácilmente y en forma tal que no pierdan su esterilidad.

f) Para ciertos trabajos es necesario utilizar tapones de gasa y algodón, que se deben confeccionar con materiales de buena calidad, que no desprendan aceites volátiles con el calor. El algodón a usar debe ser hidrófobo, es decir no absorbente.

g) Los filtros Seitz y Millipore deben ser preparados cuidadosamente, según instrucciones (ver 12.14).

ESTERILIZACION

El material de vidrio es esterilizado en horno, por calor seco, a una temperatura de 180°C durante 2 horas. Para que la esterilización se realice en buena forma es indispensable colocar el material dentro del horno de

modo que haya una adecuada circulación de aire caliente, evitando las bolsas de aire.

Se debe tener en cuenta la calidad del papel que se usa para envolver el material. No debe ser quebradizo ni liberar alquitranes u otras sustancias tóxicas que sean nocivas para los cultivos celulares.

Algunos materiales como tapones de goma, jeringas, frascos con tapones de gasa, tapas de rosca, tubos de goma, etc. son esterilizados en autoclaves, por calor húmedo, a una temperatura de 121°C por 30 minutos. La temperatura de 121°C corresponde a una presión de 15 libras/pulgada.² Se debe evitar que el papel se moje.

En general, se debe dejar enfriar los materiales en el propio autoclave u horno, salvo en casos de emergencia, que pueden ser enfriados a temperatura ambiental. Nunca deben ser colocados en cámaras frías, ya que se corre el riesgo de rupturas y de entrada de aire no estéril por cambios térmicos.

Los filtros Seitz y Millipore después de esterilizados deben ser enfriados según lo descrito en 12.14.

La temperatura del autoclave puede ser controlada rutinariamente con cinta 3M especial para autoclaves. Esta cinta tiene bandas que cambian de color cuando se alcanza la temperatura de esterilización.

11.2. Material de vidrio de uso general

a) Poner todo el material de vidrio en remojo durante la noche en cubas grandes con 1,0 por ciento de detergente (EVENT, Magnus Soilax, RJ).

b) Cepillar bien y enjuagar cinco veces con agua corriente.

c) Enjuagar cinco veces con agua deionizada.

d) Secar en horno a 150°C durante 30 minutos.

e) Enfriar y preparar con tapas de papel aluminio recubiertas con papel Kraft, asegurando con cordel.

f) Esterilizar en horno a 180°C por 2 horas.

11.3. Pipetas

a) Dejar de remojo durante la noche en cubas con detergente.

b) Enjuagar individualmente en agua común usando manguera adaptable al grifo de agua para eliminar los algodones por presión.

c) Colocar en el lavapipetas y enjuagar con agua desmineralizada por 10 ciclos.

- d) Secar en horno a 150°C por 30 minutos.
- e) Enfriar y poner algodón hidrófobo (no absorbente) en el extremo de succión.
- f) Separar por capacidad y poner en cilindros de acero inoxidable, o bien envolver individualmente en papel Kraft y cada grupo de 5 a 10 pipetas es otra vez envuelto en papel Kraft.
- g) Esterilizar en horno a 180°C por 2 horas.

11.4. Botellas roller

Las botellas roller no son diferentes de los otros recipientes de vidrio que se usan en los trabajos con cultivos de células. Por lo tanto pueden ser lavadas de acuerdo con el procedimiento descrito en 11.2.

Cuando son usadas en cultivos destinados a replicación de virus, el número de botellas es muy grande y es conveniente lavarlas en máquinas hidrolavadoras rotativas (ver Figura 8).

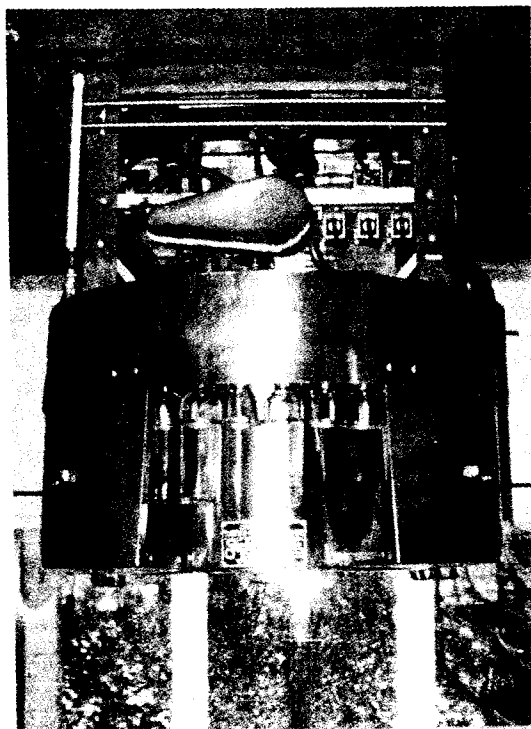


FIGURA 8
Máquina hidrolavadora
rotativa para botellas

PROCEDIMIENTO

a) En estas máquinas las botellas son colocadas en forma invertida en un soporte circular que va girando sobre una corona de picos invertidos, y que se detiene cada vez que la boca de las botellas enfrenta los picos invertidos que enviarán líquidos bajo fuerte presión al interior de la botella. Esos picos están conectados a tres recipientes conteniendo: agua corriente usada para enjuagar, agua con 1,0 por ciento de detergente no espumoso a 80°C, y agua destilada para enjuague final.

Cada botella recibirá sucesivamente: dos chorros de agua corriente para enjuague inicial, ocho chorros de detergente a 80°C, tres chorros de agua corriente para eliminar el detergente, y dos chorros de agua destilada.

b) Cuando las botellas se retiran de la máquina se colocan en posición invertida para que escurra el agua de lavado.

c) Secado en horno eléctrico a 150°C durante 1 hora.

d) Se tapan con papel aluminio, papel Kraft y se ata con cordel. Cuando son destinadas a un uso inmediato se puede usar sólo papel aluminio.

e) Esterilizar en horno eléctrico 2 horas a 180°C.

11.5. Tapas rosqueadas de botellas roller

a) Dejar las tapas nuevas en detergentes (EVENT MAGNUS) al 2,0 por ciento por 48 horas.

b) Las tapas usadas deben quedar en remojo durante la noche en detergente (EVENT MAGNUS) al 1,0 por ciento.

c) Enjuagar bien con agua corriente.

d) Enjuagar cinco veces con agua deionizada.

e) Secar a temperatura ambiente o a 37°C.

f) Poner en camadas separadas por gasa en cajas de aluminio adecuadas.

g) Tapar y asegurar con papel Kraft y cordel.

h) Esterilizar en autoclave a 121°C/15 lb por 60 minutos.

11.6. Tapones de goma

a) Poner los tapones nuevos en detergente al 2,0 por ciento por 48 horas.

b) Poner los tapones usados en detergente al 1,0 por ciento por 24 horas.

- c) Enjuagar bien con agua corriente.
- d) Enjuagar cinco veces con agua deionizada.
- e) Secar a temperatura ambiente o a 37°C.
- f) Los tapones más pequeños se ponen en frascos y los grandes se envuelven individualmente en papel Kraft para su esterilización.
- g) Esterilizar en autoclave a 121°C/15 lb por 60 minutos.

11.7. Balones con dispositivos para transferencia estéril (Figura 9)

- a) Retirar los sifones de los balones, frascos Erlenmeyer, etc., para lavar separadamente.
- b) Dejar los frascos en remojo durante la noche en solución al 1,0 por ciento de detergente (EVENT MAGNUS).
- c) Retirar los filtros de los sifones y poner estos últimos en cuba con detergente durante la noche. Los filtros no deben ser mojados.
- d) Lo mismo se hará con las mangueras de transferencia, los embudos de siembra, los embudos de cosecha y con las mangueras tapa sifón.
- e) Lavar bien con agua corriente el interior y exterior de los sifones y otras mangueras.
- f) Enjuagar en la misma forma con agua deionizada.
- g) Colgar para escurrir el agua y secar.
- h) Instalar los sifones en los balones, conectar los filtros y las mangueras tapas, cubriendo el conjunto con papel de aluminio y papel Kraft, asegurando finalmente con cordel.
- i) Taponar los extremos de las mangueras con gasa y cubrir con papel de aluminio, envolviendo toda la manguera con papel Kraft asegurando con cordel.
- j) Las mangueras tapa sifón sueltas, se tapan con gasa, en el extremo libre, se cubre con papel de aluminio y se envuelven en paquetes de 5, atando con cordel.
- k) Los filtros de sifón se cubren en sus extremos con papel de aluminio y se envuelven individualmente en papel Kraft.
- l) Los embudos de cosecha se cubren en las bocas con papel aluminio y se envuelven con papel Kraft, asegurando con cordel.
- m) Esterilizar todos los materiales en autoclave a 121°C/15 lb por 60 minutos.

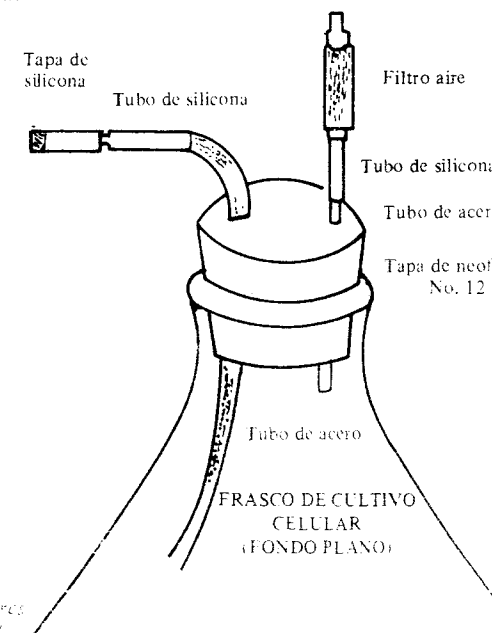
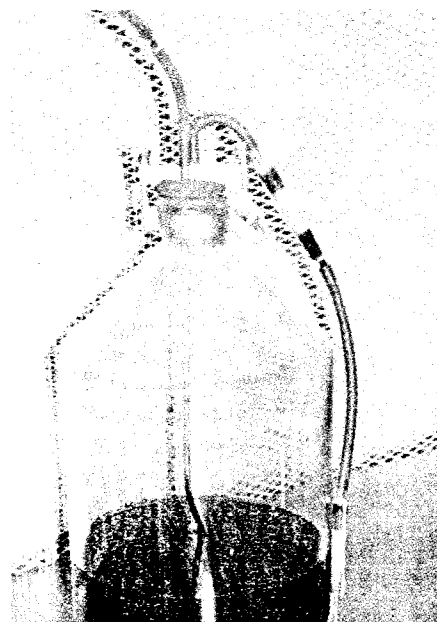


FIGURA 9

Frasco de fondo plano para cultivos celulares con dispositivo para transferencia estéril

12. UNIDAD DE PRODUCCION DE MEDIO DE CULTIVO

En esta unidad se producen los medios de cultivo para el área limpia y el área de virus.

Los medios que se producen en mayor volumen son los medios de crecimiento celular (M.C.) y el medio de mantenimiento para virus (M.V.) que son destinados a los cultivos en el área de virus. Esos medios son formulados en esta unidad y transferidos por tubulación al área de virus donde se realiza la filtración esterilizante.

En laboratorios de mayor porte la filtración esterilizante de estos medios es hecha en el área limpia y los medios transferidos por tubulación estéril a los tanques del área de virus donde van a ser usados.

Todos los otros medios de cultivo y soluciones que se producen son esterilizados y controlados en esta unidad antes de librarlos al uso.

12.1. Equipo

- Balanza Mettler sensible a 0,1 g (Modelo P2000N).
- Balanza hasta 2,0 kg (OHAUS. Scala Corp. USA).
- pH meter (Metrohm y Portatest 901).
- Osmómetro (Osmette, Precision osmometer).
- Agitadores magnéticos (Mag Mix, Mod. No. 4815. Cole Parmer Inst. Co., Chicago, Ill. USA).
- Barras magnéticas 1 3/8" x 5/8", 2 1/2" x 5/8", 1 1/2" x 3/8", etcétera.
- Balones Pyrex fondo plano 1-2-5-10 y 20 litros, etcétera.
- Mecheros Bunsen. Soportes para frascos.
- Beakers diversos tamaños.
- Tanques de pared simple de 50 y 300 litros con agitación.
- Conexiones de latex y silicona.
- Cabina de flujo laminar (Edge Gard Hood. The Baker Co., Inc).
- Filtros Millipore 142 y 293 mm.
- Tanques Millipore de presión de 5 y 20 litros.
- Prefiltros Millipore para ambos tamaños tipo AP25, AP20, AP15, AW03, separador AP32.
- Placas filtrantes pH 0,30 μm y GS 0,22 μm .
- Bomba de vacío y presión – Millipore XX6000000.

12.2. Medio de crecimiento (M.C.) para células en suspensión

Medio de crecimiento de células – 100 litros

– Colocar alrededor de 70 litros de agua desmineralizada.

– Agregar bajo agitación:

- | | |
|--|-----------------|
| a) MEM-GIBCO – Cat. 410-1100 – c.s.p. | 82 litros |
| b) Vitaminas (sol. stock, concentrada 250 x) | 164 ml |
| c) Glucosa anhidra | 287 g |
| d) Nitrato férrico (sol. stock 1 g/litro) | 8,2 ml |
| e) NaHCO ₃ | 220 g |
| f) Caldo triptosa fosfato (T.P.B.) | 295 g |
| g) Penicilina G. potásica | 10.000.000 u.i. |
| h) Sulfato de Neomicina | 15 g |
| i) Fungizona | 250 mg |
| j) Polimixina B (optativo) | 4.000.000 u.i. |
| k) Suero bovino | 8,0 litros |
| l) Agua deionizada – c.s.p. | 100 litros |

– Ajustar pH = 7,4 a 7,45.

– Filtrar en filtro Seitz por placas K2 + EKS1.

– Controles bacteriológicos.

Cuando el medio se destina a células de stock y para congelación, se formula sin antibióticos (items – g a j) y se filtra por membranas Millipore GS 0,22 μm . Se hace control bacteriológico por incubación en estufa a 37°C durante 7 días y por siembra en TPB (ver 12.12).

Drogas utilizadas

- a) MEM-GIBCO Cat. No. 410-1100
(Gibco Laboratories – Grand Island Biological Co. Grand Island, NY 14072, USA).
- b) Vitaminas.
Conservadas como Sol. Stock concentrada 250 x (ver 12.7).
- c) Glucosa anhidra MERK . . . Cat. 8337.
- d) Nitrato férrico MERK Cat. 3883. Se prepara una solución al 0,1 por ciento y se guarda en congelación.
- e) NaHCO₃ – MERK . . . Cat. 6329.
- f) Caldo triptosa fosfato MERK Cat. 13811. o
Caldo triptosa fosfato DIFCO – Cat. 0060-01-6.
El producto viene en polvo.
- g) Penicilina G potásica (SQUIBB).
- h) Sulfato de Neomicina (UPJOHN).
- i) Fungizona – Anfotericina B inyectable SQUIBB.

- j) Polimixina B – GIBCO Cat. No. 860-1850.
k) Suero bovino (ver 12.9).

12.3. Medio de mantenimiento para virus (M.V.)

- Colocar alrededor de 60 litros de agua desmineralizada.
- Agregar bajo agitación:

a) MEM-GIBCO – Cat. 410-110 – c.s.p.	63 litros
b) Vitamina (solución stock concentrada 250 x)	126,0 ml
c) Glucosa	220,50 g
d) Nitrato férrico (solución stock 1 g/litro)	6,3 ml
e) NaHCO ₃	154,0 g
f) Caldo triptosa fosfato (T.P.B.)	206,5 g
g) Solución Tris Buffer (ver 12.4)	30 litros
h) Penicilina	10.000.000 u.i.
i) Sulfato de neomicina	15 g
j) Fungizona	250 mg
k) Polimixina B (optativo)	4.000.000 u.i.
l) Agua desmineralizada – c.s.p.	100 litros
- pH = 7.6.
- Filtrar en filtro Seitz por placas K2 y EKS1.
- Controles bacteriológicos.

Drogas utilizadas

- a) MEM-GIBCO Cat. 410-1100.
(Gibco Laboratories – Grand Island Biological Co.
Grand Island, NY 14072, USA)
- b) Vitaminas
Conservadas como Sol. Stock concentrada 250 x (ver 12.7).
- c) Glucosa anhidra MERK Cat. 8337.
- d) Nitrato férrico MERK Cat. 3883. Se prepara una solución al 0,1 por ciento y se guarda en congelación.
- e) NaHCO₃ – MERK Cat. 6329.
- f) Caldo triptosa fosfato MERK Cat. 13811. o
Caldo triptosa fosfato DIFCO – Cat. 0060-01-6.
El producto viene en polvo.
- g) Penicilina G potásica (SQUIBB).
- h) Sulfato de Neomicina (UPJOHN).
- i) Fungizona – Anfotericina B inyectable SQUIBB.
- j) Polimixina B – GIBCO Cat. No. 860-1850

12.4. Solución de tris-buffer 0.2 M

- Pesar 726,84 g de TRIS y disolver en 25 litros de agua deionizada bajo agitación.
- Agregar 250 ml de HCl concentrado. Como el pH aún estará alto, agregar más HCl concentrado hasta llegar a pH 7,6. Completar el volumen a 30 litros.
- Preparar la solución inmediatamente antes de usar.

Drogas utilizadas

- a) TRIS – Hydroxymethyl amino metano P.M. 121.14
(GIBCO Laboratories, Cat. No. 845-1310
Grand Island NY 14072, USA)
- b) HCl concentrado 37 por ciento (MERK Cat. No. 317).

12.5. Medio de crecimiento para células BHK de monocamada

Cantidad para 100 litros:

- Sobre 40 litros de agua deionizada bajo agitación agregar

a) Polvo MEM GIBCO Cat. 410-1100 – c.s.p.	82 litros
b) Vitaminas (Sol. Stock concentrada 250 x)	164 ml
c) Glucosa anhidra	287 g
d) Nitrato férrico (Sol. Stock 0,1 por ciento)	8,2 ml
e) Na HCO ₃	200 g
f) Caldo triptosa fosfato (T.P.B.)	295 g
g) Suero bovino tratado por PEG (ver 12.9.)	9,0 litros
h) Penicilina G potásica 100 u.i./ml	10 M.U.
i) Sulfato de Neomicina 0,15 mg/ml	15 g
j) Fungizon 2,5 mg/litro	250 mg
- Completar a 100 litros con agua deionizada.
- Burbujear CO₂ hasta pH 6,7.
- Filtrar por filtros Millipore montados con placas AP25-AW03-
Separador AP32 y GS 0,22 µm y distribuir en balones de 5 a 10 litros.
- Controles bacteriológicos.
- Cuando el medio se destina a mantenimiento de células del stock se usa sin antibióticos y se controla por incubación a 37°C por 7 días, y se siembra en T.P.B. (ver 12.12.11).

Drogas utilizadas

- a) MEM-GIBCO Cat. No. 410-1100
(Gibco Laboratories – Grand Island Biological Co.
Grand Island, NY 14072, USA)
- b) Vitaminas
Conservadas como Sol. Stock concentrada 250 x (ver 12.7).
- c) Glucosa anhidra MERK Cat. 8337.
- d) Nitrato férrico MERK Cat. 3883. Se prepara una solución al 0,1 por ciento y se guarda en congelación.
- e) NaHCO_3 – MERK Cat. 6329.
- f) Caldo triptosa fosfato MERK Cat. 13811, o
Caldo triptosa fosfato DIFCO – Cat. 0060-01-6.
El producto viene en polvo.
- g) Penicilina G Potásica (SQUIBB).
- h) Sulfato Neomicina (UPJOHN).
- i) Fungizona – Anfotericina B inyectable SQUIBB.
- j) Polimixina B – GIBCO No. 860-1850.
- k) Suero bovino (ver 12.9.)

12.6. Medio para congelación de células

- Medio de crecimiento celular (M.C.) con 8,0 por ciento suero bovino, sin antibióticos 380 ml
- Suero normal de bovino estéril 70 ml
- Glicerina pura esterilizada 50 ml
- Control bacteriológico.
- Glicerina pura MERK Cat. 4091 esterilizada en autoclave 30 minutos a 121°C.
- Suero normal bovino estéril (ver 12.9.).

12.7. Solución de vitaminas 250 x (1.0 litro)

– Preparar una solución de 1,6 g de NaOH en 40 ml de agua deionizada. En esa solución disolver:

- | | |
|---|--------|
| Acido fólico | 0,5 ml |
| En 800 ml de agua desmineralizada en agitación agregar: | |
| a) Solución anterior de ácido fólico | |
| b) Cloruro de colina | 0,5 g |
| c) Nicotinamida | 0,5 g |
| d) D. Pantotenato de calcio | 0,5 g |

- | | |
|---------------------------------------|-------|
| e) Piridoxal HCl | 0,5 g |
| f) Tiamina HCl (aneurina) | 0,5 g |
| g) Riboflavina en solución 0.005 g/ml | 10 ml |
- Solución de Riboflavina:
– Disolver 2 ml de una solución 1N de NaOH en 98 ml de agua deionizada.
– Disolver bajo agitación 0,5 g de Riboflavina.
– Guardar en congelación
- | | |
|---------------------------|---------|
| h) Completar el volumen a | 1000 ml |
|---------------------------|---------|
- Distribuir en frascos, proteger de la luz y guardar en congelación a –20°C.

Drogas utilizadas

- a) NaOH (MERK Cat. 6498).
- b) Acido fólico (MERK Cat. 3948).
- c) Cloruro de colina (MERK Cat. 500117).
- d) Nicotinamida (MERK Cat. 6818).
- e) D Pantotenato de calcio (MERK Cat. 2316).
- f) Piridoxal (MERK Cat. 7523).
- g) Tiamina HCl (aneurina) (MERK 8181).
- h) Riboflavina (MERK 7609).

12.8. Solución de tripsina 0,1 por ciento (cantidad 1.000 ml)

- Sobre 800 ml de agua deionizada en agitación agregar:
- | | |
|---|---------|
| a) NaCl | 8,0 g |
| b) K Cl | 0,2 g |
| c) $\text{Na}_2\text{NPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ | 2,0 g |
| d) Tripsina 1:250 | 1,0 g |
| e) NaHCO_3 | 1,0 g |
| f) Rojo fenol 1,0 por ciento | 1,2 g |
| g) Agua deionizada – c.s.p. | 1000 ml |
- Filtración esterilizante por filtro Millipore 142 mm con placas AP25 y GS 0,22 μm . Distribuir en frascos de 50 ml.
– Control bacteriológico.

Drogas utilizadas

- a) NaCl (MERK Cat. 6404).
- b) KCl (MERK Cat. 4936).
- c) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (MERK Cat. 6579).

- d) Tripsina 1:250
(DIFCO Lab., Detroit, Michigan, USA), DIFCO Certified.
- e) NaHCO₃ (MERK Cat. 6329).
- f) Rojo fenol soluble
(Nutritional Biochemical Corporation
Cleveland, Ohio, USA).

12.9. Suero bovino para medio de crecimiento y congelación

El suero bovino constituye un elemento promotor de crecimiento imprescindible para los cultivos de células BHK21, y para que éstas mantengan su susceptibilidad inalterada frente al virus de la FA.

Siendo el suero un elemento extraído de animales vivos, puede ser vehículo de agentes infecciosos, bacterias, virus, PPLO, y/o factores tóxicos que afectarían los cultivos, por lo cual cada partida de suero debe ser debidamente controlada.

PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN Y PROCESO DEL SUERO BOVINO

a) La sangre debe ser colectada en un matadero higiénico y con control sanitario.

b) Se utilizan tachos de aluminio o plástico esterilizables, de boca ancha y 10 litros de capacidad. Para el suero destinado a producción, se agrega 100.000 u.i. de penicilina G potásica y 0.15 g de sulfato de neomicina por litro de sangre.

Cuando se trata de suero para cultivo de células sin antibióticos, se omite el uso de penicilina y neomicina, tomándose especiales cuidados de asepsia.

c) Se deja coagular la sangre y se corta el coágulo en trozos pequeños.

d) Se vacían los coágulos cortados en un balde plástico con orificios, contenido dentro de otro balde adonde caerá el suero que se va separando por retracción de los coágulos. Se coloca todo en cámara a 4°C por 12 a 18 horas.

e) Se centrifuga el suero en centrífuga (Alfa Laval, Modelo BPB 204A-11) a 7.000 revoluciones por minuto.

f) El suero centrifugado es inactivado por calentamiento a 56°C durante 30 minutos, bajo continua agitación suave.

g) Inmediatamente después, el suero es clarificado en filtro Seitz Pilot 20 x 20 (ver 12.14) equipado con placas clarificantes K5 a razón de una placa por cada 10 litros de suero, y se distribuye en balones de

polipropileno de 18 litros de capacidad a razón de 14 litros de suero por cada balón.

h) Se toma una muestra para recuento bacteriano (ver 17.1.4).

i) Se toma una muestra de 1.000 ml y se somete a filtración esterilizante en filtro Millipore 293 mm, equipado con placas AP25-AW03, separador de dacron AP32 y placas GS 0.22 µm. Esta muestra será usada para controles de crecimiento celular (ver 12.9.3.2).

j) Si la partida de suero es aprobada quedará congelada hasta el momento de su uso para preparación de M.C. Para ello, el día anterior a su uso se retira del congelador y se deja a temperatura ambiente. Cuando está totalmente descongelado y antes de incorporarlo al medio de cultivo, se clarifica por filtro Seitz, con placas K5, a razón de una placa K5 20 x 20 por 1,5 litros de suero.

SUERO BOVINO TRATADO CON POLIETILENGLICOL

Materiales

- Polietilenglicol (PEG)
(CARBOWAX PEG 8.000
Fisher Scientific Co.
Fair Lawn, NY, USA)

Se prepara una solución conteniendo:

PEG	800 g
Solución salina fisiológica NaCl 0.85 por ciento	1 000 ml
– Se calienta para disolver bajo agitación.	
– Autoclave 15 libras (121°C) por 30 minutos.	

Procedimiento

a) La sangre debe ser colectada en un matadero higiénico y con control sanitario.

b) Se utilizan tachos de aluminio o plástico esterilizables de boca ancha y 10 litros de capacidad. Para el suero destinado a producción, se agrega 100.000 u.i. de penicilina G potásica y 0.15 g de sulfato de neomicina por litro de sangre.

Cuando se desea un suero para cultivo de células sin antibióticos se omite el uso de penicilina y neomicina, tomándose especiales cuidados de asepsia.

c) Se deja coagular la sangre y se corta el coágulo en trozos pequeños.

d) Se vacían los coágulos cortados en un balde plástico con orificios

contenido dentro de otro balde adonde caerá el suero que se va separado por retracción de los coágulos. Se coloca todo en cámara a 4°C por 12 a 18 horas.

e) Se centrifuga el suero en centrífuga (Alfa Laval, Mod. DPB 202A-11) a 7 000 revoluciones por minuto.

f) Agregar a cada litro de suero 170 ml de solución de PEG.

g) Agitar durante una hora a temperatura ambiente.

h) Dejar sedimentar durante una hora.

i) Sifonar el líquido sobrenadante, clarificar por gasa y congelar a -20°C en frascos de polipropileno de 18 litros de capacidad con 14 litros de suero.

j) Se toma una muestra para recuento bacteriano.

k) Una muestra de un litro es filtrada por filtro Millipore equipado con placas AP25-AW03, separador AP32 y placa GS 0,22 µm para estudios de crecimiento celular.

CONTROLES DE SUERO BOVINO

Todas las partidas de suero bovino, una vez filtradas deben ser sometidas a los siguientes controles:

Bacteriológico

Controles en T.P.B., caldo thioglicolato y Agar Sabouraud. Cultivos a 37°C y temperatura ambiente por 8 días.

Control de crecimiento celular

Una muestra de cada nueva partida de suero es sometida a control de crecimiento celular frente a un suero conocido tomado como referencia.

Materiales

- Muestras estériles de 300 ml del suero en ensayo y 300 ml de un suero de referencia. Si es para monocamada serán sueros tratados por PEG, si es para suspensión serán sueros no tratados por PEG.

- Dos balones de 5,0 litros con barra magnética y 2.760 ml de medio de crecimiento sin suero y dispositivo para transferencia estéril.

- Cultivo de células BHK de monocamada o suspensión.

Procedimiento para suero destinado a células de monocamada

1) Se prepara 1 balón, Balón A adicionado 240 ml de suero tratado con PEG en estudio al medio de cultivo.

2) Se prepara 1 balón, Balón B adicionando 240 ml de suero de referencia tratado con PEG.

3) Se tripsinizan 2 cultivos celulares en botellas Roux, y con ellos se siembra 3 botellas Roux con 30 millones de células por botella, usando medio de cultivo y suero en estudio del Balón A (línea A). En iguales condiciones se siembran 3 botellas con medio de cultivo y suero de referencia del Balón B (línea B).

4) A las 48 horas: se tripsinizan las botellas línea A y se hace recuento celular y se siembran 3 nuevas botellas Roux ajustando la concentración celular a 30 millones de células por botella. Pase 2.

Se tripsinizan las botellas de línea B, y se hace recuento celular y se siembran 3 nuevas botellas Roux ajustando la concentración celular a 30 millones de células por botella. Pase 2.

5) A las 48 horas: se repiten las operaciones 4, sembrándose el Pase 3 de la línea A y el Pase 3 de la línea B.

6) A las 48 horas: se tripsinizan y cuentan las células del Pase 3 de la línea A y el Pase 3 de la línea B.

Interpretaciones. Si el aspecto morfológico macro y microscópico de los cultivos y recuentos celulares fueron similares, se considera aprobado el suero en estudio. Si los cultivos hechos con el suero en estudio fueron inferiores, se rechaza la partida de suero. En caso de duda se puede hacer un cuarto pase con ambas líneas.

PROCEDIMIENTO PARA SUERO DESTINADO A CULTIVOS DE SUSPENSION

1) Se prepara 1 balón A adicionando 240 ml de suero en estudio, sobre 2.760 ml de M.C. sin suero.

2) Se prepara 1 balón B adicionando 240 ml de suero de referencia sobre 2.760 ml de M.C. sin suero.

3) A partir de un mismo cultivo celular; se siembra el Pase 1 de la línea A con medio de cultivo del balón A y una concentración celular de $0.5 \times 10^{6.0}$ cél/ml.

Se siembra el Pase 1 de la línea B con medio de cultivo del balón B y una concentración celular de $0.5 \times 10^{6.0}$ cél/ml.

4) 24 horas después: se hace recuento celular del primer pase de la línea A, y se siembra el segundo pase de la línea A, ajustando la concentración celular a $0.5 \times 10^{6.0}$ cél/ml.

Se hace recuento celular del primer pase de la línea B y se siembra el segundo pase de la línea B, ajustando la concentración celular a $5,0 \times 10^6$ cél/ml.

5) 24 horas después: se repiten las operaciones 4, sembrando el tercer pase de las líneas A y B.

6) 24 horas después: se repiten los recuentos celulares y observación microscópica del tercer pase de las líneas A y B.

Interpretación. Si el aspecto morfológico y el recuento de células fueron similares para las líneas A y B el suero en estudio se considera aprobado.

Si el suero en estudio demostró ser inferior, es eliminado. En caso de duda se puede hacer un cuarto pase con ambas líneas.

12.10. Solución de buffer glicocola (10 litros)

Sobre 7 litros de agua deionizada bajo agitación agregar:

- | | |
|--------------|--------|
| a) NaOH | 505 g |
| b) NaCl | 1040 g |
| c) Glicocola | 1580 g |

Cuando las drogas estén bien disueltas completar el volumen a 10 litros con agua deionizada. El pH será de 9,8 a 10,2.

Distribuir en frascos color oscuro de 1000 ml con 700 ml de buffer y esterilizar en autoclave a 121°C por 30 minutos.

Drogas utilizadas

- NaOH (MERCK Cat. 6498),
- NaCl (MERK Cat. 6404).
- Glicocola – Glycin (MERK Cat. 4201).

12.11. Solución salina P.B.S. M/25 pH 7,6 (10 litros)

Sobre 8 litros de agua deionizada en agitación agregar:

- | | |
|---------------------------------------|-----------|
| a) NaCl | 80 g |
| b) K Cl | 2.0 g |
| c) Na_2HPO_4 Sol. 1 M | 355 ml |
| d) KH_2PO_4 Sol. 1 M | 45 ml |
| e) Agua deionizada – c.s.p. | 10 litros |
- Ajustar a pH 7,6 con HCl o NaOH (solución molar).

Drogas utilizadas

- NaCl (MERK Cat. 6404).
- K Cl (MERK Cat. 4936).
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (MERK Cat. 6579 Sol. molar: 358,14 g en 1000 ml agua.
- KH_2PO_4 (MERK Cat. 4881) Sol. molar: 136,09 g en 1000 ml agua.
 - Filtración por placas AP25 y GS 0,22 μm .
 - Control bacteriológico.

12.12. Medios para control bacteriológico

CALCO TRIPTOSA FOSFATO

- Pesar 29,5 g de polvo de Bacto Tryptose Phosphate Broth y disolver en 1000 ml de agua deionizada o destilada.
- Distribuir en frascos de 120 ml con tapa de rosca, a razón de 70 ml en cada frasco o en tubos de ensayo a razón de 15 ml por tubo.
- Esterilizar en autoclave a 15 libras (121°C) por 30 minutos.
- Incubar a 37°C por 48 horas para control de esterilidad, después guardar a temperatura ambiente.

Medios utilizados

Bacto Tryptose Phosphate Broth (DIFCO-0060-01-6, Difco Laboratories Detroit, Michigan, USA).

MEDIO DE THIOGLICOLATO

- Pesar 40,5 g de polvo Bacto Brewer Thioglycollate Medium de DIFCO y adicionar a 1000 ml de agua deionizada o destilada fría y calentar hasta ebullición para disolver el medio completamente.
- Distribuir en frascos de 120 ml con tapa de rosca a razón de 70 ml por frasco, o en tubos de ensayo de rosca a razón de 15,0 ml por tubo.
- Esterilizar en autoclave a 15 libras (121°C) por minutos.
- Incubar a 37°C por 48 horas para control bacteriológico. Guardar a temperatura ambiente. Si durante la conservación más de un 20 por ciento de la porción superior del medio tomó un color verde debido a oxigenación, el medio debe ser calentado a baño maría para eliminar el oxígeno absorbido.

Medios utilizados

Bacto Brewer Thioglycollate Medium (DIFCO-0236-01, Difco Laboratories Detroit, Michigan, USA).

MEDIO DE AGAR SABOURAUD

- a) Pesar 65 g de polvo Bacto Sabouraud Dextrose AGAR y adicionar a 1000 ml de agua deionizada o destilada fría, y calentar hasta ebullición para disolver el medio completamente.
- b) Distribuir en tubos de ensayo con tapa de rosca a razón de aproximadamente 8 ml por tubo.
- c) Esterilizar en autoclave a 15 libras (121°C) por 15 minutos.
- d) Colocar los tubos en posición inclinada para que el agar solidifique en forma de pico de flauta.
- e) Incubar a 37°C por 48 horas para control bacteriológico y luego conservar en cámara a 4°C.

Medios utilizados

Bacto Sabouraud Dextrose Agar (DIFCO-0109-01, Difco Laboratories Detroit, Michigan, USA).

12.13. Solución de eosina 0,2 por ciento

- Solución madre:

Eosina en polvo	2,0 g
Agua deionizada	100 ml
- Se disuelve y se filtra por placa AP25 GS 0,22 μ m de Millipore.
- Se distribuye en frascos estériles de 50 ml.
- Control bacteriológico.
- Antes de usar se diluye la solución madre a razón de:

Solución madre de eosina	3,0 ml
P.B.S. estéril	27 ml

Materiales usados

Eosina (MERK Cat. 1344).
P.B.S. (ver 12.11).

12.14. Filtración clarificante y esterilizante

Filtración esterilizante es aquella que retiene todas las bacterias y otros microorganismos que se encuentran en suspensión en un medio líquido o gaseoso determinado, como medio de cultivo, suspensión vírica, etcétera.

Esa remoción es hecha por filtros delicados, debidamente esterilizados antes de su uso y que se dividen en filtros de profundidad y filtros de superficie.

Para aliviar el trabajo de esos filtros, los medios pueden ser tratados previamente por varios procedimientos que van de la simple decantación, a la centrifugación y la filtración clarificante.

La filtración clarificante es hecha con filtros de profundidad, cuya esterilización no es imprescindible, y que pueden estar montados en soportes independientes o en los mismos aparatos en que van las placas esterilizantes.

FILTROS DE PROFUNDIDAD – TIPO SEITZ

Los filtros de profundidad retienen las partículas en suspensión por acción de tamiz y por adsorción, tanto en su superficie como en su interior. Por eso son capaces de retener partículas menores que el tamaño de sus poros (Figura 10).

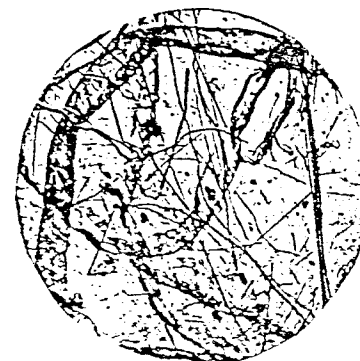


FIGURA 10
Material filtrante SEITZ
(100 aumentos)

Aunque hay varias marcas de filtros de profundidad, nos referiremos a las placas SEITZ elaboradas con celulosa y amianto. Hay varios tipos de placas SEITZ de los cuales las dos más usadas en laboratorios de producción de vacunas son:

- Las placas clarificantes de grado K clasificadas como, KO, K2, K3, K5, K7, K10 por grados crecientes de retención.
- Las placas esterilizantes que también por grados crecientes de retención son: EK, EKS, EKS1 y EKS2.

Los filtros usados en el laboratorio del CPFA son los modelos Seitz Pilot, tamaño 20 x 20 cm (Figura 11), y los filtros multiplacas ORION OF40, 40 x 40 cm (Figura 12).

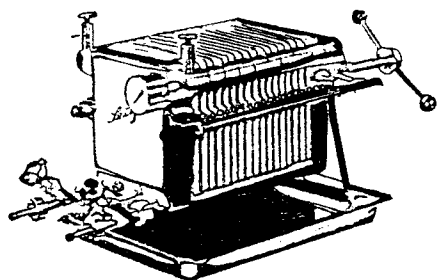


FIGURA 11
Filtro clarificante
y desgerminante
PILOT Z, tam. 20

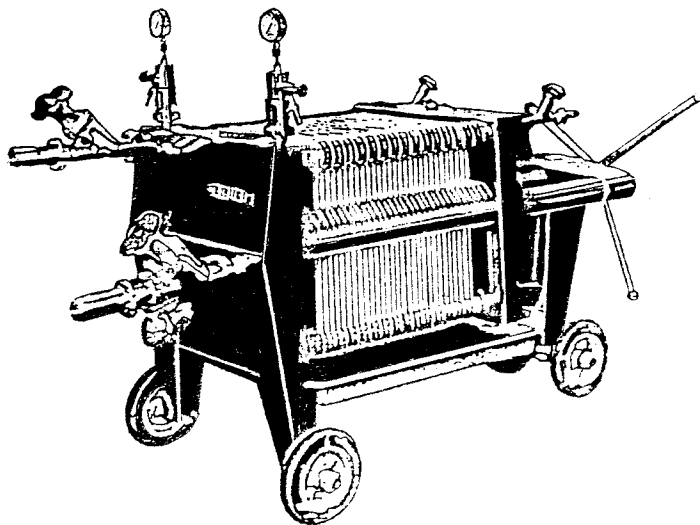


FIGURA 12
Filtro
ORION OF40

Las cámaras metálicas colocadas en posición vertical (Figura 13) se dividen en distribuidoras, que distribuyen el líquido a filtrar impulsándolo a través de las placas filtrantes y las cámaras colectoras que reciben el líquido ya filtrado. Las placas filtrantes quedan colocadas entre las cámaras metálicas y distribuidoras y colectoras (Figura 14). El medio pasa así a través de una sola placa filtrante.

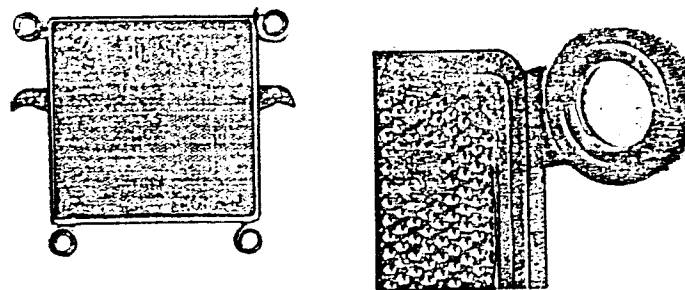


FIGURA 13
Cámara de acero inoxidable

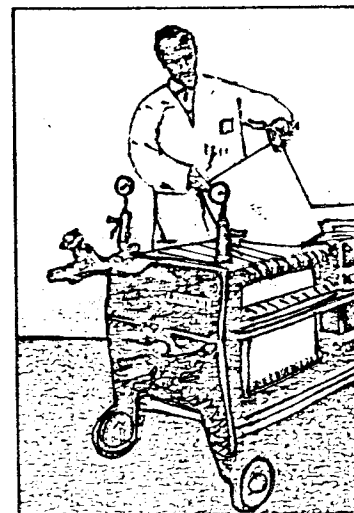


FIGURA 14
Colocación de las placas en posición vertical

Hay una cámara metálica especial, llamada inversora (Figura 15), que colocada en el medio del filtro, o en la posición más adecuada invierte el flujo del líquido y así permite hacer una filtración doble. En la primera parte del filtro se colocan placas clarificantes y por medio de la placa inversora la segunda parte del filtro actuará como una unidad independiente. En este sistema el medio pasará a través de 2 placas, siendo la primera clarificante y la segunda esterilizante.

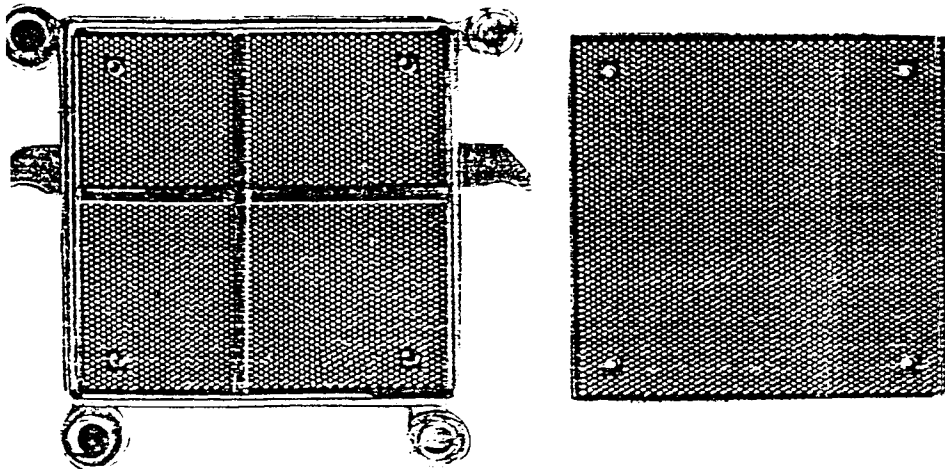


FIGURA 15
Filtración doble. Placa inversora

Las Figuras 16 y 17 ilustran el flujo del líquido en una filtración simple y doble.

La Figura 18 ilustra los distintos elementos de un filtro montado.

Montaje del filtro SEITZ

Para montar el filtro Seitz se colocan todas las cámaras metálicas sobre el soporte del filtro dejándolas separadas entre sí.

a) *Filtración simple.* No se usa cámara inversora. A partir del extremo del filtro por donde se hace la admisión del líquido, se comienza a colocar las placas sean estas clarificantes o esterilizantes de manera que su lado rugoso enfrente las cámaras metálicas de distribución, y su lado liso, enfrente a las cámaras colectoras, que enviarán el medio filtrado hacia la salida.

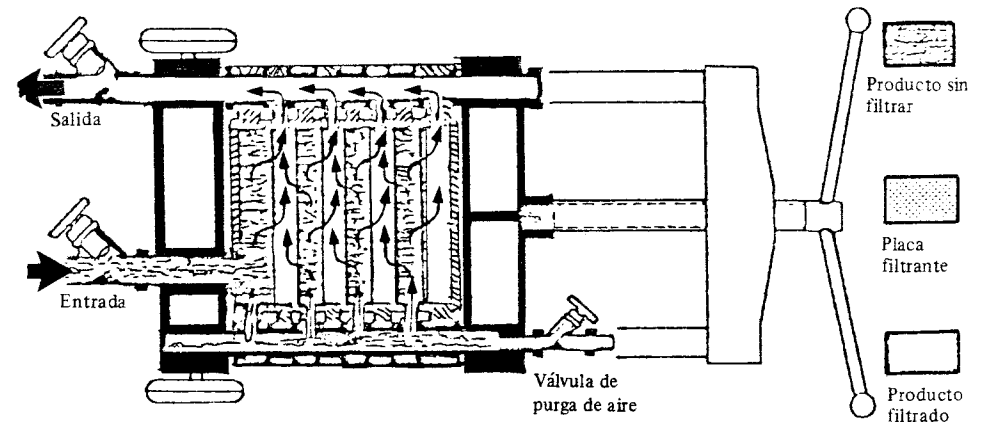


FIGURA 16
Filtración simple

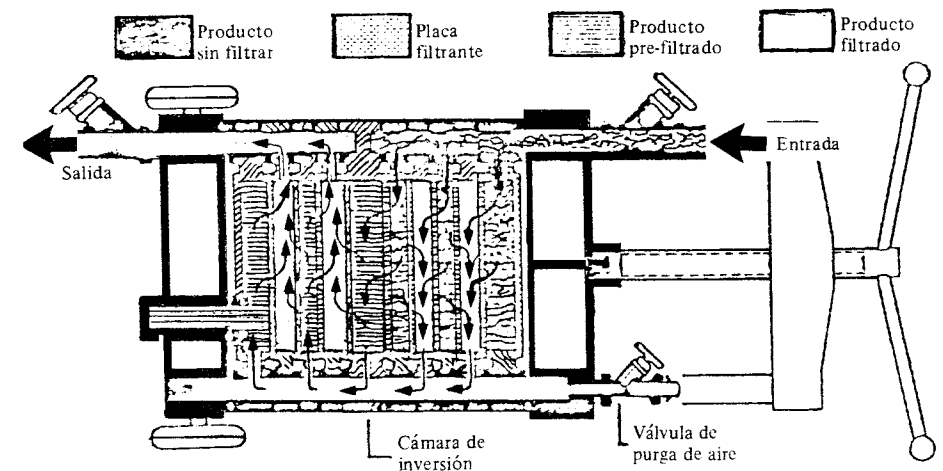
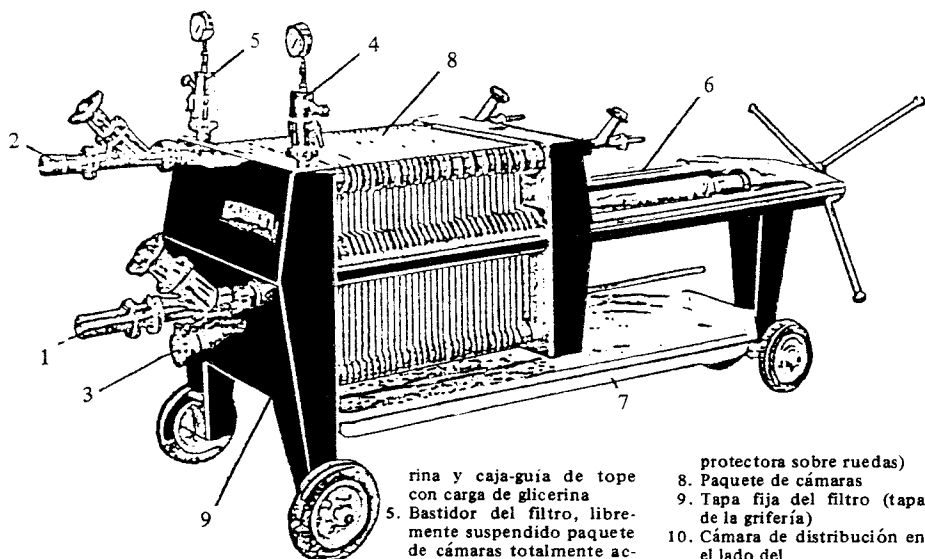


FIGURA 17
Filtración doble

Se cuadran bien las placas y se aprieta el eje central, girando el volante en el sentido de las agujas del reloj.

b) *Filtración doble.* Se comienza colocando las placas clarificantes o de menor grado de filtración en la forma descrita en (a) calculando el



1. Entrada al filtro (válvula de asiento oblicuo)
2. Salida del filtro (válvula de asiento oblicuo)
3. Manguito de conexión para casos especiales (cerrado con tapón roscado)
4. Mirilla de salida con válvulas de purga de aire y de prueba manómetro de diafragma con carga de glicerina

5. Bastidor del filtro, libremente suspendido paquete de cámaras totalmente accesible desde su parte inferior.
7. Bandeja colectora de material sintético fácil de extraer (para filtración con Kreselgur; bandeja colectora de acero, con laca

- protectora sobre ruedas)
8. Paquete de cámaras
9. Tapa fija del filtro (tapa de la grifería)
10. Cámara de distribución en el lado del
11. Tapa móvil del filtro
12. Cámara de distribución en el lado del
13. Válvulas de purga de aire y de aire comprimido
14. Válvulas de purga de aire de vapor y de toma de pruebas
15. Manguito para la evacuación de residuos
16. Manguito para la evacuación de residuos (al que se acopla, al utilizar una cámara de inversión, la grifería de entrada)
17. Husillo central de apriete
18. Ruedas dirigibles

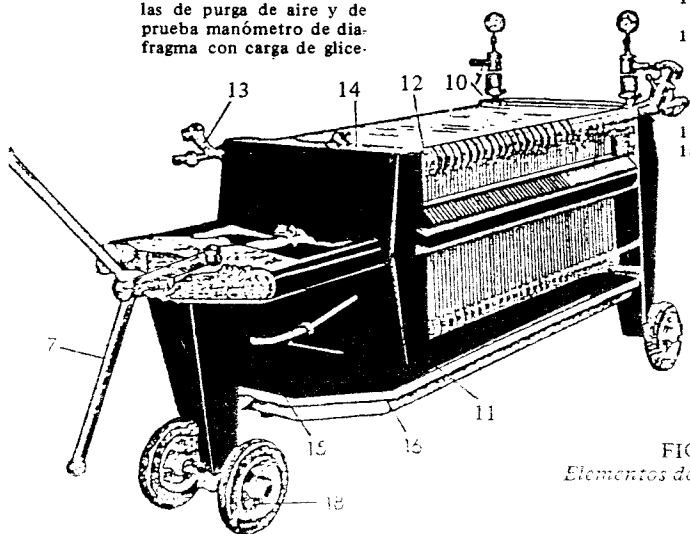


FIGURA 18
Elementos de un filtro montado

número de placas que será necesario, luego se coloca la cámara metálica inversora y después las placas filtrantes de grado más fino, en general esterilizantes. Para dar un ejemplo, si se desea filtrar 500 litros de M.C. con 8,0 por ciento de suero bovino se usarán 20 placas K2 y 40 EKS1. Si el suero bovino fue previamente filtrado por placas clarificantes K5 después de su descongelación, el rendimiento de las placas aumentará sensiblemente.

Para filtrar 500 litros de M.V. sin suero, bastará con 4 placas K2 y 12 placas EKS1.

Cuando se filtran volúmenes mayores, arriba de 1000 litros, es preferible usar 2 filtros independientes, uno para clarificar y otro para esterilizar, pues debido al mayor número de placas el ajuste se hace más difícil con la cámara inversora.

Esterilización del filtro SEITZ

Se ajustan las placas y se conecta la entrada de admisión a la línea de vapor, dejando al comienzo todas las válvulas abiertas. Luego se van cerrando todas las válvulas, menos la salida principal que permitirá regular la presión y se da una presión de vapor de 15 libras durante 1 hora, purgando el filtro por los drenos inferiores. La presión en el manómetro de entrada y salida será casi la misma.

Una vez terminada la esterilización se aprietan bien todas las válvulas, menos la válvula de entrada que deberá quedar abierta para compensar el vacío al producirse el enfriamiento. En las salidas destinadas a purga de aire, es conveniente colocar filtros de algodón no absorbente.

Se aprietan nuevamente las placas mediante el volante central. Si se desea enfriar rápidamente el filtro, se puede acelerar filtrando agua destilada fría de preferencia estéril, en el mismo sentido de la filtración.

Filtración

Una vez que la temperatura del filtro descendió a un grado compatible con el líquido a filtrar, se conecta la entrada del filtro al tanque de medio y la salida al tanque receptor y se comienza la filtración dando una presión de 10 libras.

Debido a que el filtro tiene agua en su interior, se debe dejar salir el líquido por todas las válvulas de alivio, hasta que comience a salir el medio, lo que es reconocible por su color. Sólo en ese momento se abrirá la válvula de salida de producto estéril conectada al tanque receptor.

Se debe mantener estable la presión de filtración durante toda la duración de la misma

Limpieza y lavado de filtro

Una vez que acabó la filtración, el filtro debe ser desarmado y lavado inmediatamente.

Se afloja el eje central, se separan las cámaras metálicas, y se eliminan las placas filtrantes. Luego se retiran las cámaras metálicas que serán lavadas individualmente con agua y un jabón neutro, cepillándolas suavemente y haciendo correr bastante agua por todos los orificios de las placas y filtro, de forma que no queden detritus ni restos de placas filtrantes.

Se secan las cámaras metálicas y se colocan en el filtro en posición vertical. Cuando los filtros son de un tamaño que lo permita, se pueden colocar a secar en la estufa a 37°C.

FILTROS DE SUPERFICIE O DE MEMBRANA. TIPO MILLIPORE

Los filtros de superficie o de "membrana" actúan solamente por acción de tamiz y para aumentar su rendimiento, los propios fabricantes proporcionan filtros clarificantes de profundidad.

En este caso también, aunque hay varias marcas de filtros de membrana, nos referiremos a la marca "Millipore", la más conocida, y que fue usada durante los Cursos de Producción y Control de Vacunas Anti-aftosa con Adyuvante Oleoso. Las Figuras 19 y 20 esquematizan ambos tipos de placa.

Filtros clarificantes de profundidad para prefiltración de filtros de membrana

Las placas clarificantes de profundidad no tienen una estructura que presente poros uniformes en un material continuo, sino que son fibras comprimidas con una resina que las retiene unidas evitando que se desprendan y sigan con la corriente de líquido.

Al igual que las placas Seitz estas placas retienen partículas no sólo en su superficie sino también en su interior, y poseen gran poder de retención.

Los tipos más usados son elaborados a partir de fibras de vidrio de borosilicato unidas con una resina acrílica. Son consideradas placas sólo clarificantes y por orden creciente de retención se denominan AP25, AP20 y AP15.

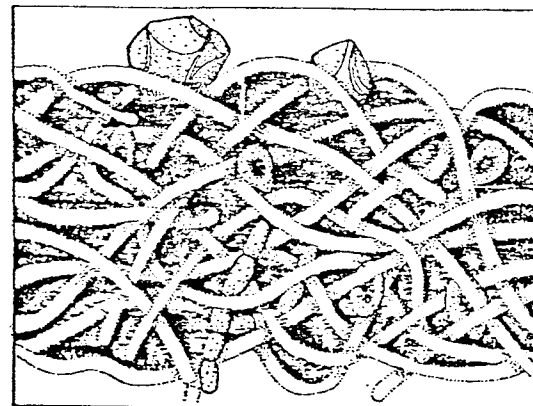


FIGURA 19
Prefiltro de profundidad. Retiene partículas en la superficie y en su interior

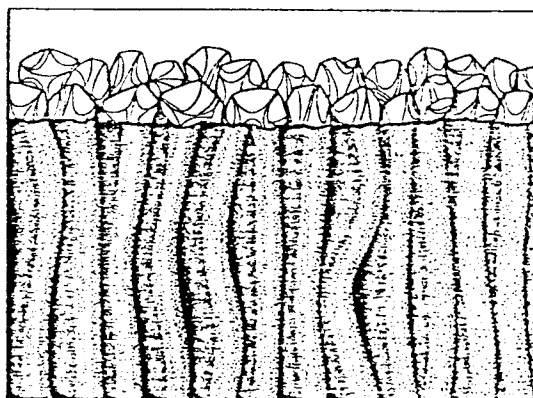


FIGURA 20
Filtro de superficie (de membrana). Retiene partículas sólo en su superficie

Filtros clarificantes de superficie

Hay otro tipo de placa clarificante, que no es del tipo de profundidad, sino que es un material polimérico de celulosa sobre un soporte también de celulosa. El material presenta micro poros parecidos a los filtros esterilizantes, pero a nivel clarificante.

Por orden creciente de retención se denominan tipo AW19, AW06 y AW03.

Filtros esterilizantes de superficie

Los filtros de superficie o de membranas son estructuras poliméricas muy finas, con poros sumamente uniformes. Son hechos con diferentes

materiales y con una gran variedad de tamaños de poros.

Dentro de las membranas más usadas de acetato y nitrato de celulosa la compañía Millipore ofrece los tipos:

Tipos	Media tamaño poros
SC	8,0 μm
SM	5,0 μm
SS	3,0 μm
RA	1,2 μm
AA	0,30 μm
DA	0,65 μm
HA	0,45 μm
PH	0,30 μm
GS	0,22 μm
VC	0,10 μm
VM	0,05 μm
VS	0,025 μm

Soportes para filtros y prefiltros Millipore

Las membranas esterilizantes son muy frágiles y deben ser manejadas con mucho cuidado. Los soportes cuentan con todos los elementos para darles protección y para permitir su esterilización. La Figura 21 muestra todas las piezas del soporte.

Montaje del filtro Millipore

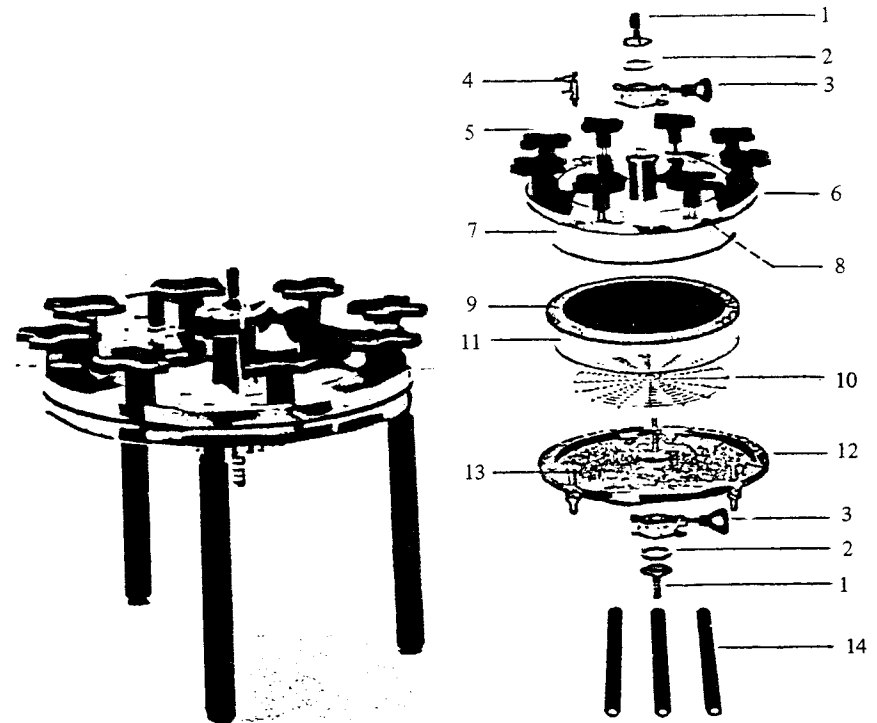
El montaje y manejo de las placas y filtros Millipore es una operación que debe ser hecha con todo cuidado.

En este ejemplo vamos a suponer que prepararemos el filtro para filtrar 80 litros de M.C. con 8,0 por ciento de suero tratado por PEG. Si el suero no ha sido tratado por PEG es preferible la filtración Seitz.

El filtro se debe colocar en una mesa con toda la parte inferior montada, partes 9 a 14 y 1 a 3 inferiores (Figura 21).

Se coloca la placa esterilizante GS 0,22 μm con su parte más pulida hacia abajo.

Se coloca encima un separador de dacrón AP32. Este separador será necesario siempre que se coloquen 2 membranas juntas. No es necesario entre filtro de profundidad y membrana.



1. Adaptador; 2. Junta silicona; 3. Cierre metálico para ajuste; 4. Purga de aire; 5. Llaves de ajuste; 6. Placa superior de admisión; 7. Junta de teflón; 8. Deflector de entrada de líquido; 9. Soporte de las placas recubierto de teflón; 10. Soporte inferior; 11. Junta de teflón; 12. Placa inferior de salida; 13. Soportes para colocación de los elementos; 14. Patas del filtro.

FIGURA 21

Soporte de filtro esterilizante 293 mm, acero inoxidable Tipo 316, y piezas del soporte

Se coloca una membrana clarificante AW03.

Se coloca encima una placa clarificante AP25.

Se coloca encima una tela metálica (no aparece en la Figura 21) destinada a proteger las membranas contra una eventual contra presión.

Se coloca la tapa superior que ya tiene el deflector 8 y se ajustan las llaves de ajuste dos a dos, siempre por diámetros opuestos. El ajuste no debe ser demasiado fuerte.

En la salida inferior se coloca un tubo de silicona adecuado para las conexiones estériles durante la filtración.

Las dos aberturas del filtro superior e inferior (tubo silicona) se tapan con papel Kraft y se ata con cordel.

Esterilización del filtro

El filtro preparado se coloca en autoclave, teniendo cuidado de dejar abierta la válvula 4.

Se esteriliza a 15 libras (121°C) durante 1 hora.

Se deja enfriar lentamente. Después que el filtro está a temperatura ambiente se cierra la válvula 4.

Filtración

a) Se conecta la abertura superior del filtro al tanque en el cual está contenido el medio a filtrar por medio de una manguera de conexión que debe ser resistente a la presión. La manguera se conecta al adaptador 1. El cierre metálico 3, tipo "tri-clover" es muy adecuado pues es muy fuerte y permite un ajuste correcto.

b) Se conecta el tubo de salida al o a los recipientes estériles que recibirán el medio filtrado.

c) Se aprietan en forma uniforme y por pares opuestos las llaves de ajuste.

d) Se abre la válvula 4 para purgar el aire y se comienza a dar presión al tanque de medio. Cuando comienza a salir el medio por la válvula 4, se cierra y comienza la filtración.

e) Se eleva la presión a 1 kg/cm² que se mantiene constante durante toda la filtración.

f) Cuando pasó todo el líquido, se desconecta el tubo de salida del filtro de los recipientes receptores.

g) *Prueba de burbuja.* Se introduce la extremidad del tubo de silicona de salida en un recipiente con agua y se sube la presión a 3,0 kg/cm². No deben pasar burbujas de aire. Las placas GS estando mojadas tienen una resistencia hasta 3,87 kg/cm², o sea 55 libras por pulgada cuadrada, antes de dejar pasar el aire. Si al subir la presión comienza a burbujear aire dentro del agua, indica que la membrana no está intacta y habrá que repetir la filtración.

Limpieza y lavado de filtro

Una vez que el filtro fue usado, se desarma. Se observan las placas usadas y luego se eliminan.

El filtro y todas sus partes son lavadas con jabón suave y mucha agua.

Si se va a usar enseguida, se seca con un paño y si no se va a usar

enseguida se deja secar a temperatura ambiente.

12.15 Colorantes de Gram

Hay varias fórmulas de colorantes de Gram, que se encuentran en libros de técnicas e laboratorio. Se detalla una de ellas:

1) Cristal violeta de Hucker, modificado

Solución A:

– Cristal violeta (certificado)	2,0 g
– Etanol 95%	20 ml

Solución B:

– Oxalato de amonía (NH ₄) ₂ C ₂ O ₄ H ₂ O	0,8 g
– Agua destilada	80 ml

Se mezclan las soluciones A y B, se dejan sedimentar por 24 horas, se clarifica por filtro de papel, y se guarda en frasco oscuro.

2) Solución yodo-yodurada de Gram

Yodo	1,0 g
Yoduro de potasio	2,0 g
Agua destilada	300 ml

Se disuelve primero el KI y luego el I y se guarda en frasco oscuro.

3) Etanol 95%.

4) Solución de safranina:

Solución madre:	
– Safranina O – (certificada)	2,5 g
– Etanol 95% – c.s.p.	100 ml

Solución de trabajo:

– Solución madre	10 ml
– Agua destilada	90 ml

Guardar en frasco color oscuro.

13. UNIDAD DE MANTENIMIENTO DE CELULAS – BANCO DE CELULAS

13.1 Equipo

– Congelador –80°C, Modelo REVCO 1280-C-0 (Reveco Inc., Columbia S.C.).

– Biostato de Nitrógeno líquido –196°C, Modelo LINDE LR31 (Unión Carbide, U.S.).

- Cabina de flujo laminar, Modelo EG62562 (The Baker Co. Inc., Sandford, Maine, U.S.).
- Cuarto estufa a 37°C, con estantería.
- Cámara a 4°C.
- Mesa con 6 puntos de agitación magnética (Calderaria e Mecanica INOX) (ver Figura 22).
- Aparato roller para 9 botellas.
- Microscopio de óptica directa Standar K, (Carlo Zeiss).
- Colorantes para microscopía, aceite de inmersión.
- Cámara cuenta glóbulos de Neubauer, y cubre objetos para la misma.
- Microscopio de óptica invertida Standard UPL (Carl Zeiss).
- Centrífuga refrigerada International Mod. PR6.
- Agitadores magnéticos tipo Mag Mix (CGA-Precision Scientific, U.S.) (Figura 22).
- Barras magnéticas de 1 1/2" x 3/8", 1 3/8" x 1/2", 1 3/8" x 5/8", 2,5" x 5/8", etcétera.
- Frascos de fondo plano de 1,0; 2,0; 5,0; 10 y 20 litros con dispositivos para conexiones estériles (ver Figura 9).
- Botella de Roux de 1,0 litros y frascos "prescription" de 160 ml (ver Figura 23).
- Frascos Falcon estériles de 250 y 500 ml.
- Pipetas graduadas de 1, 2, 5, 10 y 20 ml.
- Propipetas para succión y transferencia de líquidos.
- Pipetas Pasteur estériles con tapón de algodón.
- Jeringas automáticas de 2 y 5 ml.
- Jeringas automáticas montadas en frascos para distribución de cultivos (ver Figura 25).
- Bombas de vacío/presión (Millipore Serie núm. 0674) (Figura 25).
- Peras Richardson.
- Máscara para proteger la cara, con pantalla de policarbonato (SYBRON, Nalge, U.S.).

13.2 Congelación de células

En esta unidad se mantiene el stock de células congeladas en ampollas en nitrógeno líquido (ver Figura 26) y también en frascos con volúmenes mayores en congeladora REVCO a -80°C (ver Figura 27). Para mantener las células en pases bajos se congelan frecuentemente ampollas de bajo pase y se cultivan hasta un máximo de 30 pasajes. El

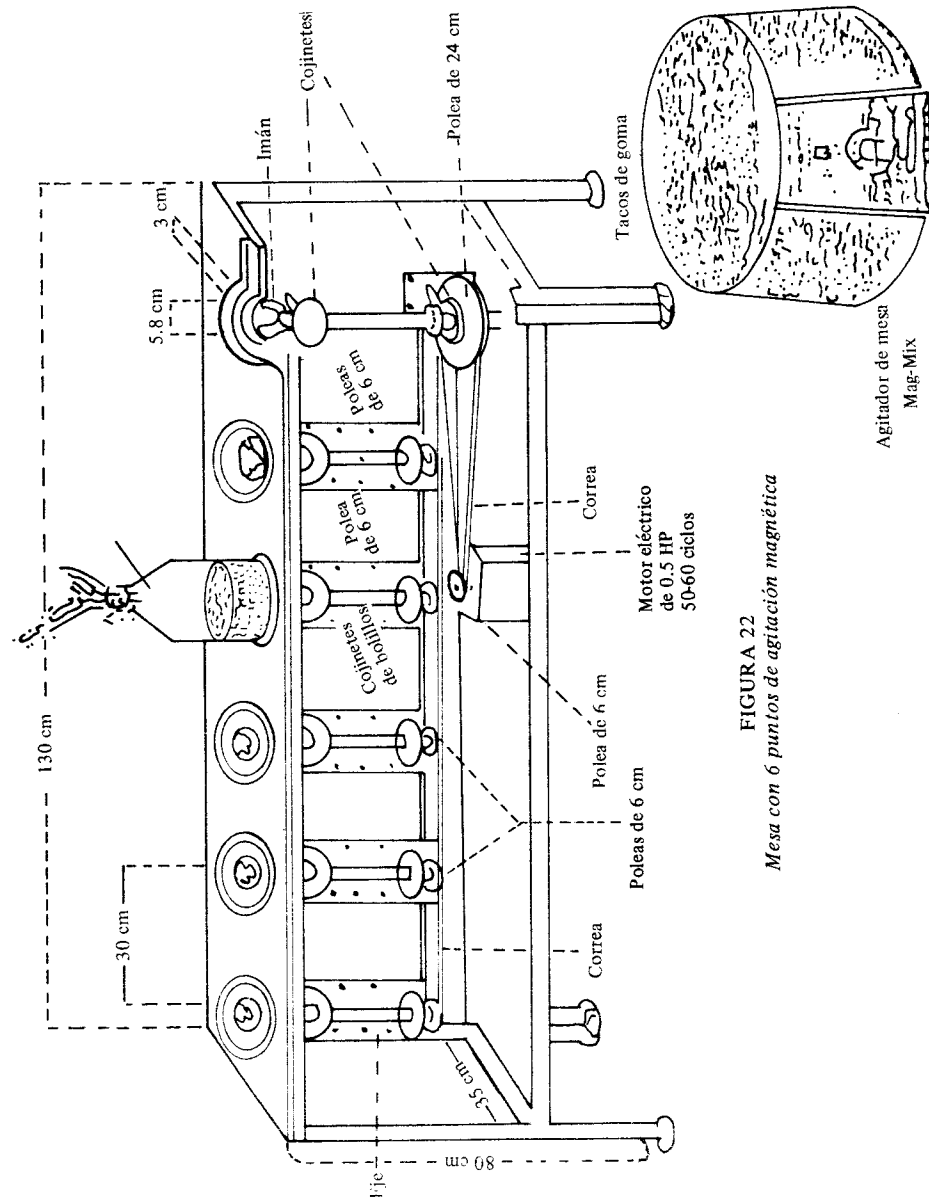


FIGURA 22
Mesa con 6 puntos de agitación magnética

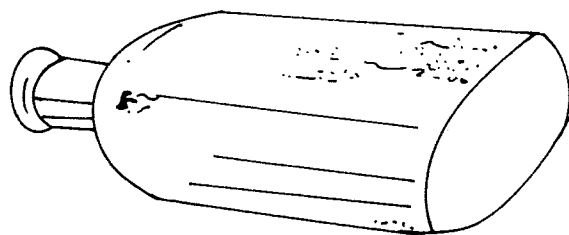


FIGURA 24
Botella Roux 1 000 ml.
Tapón núm. 5 1/2

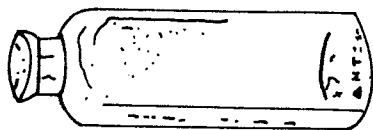


FIGURA 23
Frasco "Prescription" o "Milk dilution"
160 ml. Tapón núm. 3

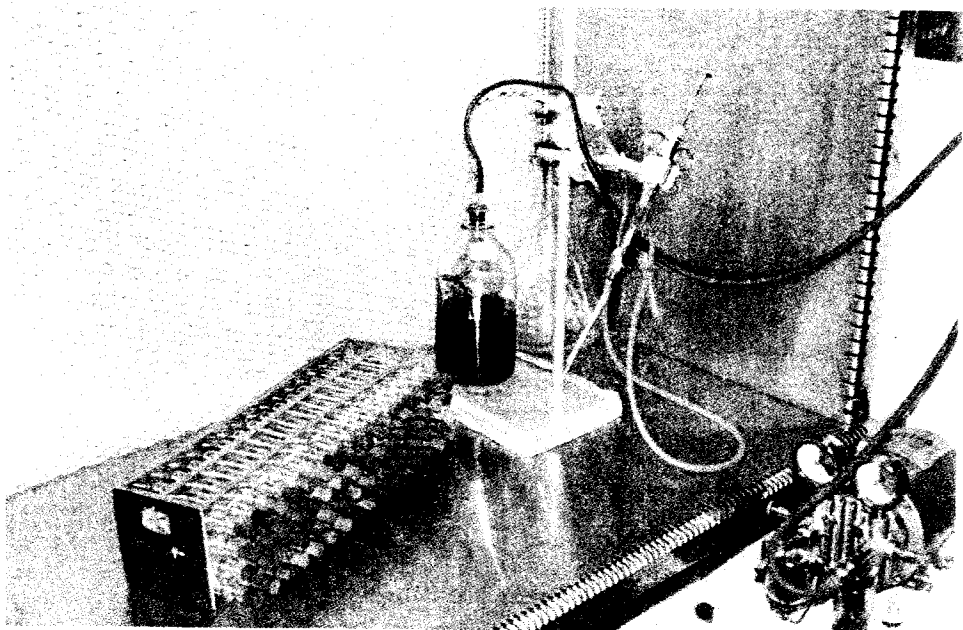


FIGURA 25
Jeringa automática montada en frascos de cultivo. Bomba de vacío y presión
MILLIPORE. Tubos para titulaciones.

frío disminuye el metabolismo celular sin provocar la muerte de las células. Las células debidamente congeladas conservan sus propiedades biológicas intactas por muchos años pudiendo mantener grandes reservas de células por largos períodos.

La glicerina es un excelente protector de las células en las temperaturas bajas, por eso se usa a razón de 10 por ciento en el medio de congelación. El enfriamiento debe ser lento para permitir la difusión de la glicerina a través de la membrana celular manteniendo el equilibrio osmótico. El congelamiento lento, con descenso de temperatura a razón de 1,0°C por minuto es indicado y fácil de obtener con el uso de una caja térmica de poliestireno tapada dentro del congelador de -80°C.

Un efecto similar al de la glicerina se obtiene con dimetil-sulfóxido (DMSO).

CONGELACION DE CELULAS BHK₂₁ DE MONOCAMADA

Materiales

- Cultivos de células BHK₂₁ de monocamada que se desea congelar.
- 200 ml solución de tripsina (12.8).
- 500 ml de medio de congelación (12.6).
- Ampollas de 1,0 ml.
- Frascos de vidrio de 50 ml.
- Opérculos de goma y capacete de aluminio para los mismos.
- Pipetas graduadas de 10 ml y pipetas Pasteur estériles.
- Pipeta automática de 2,0 ml conectada a frasco de cultivo de 500 o 1000 ml con barra magnética.
- Soplete de oxígeno para cerrar ampollas.
- Cajas térmicas de poliestireno.
- Medio de control bacteriológico.

Procedimiento

- Sembrar células que se desea congelar en botellas de Roux. Seleccionar cultivos jóvenes semi confluentes con buen aspecto morfológico.
- Tripsinizar (ver 13.5.1).
- Resuspender las células en M.C. y centrifugar a 600 rpm por 10 minutos.
- Eliminar líquido sobrenadante y resuspender en medio de congelación hasta una concentración de $5 \times 10^{6.0}$ cél./ml. Hacer control bacteriológico en medio T.P.B. De aquí se pueden tomar 2 opciones:

congelar a -80°C en congelador eléctrico o congelar a -196°C en N^2 líquido:

1) *Congelación a -80°C en congelador eléctrico*

– Distribuir por presión positiva en frascos tipo Penicilina de 50 ml conteniendo 30 ml de cultivo celular. Tapar los frascos con opérculos de goma y capacetes de aluminio.

– Colocar los frascos en cajas de poliestireno, tapar las cajas y colocarlas dentro de un congelador a -80°C . El aislamiento de la caja hará que la congelación sea lenta. Las células permanecerán inalteradas por más de 2 años.

2) *Congelación a -196°C en congelador de N^2 líquido*

– Distribuir las células con jeringa automática montada en frasco de cultivo de 500 ml en ampollas de 1,0 ml y cerrarlas con soplete.

– Colocarlas en caja de poliestireno en congelador a -80°C .

– Al día siguiente retirarlas e inmediatamente colocarlas en biostato de N^2 líquido a -196°C . Las células quedarán inalteradas por más de 10 años.

e) Se debe llevar un registro que permita identificar cualquier cultivo congelado, sabiendo su ubicación exacta en el biostato de -196°C o en el congelador de -80°C .

f) Es buena norma tomar muestra de las células, 24-48 horas después de congeladas (-80°C o -196°C) y verificar su viabilidad por observación microscópica y cultivo celular.

CONGELACION DE CELULAS BHK₂₁ DE SUSPENSION

Materiales

- a) Cultivos de células BHK₂₁ de suspensión que se desea congelar.
- b) Frascos de 5,0 litros de fondo plano con barra magnética, esterilizados para cultivos.
- c) 500 ml de medio de congelación.
- d) Ampollas de 1,0 ml.
- e) Frascos de vidrio de 50 ml.
- f) Opérculos de goma y capacetes de aluminio para los mismos.
- g) Pipetas graduadas de 10 ml y pipetas Pasteur estériles.
- h) Pipeta automática de 2,0 ml conectada a frasco cultivo de 500 o 1 000 ml con barra magnética.
- i) Soplete de oxígeno para cerrar ampollas.
- j) Cajas térmicas de poliestireno.
- k) Medio de control bacteriológico.

Procedimiento

a) Sembrar células BHK₂₁ de suspensión de balón de 5,0 litros con 2,0 litros de cultivo celular a concentración de $0,5 \times 10^{6,0}$ cél/ml.

b) Antes de las 24 horas, cuando el cultivo tenga una concentración de $1,0$ a $1,5 \times 10^{6,0}$ y pH 7,2 a 7,3 colocar el cultivo en cámara a 4°C para sedimentación. Si el pH fuera inferior a 7,2 se puede corregir con buffer glicocola estéril.

Antes de enfriar hacer control bacteriológico.

c) Al día siguiente, eliminar por presión positiva el líquido sobrenadante. Agregar asépticamente medio de congelación para obtener una concentración celular de $5,0 \times 10^{6,0}$ cél/ml.

d) Hacer control bacteriológico en medio T.P.B. De aquí se pueden tomar 2 opciones: congelar a -80°C en congelador eléctrico, y congelar a -196°C en N^2 líquido:

1) *Congelación a -80°C en congelador eléctrico*

– Distribuir por presión positiva en frascos tipo Penicilina de 50 ml conteniendo 30 ml de cultivo celular. Tapar los frascos con opérculos de goma y capacetes de aluminio.

– Colocar los frascos en cajas de poliestireno, tapar las cajas y colocarlas dentro de un congelador a -80°C . El aislamiento de la caja hará que la congelación sea lenta. Las células permanecerán inalteradas por más de 2 años.

2) *Congelación a -196°C en N^2 líquido*

– Distribuir con jeringa automática montada en frasco de cultivo de 500 ml en ampollas de 1,0 ml y cerrarlas con soplete.

– Colocarlas en caja de poliestireno en congelador a -80°C .

– Al día siguiente retirarlas e inmediatamente colocarlas en biostato de N^2 líquido a -196°C . Las células quedarán inalteradas por más de 10 años.

e) Se debe llevar un registro que permita identificar cualquier cultivo congelado, sabiendo su ubicación exacta en el biostato de -196°C o en el congelador de -80°C .

f) Después de congelar durante 24 o 48 horas, tomar una muestra y verificar la viabilidad celular por observación microscópica directa y por cultivo celular.



FIGURA 26
Biostato LINDE.
Nitrógeno líquido

13.3 Descongelación de células

CELULAS BHK₂₁ DE MONOCAMADA

A partir de la ampolla congelada en N² líquido

Materiales

- Máscara para proteger la cara.
- Beaker con agua a 37°C.
- Lima para cortar ampolla.

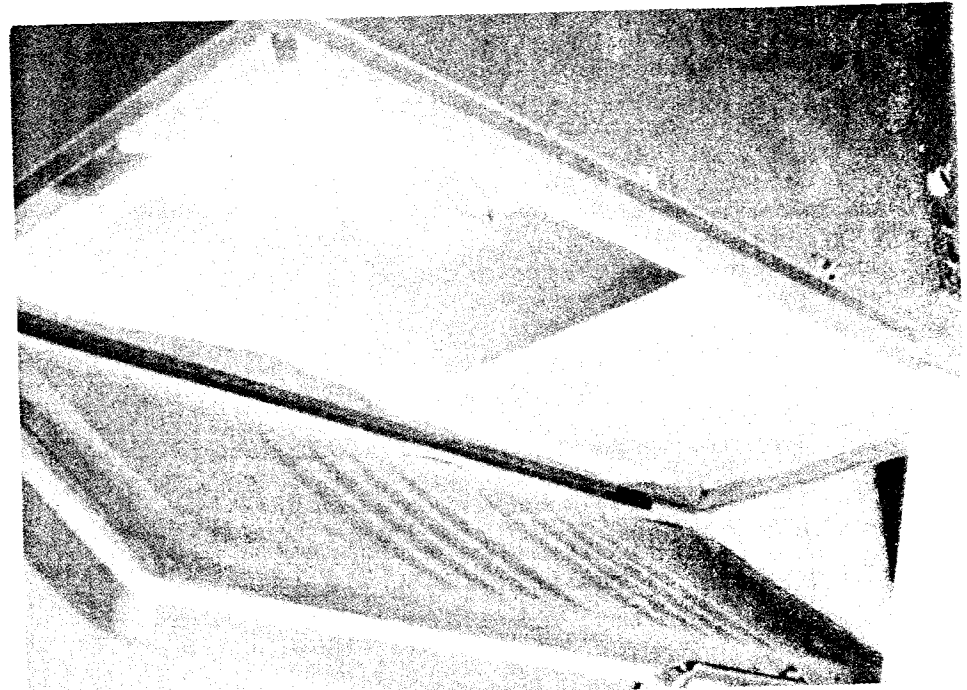


FIGURA 27
Congelador eléctrico "REVCO" a -80°C

- Pipetas Pasteur estériles.
- Frasco "prescription" de 160 ml.
- Medio de crecimiento celular M.C.
- Botellas Roux estériles.

Procedimiento

- Observar en el registro la ubicación de las células que se quiere descongelar (núm. biostato, núm. canister) (ver Figura 26).
- Colocarse la máscara y llevar un beaker con agua a 37°C al lado del biostato.
- Retirar 1 ampolla y sumergirla inmediatamente en agua a 37°C (si se demora y se deja la ampolla a temperatura ambiente puede explotar, con peligro para el operador).
- En cabina de flujo laminar, retirar una ampolla que va a ser des-

congelado, pasar un algodón con alcohol por afuera de la ampolla, cortar el extremo de la misma con ayuda de una lima o una pinza.

e) Con pipeta Pasteur estéril, usando una propipeta, succionar el cultivo celular y sembrar un frasco "prescription", adicionando 10 ml de M.C. Incubar a 37°C.

f) Con las células que quedan en la pipeta Pasteur, se puede hacer una observación microscópica, que dará idea de la viabilidad celular.

g) Después de algunas horas, cuando las células en buenas condiciones se hayan adherido a la pared del frasco es conveniente cambiar el medio de cultivo, para así eliminar las células muertas o en malas condiciones.

h) Cultivar por 48 horas.

i) Cuando el cultivo esté confluyente, tripsinizar y sembrar una botella Roux.

j) 48 horas después tripsinizar y sembrar 3 botellas Roux.

A partir del frasco congelado a -80°C en congelador REVCO (ver Figura 27)

Materiales

- a) Baño de agua a 37°C.
- b) Botellas Roux estériles.
- c) Medio de crecimiento.

Procedimiento

a) Retirar 1 frasco de 50 ml con 30 ml de cultivo celular.
b) Sumergirlo en baño de agua a 37°C.
c) Cuando el cultivo esté descongelado, tomar el frasco, limpiarlo por fuera con algodón empapado en alcohol y destapararlo en la cabina de flujo laminar.

d) Distribuir el contenido en 2 botellas Roux y agregar 100 ml de M.C. a cada una. Incubar a 37°C.

e) Con las células que quedan en el frasco hacer observación microscópica.

f) Algunas horas después, cuando las células en buenas condiciones estén adheridas a la pared de la botella es conveniente cambiar el medio de cultivo para así eliminar las células muertas o en malas condiciones.

g) 48 horas después el cultivo debe estar confluyente, tripsinizar y sembrar 3 botellas nuevas a partir de cada botella Roux.

CONGELACION DE CELULAS BHK₂₁ DE SUSPENSION

A partir de ampolla congelada en N² líquido

Materiales

- a) Máscara para proteger la cara.
- b) Beaker con agua a 37°C.
- c) Lima para cortar ampolla.
- d) Pipetas Pasteur estériles.
- e) Frasco "prescription" de 160 ml.
- f) Medio de crecimiento celular M.C.
- g) Botellas Roux estériles.
- h) Frasco de 1000 ml con barra magnética y dispositivo para transferencias estériles.

Procedimiento

a) Observar en el registro la ubicación de las células que se quiere descongelar (núm. biostato, núm. canister) (Figura 26).
b) Colocarse la máscara y llevar un beaker con agua a 37°C al lado del biostato.

c) Retirar 1 ampolla y sumergirla inmediatamente en agua a 37°C.
d) En cabina de flujo laminar, retirar una ampolla que ya haya descongelado, pasar algodón con alcohol por afuera de la ampolla, cortar un extremo de la misma con ayuda de una lima o una pinza.

e) Con pipeta Pasteur estéril usando una propipeta succionar el cultivo celular y sembrar un frasco "prescription", adicionarle 10 ml de M.C. Incubar a 37°C.

f) Con las células que quedan en la pipeta Pasteur, se puede hacer una observación microscópica, que dará idea de la viabilidad celular.

g) Después de algunas horas, cuando las células se hayan adherido a la pared del frasco, es conveniente cambiar el medio de cultivo por M.C. fresco.

h) Cultivar por 48 horas.

i) Cuando el cultivo sea confluyente, tripsinizar y sembrar una botella Roux.

j) 48 horas después tripsinizar y sembrar 3 botellas Roux.

k) 48 horas después tripsinizar y preparar una suspensión celular en M.C. ajustado a una concentración de $0.5 \times 10^{6.0}$ cél/ml. Sembrar un frasco de fondo plano de 1.0 litro con barra magnética.

A partir del frasco congelado a -80°C en congelador REVCO

Materiales

- Baño de agua a 37°C .
- Botellas Roux y roller estériles.
- Medio de crecimiento.

Procedimiento

- Retirar 1 frasco de 50 ml con 30 ml de cultivo celular.
- Sumergir en baño de agua a 37°C .
- Cuando el cultivo esté descongelado, tomar el frasco, limpiarlo por fuera con algodón empapado en alcohol y destapararlo en la cabina de flujo laminar.
- Distribuir el contenido del frasco en 1 botella roller, agregando 300 ml de M.C. Colocar la botella en un aparato roller y cultivar a 37°C .
- A las 24 horas eliminar en operación suave el medio de cultivo y substituirlo por 300 ml de M.C. fresco. Continuar la incubación.
- 48 horas después cuando el cultivo esté bien desarrollado, se retira la botella de la estufa, se agita enérgicamente para desprender el cultivo celular. En la cabina de flujo laminar se transfiere el cultivo a un frasco de 2 litros de fondo plano, con barra magnética y dispositivo de transferencia estéril. Se coloca sobre un agitador magnético por 10 o 15 minutos. Se hace un recuento celular y se diluye en M.C. fresco para tener una concentración de $0,5 \times 10^{6,0}$ cél/ml.
- Se siembran frascos de cultivo con barra magnética y dispositivos para transferencia estéril y se incuban en mesa magnética a 37°C por 24 horas, continuándose en esa forma los cultivos en suspensión.

13.4 Recuento celular

El recuento celular es una operación de la mayor importancia en trabajo con cultivos celulares. La suspensión celular, sea hecha a partir de células de monocamada tripsinizada o de células de suspensión debe ser preparada en tal forma que las células estén lo más sueltas posibles, evitando la formación de grumos.

Para facilitar el recuento y observar mejor la morfología y vitalidad celular, se usa siempre un colorante que penetra las células muertas y es excluido por las células vivas. Los dos colorantes más usados son la eosina y el azul de tripano. En nuestro caso usamos la eosina.

Materiales

- Hemocitómetro, cámara de Neubauer mejorada con cubre-objetos 20×26 mm.

- Microscopio con óptica directa.
- Pipetas graduadas de 1,0 ml.
- Pipetas Pasteur.
- Tubos de hemólisis.
- Solución de eosina 0,2%.

Procedimiento

- Toma de muestra.

1) *Células de monocamada.* Se tripsiniza el cultivo como descrito en 13.5.1, se suspenden las células en un volumen conocido de M.C. y se pone en agitación en un recipiente con barra magnética dentro de una cabina de flujo laminar. Después de 10 minutos de agitación, se toma asépticamente una muestra de no menos de 5,0 ml que se coloca en un frasco estéril.

2) *Células de suspensión.* Se toma directamente una muestra de 5 a 10 ml en forma estéril de un frasco en agitación. Si el recipiente es pequeño la muestra se toma en la cabina de flujo laminar. Si el cultivo está en un frasco grande con dispositivo para transferencia estéril se extrae una muestra por presión positiva y si el cultivo está en un tanque se extrae la muestra a través del opérculo de goma instalada en la pared del tanque a esos efectos. (Ver Figura 38.) En todos los casos el cultivo debe estar en agitación.

b) Se toma 1,0 ml de la muestra y se coloca en un tubo de hemólisis que contiene 1,0 ml de solución de eosina. Por medio de una pipeta Pasteur se mezcla bien. Se deja la pipeta en el tubo de hemólisis mientras se prepara la cámara de Neubauer.

c) Se toma una cámara de Neubauer, se humedece levemente las partes laterales elevadas que harán de contacto para la lamínula o cubre-objetos y se monta el mismo presionando con los pulgares para fijarlo (Figura 28).

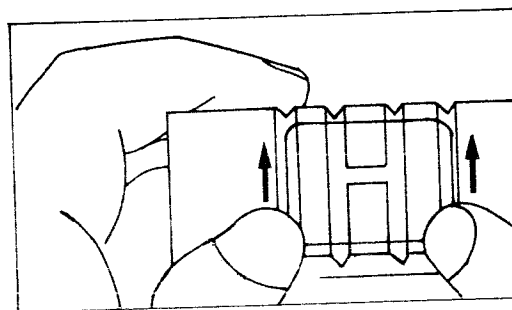


FIGURA 28
Colocación del
cubre-objeto en la
cámara Neubauer

d) Cuando la cámara esté lista se mezclan nuevamente las células, succionando y expulsando el líquido con la pipeta Pasteur y se carga la cámara de Neubauer usando la ranura que ésta posee a esos efectos. Se debe llenar sólo el área cuadriculada (Figura 29).

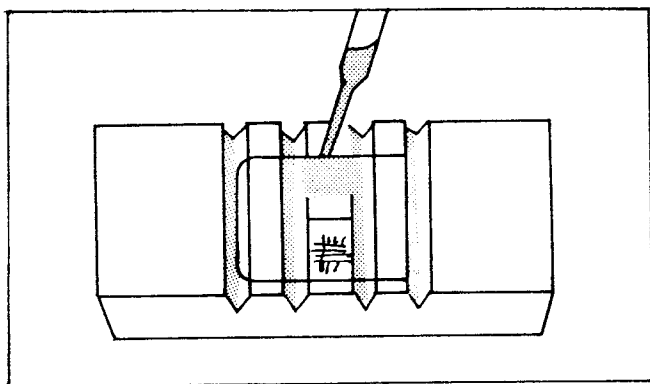


FIGURA 29
Colocación de la suspensión celular en la cámara de Neubauer

e) Se lleva la cámara al microscopio, usando el ocular 6X u 8X y el objetivo 10X (Figura 30).

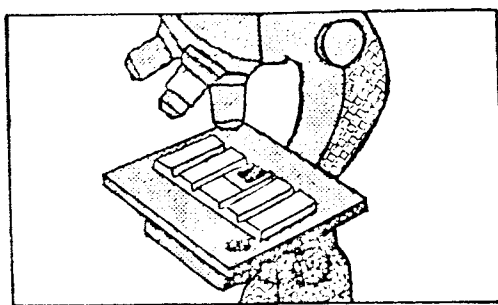


FIGURA 30
Colocación de la cámara en el microscopio

f) Colocar la lámina en el microscopio y ajustar la iluminación correcta. No es conveniente iluminación excesiva, y esto se controla regulando la apertura del diafragma y la altura del condensador. En el centro del campo debe quedar uno de los cuadrados 1, 2, 3, 4 (Figura 31) donde se deben ver nítidamente las células. Las células vivas se verán claras y refringentes. Su morfología dependerá del momento evolutivo en que se encuentran. Cuando están en proceso de reproducción presentan una forma agrandada y se ven muchas células piriformes. Las célu-

las muertas habrán sido penetradas por el colorante y aparecerán teñidas en rojo.

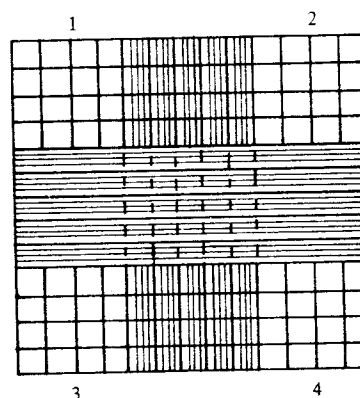


FIGURA 31
Aspecto microscópico.
Cámara de Neubauer

Se cuentan las células en cada cuadrado para lo cual se debe seguir en orden predeterminado, como por ejemplo en la Figura 31. Las células colocadas sobre los bordes superior y derecho del cuadrado se consideran dentro de él. Las células colocadas sobre los bordes inferior e izquierdo se consideran como fuera de él. El mismo criterio debe seguirse con las células colocadas sobre las líneas internas que delimitan los cuadrados pequeños, para evitar contar dos veces la misma células (Figura 32).

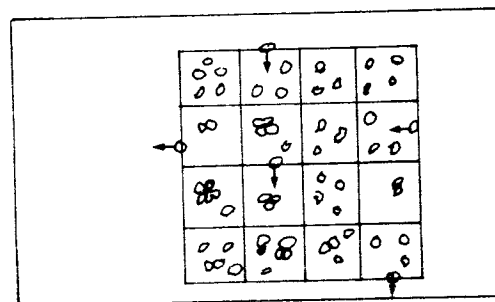


FIGURA 32
Recuento de células

Cada uno de los cuadrados 1, 2, 3 y 4 tiene 1 mm^2 de superficie y $0,1 \text{ mm}$ de altura. Su volumen es $0,1 \text{ mm}^3$ o 1 diez milésimos de un mililitro. Como la distribución celular a veces no es uniforme se debe contar los 4 cuadrados y dividir por 4 para obtener el promedio.

CALCULOS DE CONCENTRACION CELULAR

La concentración celular es generalmente expresada como células por mililitro. Promedio de células de cada cuadrado $\times 10\ 000$ = células por mililitro, pero se debe usar un factor de corrección por la dilución hecha con la solución de eosina, entonces:

células de cada cuadrado $\times 2 \times 10\ 000$ = células por mililitro.

Si sumamos las células de 4 cuadrados el cálculo será:

$\frac{\text{Células sumadas de 4 cuadrados}}{4} \times 2 \times 10\ 000$ = células/mililitro, o sea células sumadas de 4 cuadrados $\times 5\ 000$ = células por mililitro.

Ejemplo:

Cuadrado	Núm. células
1	39
2	42
3	31
4	34
Total	146

146 $\times 5\ 000$ = 730 000 cél/ml.

Si se desea hacer un recuento más exacto se puede cargar la cámara de Neubauer por los dos lados y contando los 8 cuadraditos el cálculo será:

células sumadas de los 8 cuadrados $\times 2\ 500$ = células por mililitro.

En algunos casos es conveniente usar otros factores de dilución, como por ejemplo en cultivos en suspensión con alto número de células es indicado mezclar:

- suspensión celular - 1,0 ml
- solución de eosina - 3,0 ml

En este caso el factor de corrección por la dilución del colorante en lugar de 2 será 4.

CALCULOS PARA PASES DE CELULAS

Mediante el recuento celular se sabe qué concentración celular tiene el cultivo, es decir cuantas células por milímetro. Si se considera el volumen de este cultivo madre se podrá calcular el máximo volumen que podrá tener el nuevo cultivo que vamos a sembrar.

Ejemplo: Supongamos que un cultivo madre de 2 000 ml con una concentración celular de 1 500 000 o $1,5 \times 10^6$ cél/ml.

Si queremos sembrar un cultivo hijo, usando una concentración inicial de siembra de 500 000 o $0,5 \times 10^6$ cél/ml tendremos células suficientes para un volumen mayor que llamaremos x que tendrá con respecto al volumen del cultivo madre una relación inversamente proporcional a sus concentraciones.

$$\frac{\text{Concentración cultivo madre}}{\text{Concentración cultivo hijo}} = \frac{x (\text{Volumen cultivo hijo})}{\text{Volumen cultivo madre}}$$

$$\frac{1.500.000}{500.000} = \frac{x}{2.000} \quad x = 6.000 \text{ ml}$$

Ese cálculo basado en que a igual número de células, los volúmenes serán inversamente proporcionales a las concentraciones, es el cálculo básico que usaremos en todo el trabajo con células.

Si deseamos sembrar un nuevo cultivo con un volumen determinado, deberemos calcular qué cantidad de cultivo madre necesitaremos, y a esto lo llamamos x .

Ejemplo: Tenemos un cultivo de 80 litros en un tanque con una concentración de $1,9 \times 10^6$ cél/ml.

Queremos sembrar 50 litros con una concentración de $0,6 \times 10^6$ cél/ml y vamos a calcular qué volumen de cultivo madre necesitaremos usar.

$$\frac{\text{Concentración cultivo madre}}{\text{Concentración cultivo hijo}} = \frac{\text{Volumen cultivo hijo}}{x}$$

$$\frac{1.900.000}{600.000} = \frac{50.000 \text{ ml}}{x} \quad x = 15.789 \text{ ml}$$

Necesitaremos 15 789 ml de cultivo madre a los cuales se debe agregar 34 211 ml de M.C. para completar 50 litros con una concentración celular de $0,6 \times 10^6$ cél/ml.

13.5 Cultivos de células BHK₂₁ en monocamada

El cultivo de células BHK₂₁ en monocamada es un cultivo rutinario, que se debe hacer por lo menos 3 veces por semana para tener siempre cultivos jóvenes.

El principal uso de las células BHK₂₁ de monocamada es para pruebas de no infecciosidad del virus inactivado y para titulaciones de virus. En estos cultivos se debe evitar toda interferencia de anticuerpos contra el virus de la FA que el suero pueda tener. Los laboratorios ubicados en áreas donde la población bovina está expuesta a la FA o es vacunada, tienen dificultad para obtener sueros sin anticuerpos.

En la rutina del CPFA, las células BHK₂₁ de monocamada sólo se cultivan en M.C. formulado con suero bovino tratado con PEG (ver 12.9.2). El tratamiento del suero con PEG no afecta la morfología ni las propiedades de las células BHK₂₁ pero remueve las macromoléculas de globulinas del suero, y entre ellas todos los anticuerpos contra los virus de la FA. Eso es de fundamental importancia para trabajos de titulaciones de virus y pruebas de inocuidad.

Pero no solamente los anticuerpos pueden afectar la susceptibilidad de las células frente al virus de la FA, sino que muchas veces los cultivos van perdiendo su susceptibilidad en forma espontánea. De ahí la importancia de disponer de un buen stock de células congeladas, de las cuales se puede partir en cualquier momento. Por otra parte, las células deben ser controladas frecuentemente en cuanto a la sensibilidad frente al virus, realizando titulaciones de virus en forma paralela, usando las mismas diluciones de virus, en el mismo momento, frente a un cultivo celular de sensibilidad conocida.

Las células BHK₂₁ de monocamada presentan un aspecto microscópico con grupos de células de morfología fusiforme, orientadas en un mismo sentido (Figura 33), y también el aspecto microscópico es característico. Observando el cultivo con luz adecuada se observa un dibujo o "pattern" propio de esos cultivos. Cualquier alteración en su morfología, aun antes de observarse pérdida de sensibilidad frente al virus de la FA, es motivo suficiente para abandonar la línea y comenzar de nuevo a partir de las células congeladas.

Constituye una buena norma no superar los 30 pases después de cada descongelación.

CULTIVOS EN BOTELLAS ROUX

Materiales

- Botellas Roux estériles y tapones de Neopreno núm. 5.
- Solución de tripsina 0,1%.
- Pipetas graduadas y Pasteur estériles.
- Propipetas.
- Frascos con barra magnética estériles.
- Elementos para contar células.

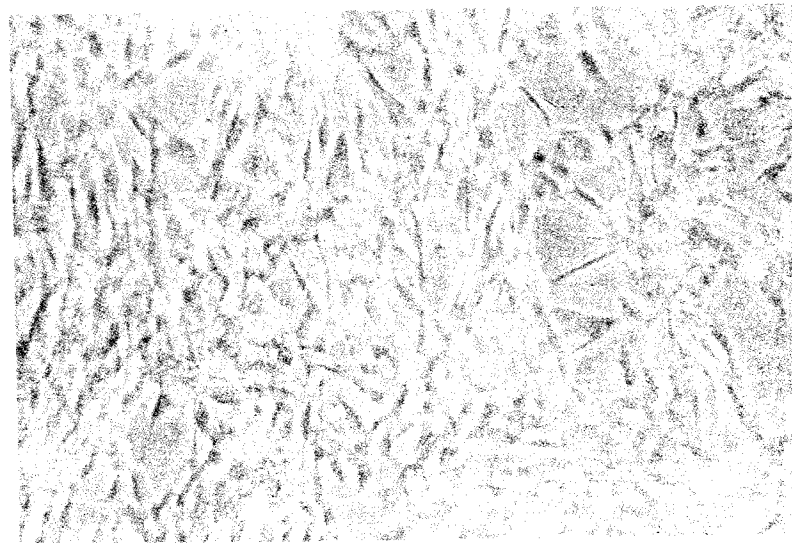


FIGURA 33
Células de monocamada

Procedimiento

a) A partir de cultivos confluentes de células recientemente descongeladas en botellas Roux, eliminar el medio de cultivo y agregar 10 ml de solución de tripsina por botella.

b) Agitar suavemente la botella hasta que las células se hayan desprendido de la superficie del vidrio. Agregar a cada botella 50 ml de M.C. con suero. De esta forma se neutraliza la acción de la tripsina.

c) Juntar los cultivos de varias botellas y centrifugar en centrífuga refrigerada a 600 rpm durante 10 minutos. Eliminar el líquido sobrenadante y resuspender las células en M.C. con suero a razón de 100 ml por cada botella Roux.

d) Tomar una muestra de 1,0 ml y mezclar con 1,0 ml de solución de eosina (ver 13.4). Hacer observación microscópica y recuento celular.

e) Diluir el cultivo en M.C. para tener una concentración de $0,25 \times 10^{6,0}$ cél/ml y sembrar aseptícamente otras botellas Roux que recibirán $25 \times 10^{6,0}$ células por botella.

Otra opción:

Algunos técnicos prefieren hacer la tripsinización en la siguiente forma:

a) Eliminar el sobrenadante del cultivo y agregar 10 ml de tripsina. Cuando apenas comienza el efecto de la tripsina y las células comienzan a separarse del vidrio, eliminar la tripsina quedando sólo aquella unida a las células. Golpeando suavemente la botella con las manos se logra la separación del resto de las células de la pared del vidrio.

b) Agregado de 100 ml de M.C. con suero. Cuando se opera de esta forma no es necesario centrifugar. Se hace directamente el recuento celular, dilución de las células $0,25 \times 10^{6.0}$ cél/ml y siembra de otras botellas con $25 \times 10^{6.0}$ células por botella.

SIEMBRA DE TUBO DE ENSAYO PARA TITULACIONES

Materiales

- Cultivo confluyente de células BHK₂₁ en botella Roux.
- Tubos de ensayo con tapa de rosca estériles.
- Soportes metálicos para mantener los tubos en posición inclinada durante la incubación (ver Figura 25).
- Pipeta automática de 2,0 ml montada en frasco con barra magnética para agitación (ver Figura 25).

Procedimiento

a) Realizar las etapas (a) y (d) del proceso normal con botellas Roux (ver 13.5.1).

b) Diluir las células en M.C. para tener una concentración de $0.3 \times 10^{6.0}$ cél/ml.

c) Estando la suspensión celular en agitación y mediante el uso de la pipeta automática distribuir 1.5 ml de suspensión celular en cada tubo de ensayo.

d) Colocar los tubos en el soporte metálico y cultivarlos en cultivo estático durante 48 horas.

– Las próximas etapas de la titulación de virus se cumplirán en el área de virus (véase 17.2).

CULTIVOS DE CELULAS BHK₂₁ EN FRASCOS - "PRESCRIPTION"*Materiales*

- Frascos "prescription" de 160 ml estériles (ver Figura 23).
- Tapones de Neopreno núm. 3 estériles.

Procedimiento

a) A partir de las mismas células usadas para siembra de botellas Roux con una concentración de $0.25 \times 10^{6.0}$ cél/ml, se siembran las botellas "prescription" con 10 ml.

b) La incubación y tratamiento posterior es en un todo igual a las botellas Roux.

13.6 Cultivos de células BHK₂₁ en suspensión

La adaptación de la línea celular BHK₂₁ Clon 13 a crecimiento en suspensión (ver Aspectos Generales, punto 1) significó un avance de gran trascendencia en lo relacionado al uso de cultivos celulares como sustrato para la replicación viral en la producción de vacunas contra la FA.

La producción de células se puede hacer en una forma semi continua, en grandes volúmenes y en circuito totalmente cerrado.

La etapa delicada y laboriosa de la tripsinización fue así totalmente superada.

Al adaptarse al crecimiento en suspensión las células cambian su morfología, que de fusiforme pasa a ser redondeada (Figura 34) y se modifica su afinidad por adherirse a la pared del recipiente. Sin embargo, si son debidamente manejadas, se logra que se adhieran a las paredes de las botellas Roux en cultivos estáticos y a las botellas roller que se colocan en aparatos que rotan a baja velocidad, aproximadamente 8 revoluciones por hora (ver 11.4, Figura 37).

La susceptibilidad al virus de la FA no es afectada por el crecimiento en suspensión, dentro de ciertos límites. No obstante, como sucede también con las células de monocapa la sensibilidad de las células frente al virus de la FA puede modificarse en los pases sucesivos, por lo que debe ser controlada frecuentemente.

A partir de cultivos de células en suspensión en frascos, se puede seguir varios caminos:

- Cultivo de frasco con agitación para otros frascos mayores con agitación.
- Cultivo de frasco con agitación para tanque de cultivo celular.
- Cultivo de frasco con agitación para botellas roller.
- Cultivos para células de reserva, conservadas a 4°C.
- Cultivos para congelación de células (ya descrito en 13.2).

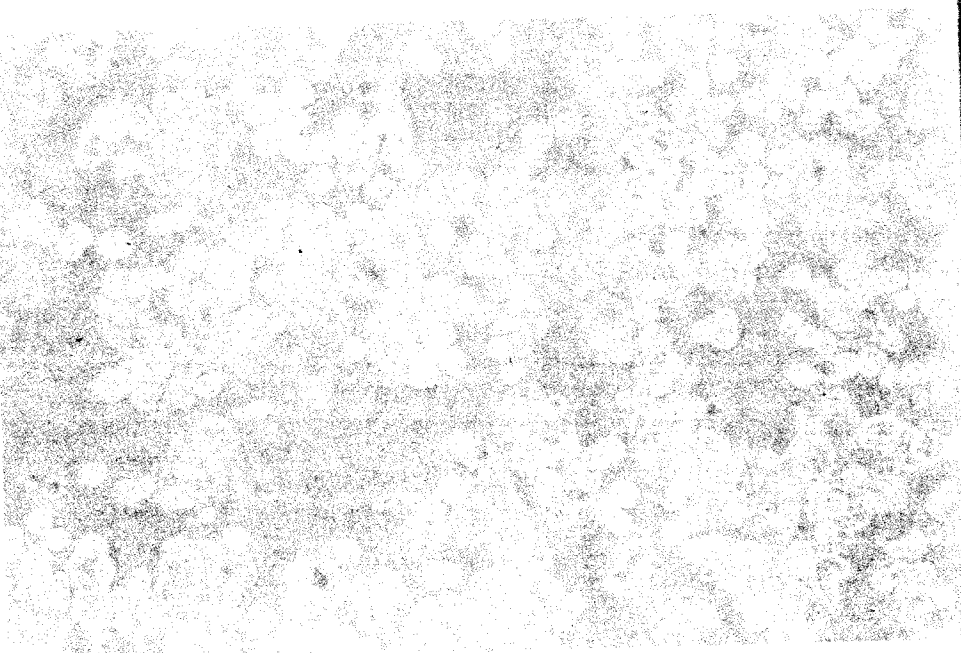


FIGURA 34
Células BHK en suspensión

CULTIVOS DE CELULAS BHK₂₁ DE SUSPENSION. CULTIVO DE FRASCO CON AGITACION PARA FRASCO CON AGITACION. CULTIVO PREVIO PARA TANQUES

Material

- Frascos de fondo plano de 1, 2, 5, 10 y 20 litros con barra magnética y dispositivos para transferencia estéril (Figura 35).
- Mesas con dispositivos para agitación magnética.
- Elementos de recuento celular.
- Medio de crecimiento M.C.

Procedimiento

- Se parte de cultivo celular en suspensión de reciente descongelación (ver 13,3), se toma asépticamente una muestra (el cultivo debe estar en agitación, para lo cual sobre la mesa de trabajo debe colocarse un agitador magnético).

- Se hace el recuento celular. Un cultivo de 18 a 24 horas que haya sido sembrado con una concentración celular de $0,5 \times 10^{6,0}$ cél/ml debe tener aproximadamente $1,5 \times 10^{6,0}$ cél/ml.

Si este cultivo es de 2,0 litros, se podrá sembrar un frasco mayor con 6,0 litros de cultivo celular, que partirá de la concentración de $0,5 \times 10^{6,0}$ cél/ml.

- En un frasco de 20 litros de fondo plano con barra magnética, se colocan 4,0 litros de M.C. Se transfieren asépticamente los dos litros del cultivo anterior, por medio de presión positiva. Así tendremos 6 litros de cultivo que se ponen a incubar a 37°C en mesa magnética con agitación. En 18 a 24 horas ese cultivo habrá alcanzado una concentración de aproximadamente $1,5 \times 10^{6,0}$ cél/ml.

- A partir de ese cultivo se puede hacer cultivos mayores.

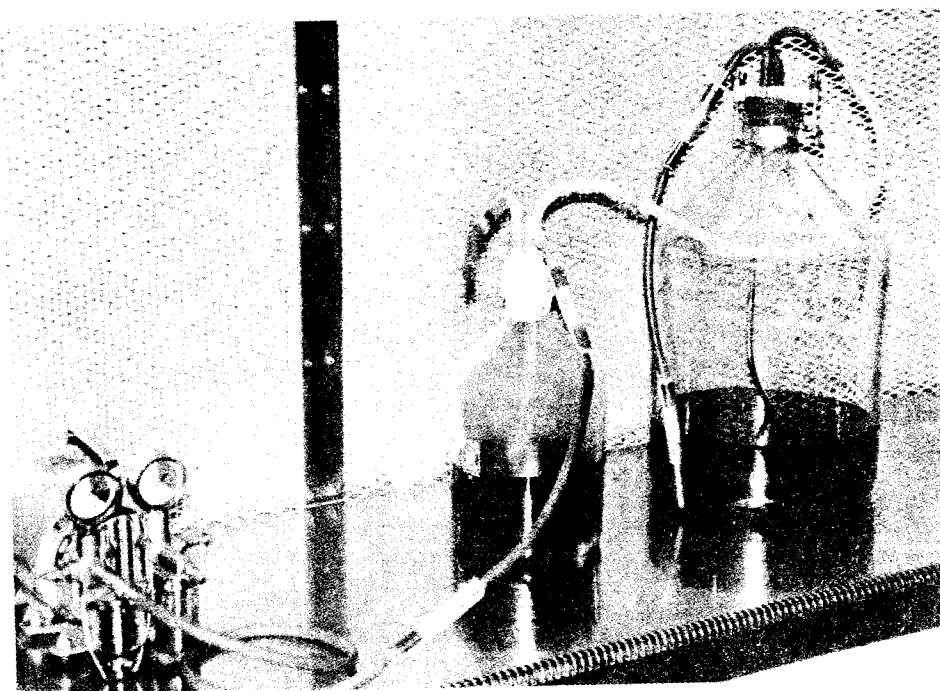


FIGURA 35
Frascos de cultivo con dispositivo para transferencia estéril

Ejemplo 1: El cultivo tiene $1,5 \times 10^{6.0}$ cél/ml. Será suficiente para sembrar 18 litros de cultivo nuevo con $0,5 \times 10^{6.0}$ cél/ml, que se podrá distribuir en 2 frascos de 20 litros con 8 litros de cultivo cada uno y en frasco de 5,0 litros con 2 litros de cultivo.

Ejemplo 2: El cultivo tiene $2,0 \times 10^{6.0}$ cél/ml. Será suficiente para 24 litros de cultivo que se puede distribuir en 3 frascos de 20 litros con 8 litros de cultivo cada uno.

e) Para iniciar cultivo en el tanque de 100 litros, se necesitará de 2 frascos con 8 litros de suspensión celular. Si partimos de 16 litros de cultivos con $1,5 \times 10^{6.0}$ cél/ml y agregamos 24 litros de M.C. tendremos una concentración inicial de $0,6 \times 10^{6.0}$ cél/ml.

CULTIVO EN FRASCOS CON AGITACION PARA SEMBRAR BOTELLAS ROLLER

Materiales

- Frascos de fondo plano con barra magnética y dispositivos para transferencia estéril.
- Mesas con agitación magnética.
- Elementos de recuento celular.
- Medio de crecimiento M.C.
- Botellas roller. Aparato roller (Figuras 36 y 37).



FIGURA 36
Botellas
roller de
2 000 ml

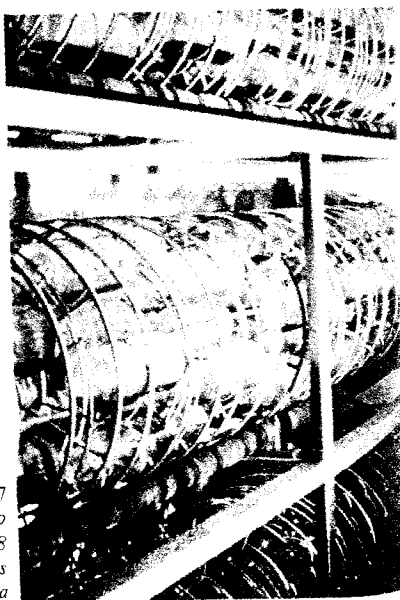


FIGURA 37
Aparato
roller 8
revoluciones
por hora

Procedimiento

a) Se parte de cultivos celulares de 24 horas en frascos con agitación. Se hace recuento celular. Supongamos una concentración de $1,5 \times 10^{6.0}$ cél/ml.

b) Si deseamos hacer cultivos celulares en botellas roller para producción de virus y cultivar botellas por 72 horas, es conveniente una concentración celular de $0,3 \times 10^{6.0}$ cél/ml lo que en 300 ml de cultivo dará un total de $90 \times 10^{6.0}$ células por botella roller.

Un litro de cultivo será suficiente para 5,0 litros de suspensión celular para siembra de botellas roller.

c) Por cada 1,0 litro de cultivo con concentración $1,5 \times 10^{6.0}$ cél/ml, se adiciona 4,0 litros de M.C., se agita y se distribuye a razón de 300 ml por botella.

Si se desea hacer un cultivo en botella roller de sólo 48 horas, es mejor usar una concentración celular no menor de $0,4 \times 10^{6.0}$ cél/ml, es decir $120 \times 10^{6.0}$ cél/botella. En este caso por cada 1,0 litro de cultivo se adiciona 2,75 litros de M.C. y se distribuye en la botella a razón de 300 ml cada una.

d) Se colocan las botellas en el aparato roller y se incuban por 72 horas en el primer caso y por 48 horas en el segundo.

CONSERVACION DE CELULAS EN REFRIGERACION A 4°C

La conservación de células BHK21 de suspensión a 4°C aunque no puede ser hecha por períodos prolongados, es un recurso de gran utilidad y debido a que se puede conservar volúmenes grandes de cultivo. Eso permite reaccionar rápidamente en caso de contaminación bacteriana u otros problemas que se puedan presentar con los cultivos mayores.

Procedimiento

a) Se parte de cultivos de 18 a 24 horas de crecimiento. Se hace recuento celular y se mide el pH.

b) Si el recuento es adecuado y el pH no es menor de 7,2 se coloca el balón en la heladera a 4°C. Si el pH es inferior a 7,2 se corrige agregando buffer de glicocola estéril (ver 12.10).

c) Si se quiere guardar esas reservas celulares por varias semanas, es conveniente dejar sedimentar los cultivos durante 24 horas a 4°C y luego reemplazar el medio de cultivo sobrenadante por M.C. fresco. Una buena norma, usada sobre todo para conservación de cultivos a 4°C en tanque, es mantener en agitación suave durante todo el período de conservación.

14. CULTIVOS CELULARES PARA REPLICACION INDUSTRIAL DE VIRUS. PRODUCCION DE SUSPENSIONES VIRICAS PARA VACUNAS

La producción de células para replicación industrial de virus y la producción de las suspensiones víricas para vacunas, serán consideradas en un mismo capítulo debido a que ambas son producidas en el mismo sector del laboratorio y utilizando los mismos equipos.

La producción de células comienza en el área limpia y cuando se alcanza un volumen de algunos litros, suficiente para comenzar cultivos en tanque, se transfiere el cultivo al área de virus por tubería estéril.

Los tanques de cultivos del área de virus pueden ser usados de acuerdo con diferentes criterios, como por ejemplo usar el mismo tanque para crecimiento de células y virus, o hacer el crecimiento celular en un tanque y luego transferir las células ya listas para la agresión viral a otro tanque en donde se inocula virus.

Algunos laboratorios hacen su producción viral en tanques, otros solamente utilizan roller y otros usan una combinación de ambos métodos.

Cualquiera de esas combinaciones es válida y el criterio a seguir dependerá de las conveniencias locales de cada unidad.

En este Manual, a los efectos de esquematizar el proceso de producción, trabajaremos de acuerdo con los siguientes presupuestos:

- La producción calculada de vacuna trivalente con adyuvante oleoso será de 9 millones de dosis por año.
- Los primeros cultivos celulares para producción serán hechos en frascos en el área limpia (ver 13.6) y luego transferidos al área de virus para comienzo de producción de cultivos celulares en tanques (ver 13.6.).

Supondremos también que 2/3 de la producción de virus será hecha por el sistema roller y 1/3 de la misma será hecha en tanques en cultivos de células en suspensión.

Como consecuencia de este esquema se considera como tiempo de producción efectiva 40 semanas por año.

14.1 Equipo

- 4 tanques para cultivos celulares de 120-250-500-500 litros.
- 2 tanques para inactivación de virus de 600 litros.
- 1 tanque para tratamiento del virus con cloroformo de 600 litros.
- 1 equipo roller para 1600 botellas roller de 2 litros.

- 2 filtros Seitz Orion 40 x 40 para 60 placas (ver 12.14.).
- Equipo de aire comprimido de preferencia libre de aceite, válvulas reguladoras y fluxómetros.
- Red de aire comprimido en todo el laboratorio.
- Red de agua a 37°C.
- Red de vapor filtrado.
- Red de agua a 4°C.
- Red de agua corriente.
- Red de agua deionizada o destilada.
- Red de gas.
- Centrífuga refrigerada, tipo PR6 International.
- 3 cabinas de flujo laminar.
- Potenciómetro Metrohm o Portatest 901.
- Microscopio de óptica directa (Standard K, Carl Seitz).
- Microscopio de óptica invertida (Standard UPL, Carl Seitz).
- Elementos de microscopía, colorantes, aceites de inmersión.
- Cámaras Neubauer, cubre-objetos, etc.
- Congeladores eléctricos -80°C.
- Bombas de presión.
- Bombas peristálticas.
- Frascos de fondo plano de 1,0-2,0-5,0-10 y 20 litros, con dispositivo para transferencia estériles.
- Peras Richardson.
- Propipetas.
- Pipetas graduadas de 1, 2, 10 y 25 ml.
- Pipetas Pasteur.

14.2 Características de los tanques de cultivos celulares y servicios necesarios

Aunque puede haber muchos diseños de tanques para cultivos celulares, hay algunas características que deben ser siempre respetadas. Ante todo se debe tener presente que los tanques para cultivos celulares son equipos delicados que sólo deben ser fabricados por firmas especializadas.

Todos los tanques deben tener doble pared. El líquido que circula entre las dos paredes tiene la finalidad de dar la temperatura adecuada al interior del tanque donde se hace el cultivo celular. Esas dos cavidades no se comunican entre sí.

Todo tanque debe contar con abastecimiento de agua a 37°C y 4°C que circulará por el interior de la doble pared o "camisa" (cámara externa).

Servicio de vapor para esterilización.

Servicio de aire comprimido libre de aceite.

Servicio de agua corriente y deionizada.

Tubería estéril para transferencia entre tanques, con válvulas adecuadas.

Tubería de acero inoxidable para medio de cultivo.

La Figura 38 muestra detalles de un tanque de cultivo celular de 200 litros de capacidad.

La Figura 39 esquematiza los servicios requeridos por todo tanque y que son brindados por medio de tubos que en este caso corren contra la pared.

La Figura 40 da una idea más clara en un diseño isométrico.

La Figura 41 es una fotografía que muestra las conexiones de los servicios al tanque y las conexiones entre tanques.

La cavidad interna y todas las partes en contacto con el producto deben ser de acero inoxidable tipo AISI 316 y de un espesor suficiente para soportar las condiciones extremas de presión y temperatura a que el tanque será sometido. Un punto particularmente crítico lo constituye la abertura en la tapa por donde pasa el eje en el sistema de agitación convencional.

Consideramos de una gran ventaja el uso de agitación magnética, en la cual el disco magnético colocado fuera del tanque que rota impulsado por un motor eléctrico, acciona por acción magnética a otro disco similar colocado dentro del tanque y separado por una placa de acero inoxidable que es amagnética. Los discos internos impulsan al eje de agitación colocado dentro del tanque (Figura 42). En esta forma el tanque no tiene abertura alguna.

Las paletas o turbinas de agitación deben ser bien dimensionadas y tener una ubicación correcta dentro del tanque (Figura 43).

La velocidad a que los cultivos deben agitarse dependerá del diseño del tanque pero es baja en general, 60 a 120 rpm, y variable según el volumen del cultivo y su momento de desarrollo. Por ello es necesario contar con un reductor y un variador de velocidades, como se ve en las Figuras 38 y 42.

Los tanques deben tener dispositivos para toma de muestra en pequeña escala para recuentos celulares y controles de pH y bacteriológicos. Para muestras pequeñas se usa, en general, un tapón de goma perforable debidamente protegido contra los cambios de presión, por una tapa de rosca con un tope que lo soporta (Figura 38). Para muestras mayores se usa un dispositivo en la tubería externa del tanque.

Toda operación de adición o sustracción de medio interno del tanque debe ser seguida de esterilización del sector utilizado. Los filtros de aire

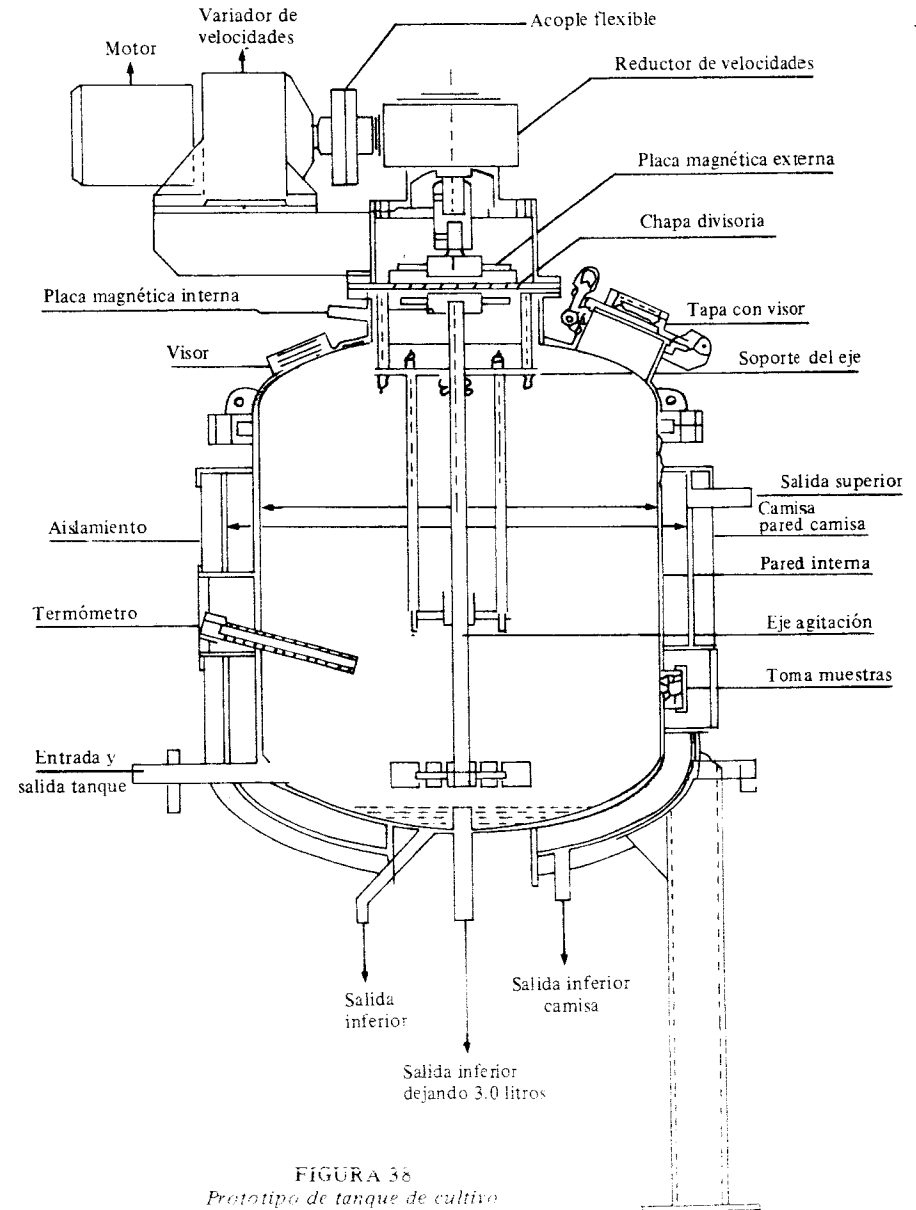


FIGURA 38
Prototipo de tanque de cultivo

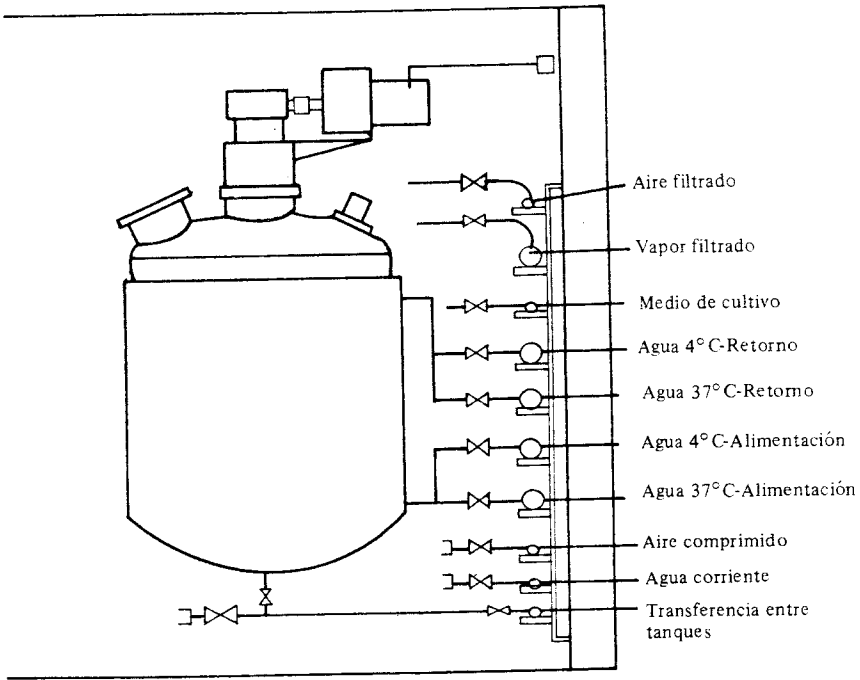


FIGURA 39
Servicios

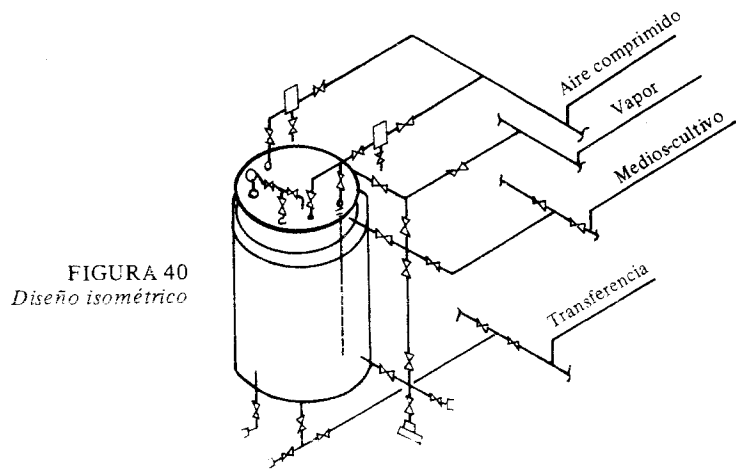


FIGURA 40
Diseño isométrico

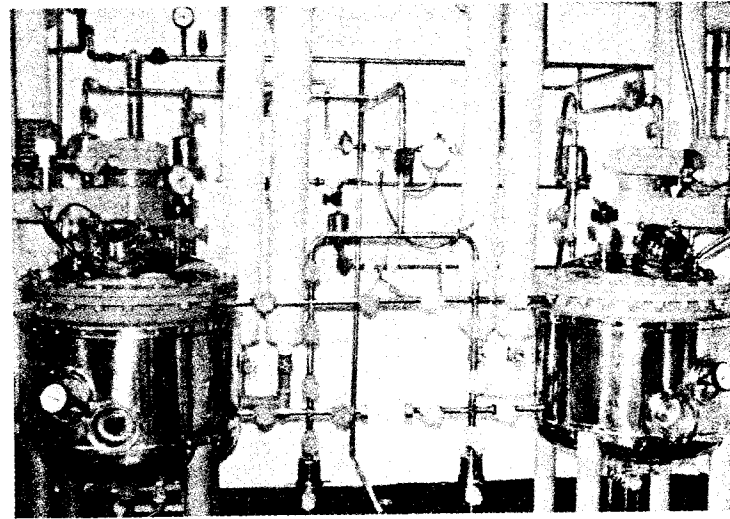


FIGURA 41
Conexiones de los servicios a los tanques

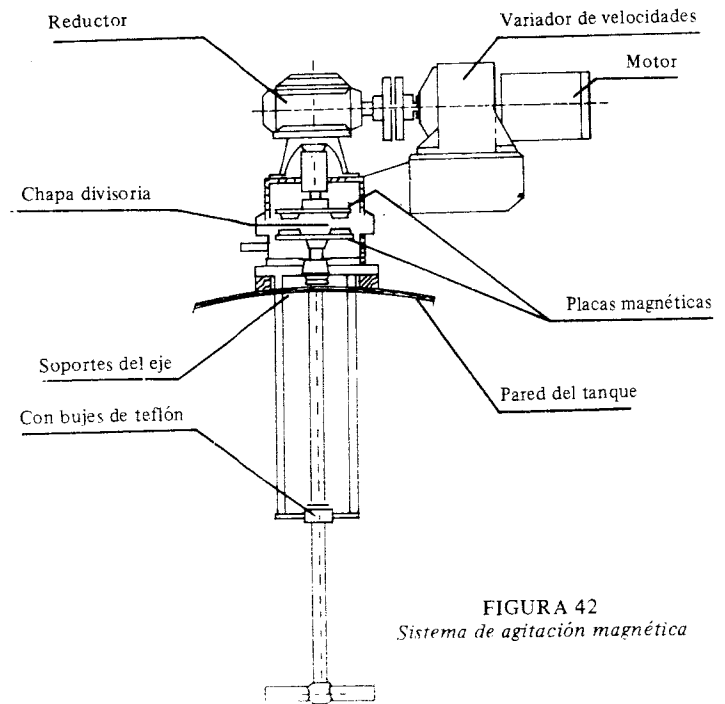


FIGURA 42
Sistema de agitación magnética

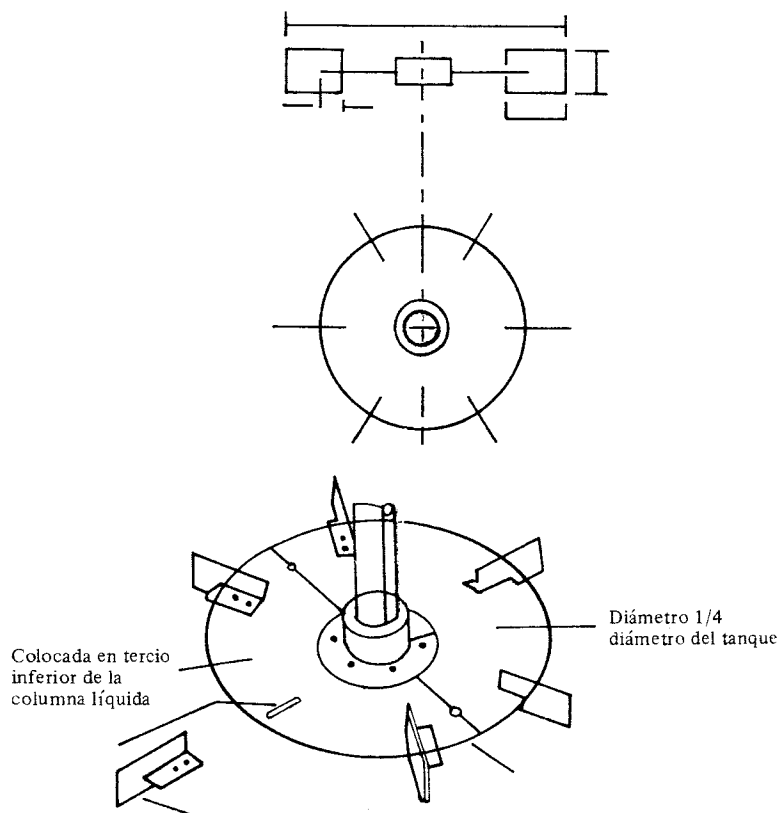


FIGURA 43
Paletas o turbinas dentro del tanque

de entrada y salida deben ser filtros especiales esterilizables. Son excelentes los filtros Domnick Hunter, modelo C4MESR.

(Domnick Hunter Ltd.
Washington Steel Works
Washington, Dunham, England)

Todo tanque debe tener 2 visores en la tapa (ver Figura 38), uno de ellos equipado con sistema de iluminación y en el interior del tanque una regla graduada bien visible para poder medir el nivel del líquido.

14.3 Lavado de tanques de cultivo celular

Un buen lavado de los tanques de cultivos celulares es fundamental para obtener buenos cultivos celulares.

Siempre se debe lavar o por lo menos enjuagar el tanque inmediatamente después de su uso.

En algunos diseños de tanques de gran volumen puede entrar un hombre por una abertura grande colocada en la tapa, pero eso no es posible en los tanques de menor capacidad. Es fundamental que el lavado llegue a todos los puntos, con especial cuidado en los orificios de entrada y salida, bujes y soportes de eje, etc. Los caños de entrada y salida del medio de cultivo, transferencia de cultivos celulares y virus, deben ser enjuagados y lavados de acuerdo con las mismas directivas seguidas para los tanques.

Dependiendo del montaje del conjunto del equipo, cada laboratorio debe establecer sus esquemas de lavado y esterilización de tanques y tubería, los que deberán ser efectuados siempre en la misma secuencia para evitar errores.

Materiales

- Agua corriente y desmineralizada.
- Jabón neutro.
- Esponja grande y cepillo con mango largo.
- Solución de ácido cítrico al 1,0%.

Procedimiento

a) Si el tanque fue usado en producción de virus es conveniente enjuagarlo enteramente con una solución de ácido cítrico al 1,0 por ciento que se hará correr por la tapa, paredes y tubería de transferencia de virus.

b) Con todos los registros de salida cerrados se procede a un enjuague general del tanque. En todo momento se debe tomar cuidado de cerrar los registros de los filtros de aire para no mojarlos.

c) Se hace correr agua por las tuberías de medio, y de cultivos celulares y virus que hayan sido usadas.

d) Se lava bien el interior del tanque con agua y jabón, usando esponja y cepillo.

e) Se enjuaga cuidadosamente con agua corriente el tanque y las tuberías usadas.

f) Se enjuaga otra vez muy cuidadosamente todo el sistema con agua desionizada o destilada.

14.4 Esterilización de tanques de cultivo

1. Vaciar completamente la "camisa" del tanque.
2. Verificar que los registros de entrada y salida de agua a 4°C y 37°C de la camisa están completamente cerrados.
3. Si el tanque está equipado con tapón de goma para toma de muestra y fue usado en el cultivo anterior, debe ser cambiado.
4. Cerrar los registros de entrada de aire a los filtros Domnick Hunter. Los filtros serán esterilizados junto con el tanque.
5. Abrir todos los registros de salida del tanque.
6. Abrir parcialmente el registro de entrada de vapor y dejar salir vapor por todas las válvulas. Las válvulas se irán cerrando parcialmente, pero siempre dejando salir vapor por 15 a 30 minutos.
7. Cerrar progresivamente, hasta el cierre casi completo todas las válvulas para elevar la presión de 15 a 20 libras durante 60 minutos. La presión debe ser controlada para que no fluctúe durante ese período.
8. Cuando se completan los 60 minutos, se cierra el registro de entrada de vapor. Se deja el registro del filtro Domnick Hunter de salida y la conexión al manómetro.
9. Cuando la presión comienza a caer, se abre el registro de entrada de aire para mantener siempre una presión positiva de 10 libras dentro del tanque.
10. Cuando el tanque ya se enfrió 40-50°C se puede cerrar la salida del aire, dejando siempre presión positiva de 10 libras.
11. El o los tanques podrán ser esterilizados junto con la línea de medios de cultivo o de transferencia entre tanques. Para estas líneas registrarán los mismos principios que para la esterilización de los tanques.

Atención. El tanque deberá estar siempre sometido a presión positiva para:

a) Evitar el colapso del tanque que se produciría si por error se cerraran todos los registros y se produjera vacío por enfriamiento. En este caso el tanque puede llegar a destruirse totalmente.

b) La presión interna positiva ayuda a mantener la esterilidad del medio interno.

14.5 Demostración esquemática de producción de células y virus

Se reciben 2 balones con 8.0 litros de cultivos celulares de la unidad de mantenimiento de células y se trabajará de acuerdo con el esquema de la Figura 44 y del Cuadro 13.

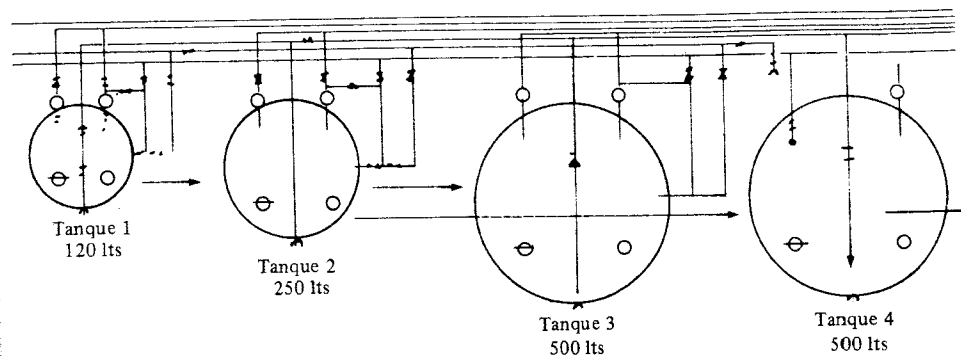


FIGURA 44
Esquema de producción (en litros)

CUADRO 13
Esquema de producción (en litros)

DIA	TANQUE 1 120 lts	TANQUE 2 250 lts	TANQUE 3 500 lts	TANQUE 4 500 lts	ROLLER 1 600 botellas
LUNES	80 C.C.	80 C.C. 80 M.C. 160			Elimina M.C. 400 M.V. 400 ml S.V.
MARTES		100 60 C.C. Enfría 4°C	100 C.C. 100 M.C. 200		Cosecha virus
MIÉRCOLES		4°C	200 C.C. 200 M.C. 400	Recibe 360 M.C.	
JUEVES	16 C.C. 24 M.C. 40	60 C.C. 60 M.C. 120	Enfría y Sedimenta 400 C.C.	Control N.C.	
VIERNES	40 C.C. 40 M.C. 80	120	Elimina Sobrenadante 200 M.V. 20 ml S.V.	120 C.C. 360 M.C. 480	1.600 botellas con 300 ml C.C. 480 C.C.
SABADO	80 C.C. refrigera 4°C		Cosecha virus		crecimiento células
DOMINGO	80 C.C. 4°C				crecimiento células

C.C. Cultivos celulares
M.C. Medio de crecimiento para células
M.V. Medio de virus
S.V. Semilla de virus

El esquema que antecede es propuesto solamente para facilitar la comprensión del significado e interrelación de las distintas piezas del equipo de producción propiamente dicho. Es un esquema conservador que al dejar los equipos libres algunos días de la semana, permite tener gran capacidad de reacción cuando algún cultivo celular se pierde por contaminación u otra causa o cuando alguna partida de virus no llegue al nivel de calidad exigido.

Los volúmenes de cultivo y de transferencia propuestos no deben ser tomados al pie de la letra sino que dependerán de los recuentos celulares hechos en cada caso y también de la concentración celular que se desea tener en el tanque que va a ser sembrado.

Por ejemplo: Si se desea un cultivo rápido en 24 horas, sembraremos el tanque con $0,8$ a $1,0 \times 10^{6,0}$ cél/ml. Si vamos a hacer un cultivo de 48 horas, sembraremos con $0,5 \times 10^{6,0}$ cél/ml.

El tanque 1 de 120 litros es principalmente destinado a incrementar el cultivo celular recibido de la unidad de mantenimiento celular (13.6.), para alimentar el tanque 2. En caso de defecto de este último, servirá para alimentar los tanques 3 y 4, para lo cual deberá ser mudado el esquema.

El tanque 2 de 250 litros está destinado a aumentar el número de células recibidas del tanque 1, para alimentar los tanques 3 y 4. En caso de algún desperfecto del tanque 1, el tanque 2 podrá ser sembrado con 24 litros (3 balones) de células de 20 litros con 8 litros de cultivo celular cada uno, recibidos del área limpia, más 36 litros de M.C. y así comenzarán los cultivos.

También en el tanque 2 se cultivan las células destinadas a sembrar el roller.

En el tanque 3 se cultivan las células destinadas a replicación viral. Cuando las células alcanzan una concentración adecuada, ejemplo: $1,8$ a $2,2 \times 10^{6,0}$ cél/ml, el tanque se enfría y sedimenta (véase 14.9).

El tanque 4 se usa para diluir las células destinadas a alimentar el roller. Como está equipado con todos los mismos elementos de los otros tanques permite cualquier otro tipo de operación alternativa.

14.6 Producción de cultivos celulares en tanque

Tomaremos como ejemplo el tanque 2 del esquema propuesto en 14.5.

— *Primer ciclo de cultivo, destinado a multiplicación de células para siembra del tanque 3.*

Se van a recibir 80 litros de cultivos celulares procedentes del tanque 1, el cultivo tiene una concentración de $1,6 \times 10^{6,0}$ cél/ml.

Como deseamos hacer un cultivo rápido, que asegure un elevado número de células para transferir al tanque 3 en algo menos de 24 horas, comenzaremos el cultivo con $0,8 \times 10^{6,0}$ cél/ml.

Procedimiento

a) A través del Seitz ORION (Figura 12) se filtran 80 litros de medio de crecimiento de células M.C. (ver 12.2) a través de la línea de medio de cultivo. Si ya se dispone de medio estéril se envía directamente a través de la línea de medio. Se hace circular el agua a 37°C por la camisa del tanque.

b) A través de la línea de transferencia se pasa 80 litros de cultivo celular C.C. del tanque 1. Se agita durante 30 minutos.

c) Se toma una muestra de cultivo de aproximadamente 40 ml a través del tapón de goma de toma de muestras, por medio de una jeringa estéril de 50 ml.

d) Se mide el pH que debe estar alrededor de 7,3 o 7,4 se hace recuento celular que debe ser aproximadamente $0,8 \times 10^{6,0}$ cél/ml, y se hace control bacteriológico en medio T.P.B. en frasco conteniendo 70 ml.

e) Dependiendo del pH se pasará más o menos aire por la superficie del cultivo. La cantidad de aire se regula en el fluxómetro.

f) Dos horas después de iniciado el cultivo y luego cada 8 horas se repiten las operaciones (c), (d) y (e). Recordar de observar siempre los controles bacteriológicos.

g) De 18 a 24 horas después de comenzado el cultivo, se debe haber alcanzado una concentración de $1,5$ a $1,8 \times 10^{6,0}$ cél/ml y se está en condiciones de transferir todo o parte del cultivo al tanque 3. Supongamos que transferimos 100 litros. En el tanque 2 quedan 60 litros, con los que comenzaremos un segundo ciclo de cultivo.

El segundo ciclo podemos comenzar enseguida o podremos refrigerar las células a 4°C dentro del tanque y comenzarlo 2, 3 o más días más tarde.

— *Segundo ciclo de cultivo —destinado a multiplicación de células para siembra de botellas roller.*

Tenemos en el tanque 40 litros de C.C. con una concentración de $1,8 \times 10^{6,0}$ cél/ml.

Procedimiento

a) Sobre 60 litros de C.C. se agregan 60 litros de M.C.

b) Se agita y se procede como en el cultivo anterior. El recuento celular debe indicar una concentración de aproximadamente $0,8 \times 10^{6,0}$ cél/ml.

c) A las 24 horas habrá una concentración celular de aproximadamente $1,5$ a $1,8 \times 10^{6.0}$ cél/ml.

Supongamos que todos los controles bacteriológicos están correctos, la concentración celular $1,7 \times 10^{6.0}$ y el pH 7.3 y que deseamos sembrar 1 200 botellas roller para cultivarlas durante 72 horas con 300 ml de M.C. por botella y una concentración inicial de $0,3 \times 10^{6.0}$ cél/ml.

Debemos calcular cuantos litros de cultivo celular se necesitan. Los cálculos se hacen de acuerdo con el método descrito en 13.4:

$$1.200 \times 300 \text{ ml} = 360.000 \text{ ml} = 360 \text{ litros}$$

$$\frac{360}{x} = \frac{1,7}{0,3} = 63,5 \times = 63,5 \text{ litros}$$

d) Por medio de presión positiva aplicada sobre el tanque 2, se pasan 63,5 litros de cultivo celular al tanque 4 a través de la línea de transferencia.

Previamente, de acuerdo con el cálculo, hemos agregado 296,5 litros de M.C. y así tendremos 400 litros de C.C. listos para sembrar las botellas roller. El cultivo celular debe estar continuamente bajo agitación.

14.7 Producción de cultivos celulares en roller

La suspensión celular ya diluida para contener $0,3 \times 10^{6.0}$ cél/ml será usada para sembrar las botellas roller, a razón de 300 ml por botella ($90 \times 10^{6.0}$ células/botella). Si se quisiera hacer un cultivo de sólo 48 horas, se partiría de una concentración celular más elevada $0,4 \times 10^{6.0}$ cél/ml ($120 \times 10^{6.0}$ células/botella).

Procedimiento

a) Se esteriliza la línea de transferencia que llevará la suspensión celular a la sala de siembra de botellas roller.

b) Trabajando en una cabina de flujo laminar se distribuye 300 ml de suspensión celular por botella y se tapan las botellas con tapa rosqueada.

c) Se colocan las botellas en los tambores.

d) Se colocan los tambores en los soportes que girarán en el aparato roller a 8 revoluciones por hora durante 72 horas a 37°C (véanse 13.6.2, Figura 37).

Al fin de ese período se habrá operado el crecimiento celular, en

forma de grumos celulares adheridos a la pared interior de la botella. El número de células por botella fluctuará entre 500 y 600×10^6 . El cultivo estará así listo para pasar a la producción de virus (véase 14.10).

14.8 Producción de semillas de virus para cultivos

Cuando de acuerdo con los criterios descritos en 8.1, Producción de un antígeno inmunogénico y luego de ensayada frente al Banco de Sueros (Anexo 4) se decide incorporar una nueva cepa de virus a la vacuna, se procede de la siguiente forma:

Procedimiento

a) Se coloca un trocito de epitelio virulento en un mortero estéril.
b) Se agrega arena lavada estéril, 20 ml de M.M. y 3,0 ml de cloroformo (Merk Cat. 2445).

c) Se macera hasta tener un líquido espeso y uniforme.

d) Se centrifuga en centrífuga refrigerada a 3 000 r.p.m. durante 10 minutos.

e) Se toma una botella roller con cultivo de 48 a 72 horas de células BHK₂₁ de suspensión. Se elimina el M.C. y se enjuaga por 2 veces el cultivo celular con M.V. (ver 12.2) estéril. Se elimina el M.V. (ver 12.3).

f) Con el sobrenadante del virus centrifugado se inocula la botella a 37°C durante 30 minutos.

g) Se elimina el líquido de siembra, se colocan 200 ml de M.V. y se pone otra vez a rodar en el roller a 37°C .

h) Al cabo de 16 a 22 horas ya se habrá producido efecto citopático. Se cosecha ese virus que será sometido a todos los controles bacteriológicos, de infectividad, tipificación y subtipificación (ver 17.1, 17.2 y 17.3).

i) Se agrega cloroformo 0,33% v/v, se agita enérgicamente, se ajusta el pH a 7,6 con buffer glicocola (ver 12.10) se fracciona en tubos de ensayo o frascos de 10 ml con tapa de goma y precinto de aluminio, y se congela a -80°C en congelador eléctrico. A ese virus se le llama "semilla de semilla".

j) A partir de esa "semilla de semilla", se siembra directamente un mayor número de botellas roller sometidas a igual tratamiento.

k) Al producirse el efecto citopático, el virus se procesa de acuerdo con (h) e (i). Se toma muestra para control bacteriológico, titulación de infectividad, tipificación y subtipificación, se distribuye en frascos adecuados al volumen requerido para siembra y se congela a -80°C en

congelador eléctrico. Ese virus es llamado "semilla de uso" que dependiendo de la cepa de virus será un segundo o tercer pasaje de células BHK₂₁. El título infectante debe ser siempre superior a $10^{7.5}$ u.i. 50% ml.

Cada vez que se produce una semilla de virus es sometida a un ensayo consistente en hacer 3 pases sucesivos para descartar cualquier tendencia a desvío serológico que se pudiera presentar. Cada pase es tipificado y subtipificado.

La concentración de uso en los cultivos de virus en tanques o roller debe ser establecida para cada cepa de virus. En general oscila alrededor de 1,0 ml por litro.

14.9 Producción de virus en tanque

Tenemos como ejemplo el tanque 3 del esquema propuesto en 14.5.

1. A través de la línea de transferencia previamente esterilizada:

– Recibimos del tanque 2, 120 litros de C.C. con una concentración celular de $1,7 \times 10^{6.0}$.

– Por la línea de medio de cultivo previamente esterilizada agregamos 120 litros de M.C. (12.2) filtrado por filtro Seitz ORION (12.14).

2. Se hace circular el agua a 37°C por la cañería del tanque, se agita el cultivo por 30 minutos y se toma muestra para controles con una jeringa estéril de 50 ml.

Se hace control de pH que debe estar alrededor de 7,3 o 7,4 recuento celular, que debe estar alrededor de $0,8 \times 10^{6.0}$ y control bacteriológico. A través del filtro Dominick Hunter, se pasará aire en la superficie del cultivo a razón de aproximadamente 50 litros por minuto.

3. Se repiten los controles como descrito en 14,6. Si el pH fuera inferior a 7,1 y no se lograra controlarlo con aire en la superficie del cultivo se puede agregar aire en la entrada de profundidad a razón de 5,0 litros por minuto, cuidando que no se forme tanta espuma que pueda llegar a los filtros de aire.

4. A las 24 horas previo controles, se agregan 200 litros de M.C. y se repiten las operaciones descritas en 2 y 3.

5. 24 horas después la concentración celular debe ser de 1,6 a $2,0 \times 10^{6.0}$ cél/ml. Si todos los controles están correctos y previo ajuste del pH a 7,2 o 7,3, se cambia la circulación del agua de 37°C de la camisa por agua a 4°C y se deja enfriar el cultivo bajo agitación hasta que la temperatura baje a menos de 10°C. Entonces se suspende la agitación y se deja sedimentar las células. La circulación de agua a 4°C continúa.

6. Luego de 18 horas, las células estarán sedimentadas. Tomando una muestra de líquido sobrenadante se observará que la concentra-

ción celular es del orden de $1,0 \times 10^{5.0}$ cél/ml.

Se procede a eliminar el líquido sobrenadante por una salida especial en el fondo del tanque que permitirá salir el líquido, quedando las células adheridas al fondo del tanque (Figura 38).

En el fondo del tanque quedaron aproximadamente 6 litros de M.C. y prácticamente todas las células del cultivo.

7. Se adiciona M.V. filtrado por filtro Seitz ORION en un volumen suficiente para tener un recuento celular de $2,5 \times 10^{6.0}$ cél/ml. Se pone el cultivo en agitación y se cambia la conexión de agua a 4°C de la camisa del tanque por agua a 37°C.

8. Cuando la temperatura del cultivo comienza a subir se inocula aseptícamente la semilla de virus a razón de aproximadamente 1,0 ml x litro de cultivo.

9. Se controla el cultivo de virus cada 2 horas por medio de toma de muestras. Es particularmente crítico el control de pH que nunca podrá bajar de 7,2 siendo ideal el pH 7,4. El control se hará por adición de aire en superficie en forma continua, en profundidad en forma esporádica y si fuera necesario por adición suplementaria de buffer de glicocola (ver 12.10). En ese caso se ensayará un agregado de 4,0 ml por litro de cultivo hasta obtener el pH deseado.

Al comienzo del cultivo puede haber un leve aumento del número de células, pero luego el virus las atacará y comenzarán a aparecer teñidas de rojo por permeabilidad a la eosina y luego desintegradas hasta desaparecer.

10. Cuando el recuento celular indique menos de $1,0 \times 10^{5.0}$ células vivas x ml se enfriará el tanque y luego se suspende la agitación. Se toma una muestra para controles habituales, bacteriológicos, pH y para los controles de calidad.

14.10 Producción de virus en roller

1. Se parte de cultivos celulares en botellas roller producidas de acuerdo con 14.7.

Se toman 3 botellas cultivadas, se elimina el M.C. y se agrega 15 ml de solución de tripsina (ver 12.8). Se ponen las botellas en un cesto a rodar por 15 a 20 minutos en el aparato roller.

Al cabo de 15 minutos se agrega a cada botella 285 ml de M.C. Se introduce una barra magnética estéril 1 1/2" x 3/8" y se coloca en agitación magnética por 10 minutos.

Se hace recuento celular (ver 13.4). El recuento indicará la cantidad de células por botella. Dependiendo de esa cantidad se decide el volu-

men de M.V. que se va a usar. En general se ajusta a una concentración alrededor de $2.0 \times 10^{6.0}$ cél/ml.

2. En la cabina de flujo laminar se invierte cada botella de la producción (14.7) y se elimina el M.C., inyectándose enseguida el M.V. (10.3) conteniendo ya el inóculo viral (14.8) en la proporción establecida.

3. Las botellas vuelven a sus cestos y al roller a 37°C por el tiempo suficiente para producirse un ataque completo de las células. Esto se exterioriza porque las células se desprenden de la pared y aparecen formaciones mucoides, filamentosas de gran tamaño. El tiempo requerido es en general de 16 a 24 horas. El medio de mantenimiento se mantendrá límpido y permite apreciar el pH del cultivo.

4. En otra cabina de flujo laminar se cosecha el virus invirtiéndose las botellas sobre un embudo de acero inoxidable estéril conectado por tubuladuría estéril a un tanque especial para tratamiento con cloroformo.

Es conveniente observar cada botella antes de cosecharla, para descartar eventuales botellas contaminadas.

5. Se toma muestras del tanque para los controles habituales de pH y bacteriológicos y para los controles de calidad ya mencionados.

14.11 Tratamiento del virus con cloroformo

Tanto el virus producido en tanque como en roller será sometido a un tratamiento con cloroformo (Merk Cat. 2445) que tendrá la ventaja de remover restos celulares, lípidos, lipoproteínas y eventuales contaminantes que puedan estar en suspensión.

Procedimiento

1. Se coloca toda la suspensión vírica en el tanque especial para tratamiento con cloroformo y se hace circular agua a 4°C por la camisa externa del tanque. Cuando la temperatura de la suspensión es del orden de 10°C se agrega cloroformo a la concentración de 1,0% v/v. Esa concentración supera la solubilidad del producto.

2. Se agita intensamente a 110 o 120 r.p.m. durante 2 horas para dispersar y micronizar el cloroformo, de forma que tenga la mayor superficie de contacto posible con la suspensión vírica. Se puede usar un aparato emulsificador fuera del tanque, conectado en circuito cerrado. Se suspende la agitación y se deja sedimentar por 18 a 20 horas.

3. Al fin de ese período, el cloroformo no disuelto habrá sedimentado en el fondo del tanque junto con otros materiales precipitados y presentará el aspecto de una masa mucosa blanca.

4. Se sifona la parte límpida de la suspensión vírica dejando ese

sedimento en el tanque. Para ello se usa el dispositivo del fondo del tanque (Figura 38) y si no se dispone de ese modelo de tanque, por medio de un caño introducido desde la tapa hasta el nivel deseado "caño pescador". En este caso la suspensión vírica saldrá por presión positiva.

5. La suspensión vírica será clarificada por placas Seitz K2, en el filtro Setz Orion o centrifugada en centrífuga Sharpless o similar, y se envía al tanque de inactivación. Se toman muestras para controles de pH, bacteriológicos, título infectante y fijador (ver 17.1, 17.2 y 17.3).

15. INACTIVACION

Inactivar el virus quiere decir quitarle su capacidad de replicación, respetando su cápside proteico. Existen varias técnicas y varios inactivantes (ver Aspectos Generales, punto 8.2).

La inactivación del virus en el laboratorio de producción experimental del CPFA se hace por la acción de la etilenimina binaria (BEI) a una concentración de 3 mM sobre la suspensión vírica a 26°C y en agitación durante 24 horas. También se puede inactivar usando una concentración de 1,5 mM de BEI a la temperatura de 37°C durante 24 horas. En el CPFA se usa actualmente la primera técnica.

15.1 Preparación del inactivante

Materiales

- Hidrobromido de 2-bromo-etilamina (BEA) $\text{BrCH}_2 \text{CH}_2 \text{NH}_3 \text{Br}$. PM 204.90 (MERK Cat. 820.176).
- Hidróxido de sodio P.A. (MERK Cat. 6498).
- Tiosulfato de sodio 5-hidrato P.A. (MERK Cat. 6516) PM = 248.18.
- Solución de β naftol-violeta (ICN Pharmaceutical Inc. Plainners N.Y., USA) al 1,0/ en agua destilada.
- Agua destilada estéril a 37°C.
- Balanza de precisión.
- Baño de agua a 37°C.
- Campana con exhaustor.
- Agitador y barra magnética.
- Frasco u otro recipiente con sifón y conexión para el tanque inactivación.
- Recipiente con 10 litros de solución 1M de tiosulfato de sodio 248.14 g/litro.

PREPARACION DE UNA SOLUCION DE 0,1 M DE BEI, EN UNA SOLUCION
0,175 M DE Na OH (7,0 g/LITRO) (POR CICLIZACION DE BEA)

Todas las operaciones que impliquen uso del BEI deben ser hechas usando máscara contra gases, guantes de goma y delantal de goma.

Las transferencias entre balones deben ser hechas en la cabina exhaustora.

Toda salpicadura de BEA debe ser recogida y tratada con solución de tiosulfato 1,0 M o ácido cítrico al 1,0 por ciento, pues cualquier pequeña porción de BEA que caiga en un medio alcalino puede generar BEI.

Todo el equipo en contacto con BEI debe ser inmediatamente tratado con solución de tiosulfato.

Supongamos que vamos a inactivar 100 litros de virus. Necesitaremos 3,0 litros de solución de BEI.

Procedimiento

a) Pesar $7 \times 3 = 21$ g de Na OH y disolverlos en 3,0 litros de agua deionizada a 37°C bajo agitación en un balón con sifón y barra magnética mantenido en estufa a 37°C.

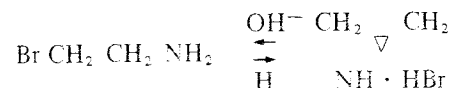
b) Agregar 1,5 ml de solución β naftol-violeta. La solución tomará un color violeta.

c) Pesar $20,49 \times 3 = 61,47$ g de BEA y colocarlo en otro balón con sifón y barra magnética mantenido hasta entonces en estufa a 37°C.

d) En la cabina exhaustora y por circuito cerrado entre balones transferir la solución de soda al balón conteniendo el BEA. La solución continuará presentando un color violeta. Poner a agitar sobre un agitador magnético a 37°C ya sea en la estufa o en baño de agua.

Al producirse la ciclización del BEA, con formación de BEI, el color pasará de violeta a naranja debido al descenso del pH. Ese cambio de color es indicativo de que se operó la reacción deseada.

La reacción química que se produjo es la siguiente:



e) Al completarse 60 minutos a 37°C y habiéndose observado el cambio de color, la solución de BEI está lista para uso.

15.2 Inactivación de la suspensión vírica

Materiales

a) Frasco con dispositivo para transferencia estéril, y conexión para tanque, conteniendo la solución 0,1M de BEI, según 15.1.

b) Cloroformo (PA MERK Cat. 2445).

c) Recipiente con 10 litros de solución 1,0 M de tiosulfato de sodio 248.14 g/litro.

Tanques de inactivación

Tanques con agitación magnética y doble pared con circulación de agua a 26°C (dependiendo de la técnica seguida puede ser 37°C) (Figura 38).

Es importante que este tanque no tenga espacios muertos o fondos de saco, donde pueda quedar virus no alcanzado por el BEI y la temperatura de 26°C.

Cuando es posible, se aconseja hacer el agregado de BEI al virus en un tanque, mezclarlo a 26°C durante 2 horas y luego transferirlo a otro tanque. Cuando esto no sea posible, se aconseja introducir el virus al tanque por una abertura sobre la pared lateral y luego de efectuada la inactivación se remueve el virus introduciendo un caño estéril por la tapa, "caño pescador" y se retira el virus por presión positiva, no tocando el virus que haya quedado en el fondo del tanque aunque los espacios muertos estén llenos de cloroformo.

Otro sistema consiste en hacer "purgas" de virus por el orificio inferior del tanque, para que pase a ser ocupado por virus ya mezclado al BEI.

Como todos los laboratorios no tienen tanques ideales, el principio general es: a) evitar los espacios muertos y b) toda la masa vírica debe ser sometida a idéntico tratamiento.

Debido a que el virus después de inactivado pasará al área limpia, es de gran importancia disponer de tanques de inactivación en cantidad suficiente para poder retener el virus después de inactivado, en refrigeración a 4°C hasta que se haya hecho el control de no infectividad (17.5) o por lo menos que se hayan hecho los dos primeros pases en células.

Procedimiento

a) Se esteriliza y deja enfriar el tanque de inactivación.

b) Se agrega cloroformo en cantidad suficiente para llenar los espacios muertos que quedan sobre las válvulas de salida inferior (ver Figura 50).

El uso del cloroformo es para evitar que quede parte del virus sin ser sometido a la temperatura de 26°C y a la acción del BEI.

c) Se recibe en el tanque el virus tratado por cloroformo y clarificado según 14.11 y se calienta a 26°C.

d) Se conecta el frasco que contiene el BEI a una abertura superior del tanque con rosca para conexión estéril. Se transfiere el BEI del balón al tanque por presión positiva.

e) Se cierra el registro de la entrada del tanque y se desconecta el balón. Todas las partes que estuvieron en contacto con el BEI son tratadas por la solución de tiosulfato.

f) A las 2 horas de haber agregado el BEI se toma una muestra para controles de pH y bacteriológico.

Fuera de estos controles, constituye una excelente norma, que a las 2, 4, 6 y 8 horas después de agregado el BEI se tomen muestras para titulaciones del virus.

La muestra de virus debe ser tratada por una solución de tiosulfato estéril, calculada para quedar a una concentración final de 10 mM. Esto tiene la finalidad de evitar que continúe la acción del BEI. El título debe decaer de acuerdo con una cinética de primer orden (ver Aspectos Generales, punto 8.2).

g) A las 24 horas se enfría el tanque a 4°C y se toma una nueva muestra para controles bacteriológicos, pH, título fijador, masa antigénica e inocuidad.

h) El virus quedará en el tanque de inactivación hasta que se hayan hecho por lo menos los dos primeros pases en células del control de inocuidad (ver 17.5).

16. FORMULACION DE LA VACUNA CON ADYUVANTE OLEOSO

Una vez que la suspensión vírica monovalente fue inactivada, y pasó por todos los controles de pureza bacteriológica, pH, título infectante antes de inactivar, título fijador del complemento antes y después de inactivar y si posible masa antigénica, estará pronta para ser incorporada en la vacuna.

Como en general las vacunas son trivalentes, también las otras valencias deberán estar prontas para ser mezcladas antes de proceder a la emulsificación. En esta etapa las suspensiones víricas se encuentran en cámara fría a 4°C en el área limpia del laboratorio.

Como ya fue descrito (ver Aspectos Generales), (ver 8.3), las vacunas con adyuvante oleoso son emulsiones tipo agua-en-aceite, de ahí que la suspensión vírica debe ser dispersada en el seno de la fase oleosa

para lo cual se necesita de agentes emulsificantes y equipo especial de emulsificación, equipos de control y una serie de tanques interligados. A continuación se detalla el equipo de producción y control.

16.1 Equipo

- Conductivímetro (Figura 59).
- Centrífuga refrigerada.
- Estufa a 37°C y 56°C.
- Cabina de flujo laminar.
- Densímetro con faja de sensibilidad para pesos específicos entre 0,800 y 0,900.
- Viscosímetro tipo Brookfield modelo LTV o similar (Figura 45).

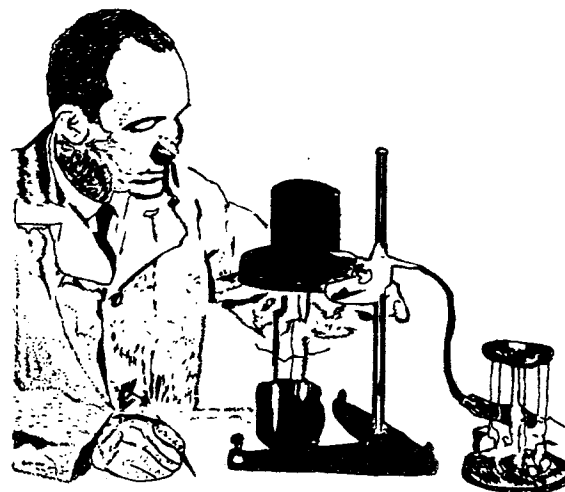
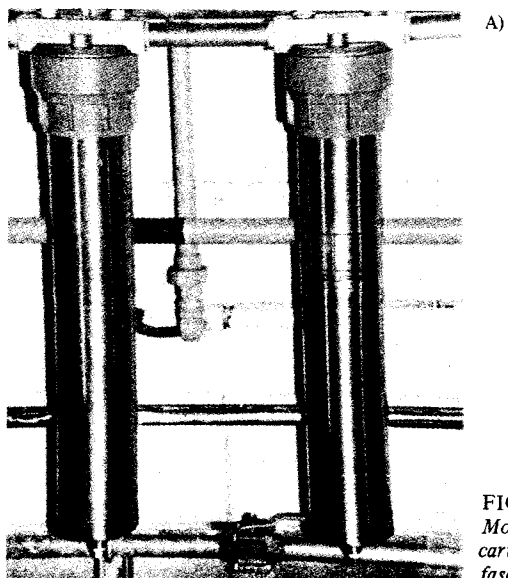


FIGURA 45
Viscosímetro

- Filtro Millipore 293 mm (ver 12.14.2).
- Placas AP25, AP20, AW03, GS 0,22 µm.
- Cartuchos clarificantes CP15, CP20 o CP19.
- Cartuchos esterilizantes CVGL.
- Estructura y montaje completo en la línea de cartuchos. Los cartuchos esterilizantes deben ser esterilizados por vapor (Figuras 46a y b).
- Emulsificador de mesa Standard Model (Silverson Machines Ltd).

Waterside, Cheshan Buckinghamshire, England HP5 1P2) (Figura 47).

– Emulsificadores para vacuna (Calderaria e Mecanica INOX, Avda Papa Joa XXIII, Maua, Sao Paulo, Brasil) (Figura 48).



FIGURAS 46a y b.
Montaje de filtros de
cartucho para filtrar la
fase oleosa.

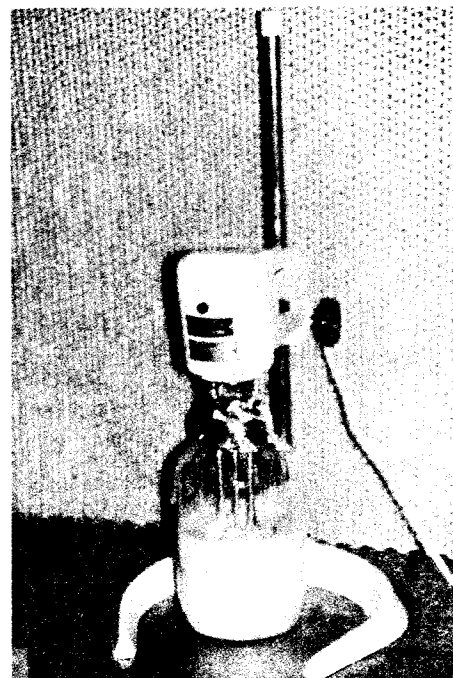
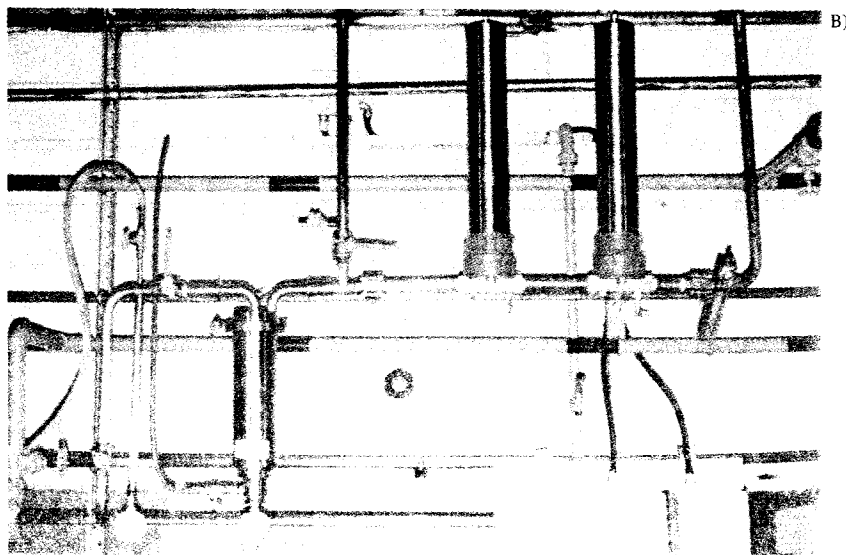


FIGURA 47
Emulsificador de mesa
Silverson para trabajos
experimentales
colocado en cabina de
flujo laminar

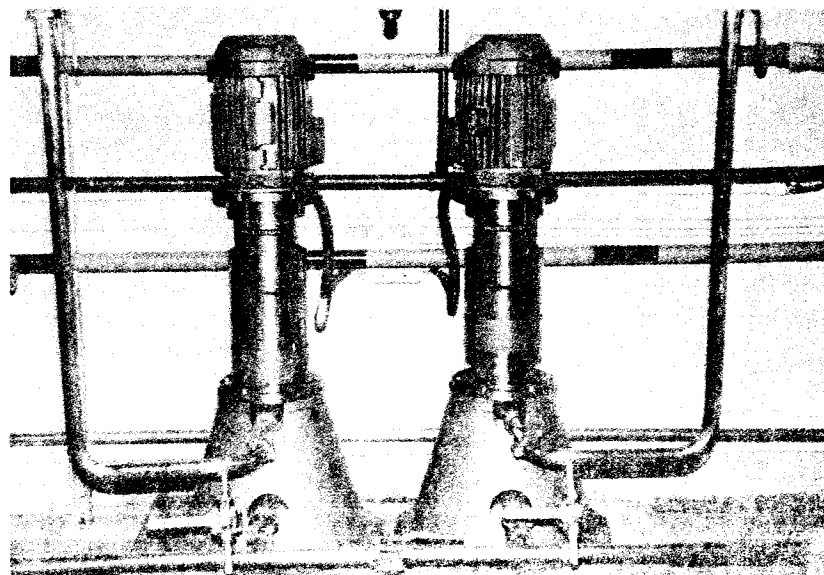


FIGURA 48
Emulsificadores para vacuna
instalados

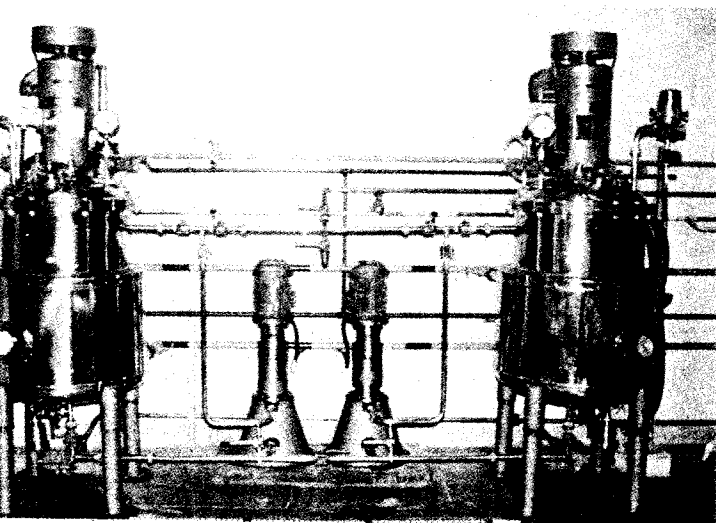


FIGURA 49
Tanques de
mezcla,
conectados
a los
emulsificadores

— Tanques de mezcla, conectados a los emulsificadores (Figura 49).
La Figura 50 presenta el esquema de los tanques imprescindibles en los sectores de emulsificación y envasado.

16.2 Esterilización de los tanques y aparatos emulsificadores

Inmediatamente después de uso, se debe eliminar toda el agua de la camisa de refrigeración (cámara) y se deben limpiar los tanques y aparatos emulsificadores por pase de vapor fluente, dejando abiertas todas las salidas, para la eliminación de todo el material oleoso.

1. Antes de comenzar la esterilización propiamente dicha, se debe verificar que la camisa de refrigeración no contenga agua y se pasa otra vez vapor fluente por los tanques y aparatos emulsificadores en una sola operación. El vapor ingresa por el tanque 1, pasa por los emulsificadores y sale por el tanque 2. Las salidas inferiores de todos los equipos deben estar parcialmente abiertas para eliminación de condensados.

2. Se comienza a subir la presión de todo el sistema a 15 lbs/pulgada dejando parcialmente abiertas las salidas y conexiones con los filtros que necesitan ser esterilizados. Durante el período de ajuste de presión es conveniente cerrar los registros de los aparatos emulsificadores, que pueden sufrir si hubiera variaciones bruscas de presión.

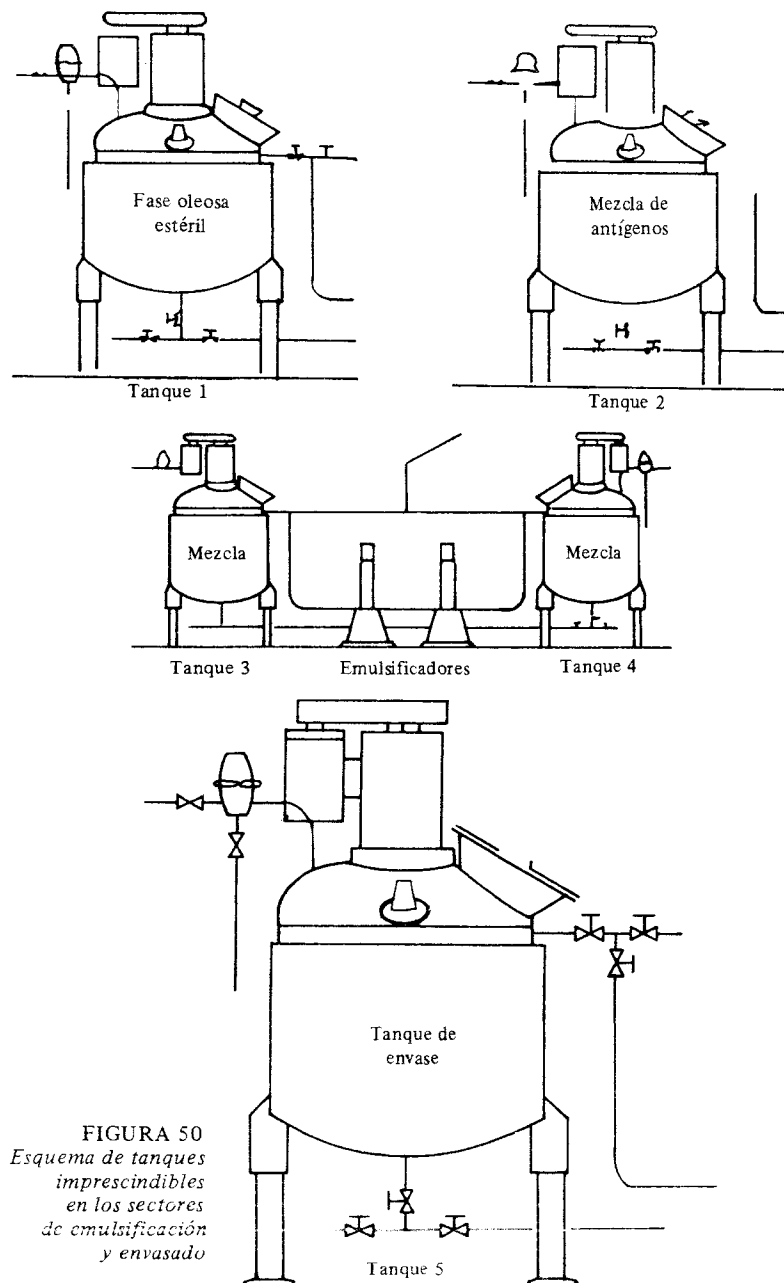


FIGURA 50
Esquema de tanques
imprescindibles
en los sectores
de emulsificación
y envasado

3. Cuando la presión quedó estabilizada a 15 lbs/pulgada², se abren los registros de los aparatos emulsificadores, y se continúa la esterilización por 30 minutos más.

4. Se cierra la entrada del vapor y antes de que la presión caiga totalmente, se abre la entrada del aire regulado a 10 lbs a través de los filtros Dominick Hunter. Periódicamente se eliminan los condensados por aberturas rápidas de las salidas inferiores de los tanques, manteniendo siempre presión positiva.

El tanque de envase núm. 5 puede ser esterilizado en serie con el resto del equipo, o en forma independiente, de acuerdo con la técnica general de esterilización de tanques descrita en 14.4.

Los tanques 1 y 2 del esquema (Figura 50) se esterilizan por separado.

16.3 Producción de vacuna oleosa en forma de emulsión primaria

Materiales

— *Aceite mineral blanco refinado*. El Marcol 52 (Exxon Corp., USA) es el aceite más extensamente usado en la producción de vacuna con adyuvante oleoso.

Es un producto aprobado por todos los Codex europeos y por la Pharmacopeia y la Food & Drug Administration de los Estados Unidos para uso farmacéutico.

Tiene un peso específico de 0,821 a 25°C y una viscosidad de 10 cps a igual temperatura. Pasa las pruebas de toxicidad por inoculación intraperitoneal en ratones jóvenes (Test de Berlin, Annals of Alergy, vol. 20, págs. 472-490, 1962). Para su mejor estabilidad y como agente antioxidante contiene hasta 10 ppm de dl-alpha-tocopherol. Pueden ser usados aceites de otras marcas desde que reúnan las mismas características.

— *Emulsificante*.—Montanide 888 — ether de anhydromannitol octodecenoato-HLB 5.0.

— Montanide 80 — monooleato de manitol HLB = 2,6 ambos de SEPPIC, 70 Champs Elysées, 75008 Paris, France.

— Arlacel A — monooleato de manitol (SANDRIA, Box 800, Norwalk CT, USA 06856).

— *Suspensión vírica*. En forma mono, bi o trivalente, inactivada y controlada según 15.2, 17.1 a 17.4.

— *Merhiolate*. Thimerosal Lilly, Powder núm. 20.

— Medios para control bacteriológico (ver 12.12).

— Equipo de control descrito en 17.1.

Procedimiento

1. Se mezcla el Marcol 52 y el Montanide 888 (en el CPFA se usa sólo este emulsificante) en la proporción de:

90% Marcol 52

10% Montanide 888

Se debe colocar primero el Marcol 52 en el tanque y luego agregar el Montanide 888 estando el Marcol 52 en agitación.

2. Se somete la mezcla a filtración esterilizante por placas Millipore en filtro montado con placas clarificantes AP25, AP15, AW03, placa separadora AP32 y esterilizante PH 0,3 µm, o por filtro de cartucho clarificante CP19 o CP15 y CP20 y esterilizante CVGL, montados en la línea.

La mezcla filtrada es recibida en el tanque estéril (Tanque 1 de la Figura 44). En casos de filtración por placas es conveniente calentar la mezcla a 50 o 60°C, lo que disminuye su viscosidad y facilita la filtración. Se enfría el medio filtrado a 4°C por circulación de agua fría por la camisa (cámara) del tanque.

3. Se hace la mezcla de virus que se va a usar. Se puede agregar Merthiolate Lilly a razón de 1:30.000. Se mantiene el virus a 4°C por circulación de agua fría por la camisa del tanque (Tanque 2 de la Figura 50).

4. Se transfieren 100 litros de aceite con emulsificante del Tanque 1 al Tanque 3 y se pone en agitación. Se transfiere lentamente la suspensión vírica del Tanque 2 al Tanque 3. La adición debe ser lenta, regulada para durar 10 minutos aproximadamente. A medida que el volumen va aumentando se aumenta la velocidad de agitación. Cuando se completó el agregado de suspensión vírica se agita por 5 minutos a la velocidad máxima. Se toman muestras de esta mezcla para control de emulsión (véase 17.6).

5. Se pasan los 200 litros de premezcla del Tanque 3 a través de los emulsificadores 1 y 2 simultáneamente y se recogen en el Tanque 4, donde quedan en agitación. Se toman muestras para controles de emulsión (ver 17.6).

6. Si fuera necesario, se emulsifica otra vez la emulsión, pasándola del Tanque 4 al Tanque 3 a través de dos emulsificadores.

Se toman nuevamente muestras para controles de emulsión (ver 17.6) y si la conductividad es negativa >10.0 M Ohms y la prueba de gota demuestra una emulsión correcta se pasa la vacuna al Tanque de mezcla final para envase, donde se juntará con otras partidas de 200 litros emulsificadas en la misma forma. Toda la vacuna contenida en el Tanque 5 en un momento dado, después de debidamente mezclada, constituye una partida o serie de vacuna.

Al tomar la muestra se aprecia que la vacuna adhiere a la pared del

tubo. La observación microscópica muestra gotas pequeñas y uniformes de fase acuosa, dispersas en una fase continua oleosa (Figura 51).



FIGURA 51

Pequeñas gotas de antígeno dispersas en una fase oleosa continua

Dosis y vía de aplicación

La dosis de esta vacuna para bovinos es de 5,0 ml, de la cual 2,5 ml corresponde a la suspensión vírica y 2,5 ml a la fase oleosa.

La vía de aplicación más aconsejada es la intramuscular profunda en el tercio superior del pescuezo. También puede aplicarse por vía subcutánea, pero en algunos animales se produce una reacción local que perdura mucho tiempo afectando solamente el aspecto estético.

En la especie porcina se puede aplicar la dosis de 1,5 ml por vía intramuscular profunda en el pescuezo en animales adultos y por vía intraperitoneal en animales jóvenes. No se aconseja la vía subcutánea. Para la especie porcina es más indicada la vacuna oleosa de emulsión doble (ver 16.4).

En la especie ovina se puede aplicar la dosis de 2,0 ml por vía intramuscular o intraperitoneal. La vacuna con adyuvante oleoso induce en la especie ovina una inmunidad sólida y de larga duración.

16.4 Vacuna de doble emulsión

La vacuna de doble emulsión producida en el CPFA sigue la fórmula descrita por W.J. Herbert (The Lancet, October 16, 1965, p. 771).

Consta de una vacuna de emulsión primaria (16.3) dispersada en el seno de una fase acuosa, por medio de acción mecánica y de un emulsificante hidrofílico de alto HLB (balance hidrofílico/lipofílico, Tween 80). La fase acuosa es una solución salina tamponada.

Materiales

- Tween 80 – polyoxyethylene monooleato de sorbitan HLB = 15,0.
- Solución salina tamponada (ver 12.11).
- Vacuna de emulsión primaria.

Procedimiento

1. Se prepara una solución al 2,0 por ciento de Tween 80 en PBS. Se agita y calienta para disolver.

2. Cuando el Tween está totalmente disuelto se filtra por filtro Millipore 253 mm montado con placas AP25, AW03, separador AP32 y placa GS 0,22 μm .

3. Se coloca la solución en el Tanque 1 y se agrega lentamente la vacuna de emulsión primaria sobre ella estando la masa en continua agitación. Cuando se igualaron los volúmenes de ambas fases ya se tendrá una emulsión doble, pero para homogeneizar más la emulsión se para por una vez a través del aparato emulsificador.

El producto final tendrá un aspecto lechoso. Al tomar una muestra se verá que no adhiere a la pared del tubo, se mezcla con el agua y es conductor de la corriente eléctrica (ver Controles en 17.6).

El aspecto microscópico muestra gotas grandes de emulsión primaria dispersas en una fase continua acuosa. Otra característica de esta emulsión que no se ve en la emulsión primaria, es la aparición de movimiento Browniano a la observación microscópica (Figura 52).

Dosis y vía de aplicación

Debido a que la vacuna de emulsión doble tiene un 50 por ciento de fase acuosa sin componentes activos desde el punto de vista inmunogénico, el volumen de la dosis debe ser el doble que en la emulsión primaria para contener igual cantidad de inmunógeno e igual poder inmunogénico.

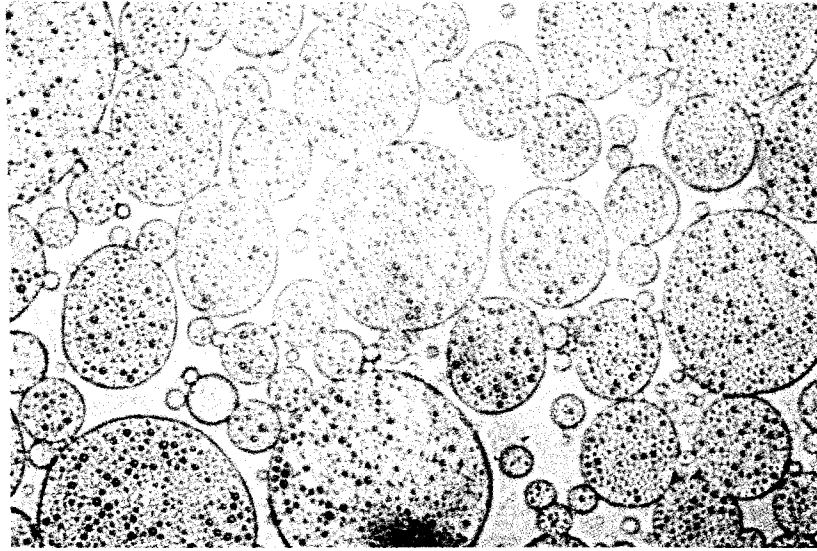


FIGURA 52

Grandes gotas de emulsión primaria dispersas en una fase continua acuosa

La vacuna de emulsión doble es particularmente indicada en la especie porcina. En trabajos preliminares realizados en el CPFA se comprobó que esta formulación produce menos reacciones tisulares adversas en cerdos que la vacuna de emulsión primaria (ver Aspectos Generales: Respuesta inmunitaria a las vacunas con adyuvante oleoso).

La vía de aplicación preferencial es la intraperitoneal para cerdos jóvenes de hasta 2 meses de edad. En cerdos adultos se debe usar la vía intramuscular profunda en la porción superior del pescuezo.

En ovinos no se han encontrado diferencias importantes en la reacción producida por ambas formulaciones, pero todavía no hay gran experiencia al respecto.

16.5 Producción de vacuna con adyuvante oleoso, emulsión primaria, a partir de virus concentrados

Cuando se produce la replicación vírica, de acuerdo con la forma descrita en el punto 14, en general no es necesario hacer concentración

de virus para obtener una vacuna de buena calidad. La cantidad de partículas víricas intactas 140S por dosis dependerá de la concentración inicial en partículas víricas en el cultivo producido.

Si se desea que la vacuna posea una mayor concentración viral, habrá que recurrir a algún procedimiento de concentración.

En el CPFA se han ensayado tres procedimientos:

- a) concentración de virus por PEG 6000
- b) concentración de virus por ultrafiltración – Membranas Pellicon
- c) concentración por adsorción de virus sobre hidróxido de aluminio y eliminación del sobrenadante.

Cualquiera de esos procedimientos permite hacer una reducción de volumen, con recuperación de altos porcentajes del virus contenido en la suspensión vírica original. Esa recuperación es fácilmente demostrable por trabajos experimentales en los que se evalúa la recuperación de virus por título infectante, por título fijador del complemento y por masa antigénica. En trabajos de inmunidad sobre bovinos, hechos con virus concentrados por hidróxido de aluminio, y muchos ensayos hechos en el CPFA, se comprobó que el uso de virus concentrado por ese procedimiento y también por ultrafiltración y por PEG pueden ser usados en vacunas con adyuvante oleoso.

Resultados mucho menos claros fueron obtenidos cuando se intentó mejorar la respuesta inmunitaria en bovinos por aumento de la concentración viral en 3 y hasta 10 veces la concentración original.

La buena calidad y concentración del virus desde el momento de su replicación industrial sobre el cultivo celular, el buen manejo de la suspensión vírica, la correcta formulación de la vacuna y su buen manejo posterior son fundamentales para que las vacunas induzcan la mejor respuesta inmunitaria.

Errores cometidos en cualesquier de esas etapas, no serán subsanados por procedimientos de concentración de virus.

16.6 Instrucciones para el uso de la vacuna

Toda vacuna que salga del laboratorio debe estar envasada en un frasco correcto, de material inerte y cierre de goma con capote de aluminio. Debe además estar impreso en forma indeleble con los datos esenciales: volumen de la dosis, condiciones de conservación, fecha de vencimiento, etcétera.

También debe acompañar una hoja con instrucciones generales de manejo (ver Figura 53).

El embalaje debe ser hecho en cajas de material aislante (Isopor).

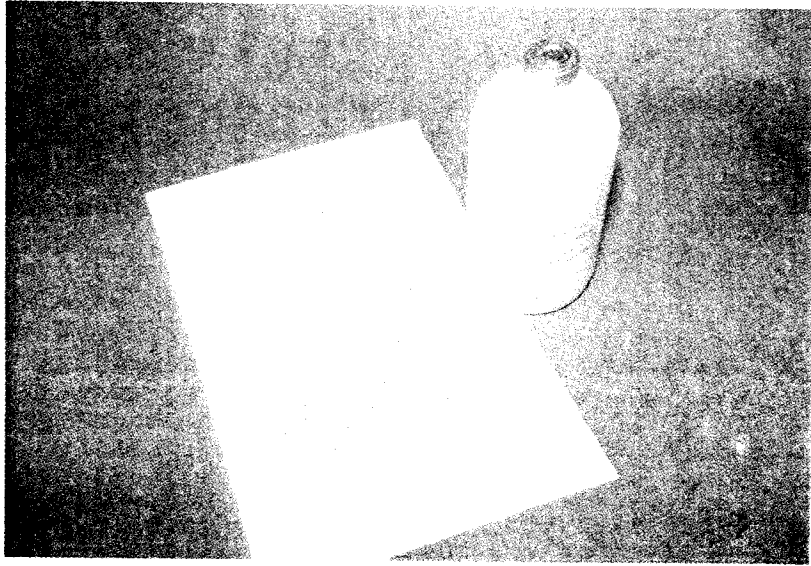


FIGURA 53

*Frasco de polipropileno, tapa de goma sintética y capacete de aluminio.
Frasco con instrucciones impresas*

que protege la vacuna de las temperaturas altas (ver Figura 54). Dentro de las cajas también se deben colocar "sachets" refrigerantes congelado. Es preferible el uso de estos "sachets" al uso de hielo, porque éste al derretirse mojaría todo el contenido. No debe usarse hielo seco para vacunas.

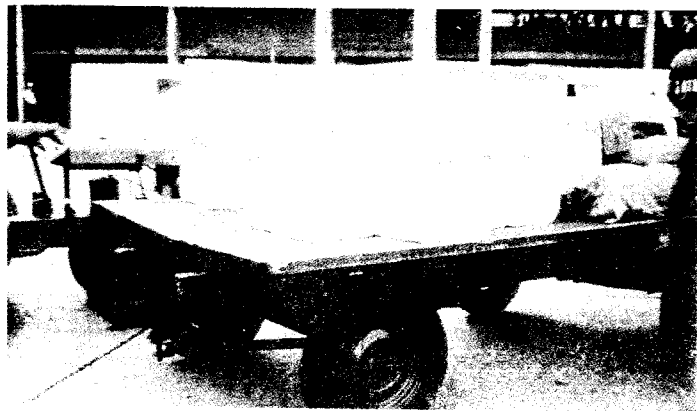


FIGURA 54

Vacuna embalada en cajas aislantes de vapor

II. Controles de proceso y producto final

17. CONTROLES DE PROCESO

17.1 Controles Microbiológicos

La contaminación por bacterias, hongos y levaduras constituye uno de los problemas más frecuentes y que causan mayores perjuicios en un laboratorio de cultivos de tejidos.

Con menos frecuencia se presentan contaminaciones por *Mycoplasmas* que son también altamente perjudiciales y más difíciles de controlar. Todas las operaciones con cultivos de tejidos deben ser asépticas y los cultivos estériles. Al aparecer cualquier indicio de contaminación él o los cultivos contaminados o sospechosos deben ser eliminados. En trabajos de cultivos de tejidos no se puede convivir con la contaminación.

Debido a la frecuencia con que las contaminaciones bacterianas y por hongos suelen aparecer es conveniente tener siempre células de reserva prontas para una rápida sustitución (ver 13.2 y 13.6.3).

El uso de antibióticos ayuda a evitar las contaminaciones y hace que muchas veces pequeñas contaminaciones por gérmenes sensibles sean eliminadas sin aparecer en los controles. Por otro lado, los antibióticos constituyen un arma de doble filo ya que algunas contaminaciones pueden quedar en estado latente (enmascaradas) por mucho tiempo no siendo detectadas en los controles, pero causando efectos perjudiciales sobre la producción de células y virus. A veces contaminaciones latentes eclosionan en momentos en que ya la producción alcanzó un gran volumen y las pérdidas económicas son mucho mayores que cuando se detectan precozmente.

Lo ideal es trabajar sin antibióticos en el "Banco de Células" (ver 13.2), así todos los controles bacteriológicos, serán valederos. El propio medio de cultivo para células constituye un medio muy rico para el desarrollo bacteriano y al ser incubado a 37°C revelará cualquier contaminación.

Todos los trabajos del "Banco de Células" realizados con las células de *stock*, destinadas a congelación y para reposición deben ser hechos sin antibióticos.

Los controles de esterilidad deben ser hechos en todo cultivo celu-

lar. cada vez que se haga cualquier operación con ellos, repique de células, transferencia de un recipiente a otro, recuento celular, etcétera. Trabajando de esta manera se tendrán dos ventajas de la mayor importancia en términos industriales:

a) Detección precoz, con lo que se ahorra los gastos de la producción de volúmenes mayores (gastos de materiales y de tiempo útil de producción) y

b) se facilita la localización de la causa o puerta de entrada de la contaminación.

Los controles de esterilidad bacteriológica y micológicos deben ser hechos principalmente en las siguientes etapas:

En medio de cultivos. Durante e inmediatamente después de terminar la filtración.

En medio de cultivo sin antibióticos. Se hará autocontrol en estufa a 37°C durante 7 días. En todo autocontrol si aparece alguna turbidez debe hacerse observación microscópica. Para enriquecer el campo microscópico es conveniente centrifugar una muestra.

En todos los medios de cultivo para células y virus, con y sin antibióticos, se hará control en los medios bacteriológicos descritos en 12.12.

En cultivos celulares en monocamada -en cada subcultivo.

En cultivos celulares en suspensión en frascos - en cada subcultivo.

En cultivos en suspensión en tanques - en cada operación de agregado de células o medio. En cada toma de muestra para controles.

En cultivos de virus en tanques. Al sembrar el virus 2 o 3 veces durante el cultivo al hacer la toma de muestras para observar pH o efecto citopático. Al terminar el cultivo.

Tanque de inactivación de virus. Al comienzo y final de la inactivación.

Controles de inocuidad. En cada pase.

Virus inactivados. Al recibirlo en el área limpia. Al hacer las mezclas polivalentes.

Vacuna final. Al comienzo, durante y final del proceso de envase.

SIEMBRAS EN MEDIO DE CULTIVO

Si bien son muchos los medios de control bacteriológico que se pueden usar, resulta práctico y confiable usar los medios descritos en 12.12:

Caldo triptosa fosfato T.P.B. en frascos de 120 ml con 70 ml de medio.

Caldo de thioglicolato en frascos de 120 ml con 70 ml de medio.

Agar de Sabouraud en tubos de ensayo.

Debido a que la mayor parte de los medios a controlar tienen anti-

bióticos los frascos deben ser sembrados con volúmenes pequeños de aproximadamente 0.2 ml e incubados durante 7 días a 37°C.

Obviamente, durante el proceso de producción no se puede esperar 7 días para pasar a la próxima etapa, pero felizmente la mayoría de los contaminantes habituales de los cultivos celulares se hacen evidentes, sobre todo en el medio T.P.B. entre 18 y 24 horas después de sembrados. Pocas veces un cultivo de T.P.B. que presenta un aspecto límpido a las 24 horas, aparece posteriormente contaminado.

En todas las etapas intermedias de la producción, el T.P.B. es el medio de control de preferencia, siendo por lo tanto el más usado.

OBSERVACION MICROSCOPICA

Cuando se desea confirmar una contaminación microbiana y/o conocer el agente causal se hace una observación microscópica, con microscopios de óptica directa con lente ocular 10X y objetivo de inmersión 100X.

Coloración—Para visualización de bacterias y levaduras es usada la coloración de Gram.

Materiales -Microscopio con lente de inmersión.

Asa de platina.

Porta objetos.

Colorante de Gram (ver 12.15).

Procedimiento

1. Se hace un frontis del cultivo con una asa de platino sobre un porta objeto desengrasado con alcohol. Si el medio es líquido puede ser centrifugado para enriquecimiento.

2. Se deja secar al aire y luego se fija sobre la llama de un mechero Bunsen.

3. Se cubre el porta objetos con la solución de cristal violeta, se deja actuar 1 minuto. Se enjuaga suavemente con agua corriente y se deja escurrir.

4. Se coloca solución de yodo de Gram y se deja actuar por 1 minuto. Se enjuaga suavemente con agua corriente y se deja escurrir.

5. Se coloca etanol a 95 por ciento y se deja actuar por un minuto. Se enjuaga en agua corriente y se deja escurrir.

6. Se cubre con solución de safranina y se deja actuar por 10 segundos. Se enjuaga en agua corriente y se deja secar.

7. Se observa en el microscopio con lente de inmersión, usando aceite de inmersión y lente 100X.

Las bacterias Gram positivas y las levaduras aparecerán teñidas en color azul violeta oscuro. Las bacterias Gram negativas aparecerán color rosa.

OTROS CONTROLES BACTERIOLÓGICOS

Si bien todas las operaciones con células deben ser bacteriológicamente estériles, los diversos componentes del medio de cultivo no son estériles hasta el momento en que son: a) autoclavados o b) filtrados por filtros esterilizantes.

La filtración, sobre todo la que se hace con filtro de profundidad, será tanto más eficiente cuanto menor sea la carga bacteriana de los medios a filtrar: por ello es conveniente tener una idea de la magnitud de esa carga. Los dos elementos que más deben ser controlados son: a) el suero bovino y b) el medio de cultivo integral.

Una forma simple de controlar esa carga microbiana consiste en hacer una serie de diluciones decimales del medio en un diluyente estéril. Cada una de esas diluciones será sembrada en medio de cultivo de preferencia placas de agar nutritivo y así se determinará el número de bacterias por milímetro de medio original.

El suero bovino, si ha sido tratado de acuerdo con un proceso correcto, debe presentar cargas bacterianas inferiores a $10^{3.0}$ gérmenes por milímetro después de la clarificación. Igualmente el medio de cultivo integral debe presentar cargas inferiores a $10^{3.0}$ gérmenes por milímetro antes de la filtración.

Si las cargas bacterianas son elevadas indican que se debe revisar el proceso de obtención de esos materiales y la metodología general.

Cargas bacterianas elevadas no sólo comprometen la eficiencia de las filtraciones, sino que incorporan toxinas al medio de cultivo que afectan su calidad.

CONTAMINACIONES POR MYCOPLASMAS

Las contaminaciones de los cultivos por microorganismos del género *Mycoplasma*, muchas veces referidos como P.P.L.O. (del inglés Pleuro Pneumoniae Like Organism) son bastante frecuentes en cultivos celulares. La infección es a veces inaparente y otras veces causa severas lesiones citopáticas que imposibilitan la utilización de los cultivos. En algunos casos la acción es moderada y afecta el desarrollo celular particularmente en los cultivos de más de 24 horas, la adherencia de las células a la

superficie del vidrio, o su conservación cuando el cultivo es refrigerado a 4°C. En los cultivos de células en suspensión muchas veces se ven células gigantes, opacas y granulosas. Cuando los cultivos presentan algunas de esas características siempre se debe pensar en la posible presencia de *Mycoplasmas*. La fuente más frecuente de contaminación es el tracto respiratorio superior del hombre ya que muchos *Mycoplasmas* son habitantes normales de esa región. Se han descrito casos en que la tripsina y el suero bovino han sido las puertas de entrada. Cuando algún cultivo se contamina, es muy frecuente la contaminación de los otros cultivos que se hagan en el mismo laboratorio debido a la formación de aerosoles.

El diagnóstico de *Mycoplasmas* no es tan simple como con las bacterias y hongos, y requiere medio de cultivo y tecnología especial. En el Anexo 1 se incluye una lista de los medios de cultivo específicos de DIFCO y una publicación didáctica sobre el tema.

De cualquier manera, cuando aparezcan algunas de las manifestaciones antes mencionadas, es una práctica muy saludable parar momentáneamente los cultivos, lavar y desinfectar todo el laboratorio y después comenzar con una línea celular nueva que venga de cultivos libres de antibióticos.

Los antibióticos comunes antes mencionados tienen poca o ninguna acción frente a los *Mycoplasmas*. Otros antibióticos como Kanamicina y Tylan son algo más eficientes, pero no resuelven satisfactoriamente el problema.

Al igual que en las contaminaciones bacterianas, los antibióticos son a veces contraproducentes, pues enmascaran la contaminación. Los cultivos celulares sin antibióticos en el Banco de Células son también muy indicados para detectar los *Mycoplasmas*.

17.2 Titulación de infectividad

La titulación de infectividad del virus consiste en la medición de las partículas infectantes por unidad de volumen que el virus tiene para un sistema de prueba determinado. Las partículas infectantes constituyen una pequeña minoría en el conjunto de partículas virales presentes en una suspensión vírica, por lo tanto su medición no dará un valor absoluto sobre la concentración vírica. No obstante, si se trabaja dentro de determinadas técnicas de titulación sobre suspensiones víricas producidas siempre en la misma forma, la titulación de infectividad dará una buena indicación sobre la suspensión vírica producida y su aptitud para ser usada como antígeno para vacuna. Se pueden utilizar varios modelos

de titulación y usar diferentes substratos (ver Anexo 2).

En un laboratorio de producción de vacunas es importante trabajar siempre con la misma técnica y usando el mismo substrato celular, cuya susceptibilidad debe ser frecuentemente comprobada.

Durante los cursos del PROASA se usó el sistema de titulación en tubos, sobre cultivos de células BHK₂₁ Clon₁₃ de monocamada, en el cual se toman como positivos los tubos que presentan efecto citopático.

También puede ser usada la técnica de titulación en placas, actualmente preferida en la Planta Piloto del Centro Panamericano de Fiebre aftosa (CPFA) (ver Anexo 2, punto 3).

Materiales

1. Muestra de virus a titular.
2. M.V.
3. Gradilla para tubos de cultivo celular en tubos y para tubos de dilución.
4. Tubos con cultivos celulares de 48 horas.
5. Tubos para hacer diluciones, pipetas de 1,0, 5,0 y 10 ml. Propietas.
6. Jeringa automática de 2,0 y 5,0 ml.
7. Bomba de vacío con depósito intermedio y cánula 14 de 4".

Procedimiento

1. *Diluciones:* Colocar los tubos de diluciones en baño de hielo y preparar diluciones 10^{-1} a 10^{-8} del virus, usando volúmenes de 4,5 ml de diluyente M.V. y 0,5 ml de virus.

2. *Tubos de cultivo:* Eliminar el medio de cultivo de los tubos usando el dispositivo de vacío y la cánula 14 a 4" y substitución por 1,5 ml de M.V.

3. *Inoculación:* Inocular 0,1 ml por tubo de cada dilución de virus, usando 6 tubos por dilución. La inoculación se empieza por la dilución más alta continuando en forma descendente. Se puede usar la misma pipeta. Se inoculan las diluciones 10^{-8} a 10^{-3} .

4. Se colocan los tubos en un soporte rotatorio para tubos y se incuban a 37°C durante 72 horas.

A las 48 y 72 horas se hacen lecturas y se anotan los tubos positivos.

5. *Interpretación del título del virus:* Frecuentemente se observará que hay tubos no afectados (negativos) a una dilución baja y tubos afectados (positivos) a una dilución 10 veces mayor (ver en el Ejemplo las diluciones $10^{-5,0}$ y $10^{-6,0}$). A veces esas aparentes contradicciones se observan en diluciones que difieren en dos unidades logarítmicas. Esto

se observa también cuando se titulan virus o se estudian dosis protectoras de vacunas o sueros sobre animales vivos.

Por eso se considera más exacto establecer la dosis infectante o protectora 50 por ciento, es decir aquella que infectaría o protegería el 50 por ciento de las unidades de prueba, tubos de cultivos o animales y se toman en cuenta los resultados obtenidos en todas las diluciones.

Ejemplo:

Diluciones		Positivos	Negativos
1:10 000	$10^{-4,0}$	6	0
1:100 000	$10^{-5,0}$	5	1
1:1 000 000	$10^{-6,0}$	1	5
1:10 000 000	$10^{-7,0}$	0	6

Buscamos la dilución que usando un inóculo de 0,1 ml será positiva para el 50 por ciento de los tubos. De la observación de los resultados surge que estará entre las diluciones $10^{-5,0}$ y $10^{-6,0}$. Para establecer el punto exacto, es decir la distancia proporcional entre las dos diluciones, se usan 2 fórmulas estadísticas que consideran no sólo los positivos o negativos a una dilución dada, sino los positivos acumulativos y los negativos acumulativos.

Por positivos acumulativos para una dilución dada se consideran todos los positivos a esa dilución o diluciones mayores. Ejemplo: en la dilución $10^{-5,0}$ se contarán 6 positivos acumulativos.

Por negativos acumulativos para una dilución dada se consideran todos los tubos negativos a esa dilución o diluciones menores. Ejemplo: en la dilución $10^{-7,0}$ se consideran 12 negativos acumulativos.

Ejemplo:

Diluciones	Pa ^a	Nb ^b	Pa ^c	Na ^d	Tot ^e	% pos ^f
$10^{-4,0}$	6	0	12	0	12	100
$10^{-5,0}$	5	1	6	1	7	85,71
$10^{-6,0}$	1	5	1	6	7	14,29
$10^{-7,0}$	0	6	0	12	12	0

^a Positivos

^b Negativos

^c Positivos acumulativos

^d Negativos acumulativos

^e Totales de valores acumulativos para esa dilución

^f Porcentaje de positivos

Método de Reed y Muench

La fórmula es así:

$$\text{Logaritmo negativo de la dilución inmediatamente superior a 50\%} - \left(\frac{\text{Porcentaje de positivos acumulativos inmediatamente superiores a 50\%} - 50}{\text{Porcentaje de positivos acumulativos inmediatamente superiores a 50\%} - \text{Porcentaje de positivos acumulativos inmediatamente superiores a 50\%}} \right) \times \text{log del factor de dilución}$$

$$-5,0 - \left(\frac{85,71 - 50}{85,71 - 14,29} \right) \times 1 = -5,0 - 0,5 = -5,5$$

$10^{-5.5}$ es la dilución que encierra 1 dosis infectante 50 por ciento (DI_{50}) en 0,1 ml de inóculo. Recíprocamente, cada 0,1 ml de virus sin diluir tendrá $10^{5.5} DI_{50}$.

La infectividad de las suspensiones víricas en general se refiere a 1,0 ml. En este caso 1,0 ml de la suspensión vírica tendrá $10^{6.5}$ UI 50 por ciento. Es decir, el título de esta suspensión vírica es $10^{6.5}$ UI 50 por ciento/ml.

Método de Spearman Kärber

La fórmula es así:

$$\text{Logaritmo de la dilución más baja utilizada} - \left[\left(\frac{\text{Suma de los \% de mortalidad en cada dilución}}{100} - 0,5 \right) \times \text{log de factor de dilución} \right]$$

$$-4,0 - \left[\left(\frac{100 + 85,71 + 14,29}{100} - 0,5 \right) \times 1 \right] = -4,0 - 1,5 = -5,5$$

$10^{-5.5}$ es la dilución que encierra una dosis infectante 50 por ciento (UI 50 por ciento) por 0,1 ml. Recíprocamente, cada 0,1 ml de virus sin

diluir tendrá $10^{5.5}$ UI 50 por ciento. Cada 1,0 mililitro de virus sin diluir tendrá $10^{6.5}$ UI 50 por ciento.

17.3 Tipificación y subtipificación

Tipificar una cepa de virus significa establecer a qué tipo serológico corresponde, ej.: tipo 0, tipo A o tipo C.

Subtipificar una cepa de virus significa establecer a qué subtipo corresponde, ej.: tipo 0 subtipo O_1 , tipo A subtipo A_{10} .

Cuando se trata de materiales de campo o de cepas desconocidas, la tipificación y subtipificación se hacen para conocer y clasificar el virus.

Cuando se trata de semilla de virus de producción de vacunas se deben someter continuamente a pruebas de tipificación y frecuentemente a pruebas de subtipificación para detectar rápidamente eventuales contaminaciones de la semilla de virus por otro virus, o desvíos antigénicos, que se pueden producir por otras causas.

A modo de ejemplo diremos que las contaminaciones de las semillas de virus se pueden producir por el uso de sueros bovinos contaminados, errores humanos o fallas mecánicas de equipo, y en algunos casos el aire comprimido fue puerta de entrada para virus contaminantes. En cuanto a los desvíos antigénicos pueden deberse a anticuerpos contenidos en el suero o a poca susceptibilidad del sistema celular o a número muy alto de pases de cultivos de virus.

La tipificación y subtipificación se hacen por pruebas de fijación del complemento 50 por ciento. El principio de esta reacción es el siguiente:

Si se coloca un antígeno frente a un suero hiperinmune específico contra ese antígeno (ejemplo: virus A, suero anti A) en presencia de una cantidad bien calculada de complemento, se producirá una reacción antígeno/anticuerpo con fijación del complemento.

Si en cambio se coloca un antígeno frente a un suero hiperinmune no específico contra ese antígeno (ejemplo: virus A, suero anti O), en presencia de una cantidad bien calculada de complemento, no se producirá reacción antígeno/anticuerpo y no habrá fijación del complemento (FC), por lo que el complemento quedará libre.

La segunda parte de la reacción consiste en el agregado del sistema hemolítico que detectará si hubo o no reacción antígeno-anticuerpo. El sistema hemolítico consiste en glóbulos rojos de carnero sensibilizados con hemolisina, de forma que si son colocados en un sistema donde hay complemento libre se producirá hemólisis, y si no hay complemento libre no se producirá hemólisis.

En el ejemplo anterior (virus A, suero anti A) no hay complemento libre y no habrá hemólisis. Reacción positiva.

En el segundo caso (virus A, suero anti O) el complemento no fue fijado, está libre, luego habrá hemólisis. Reacción negativa.

Por lo tanto, el virus o antígeno, el suero hiperinmune y el complemento son los reactivos.

El sistema hemolítico es usado como "indicador" o "revelador" de la reacción.

La prueba de fijación del complemento 50 por ciento es usada también para cuantificar la cantidad de virus contenida en una suspensión vírica. Este estudio no tiene interés en trabajos de diagnóstico, pero sí en producción de virus para vacunas.

La técnica es simple y consiste en diluir la suspensión vírica en M.V. en diluciones de base 2 y establecer hasta qué dilución se conserva el poder fijador del complemento. Esta técnica, debido a su simplicidad y rapidez, constituye una herramienta muy útil para el productor de vacunas. Permite conocer el "título" fijador de la suspensión vírica y también conocer si se produce alguna pérdida o deterioro durante el proceso del virus, tratamiento con cloroformo, clarificación, inactivación, etcétera.

PRUEBA DE FIJACION DEL COMPLEMENTO

Materiales

Diluyente: Como diluyente de los diferentes reactivos se utiliza el tampón barbital.

Tampón Barbital: El tampón barbital (TB) es el diluyente de los reactivos que son utilizados en la prueba de FC y son conservados a 4°C. Los reactivos diluidos en TB no deben congelarse, ya que este diluyente precipita en ese estado.

Fórmula y preparación

Solución Ca-Mg

Ca Cl ₂ 2 H ₂ O	4.41 g
Mg Cl ₂ 6 H ₂ O	20.33 g
Agua desmineralizada c.s.p.	100.00 ml

Solución TB 5x

Na Cl	83.00 g
Na C ₈ H ₁₁ N ₂ O ₃ (Diétil Barbiturato)	10.19 g
Solución de Ca-Mg	5.00 ml
Agua desmineralizada c.s.p.	2.000.00 ml

Ajustar el pH a 7,6 con HCL 1N y conservar a temperatura ambiente.

El tampón barbital para uso se prepara con una parte de la solución TB 5x más cuatro partes del agua desmineralizada.

Suero hiperinmune: Los sueros hiperinmunes son utilizados en las diluciones que contienen 2.5 unidades fijadoras de complemento 50 por ciento (UFC₅₀), establecidas por titulación del suero frente a 2.5 UFC₅₀ del antígeno homólogo y a 4 unidades hemolíticas de complemento 50 por ciento (UHC₅₀), con tiempos de incubación y de hemólisis de 30 minutos a 37°C cada uno.

Antígeno: Los antígenos son las suspensiones monovalentes virulentas destinadas a la producción de vacunas, sin ningún tratamiento adicional.

Complemento: El complemento es utilizado en la dilución que contiene 4 UHC₅₀.

Sistema hemolítico: El sistema hemolítico es usado con una densidad óptica de 0,66 determinada en el espectrofotómetro, banda 545 μm, con una mezcla de 0,8 ml de sistema hemolítico más 1,2 ml de agua desmineralizada, preparada en tubos de Kahn de 12 x 75 mm.

Procedimiento

1. **Tipificación:** El antígeno sin diluir es mezclado con 2.5 UFC₅₀ de los sueros hiperinmunes tipo homólogo y heterólogo y con 4 UHC₅₀. Los diferentes reactivos son utilizados en volúmenes 0,2 ml. La prueba que también incluye controles de todos los reactivos utilizados, es mantenida en baño de agua a 37°C durante 30 minutos. A continuación se agregan 0,4 ml de sistema hemolítico en todos los tubos y nuevamente se incuba durante otros 30 minutos a 37°C. Finalmente se centrifugan a 500 g durante 10 minutos y se leen en el espectrofotómetro, banda 545 μm.

2. **Titulación:** El antígeno en diluciones base dos, se mezcla con 4 UHC₅₀ y con 2,5 UFC₅₀ del suero hiperinmune subtipo homólogo. Los reactivos son usados en volúmenes de 0,2 ml. La titulación juntamente con los controles de cada reactivo es incubada a 37°C durante 90 minutos. A continuación se añaden 0,4 ml del sistema hemolítico en todos los tubos y nuevamente se lleva a baño de agua a 37°C durante 30 minutos. Finalmente se centrifugan a 500 g durante 10 minutos, se leen en el espectrofotómetro y se determina la dilución que proporciona el 50 por ciento de FC. Esta dilución, sin ningún ajuste representa el TFC₅₀ del antígeno.

3. **Subtipificación:** El antígeno en la dilución que contiene 5,0 UFC₅₀ calculada a partir de la titulación descrita anteriormente, se me-

cla con 2.5 UFC₅₀ de los sueros hiperinmunes subtipos del tipo a que pertenece el antígeno. Los restantes detalles de la prueba son iguales a los indicados en la tipificación.

17.4 Determinación de masa antigénica por densidad isopícnica en cloruro de cesio

1. Clarificar la suspensión vírica por centrifugación durante 30 minutos a 10.000 r.p.m. y 4°C. Tratar 300 ml de ella con TTE al 7 por ciento (v/v) o cloroformo al 3 por ciento (v/v) agitando durante 2 minutos a baja rotación en una licuadora. Se debe cuidar que la temperatura se mantenga lo más baja posible.

2. Decantar la mezcla brevemente y centrifugar el sobrenadante a 10.000 r.p.m. durante 30 minutos a 4°C.

3. Medir exactamente 250 ml del sobrenadante límpido y colocarlo en un tubo de diálisis 20/32 teniendo cuidado de atar ambos extremos con un par de nudos.

4. Colocar la muestra en un beaker de aproximadamente 1.000 ml y espolvorearlo con 17 g de PEG 20.000 (polietilenglicol 20.000). Dejar por unas 24 horas en la heladera con agitaciones suaves y periódicas como para mantener las concentraciones externas e internas lo más homogéneas posible.

5. Una vez que el volumen haya sido reducido hasta unos 10 ml, retirar el líquido del tubo de diálisis y dejar en remojo este último en un buffer 0.2 M KCl; 0.5 M K₂HPO₄ pH 7,50 durante media hora. Expresar el tubo suavemente y agregar 5 ml del mismo buffer en el interior del tubo. Hacer pasar el líquido de un extremo al otro comprimiendo la membrana entre el pulgar y el borde del beaker tirando suavemente de un extremo del tubo de diálisis. El líquido de lavado se une al virus concentrado y se completa con buffer hasta 17,5 ml. Centrifugar 30 min. a 16.000 r.p.m.

6. En un tubo de centrifuga "Ultra Clear" (Beckman part. No. 344063) o similar de 25 mm por 76 mm, capacidad 34 ml nominales, se colocan sucesivamente: 17,5 ml del concentrado viral, 8,0 ml de una solución de CsCl densidad 1,38 y 6,0 ml de una solución de CsCl densidad 1,444. Las soluciones son introducidas en el fondo del tubo por medio de una jeringa de vidrio de 10 ml de capacidad a la cual se le ha adaptado una aguja hipodérmica 25 x 10 en cuya extremidad se colocó un tubo de cateterismo de polietileno (PE 190) y de longitud suficiente como para llegar hasta el fondo del tubo de centrifuga.

7. Se centrifuga en un rotor SW 25.1 (Beckman) durante 6 horas a

24.000 r.p.m. y a 10°C de temperatura. Las fracciones se retiran ya sea por succión o por perforación del fondo del tubo. La banda formada por el virus se reconoce rápidamente por su color azulado cuando se hace incidir un haz de luz en forma oblicua (puede utilizarse una lámpara de microscopio de haz puntiforme) de abajo hacia arriba. Se colectan las fracciones que contienen el virus y se leen los volúmenes correspondientes.

8. Se determina la densidad óptica de las fracciones en tres longitudes de onda, a saber: 330 nm, 280 nm y 259 nm. La relación D.O. 259/D.O. 280 nos indicará la relativa pureza del virus. Para determinar la concentración vírica se utiliza el coeficiente de extinción determinado por Bachrach

$$E_{259 \text{ nm}}^{1\%} \quad 1 \text{ cm} = 76$$

Los valores de la dispersión de la luz son corregidos multiplicando la D.O. a 330 nm por el factor 2,64 y el resultado es restado del valor de la D.O. obtenida a 259 nm. El valor corregido de la D.O. 259 nm es dividido por el coeficiente de extinción y el resultado se expresa en g%. Consecuentemente se multiplica por 10.000 y se obtienen valores de µg/ml. Alternativamente se puede multiplicar el valor corregido de la D.O. a 259 nm por el factor 131,6 y también se expresará el resultado en µg/ml.

Para conocer la concentración por litro basta multiplicar este resultado por el volumen de virus colectado del tubo de centrifuga lo cual nos da la concentración de virus en la fracción de ensayo. Este valor se multiplica por 4 por cuanto hemos partido de un volumen de 250 ml.

9. La fracción de virus colectada se dializa contra 300 ml de buffer 0.2 M KCl, 0,05 M K₂HPO₄, pH 7,50 a 4°C, con agitación continua. El baño de diálisis se cambia tres veces en un período de 24 horas. La muestra puede conservarse a -70°C y sirve para determinar la integridad de los polipéptidos por medio de PAGE.

10. Alternativamente si se posee un rotor SW 40 Ti en vez del SW 25.1 se emplearán las siguientes condiciones:

100 ml de suspensión vírica se tratan con TTE o con cloroformo y se concentran hasta un volumen de 7 ml en las mismas condiciones descritas previamente.

CsCl D = 1,386 4 ml

CsCl D = 1,444 2 ml

Jeringas siliconizadas de 5 cc de capacidad

Tubos de centrifuga Beckman Ultra Clear núm. 344060, 14 x 95 ml, volumen nominal 14 ml

Velocidad de centrifugación : 36.000 r.p.m.

Tiempo de centrifugación	4 horas
Temperatura	10°C

INTEGRIDAD DEL POLIPEPTIDO VP₁

Ha sido comprobado que la actividad de algunas enzimas proteolíticas como por ejemplo la tripsina y la quimitripsina cliva el polipéptido VP₁ del virus de FA provocando como consecuencia una disminución en su actividad inmunogénica y una falta de capacidad de infectar las células. Esto ocurre solamente con algunos tipos y subtipos.

Como un parámetro adicional a la determinación de la masa antigénica se estudia también la integridad del VP₁ asumiendo que un polipéptido íntegro tiene mejores condiciones para inducir una respuesta inmunitaria.

Este análisis se efectúa con el virus purificado el cual es tratado con una solución 8 M de urea, 0,1 por ciento de SDS (dodecil sulfato de sodio) y 0,1 por ciento de 2-mercaptoetanol. El virus se escinde en sus cinco polipéptidos VP₀, VP₁, VP₂, VP₃, VP₄ los cuales pueden ser separados por medio de disc-electroforesis (PAGE) con una concentración de acrilamida del 12,5 por ciento, la cual contiene también 8M de urea y 0,1 por ciento de SDS. En el caso de que la proteína VP₁ no haya sido clivada por alguna enzima se presenta como una sola banda al ser coloreada con Azul Brillante de Coomassie, con la característica de ser metacromática. Si hubiera existido alguna acción enzimática y como consecuencia se hubiera clivado aparecerán dos nuevos componentes VP_{1a} y VP_{1b} los cuales tendrán una posición completamente diferente en el campo electroforético aunque conservarán su metacromasia.

17.5 Control de inocuidad de la suspensión vírica

Después que la suspensión vírica fue sometida al proceso de inactivación, deben realizarse controles que garanticen que ésta se cumplió normalmente y que no restan partículas víricas infectantes. Sería más correcto hablar de control de inactivación o de no infectividad. No obstante, hemos conservado para esta prueba el nombre de Control de Inocuidad, cuyo alcance sería mucho más vasto (ver 18.1.2) por ser el comúnmente usado en todos los laboratorios de producción de vacunas.

Sala de control de inocuidad

La sala para realizar estos controles debe estar dentro del área de virus, pero tiene que ser especialmente protegida. Debe contar con cabina de

flujo laminar, potenciómetro, elementos de control bacteriológico, microscopios y una estufa con estanterías y es preferible que cuente también con un equipo roller para 20 o 30 botellas. El personal que trabaja en control de inocuidad, no debe trabajar con virus activo y debe contar con ropa especial.

Materiales

Botellas roller o Roux, con cultivos células BHK₂₁ de 48 horas. Es preferible que las células hayan sido cultivadas en M.C. con suero tratado con PEG (ver 12.9.2).

Tapones de neopreno núm. 5 1/2 sin perforar.

Tapones de neopreno núm. 5 1/2 perforados (Figura 55).

Medio de virus M.V. (ver 12.3).

Cabina de flujo laminar.

Pipetas de 10 ml.

Propipetas.

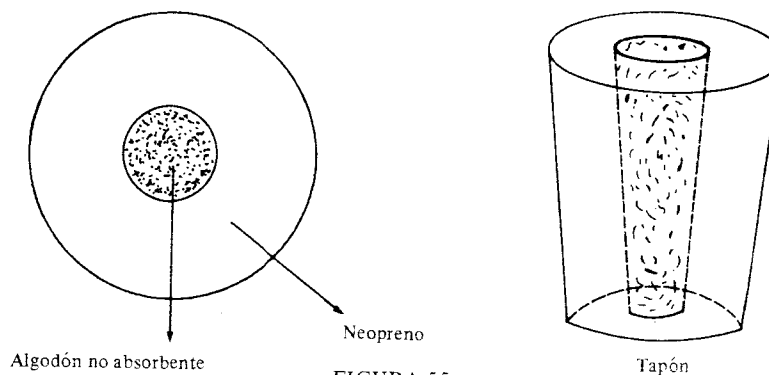


FIGURA 55
Tapones Núm. 5 1/2

Muestras – Se trabajan 2 muestras de cada partida de virus monovalentes.

Muestra 1 – Se toma, enseguida de terminar la inactivación, por la abertura inferior del tanque, dejando salir el cloroformo y aproximadamente 500 ml de virus inactivado. Cuando esa muestra se recoge en un frasco, se observará que el cloroformo queda en el fondo del mismo. Luego una parte de virus emulsificado y arriba el virus límpido. Se usará para la prueba el virus límpido.

Muestra 2 – Esta muestra de 250 ml se toma en el momento en que el virus es pasado por circuito cerrado al área limpia.

Cuando ambas muestras de cada tipo de virus han sido probadas, y se procede a la mezcla trivalente de virus para formular la vacuna, se toma una tercera muestra de virus trivalente que se envía a la Unidad de control de inocuidad.

Procedimiento

1. Se numeran las botellas roller o Roux de 1 a 6 y se llevan a la cabina de flujo laminar. Se limpian las botellas con algodón impregnado en alcohol.

2. Se elimina el medio de crecimiento y cada botella recibe M.V. a razón de 50 ml cada botella Roux y 100 ml cada botella roller. Se lava suavemente la camada celular y se elimina el M.V.

3. A cada botella Roux se adiciona 100 ml de M.V. y a cada botella roller 300 ml.

4. A cada una de las botellas Roux 1 a 5 se adiciona 3.0 ml de virus de prueba. La botella 6 queda como testigo.

A cada botella roller a 1 a 5 se adiciona 10 ml de virus de prueba. La botella 6 queda como testigo.

Las botellas se tapan con el tapón de neopreno perforado y se llevan a la estufa a 37°C. Las botellas Roux en estantería y las roller en aparato roller a 8 rev. por hora.

A las 24 horas se observan las botellas macroscópicamente, se mide el pH que debe ser superior a 7.2.

5. A las 48 horas se observan las botellas macroscópicamente. La camada celular debe estar adherida a la pared de la botella. El desprendimiento de la camada celular indicará probable presencia de virus activo. En caso de duda se hará observación microscópica en microscopio de óptica invertida. El pH debe ser superior a 7.2. Si el aspecto de las botellas no denota la presencia de virus se pasa al segundo pase.

6. Se toman nuevamente 6 botellas roller o Roux. Se numera del 1 al 6 y se procede a los lavados del cultivo, como descrito en 2 y se pone M.V., como descrito en 3.

7. Se agitan enérgicamente las botellas del 1er pase para lograr desprendimiento celular.

Con pipeta graduada y propipeta se toman 5.0 ml de medio con células de la botella Roux 1 del primer pase y se siembra la botella Roux 1 del 2o. pase; 5.0 ml de la botella Roux 2 del primer pase y se siembra la botella Roux 2 del 2o. pase, así sucesivamente.

Con las botellas roller se hace la misma operación pero transfiriendo 10 ml de cada vez.

Se llevan las botellas a incubar a 37°C como descrito en 4 y se procede igual que en el primer pase.

8. 48 horas después se procede a la siembra del 3er. pase procediendo como se describe en 7.

A las 48 horas los cultivos celulares deben estar intactos. Se hace una mezcla de los M.V. de todas las botellas de cada lote y se envía para hacer prueba de FC (ver 17.3) que debe dar negativo.

17.6 Controles de la emulsión

CONTROL DE TIPO DE EMULSION

Desde el momento en que se hace la primera mezcla en el tanque 1, (Figura 49), la emulsión debe ser del tipo "agua-en-aceite", es decir el antígeno debe estar dispersado en el seno de la fase oleosa.

Si se deposita una gota de esta emulsión en un depósito con agua, la emulsión quedará en la superficie del agua sin mezclarse. Dependiendo de la viscosidad de la emulsión, quedará como una gota compacta o formará una película, pero siempre en la superficie (ver Figura 56).

FIGURA 56

La gota de emulsión primaria no se conjuga con el agua



Si se agita el conjunto, la gota de emulsión se dividirá en múltiples gotículas, pero al dejar sedimentar, las gotículas irán a la superficie y el agua quedará límpida.

En cambio cuando se trata de una emulsión primaria aceite-en-agua, o de una emulsión doble, agua-en-aceite-en-agua, la gota de emulsión se dispersará en el agua presentando un aspecto turbio, lechoso, que no cambiará dejando la mezcla en posición estática.

PRUEBA DE CENTRIFUGA

Se toma una muestra de vacuna de 40 ml, se coloca en un tubo de centrifuga de 50 ml y se centrifuga a 3.000 r.p.m. durante 60 minutos.

Si la emulsión es primaria, agua-en-aceite, no debe separar líquido acuoso en el fondo del tubo y sólo se tolera una pequeña separación de líquido oleoso en la superficie, siendo todo el resto una emulsión uniforme. Cuando la emulsión está recién en la etapa de pre-mezcla, antes de pasar por el emulsificador, se tolera una separación de virus en la parte inferior del tubo y una mayor separación de óleo en la parte superior (ver Figura 57).

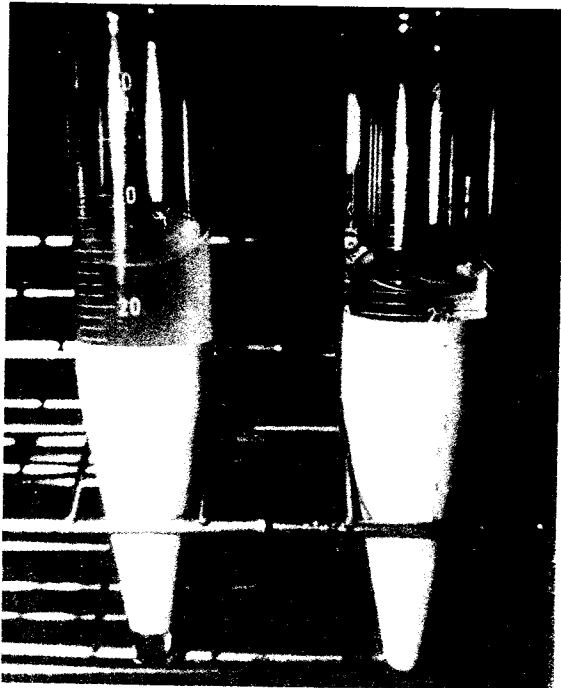


FIGURA 57
Pre-mezcla
y vacuna final

Cuando la emulsión es doble, agua-en-aceite-en-agua, el cuadro se invierte y la emulsión queda en la parte superior, quedando la fase externa acuosa en la parte inferior (véase Figura 58).

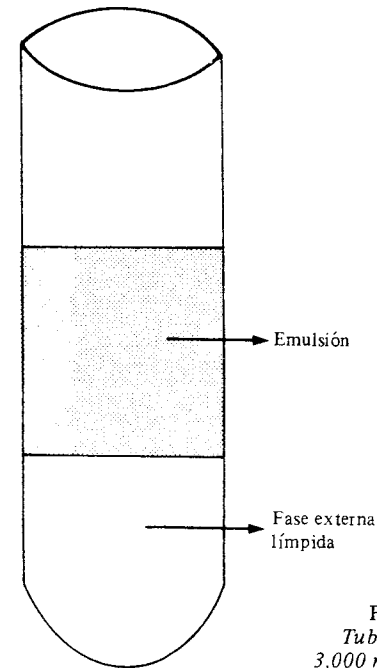


FIGURA 58
Tubo centrifugado
3.000 r.p.m. 60 minutos

CONDUCTIVIDAD

El agua conduce la corriente eléctrica. El aceite mineral no la conduce.

Cuando la fase externa de la vacuna es oleosa, no conducirá la corriente eléctrica. La resistencia será superior a 10M Ohms (ver Figura 59).

ESTABILIDAD

La estabilidad de la emulsión, cualquiera sea el tipo de vacuna oleosa que se considere, debe ser superior a 12 meses a 4°C

Hay formas de hacer pruebas aceleradas para estimar la estabilidad

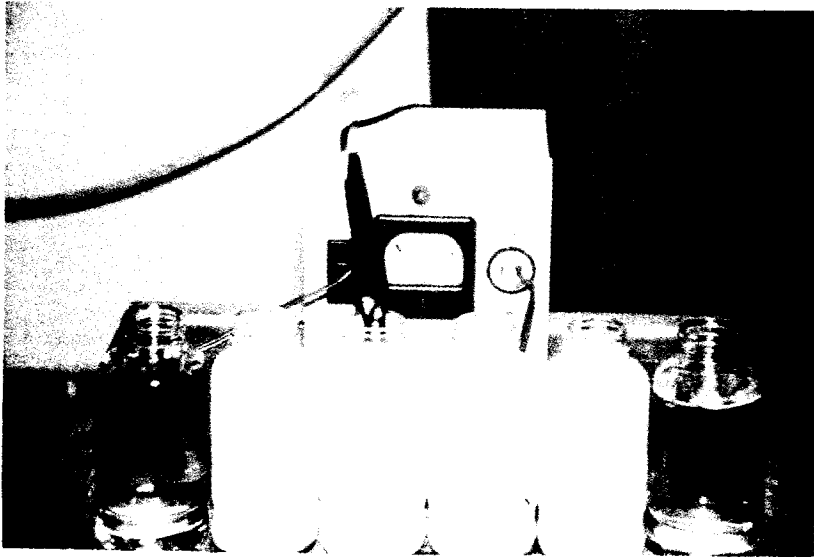


FIGURA 59

La emulsión primaria no conduce la corriente eléctrica

de las vacunas y consisten en colocar las muestras a 37°C y 56°C. A 37°C toda vacuna de emulsión primaria debe permanecer estable por lo menos durante 15 días. A 56°C toda vacuna de emulsión primaria debe permanecer estable por lo menos 5 días.

Dependiendo del tipo de emulsificante, la estabilidad puede aumentar mucho. Con Montanide 888 las vacunas permanecerán estables, sin rotura de emulsión por espacio de más de 6 meses a 37°C.

18. CONTROLES DE PRODUCTO FINAL

Los controles de producto final (vacuna pronta) deben ser claramente divididos en controles a cargo del productor y controles a cargo del organismo oficial de control (ver Aspectos Generales, Control de Producto Final, pág. 39).

18.1 Controles a cargo del productor

PUREZA BACTERIOLÓGICA

Los controles serán hechos en los medios de cultivo descritos en 12.12, incubados a 37°C y a temperatura ambiente y observados durante 10 días.

El inóculo no debe ser mayor de 0,5 ml por frasco de 70 ml de medio de cultivo y el frasco debe ser agitado para fraccionar las gotas de la emulsión y así aumentar su contacto con el medio de cultivo.

Debido a que la vacuna contiene Merthiolate es importante el uso de medio de Thiogicolato para neutralizar su efecto.

Los controles de vacuna de emulsión doble enturbiarán el medio de cultivo haciendo difícil apreciar si hay desarrollo microbiano, por ello es necesario hacer subcultivos después de 72-96 horas de incubación. Siempre que haya duda sobre un cultivo será aconsejable realizar un subcultivo. En todos los controles se deben seguir las pautas generales indicadas (ver 17.1).

CONTROLES DE INOCUIDAD

Los controles de no infectividad ya fueron hechos sobre la suspensión vírica (ver 17.5). Si el laboratorio tiene un diseño adecuado, con total separación de áreas y personal independiente para cada área, no será necesario repetir estos controles sobre la vacuna final.

Otros aspectos de la inocuidad del producto, como las reacciones locales producidas por la vacuna en las diferentes especies animales y por diferentes vías de aplicación, son de total responsabilidad del productor.

El laboratorio productor debe tener conocimiento del manejo de la vacuna en el campo, tener acceso a establecimientos donde la vacuna sea aplicada y también donde pueda obtener bovinos susceptibles para prueba de potencia (ver 18.1).

CONTROLES DE TIPO DE EMULSIÓN

Pruebas de gota, conductividad, centrifuga y estabilidad ya fueron hechas en el momento de formulación de la vacuna (ver punto 17.6) y pueden ser repetidas en cualquier momento.

CONTROL DE DESPACHO Y CADENA DE FRIO

El buen manejo de la vacuna desde su salida del laboratorio hasta su aplicación en el campo es de fundamental importancia para el éxito final del producto.

El productor debe vigilar el embalaje, medio de transporte y cadena de frío de la vacuna, desde que sale del laboratorio hasta que llega al destinatario. Cuando la vacuna va a depósitos intermediarios que hacen la distribución, éstos deben contar con las mismas facilidades, cámaras a 4°C, congeladores para sachets refrigerantes, cajas térmicas, etc. con que cuenta el laboratorio productor.

CONTROLES DE INMUNIDAD

Se debe tener presente que tanto el virus de la FA como el sistema celular usado para su replicación son elementos muy variables, lo cual sumado a la variación intrínseca de todo proceso biológico hace que nunca podamos estar seguros de que dos series de vacunas producidas en condiciones aparentemente iguales tengan el mismo comportamiento inmunológico. Los controles de proceso, particularmente aquellos que se refieren a título FC (ver 17.3), masa antigénica e integridad de proteínas (ver 17.4) brindan una excelente información preliminar, pero no suficiente por sí sola para asegurar el buen comportamiento inmunogénico de la vacuna.

El productor debe probar todas las partidas de vacunas frente a todas sus valencias y llevar un registro cuidadoso de los resultados para observar las variaciones. Difícilmente se observará una gran variación de una partida para la siguiente, pero sí pueden observarse tendencias de cambio que deben ser rápidamente controladas.

Para el productor es importante usar técnicas de control que permitan cuantificar la capacidad inmunogénica de sus vacunas, y por otra parte que esas técnicas sean suficientemente simples y económicas para que puedan ser usadas siempre.

Las pruebas para evaluar la capacidad inmunogénica de las vacunas producidas, pueden ser realizadas sobre la especie o las especies a las cuales la vacuna se destina, bovinos, porcinos, ovinos, etc. o sobre otras especies (ej.: cobayos) con las cuales habrá que establecer la correlación de las respuestas.

Por otra parte las pruebas en cualquier especie tales como: bovinos, cerdos, cobayos, etc. pueden ser directas por descarga de virus de desafío y observación de lesiones o indirectas por evaluación de anticuerpos.

Las pruebas que evalúan anticuerpos permiten acompañar el establecimiento, duración y decaimiento de la inmunidad en un mismo animal, en general de la especie destinataria de la vacuna.

Las pruebas de descarga de virus dan información solamente sobre el estado inmunitario del animal en el momento del desafío y frente a una valencia sola.

Para el productor es de gran importancia conocer la evolución de la inmunidad en los animales vacunados. Desde ese punto de vista las técnicas indirectas de anticuerpos son las más indicadas.

Las pruebas en las que se hacen diluciones de la vacuna permitirán conocer la potencia final del producto. Son hechas en general por métodos directos. Dosis protectora 50 por ciento en bovinos, en cerdos o en cobayos.

Puede también hacerse diluciones de vacunas y evaluarse la inmunidad por medición de anticuerpos. Muchos trabajos experimentales con esta técnica han sido hechos en el CPFA en bovinos, y han brindado una excelente información. Cuando se hacen diluciones de vacunas tiene gran importancia el diluyente que se use. Si el adyuvante es inerte, como la solución salina tamponada, la caída de la inmunidad es muy rápida con las diluciones, en cambio cuando se usa diluyente con adyuvante (diluyente activo) la caída es muy lenta.

En las vacunas oleosas de emulsión primaria no es posible usar diluyente inerte por no ser miscibles. Sólo se puede usar diluyente activo. En términos prácticos cuando se usa diluyente inerte, el rango de diluciones es: 1/1, 1/3, 1/9 y como máximo 1/27. Cuando se usa diluyente activo el rango será 1/1, 1/4, 1/16, 1/64 y como máximo 1/256.

En las condiciones sudamericanas, consideramos que las técnicas más aconsejables para el productor son la determinación de dosis protectoras 50 por ciento en cobayos, el índice de seroprotección ISP de Cunha, *et al* (ver 18.1. y Anexo 3) y también el índice de seroneutralización en tubos.

*Dosis protectora 50% en cobayos para vacunas de emulsión primaria**Materiales*

- Cobayos con más de tres meses de edad, patas despigmentadas y peso 550 g ± 50 g.
- Cepas de virus de descarga adaptadas a cobayo con no más de 5 pases en esta especie.
- Diluyente – Emulsión de M.V. (ver 12.3) emulsificado en la fase oleosa como si fuera vacuna (diluyente activo).
- Jeringas para vacunación y descarga de virus

– Elementos de desinfección e incineración para materiales infecciosos.

Procedimiento

1. Se preparan diluciones de la vacuna a 1/4, 1/16, 1/64 y 1/256 en diluyente activo.

2. Vacunación: Se vacuna 6 cobayos por dilución y por valencia dejando 6 cobayos sin vacunar, como testigos, por cada valencia. La dosis es 1/20 del volumen de la dosis bovina. En las pruebas de rutina, puede no ser necesario usar 5 diluciones, sino un número menor. En las pruebas de rutina del CPFA donde ya se conoce el comportamiento medio de las vacunas se usan las diluciones: 1/4, 1/16 y 1/64.

3. Comprobación: Los 30 cobayos vacunados para cada valencia si se utilizaron 5 diluciones y los 6 testigos serán inoculados 30 días después de la vacunación con las cepas de virus utilizados en la elaboración de la vacuna. Los virus de comprobación estarán adaptados a cobayos. Cada animal será inoculado en una pata por vía intradermopltar con 0,1 ml de una suspensión que contenga $10^{4,0}$ DG₅₀/ml.

4. Lectura: A los tres y cinco días después de la inoculación se observarán las lesiones podales.

5. Interpretación: Las DPC₅₀ serán calculadas por el método Spearman-Kärber o Reed y Muench a partir de los resultados de protección a la generalización podal. Se considerarán cobayos protegidos aquellos que no presenten lesiones podales en las patas no inoculadas. Para que la prueba tenga valor es necesario que haya presentado una pendiente normal.

6. Ejemplo: Se prueba una vacuna que dé el siguiente resultado:

Dilución	Log Dilución	Cobayos inoc.	Protegidos	No protegidos	Acumulativos		Total	% protección
					Protegidos	No protegidos		
1/1	0	6	6	0	23	0	23	100
1/4	-0.6	6	6	0	17	0	17	100
1/16	-1.2	6	6	0	11	0	11	100
1/64	-1.8	6	4	2	5	2	7	71.4
1/256	-2.6	6	1	5	1	5	6	12.5

Cálculo por el Método Spearman-Kärber (ver punto 17.2)

$$1 \text{ DP}_{50} \text{ C} - 1,2 - \left[\frac{100 + 71,4 + 12,5}{100} - 0,5 \times 0,6 \right] =$$

$$- 1,2 - \left[(1,839 - 0,5) \times 0,6 \right] = - 1,2 - 0,803 = - 2,03$$

La dilución $10^{-2,03}$ tiene el DP₅₀C por volumen de 0,25 ml
1 dosis de 0,25 ml de vacuna pura tendrá $10^{2,03}$ DP₅₀C = 107 DP₅₀C

Cálculo por el método de Reed and Muench (ver punto 17.2)

$$- 1,8 - \left(\frac{71,40 - 50}{71,40 - 12,5} \times 0,6 \right) = - 1,8 - 0,217 = 2,017$$

$$- 1,8 - 0,217 = - 2,017$$

La dilución $10^{-2,017}$ tiene 1 DP₅₀C por volumen de 0,25 ml – 1 dosis cobayos de 0,25 ml tiene $10^{2,017}$ DP₅₀C = 104 DP₅₀C
Como se ve hay una diferencia muy pequeña entre los dos métodos.

Dosis protectora 50% con vacunas de doble emulsión

La vacuna de doble emulsión, debido a que su fase externa es acuosa, puede ser diluida en diluyente inerte. La prueba DP₅₀% de vacuna de emulsión doble en cerdos es descrita en el Manual de Procedimientos para el Control de Vacuna Antiaftosa, CPFA, núm. 2.

Índice de seroprotección

En esta prueba se estudian los anticuerpos contenidos en sueros de bovinos cuyo estado inmunitario se desea conocer. El estudio se hace sobre ratones lactantes, estableciendo la diferencia de título de una misma suspensión vírica titulada sobre ratones protegidos con el suero en estudio y ratones normales. Es una prueba de tipo suero fijo y virus variable.

El índice de seroprotección es muy usado y muy conveniente para el productor de vacunas, debido a las siguientes causas:

a) Es una prueba que se hace sobre la especie destinataria de la vacuna y los animales son mantenidos en su habitat natural sin ser sometidos

tidos a stress alguno. Deben ser bovinos nunca vacunados ni en contacto con la enfermedad.

b) Permite acompañar la evolución de la inmunidad.

c) Cada animal dará información sobre su respuesta a todas las valencias de la vacuna.

d) Los valores ISP ya han sido correlacionados con los valores de protección frente a la generalización podal.

e) Puede usarse vacunas diluidas para observar la potencia final de la vacuna. En este caso los valores de las diluciones no están totalmente correlacionadas con la protección a la generalización podal, pero dan una excelente información al productor para comparar la potencia de sus diferentes partidas de producción.

Todos los detalles de técnica e interpretación están en el Anexo 3.

TÍTULO DE SERONEUTRALIZACIÓN EN CULTIVOS CELULARES

Es una técnica muy valiosa para el productor y posee muchas de las ventajas del ISP, aunque sus valores, si bien han sido correlacionados con la protección a la generalización podal no han sido estudiados tan exhaustivamente.

El título neutralizante de un suero es la recíproca de la dilución, expresada en log de base 10, que protege 50 por ciento de los tubos de cultivos celulares BHK frente a $10^{2.0}$ DI_{50} C.T. de virus. Es una prueba de virus fijo/suero variable.

Materiales

Tubos de cultivos celulares de 48 horas.

Virus – Virus de origen bovino con pocos pases en BHK conservados a $-70^{\circ}C$.

Muestras de suero bovino a ser estudiadas. Inactivados y conservados a $-20^{\circ}C$.

M.V. (ver 12.3).

Gradilla para tubos de cultivos celulares y tubos de dilución.

Tubos de dilución y pipetas de 1,0, 5,0 y 10 ml. Propipetas.

Jeringa automática de 2,0 y 5,0 ml.

Bomba de vacío con depósito intermedio y cánula 14 x 4".

Procedimientos

Sueros – Se preparan diluciones de suero en M.M. (ver 12.3) al 1/2, 1/4, 1/16, 1/64, 1/256.

Virus – Se prepara una solución de virus en M.M. que contenga $10^{3.0}$ DI_{50} c.c.

Mezcla suero-virus – A 1,0 ml de cada dilución de suero se agrega 1,0 ml de dilución de virus y se mezcla a $37^{\circ}C$ por 1 hora, y a continuación se colocan por 30 minutos a $4^{\circ}C$.

Inoculación de los tubos – Se sustituye el M.C. de los tubos por M.V. y se adiciona 0,2 ml de la mezcla suero-virus, usándose 6 tubos para cada dilución.

Controles – En cada prueba de seroneutralización se deben hacer controles de células sin inocular y de la dilución de virus usada. Además se debe incluir una prueba hecha con suero normal sin anticuerpos y otro con un suero de título conocido, como controles de prueba. El título del virus se establece en la forma descrita en 17.2.

Lecturas – La lectura de los tubos se hace a las 48 y 72 horas después de la inoculación. Se consideran tubos positivos aquellos que no presentan efectos citopático. La prueba será válida si los controles de la células, suero y virus tuvieron comportamiento normal.

Cálculo del resultado – Considerándose como positivos los tubos no atacados y como negativos aquellos que muestran efecto citopático, se calcula el título de protección por los métodos de Reed & Muench o Spermann Kärber, como fue descrito en 18.1.5.1.

18.2 Controles a cargo del Instituto Oficial de Control

Los organismos oficiales de control deben hacer pruebas sobre las vacunas producidas antes de otorgar la autorización de distribución y venta. Su principal cometido es garantizar al usuario y a la pecuaria nacional que el producto es inocuo y eficiente.

Es natural que en los Laboratorios de Producción trabajen sólo con el producto pronto en su envase final. Las muestras de cada partida deben ser tomadas en forma aleatoria.

Los controles de aprobación establecen un umbral mínimo de aprobación por encima del cual las vacunas serán aprobadas y por debajo del cual serán rechazadas. En algunos reglamentos se prevé la posibilidad de repetición de la prueba, en cuyo caso el valor final será el promedio de los valores obtenidos.

Los controles de vacunas tienen un interés diferente para el Laboratorio Oficial de Control y para el productor. Para el primero, es un umbral que se supera o no se supera. Si se supera el producto es aprobado, si no el productor es reprobado. Para el productor, la prueba de vacuna es un indicador de la marcha de su producción, que le indicará sobre la regularidad, progreso o retroceso en la calidad del producto.

Para el productor es de importancia el uso de método de medición de potencia de vacuna, que permita cuantificar el potencial inmunogénico de sus productos. Para el Organismo Oficial, basta una prueba de eficacia. El producto pasa o no pasa.

Los métodos de control pueden ser los mismos o diferentes. Cada país tiene un reglamento. Como ejemplo mencionamos el Manual de Procedimientos para el Control de Vacunas Antiaftosa núm. 2 publicado por el CPFA y las Pautas de Orientación, propuestas en el IV Seminario Internacional de Control de Calidad de la Vacuna Antiaftosa con Adyuvante Oleoso, realizado en Asunción, Paraguay del 26/IX a 7/X/1983 (Anexo 5) y directivas para control oficial de vacunas contra Fiebre aftosa con adyuvante oleoso y convencionales de mayor duración de inmunidad, que rigen en Brasil desde el 16 de diciembre de 1983 (Anexo 6).

Anexos

ANEXO 1. INFECCION DE CULTIVOS CELULARES BHK CON MYCOPLASMA

Los *Mycoplasmatales* han sido asignados recientemente a una nueva clase taxonómica: Mollicutas que difieren fundamentalmente de las bacterias y de las bacterias en la forma L. Esto ha sido confirmado por el uso de la técnica de homología del ácido nucleico. No se ha encontrado homología entre los Mycoplasmas y las bacterias.

Clase: *Mollicutas.*
Orden: *Mycoplasmatales.*
Género: *Mycoplasma.*

Dentro de los *Mycoplasmas* existen numerosas especies.

Los micoplasmas se encuentran frecuentemente como contaminantes de los cultivos celulares.

La infección puede ser inaparente o causar severos cambios citopáticos que interfieren seriamente en los cultivos celulares. Esto ha ocurrido en nuestros laboratorios por largo tiempo hasta que determinada la principal causa de interferencia se pudieron adoptar las medidas para suprimirla, las que hasta el presente han resultado exitosas.

La fuente primaria de la contaminación en la mayoría de los casos es el tracto respiratorio superior del hombre, ya que los micoplasmas son habitantes de la orofaringe del hombre.

La más amplia diseminación de las contaminaciones de los cultivos celulares ocurre como resultado de aerosoles ya sea provocados por el hombre y también durante el procesamiento de cultivos celulares contaminados.

El más común contaminante es *Mycoplasma hominis*, habitante del tracto genital, pero también de la orofaringe del hombre. Otro contaminante común es *Mycoplasma orale* habitante común de la orofaringe.

Los micoplasmas son más resistentes que muchas bacterias a los

antibióticos y cuando son introducidos por accidente en una línea celular ellos persisten en los diferentes pasajes.

También se ha aislado *M. hyorhinis* de cultivos celulares, una especie que afecta al cerdo.

Hayflick explica su presencia en cultivos celulares por el uso de la tripsina que se obtiene normalmente de pancreas de cerdo.

También se han aislado *Mycoplasma pulmonis*, *M. fermentans*, *M. salivarium*, etc. Se ha demostrado que una gran proporción de cultivos celulares de mamíferos se encontraban contaminados con PPLO.

Barile mostró que 72 por ciento de las líneas celulares contaminadas con antibióticos en el medio estaban contaminados comparados con solamente 7 por ciento contaminados en medio libre de antibióticos.

Según Adler las constituyentes de los medios de T.C. pueden afectar la capacidad de los micoplasmas de inducir efecto citopático y en ausencia de nutrientes determinar que estos microorganismos desarrollen intracelularmente.

Algunas características de cultivos celulares infectados con PPLO:

Muchas cepas de *Mycoplasmas* parasitan las células, sin alterar la morfología colonial, ni la multiplicación manteniéndose en equilibrio; en cambio otras cepas ejercen acción citopatogénica e interfieren significativamente en la multiplicación celular.

Aparición de células multinucleadas, células epiteliales, células redondeadas en el cultivo en monocapas y células de forma de huso largo desarrollando la monocapa en forma anárquica, desordenada y frecuentemente tienen dificultad en adherirse retrasando la formación de la monocamada "pattern".

En las células suspendidas ocurre aparición de células gigantes, irregularidad en la membrana, pérdida de refringencia y aparición de granulosidad en el citoplasma.

Irregularidad en el desarrollo y degeneración de las células obteniéndose contajes muy variables en los diferentes pasajes especialmente en cultivos con períodos de incubación más largos; las células degeneran y se desprenden en el centro de las colonias y dejan anillos de células viables.

Con cultivos cortos y cambios de medios frecuentes se logra evitar la interferencia.

Los cambios citopatogénicos del PPLO pueden demorarse cambiando el medio cada día.

Se ha informado que los micoplasmas pueden inducir anomalías cromosómicas en células infectadas, degradación del DNA de las células huéspedes y transformaciones morfológicas.

En los cultivos en células suspendidas al enfriarse parece ocurrir una

mortandad celular que podría estar asociada con la infección con micoplasma y con la acidez del medio.

Coloreadas con azul tripan se observan células muertas intensamente teñidas de azul profundo casi negro, aspecto denso en el centro con periferia más clara. Se diferencian notoriamente del E.C.P. determinado por el virus, que se caracteriza por células teñidas de un color azul muy pálido con tonalidad violácea.

El empleo de antibiótico frecuentemente no suprime la acción de PPLO ya que existe una gran variedad de cepas que se comportan con variable susceptibilidad frente a diferentes antibióticos.

La técnica aséptica rigurosa es la mejor garantía para evitar la contaminación primaria y la contaminación cruzada y el menor uso posible de antibióticos o su eliminación total cuando las condiciones del laboratorio lo permiten ya que en esa forma es posible descubrir su interferencia rápidamente.

Medios de cultivo utilizados en el aislamiento de *Mycoplasmas*

Agar para *Mycoplasma* (Medio de Chanock)

Agar PPLO Difco	7 partes
Suero de caballo no inactivado	2 partes
Extracto de levadura al 25 por ciento	1 parte

Caldo para *Mycoplasma*

Caldo PPLO Difco	7 partes
Suero de caballo no inactivado	2 partes
Extracto de levadura al 25 por ciento	1 parte

El extracto de levadura se prepara calentando en agua destilada levadura de hornear seca y activa hasta la ebullición.

Se filtra a través de dos capas de papel de filtro, se centrifuga y ajusta el pH a 8.0 con NaOH.

Esterilizar por filtración con Seitz.

El extracto puede mezclarse con el suero de caballo y almacenarse a -20°C .

Procedimiento para preparar el Agar PPLO y caldo PPLO

- Fundir el agar en agua hirviendo.
- Descongelar la mezcla extracto de levadura y suero.
- Enfriar el agar hasta cerca de 45°C y agregar la mezcla suero-levadura

- d) Verter la mezcla en Cajas de Petri y dejar endurecer.
- e) Agregar con pipeta estéril la mezcla suero-levadura al caldo PPLO.

Medio Semi-sólido

Al caldo PPLO puede agregarse 0.1 por ciento de agar para convertirlo en medio semi-sólido con lo que se logra una más larga viabilidad de los *Mycoplasma* pudiéndose hacer las transferencias entre 7 y 14 días en lugar de 3 a 5 días como en los medios líquidos. También permite detectar un pequeño número de microorganismos presentes en el inóculo.

El *medio de Hers*, que da excelentes resultados tiene la composición siguiente:

Agar PPLO Difco más 10 por ciento de extracto de levadura y 20 por ciento de suero de equino.

El extracto de levadura se prepara calentando 1 kg de levadura de hornear en 1 litro de agua destilada, calentando a 80°C durante 30 minutos y pH 4,5. Después se centrifuga y ajusta el pH a 7,8. El sobrenadante se esteriliza por filtración.

Nota: Con este medio se aumenta el número de aislamiento en forma significativa y es mucho mayor el número de colonias/ml y se acelera la aparición de las colonias pudiendo observarse en 48 a 72 horas. Además es un método que suministra mejores resultados que los medios convencionales con extracto de levadura y los basados en la producción de enzimas que desdoblan la timidina y la arginina que varían grandemente con las cepas de PPLO.

Preparación del suero de porcino

Dejar coagular, desprender coágulo, centrifugar y esterilizar por Seitz. Repartir en botellas y congelar. Puede guardarse durante meses.

AGAR PPLO (DIFCO) ENRIQUECIDO CON 1% BACTO-
FRACCIÓN DE SUERO-PPLO

PPLO (Difco):

- 1) Reconstituir el medio de agar como se indica en la etiqueta comercial.
- 2) Autoclavar 15 minutos a 15 libras de presión.
- 3) Enfriar a 45°C en baño maría.

- 4) Agregar 1 por ciento de fracción de suero PPLO (Difco). Agregar acetato de tallium 1:2.000. Penicilina 1.000 u/ml.
- 5) Verter en placas aproximadamente 15 ml de medio.

AGAR PPLO (DIFCO) ENRIQUECIDO CON 10% DE SUERO DE CERDO

1) Disolver el medio, esterilizar y dejar enfriar a 45 por ciento de suero.

2) Agregar 10 por ciento de suero de cerdo.

3) Agregar acetato de tallium 1:2.000

4) Agregar 1000 u. de penicilina/ml.

5) Verter en placas de Petri.

El acetato de tallium para medio líquido se usa 1:1000 (1 gramo por 1.000 ml de medio. se agrega antes de esterilizar en el autoclave). Para medio de agar PPLO se emplea 1:2.000.

Nota: En el laboratorio de Fabricant (Universidad de Cornell) se prepara una solución stock de 1:100 de acetato de tallium (9 gramos de acetato de tallium más 900 ml de agua destilada. Autoclavar. Agregar 10 por ciento de esta solución stock al medio, inmediatamente después del control).

No hay inconveniente en agregar el acetato de tallium y autoclavar el medio Difco.

Si se agrega después poner 1 gramo en 10 ml de agua en un tubo y etiquetar. Poner 0.5 gramos en 10 ml de agua en otro tubo y etiquetar. Autoclavar. Usar los 10 ml de solución en ambos casos.

Tener en cuenta que el agar debe estar a 45°C cuando se vierte en las placas:

los medios usando

10% suero de cerdo	+ V.F.	
10% suero de bovino	+ V.F.	
10% suero de cerdo	+ Difco.	
10% suero de bovino	+ Difco.	
10% fracción de suero de equino	Difco	+ Medio-Difco.
25% líquido ascítico	Difco	+ Medio-Difco.
15-30% suero equino		+ Medio-Difco.

Procedimiento para inoculación

No hay un método ideal para aislamiento de PPLO de cultivos celulares y existe una gran variedad de medios, tiempos de incubación, volumen del inóculo y tensión atmosférica. Se puede decir que no existe un medio capaz de permitir el aislamiento primario de todas las especies de micoplasma.

INOCULO

Se inoculan unas pocas gotas de suspensión celular sobre la superficie de la placa de agar PPLO y se extienden con varilla de vidrio. El volumen de inóculo es variable desde gotas de 0.001 ml de suspensión en cada placa hasta 0.1 ml y en medio líquido hasta 1 ml.

Las placas deben estar muy húmedas ya que la deshidratación inhibe el desarrollo. También es útil proceder a desintegrar las células en un tubo de Griffith y luego sembrar los restos celulares sobre la placa de agar PPLO.

La presencia de restos celulares y células hace más difícil ver las colonias.

INCUBACION

Sellar las placas con cinta engomada o scotch para que se mantengan húmedas, o colocarlas en una jarra en la que se coloca una pequeña cantidad de agua o papel de filtro embebido en agua. Empleamos usualmente la jarra de McIntosh-Fildes. Incubar a 37°C. La atmósfera puede ser:

- incubación anaeróbica (usada por algunos bacteriólogos)
- incubación con 5 por ciento de CO₂ y 95 por ciento de N.
- incubación con 5-10 por ciento de CO₂
- incubación aeróbica

Hemos empleado la incubación con CO₂ y aeróbica dentro de la jarra o con placas selladas. La humedad y el CO₂ tienen efecto estimulante.

Tiempo de incubación

Varía con los medios de cultivo empleados. Con el medio de Hers y con cultivos en placas alimentados con células vivas el desarrollo aparece

en 48-72 horas. en cambio con otros medios es necesario incubar durante 5-10-14 días haciendo observaciones periódicas a partir del 5° o 6° día. La incubación puede prolongarse varias semanas.

Subcultivos

En los medios líquidos los subcultivos se realizan entre el 3° y 5° días. En los medios líquidos los micoplasmas quedan viables sólo por un período limitado, en cambio en medios semisólidos permanecen vivos mayor tiempo pudiendo repicarse cada 7-14 días cuando desarrollan en medio semisólido conteniendo 0.1 por ciento de agar.

Subcultivos de colonias en medio de agar PPLO

Observadas y localizadas las colonias típicas éstas pueden ser "pescadas" para transferirlas a un medio líquido o sólido.

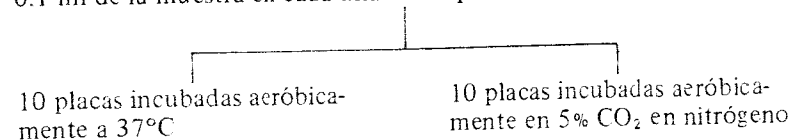
Se enfoca con la lupa de disección o en el microscopio y con bisturí estéril, se extrae el trozo de agar que porta la colonia incluida y se vierte en un medio de caldo PPLO o deposita sobre la superficie del agar PPLO extendiéndola con una varilla de vidrio estéril.

También puede picarse la colonia con una pipeta Pasteur finamente afilada y luego se pipetea repetidamente en el caldo para desintegrarla y dispersar los microorganismos, tratando que se liberen del agar.

Esquema de test para vacunas a virus vivo según Edward

Prueba en medio sólido

Verter 10 ml de medio en 20 placas de Petri. Secar a 37°C. Inocular 0.1 ml de la muestra en cada una de 20 placas

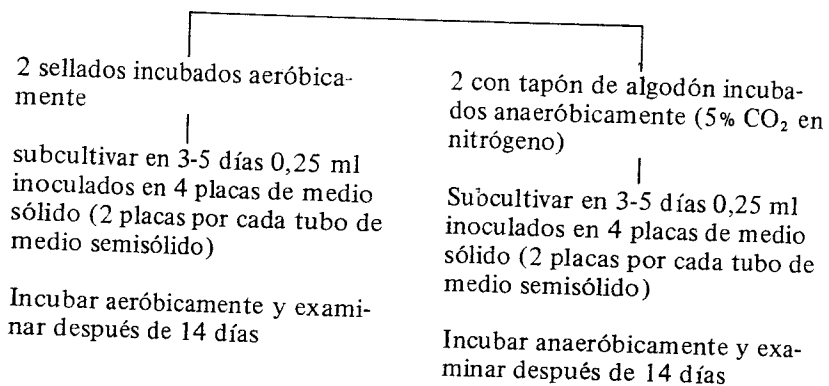


Examinar después del 7°, 14° y 19° días de incubación

Colonias dudosas subcultivarlas bajo similares condiciones. Todos los cultivos deben examinarse desde el 7° día periódicamente.

Prueba en medio semisólido

Inocular 1 ml de la muestra en cada uno de 4 tubos conteniendo cada uno 10 ml de medio PPLO

**Observación de colonias – Características**

La observación se realiza con lupa de disección o con microscopio estereoscópico con un aumento de 50 a 150. Con microscopios de mayor aumentos y con menor profundidad de foco las colonias son menos fácilmente reconocibles y lo que se gana en aumento se pierde en la apariencia total de la colonia.

Es necesario no confundir las colonias con restos celulares o agrupaciones de células o con formaciones que aparecen en el medio haciendo pequeñas prominencias o promontorios que resultan del suero no inactivado o del agar. Estas pseudocolonias pueden diferenciarse fácilmente cuando se tiene experiencia en PPLO pero al comienzo pueden inducir a error.

Las colonias desarrollan ligeramente por debajo de la superficie del agar y tienen forma esférica y muchas veces bordes bien definidos y aparecen como pequeñísimos planetas. Otras veces desarrollan periféricamente del núcleo central hacia la superficie dando la apariencia de un huevo frito. Pueden presentar apariencia granulosa o también muy lisa.

Algunas de las cepas aisladas presentaban un típico mamelón en el núcleo central. Una vez coloreada con el método de Dienes o el azul de metileno puede observarse al microscopio común con el menor aumento y entonces se observa un núcleo central teñido en azul profundo.

granuloso y con hebras irregulares y una periferia muy tenue granulosa y teñido pálido en azul. A veces la observación muestra una colonia muy delicada y difícil de enfocar. En cambio en el microscopio estereoscópico las colonias son muy características.

Tocadas con el asa no se extraen fácilmente ya que se encuentran en gran parte incluidas en el agar.

Es muy importante lograr la luz adecuada con lámparas de luz puntiforme de buena intensidad.

Cepas aisladas

Hemos aislado micoplasmas de diferentes líneas celulares BHK en suspensión y en monocapas. Se han aislado en cepas procedentes de Sao Paulo, Brasil y de Inglaterra mantenidas en Uruguay.

Los aislamientos han permitido observar dos cepas de micoplasmas que presentan caracteres coloniales marcadamente diferentes y que procedían de líneas de células de diferente procedencia.

Una de las cepas de PPLO muestra colonias perfectamente esféricas, contornos muy regulares y dando colonias lisas y colonias granulosas. Se asemejan a pequeños planetas. Observadas al microscopio común con pequeño aumento y teñidas presentan forma esférica y es posible observar detalladamente su estructura con centro más denso y granuloso y con ligero retículo y periferia más hialina delicada. Bordes bien definidos.

Estas colonias se asemejan a las descritas para *Mycoplasmas hominis*. La otra cepa que muestra diferencias presenta colonias de mayores dimensiones y más fácilmente observadas.

No mantienen tan perfectamente la esfericidad aunque muchas presentan la forma esférica. En su centro muestran un mamelón o promontorio muy nítidamente reconocible. Al microscopio común observado con el menor aumento teñido o sin tinción se presentan con la forma típica del huevo frito, apariencia granulosa en la zona central y más homogénea y delicada periféricamente.

Las cepas aisladas en los cultivos celulares mostraron una marcada resistencia a los antibióticos habiéndose empleado especialmente tilmicina en concentraciones desde 25 μ hasta 100 μ kanamicina, oxitetraciclina, etc. sin obtener éxito en lograr su inhibición.

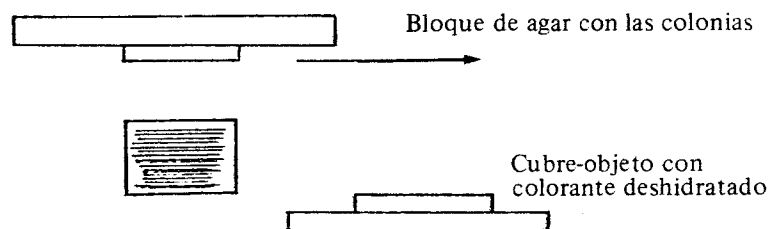
Método de Dienes (1939) para coloración de colonias de PPLO

Colorante:	Azul de metileno	2.5 gramos
	Azure	1,25 "
	Maltosa	10 "
	Carbonato de sodio	0.25 "
	Agua destilada	100 ml

Colocar el colorante sobre cubre-objeto libre de grasa, tratado con alcohol. Dejar evaporar al aire.

Cortar un bloque de medio conteniendo colonias de PPLO, con bisturí estéril y depositar sobre porta-objeto limpio desengrasado.

Depositar el cubre-objeto cuidadosamente sobre el bloque de medio, de manera que la cara conteniendo el colorante se adhiera al medio. Evitar frotar.



Sellar con parafina para evitar la evaporación y examinar a menor aumento. Las colonias de PPLO aparecen bien definidas con centro azul profundo y periferia azul suave granulosa, las colonias bacterianas también toman el colorante pero se decoloran dentro de 30 minutos.

El criterio para identificación de colonias de PPLO.

- 1) típica morfología de las colonias (muy pequeñas)
- 2) requerimientos muy exactos de proteína sérica
- 3) imposibilidad de extraer las colonias con el asa
- 4) coloración de Dienes intensa y persistente.

BIBLIOGRAFIA

The Vet. Bull. August 1968. p. 512, No. 3041
Hayflick, L. (Chairman) 1967

The Vet. Bull. December 1967.
p. 894, No. 5077

House, W. and Waddell, A., (1967)

J. Path. Bact. 93, 125-132

(Inst. Virol., Univ. Glasgow)

Detection of mycoplasma in cell cultures.

The Vet. Bull. December 1967.

Erm, H., Plastringe, W.N. and Tourtellotte, M.E. (1967)

I. Mycoplasma: Nutritional studies of laboratory strains.

II. Mycoplasma: Isolation from prepuce and semen of bulls.

Acta Vet. Scand. 8, 111-112 and 123-135 (E.g.da)

(Dep. Anim. Dis., Univ. Connecticut, Storrs 06268)

The Vet. Bull. August 1967.

p. 536, No. 3968 and 3069

Beard, C.W. and Anderson D.P. (1967)

Avian diseases 11, 54-59 - 60-64 (S.E. Poultry Res. Lab. Athens, Ga 30601)

Aerosol studies with avian mycoplasma

I survival in the air

II Infectivity of mycoplasma gallisepticum for chickens and turkeys.

The Vet. Bull. July 1967

p. 429, No. 2490

Hedberg, M. and Burms, J.M. (1966)

Ann Rep. Div. Lab. Res., N.Y.

State Dep. HLTH 1965 pp 130-131

Isolations of Mycoplasma species.

The Vet. Bull. November 1967.

p. 811, No. 4594

Reuss, K., Plescher, C.,

Hülser D. and HerzBerg, K. (1967)

Zentbl. Bakt., Parasit K. de I (orig) 203, 121 - 135 (G.e)

(Ehrlich Strasse 4016 Frankfurt/main)

Morphology of fixed and enfixed mycoplasma

The Vet. Bull. December/1968

p. 847, No. 4937

Antibiotics and antiseptics on Mycoplasma Gallisepticum.

November 1968

p. 766, No. 4466

Ogata, M., Ohta, T. Obara, A. and Pan, I.Z. (1967)

pap. p. set. Sci. 29 259-271 2 plates (E.j.) Rep. Vet. Microbiol.

Fac. Agric. Univ. Tokyo)

Investigations on growth media for Mycoplasma, etc.

The Vet. Bull June 1969

p. 402, No. 2402

Mycoplasma arginini comun contaminant in TC

Foot-and-Mouth Disease Bulletin

67. Mycoplasma in tissue culture, April 1967, Volume IV, Number 4, Adler H.E.
Adv. Vet. Sci. (1965)10: 230 – 232.

62. Mycoplasma in tissue culture, McPherson, I.J. Cell Sci: (1966) 1 (2): 145 – 168.

x 87 Elimination of Pleuro-pneumonia – like organisms from tissue culture Johnson, R.W. & Orlando, M.D. – May 1967 Volume VI Number 5 Appl Microbiol (1967) 15 (1): 209-210.

165 Detection and treatment of contaminating Mycoplasma in cell culture Coos, G.F., Goodman, M.R., Shaw E.J., Aust J. exp. December, 1967, Volume VI, Number 12, Biol. Med. Sci. (1967) 45: 201-202.

Rapid Method for demonstrating intracellular PPLO in a strain of Hamster Kidney cells (BHK₂₁ 13) – *Nature*, May 21, 1966. W.I.N. Shedden, Vol. 210 B.C. cole.

Transformation in Hamster cells Mediated by Mycoplasmas. Dr. I. Mac Pherson and W. Russell, *Nature*, June 25, 1966, p. 1343. Vol. 210.

Pathologic and serologic characteristics of a Mycoplasma, R.W. Moore, H.E. Redmond, *American Journal of Veterinary Research* Vol. 27, November 1966, No. 121, p. 1649.

A reevaluation of the use of media for the isolation of PPLO of avian origin Julius Fabricant, *Avian Diseases*, vol. 2, No. 4 – Cornell University.

Problems in the isolation and identification of avian PPLO. Julius Fabricant. Cornell University, New York Veterinary College. *Annals of the New York Academy Sciences*, Volume 79, Article 10, pp. 393 – 396, 1960.

Swine serum and CO₂ in the isolations of Avian PPLO Julius Fabricant, *Avian Diseases*, vol. III, No. 4, Nov. 1959.

MYCOPLASMA**Medios para el cultivo de mycoplasma o PPLO*****BACTO - PPLO AGAR**

Infusión de	Código 0412
Bacto - Carne y Corazón para Infusiones	50 grs.
Bacto - Peptona	10 grs.
Cloruro de Sodio	5 grs.
Bacto - Agar	14 grs.

El Bacto - PPLO Agar se recomienda como un medio base para ser enriquecido con el Bacto - PPLO Serum Fraction (Fracción del Suero para PPLO). Líquido Ascítico, sueros y otros enriquecedores satisfactorios para el cultivo y mantenimiento de los PPLO o Mycoplasmas, según ha sido descrito por Morton, Smith y Leberman.¹ Estos autores hallaron que la Bacto - Peptona, la Bacto Tryptosa y el Bacto - Extracto de Levadura eran peptonas satisfactorias para emplear en un medio para el cultivo de estos microorganismos. La Bacto - Peptona, en la presencia de una infusión de Bacto - Beef Heart for Infusions (Carne y Corazón para Infusiones), dio mejores resultados. El Bacto PPLO Agar reproduce la formulación recomendada por estos autores.

El Bacto - PPLO Agar, enriquecido con Bacto - Ascitic Fluid (Líquido Ascítico) o con Bacto - PPLO Serum Fraction, permitirá el desarrollo de colonias de PPLO visibles al microscopio, después de 48 horas o más de incubación aeróbicamente, anaeróbicamente o en una atmósfera de dióxido de carbono al 5 por ciento a 37°C. Después de la incubación de las placas invertidas, las mismas son examinadas bajo el microscopio con poco aumento, enfocando toda su superficie, para detectar la presencia de colonias superficiales sobre el medio. Los cultivos deben ser observados diariamente, al cabo de las 48 horas, durante una semana, antes de que la placa se considere negativa. Las colonias de PPLO son redondas, con un centro denso, y una periferia menos densa, dando la apariencia de un huevo frito. Varían en tamaño de 10 a 500 micras en diámetro (0.01-0.5 mm) y crecen dentro del medio. Los organismos individuales no son detectables, así hay poca evidencia, aun con ayuda del microscopio, de algún tipo de organización celular. En la periferia de algunas de las colonias se pueden observar vacuolas. Ellas son los corpúsculos grandes que caracterizan al grupo de PPLO o Mycoplasmas.

Para rehidratar el medio, suspenda 34 gramos de Bacto - PPLO

Agar en 1000 ml de agua destilada fría y caliente a ebullición para disolver el medio completamente. Distribuya en frascos y esterilice en el autoclave durante 15 minutos a 15 libras de presión (121°C). Después que el medio se ha enfriado a 45-60°C, añada 1 por ciento de Bacto - PPLO Serum Fraction o 25 por ciento de Bacto - Ascitic Fluid. Mezcle completamente y vierta en placas de Petri estériles.

La reacción final del medio no enriquecido será de pH 7.8 a 25°C.

Una libra de Bacto - PPLO Agar dará 13.3 litros de medio no enriquecido.

ENVASE:

0412-02-0	1/4 libra
0412-01-1	1 libra

REFERENCIAS:

¹ Am. J. Syphilis Gonorrh. Venereal Disease, 35:361:1951

BACTO - PPLO BROTH

Infusión de Carne y Corazón	50 grs.
Bacto - Peptona	10 grs.
Cloruro de Sodio	5 grs.
Bacto - Cristal Violeta	0.01 grs.

El Bacto - PPLO Broth (Caldo para PPLO) es preparado de acuerdo a la fórmula sugerida por Morton, Smith, Williams y Eickenberg,¹ para el enriquecimiento selectivo de los medios para PPLO (Pleuroneumonía-Like Organisms: Organismos análogos al Pleuroneumonía). Este medio ha sido diseñado para facilitar el aislamiento de PPLO, a partir de muestras clínicas. Es también de utilidad en la purificación de colonias de PPLO contaminadas con otros microorganismos. El crecimiento de microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos es suprimido, mientras los PPLO se desarrollan. A continuación de la inoculación con muestras clínicas o con bloques de colonias PPLO en agar contaminado con bacterias, incube a 37°C durante 36 a 72 horas, y, entonces, siembre en placas de Bacto-PPLO Agar, conteniendo 1 por ciento de Bacto-PPLO Serum Fraction, o 25 por ciento de Bacto - Ascitic Fluid. La inoculación de la placa es llevada a cabo transfiriendo una gota del cultivo enriquecido sobre la placa y esparciéndola uniformemente sobre la superficie del medio.

Para rehidratar el medio, suspenda 21 gramos de Bacto - PPLO Broth en 1000 ml de agua destilada, esterilice en el autoclave durante 15 minutos a 15 libras de presión (121°C). A cada libra añada 2.85 ml de Bacto - Chapman Tellurite Solution (Solución de Telurito de Chapman) para dar una concentración de 1-35 000 de telurito de potasio. Añada 25 por ciento de Bacto - Ascitic Fluid. Alórnela en labo-

* Fuente: Bacto Media Manual, E. I. du Pont de Nemours & Co., 1954

estériles, bajo condiciones asépticas. La reacción final del medio no enriquecido será de pH 7.8 a 25°C.

Una libra de Bacto - PPLO Broth dará 21.6 litros de medio no enriquecido.

ENVASE:		REFERENCIAS:	
0410-02-2	1/4 libra	¹ J. Dental Res., 30:415:1951	
0410-01-3	1 libra		
	BACTO - PPLO BROTH w/o CV		Código 0554
	Infusión de		
	Bacto - Carne y Corazón para Infusiones	50 grs.	
	Bacto - Peptona	10 grs.	
	Cloruro de Sodio	5 grs.	

El Bacto - PPLO Broth w/o CV (Caldo para PPLO sin Cristal Violeta) es recomendado como un medio base líquido, suplementado con Bacto - PPLO Serum Fraction o Bacto - Ascitic Fluid, para el enriquecimiento de muestras sospechosas de contener PPLO previo a su inoculación en el Bacto - PPLO Agar, según ha sido descrito por Morton y Lecce.¹

Para rehidratar el medio, disuelva 21 gramos en 1 000 ml de agua destilada. Esterilice en el autoclave durante 15 minutos a 15 libras de presión (121°C). El medio es enriquecido con la adición, en condiciones asépticas, de 25 por ciento de Bacto - Ascitic Fluid o 1 por ciento de Bacto - PPLO Serum Fraction. Los agentes selectivos tales como el acetato de talio (1:2000) y la penicilina pueden ser agregados, si se desea. Si el Cristal Violeta es usado como un agente selectivo el medio debe ser enriquecido con Bacto - Ascitic Fluid.

A continuación de la inoculación con muestras clínicas o con bloques de colonias PPLO en agar contaminado con bacterias, incuba a 37°C durante 36 a 72 horas, y, entonces, siembre en placas de Bacto - PPLO Agar enriquecido.

La reacción final del medio será de pH 7.8 a 25°C.

Una libra de Bacto - PPLO w/o dará 21.6 litros de medio, antes del enriquecimiento.

ENVASE:		REFERENCIAS:	
0554-02-8	1/4 libra	¹ J. Bact., 66:646:1954	
0554-01-9	1 libra		
	BACTO - PPLO SERUM FRACTION		Código 0441

La Bacto - PPLO Serum Fraction (Fracción del Suero para PPLO) es una solución estéril, recomendada como un enriquecedor, en los medios para el cultivo de PPLO. Es empleada en la concentración del 1 por ciento con el Bacto PPLO Agar y el Bacto - PPLO Broth, como se discute en la página 82 y 89 del Manual DIFCO (Observación: en el manual DIFCO este Medio figura con el nombre de Bacto - PPLO Enrichment Broth). La Bacto - PPLO Serum Fraction también ha sido empleada para la propagación, estabilización y mantenimiento de los Treponemas in vitro.

La Bacto - PPLO Serum Fraction es la fracción del suero, parcialmente purificada, requerida para el crecimiento de los PPLO, según lo han descrito Smith y Morton.¹ Tiene la ventaja sobre los sueros y sobre el ascitic fluid (líquido ascítico) de que solamente 1 por ciento es requerido para el enriquecimiento de caldo o de los medios sólidos para el cultivo de los PPLO, y de que no tiene efectos inhibidores sobre algunas cepas de PPLO, como sí lo tienen los sueros normales.

La Bacto - PPLO Serum Fraction ha sido demostrada por Rose y Morton² que reemplaza efectivamente al suero o fracciones de albúmina, que se emplean comúnmente en el cultivo de Treponemas no virulentos.

ENVASE:		REFERENCIAS:
0441-633-1*	6 x 20 ml	¹ J. Bact. 61:395:1951
		² Am. J. Syphilis Gonorrh. Venereal Diseases, 36: 1:1952
* Conservar a 2-8°C		

BACTO - MYCOPLASMA SUPPLEMENT	Código 0836
BACTO - MYCOPLASMA SUPPLEMENT S	Código 0837

El Bacto - MYCOPLASMA Supplement y el Bacto - Mycoplasma Supplement S son enriquecedores desecados y estériles para usar con el Bacto - PPLO Agar, según ha sido descrito por Hayflick¹ y con el Bacto - Heart Infusion Agar y Broth² para el aislamiento y propagación de Mycoplasmas. Son preparados de acuerdo a las fórmulas de Chanock, Hayflick y Barile³ y de Hayflick.⁴

El Bacto - Mycoplasma Supplement contiene *extracto de levadura fresco y suero de caballo*.

El Bacto - Mycoplasma Supplement S es un enriquecedor selectivo preparado al añadir acetato de talio y penicilina al Bacto - Mycoplasma Supplement.

Para rehidratar los Bacto - Mycoplasma Supplements emplee 30 ml de agua destilada estéril por cada frasco y rótelos suavemente para

disolver. Añada el contenido de un frasco a 70 ml de Bacto – PPLO Agar o Broth estériles, enfriados a 50°C. Distribúyalo en tubos o placas según se desee.

ENVASE:

0836-67-0* Bacto – Mycoplasma Supplement 30 ml
0836-68-9* 6 x 30 ml

0837-67-9* Bacto – Mycoplasma Supplement S 30 ml
0837-68-8* 6 x 30 ml

* Conservar a 2-8°C

REFERENCIAS:

¹ Texas Repts. Biol. Med., 23:285:1965

² SAM – 403 Biologic Services Vet. Biol. Div., USDA

³ Proc. Nat. Acad. Sci., 48:41:1962

⁴ Personal Communication, 1968

ANEXO 2. TITULACION DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA

Todas las reacciones biológicas con virus y anticuerpos son cuantificables y por tanto son posibles de medición. A este método de medida se le denomina titulación.

En Fiebre aftosa (FA) se puede titular un virus midiendo su capacidad de reacción frente a un suero hiperinmune en presencia del complemento (fijación del complemento), en presencia de un suero de animal inmune (seroneutralización o seroprotección) o simplemente para conocer su capacidad de infección en un sistema sensible. Se denomina sistema sensible a aquellas especies animales que son naturalmente susceptibles a los virus de la FA (bovinos, porcinos, caprinos y otros bilingulados), a las que son artificialmente susceptibles (ratones lactantes, cobayos, conejos neonatos) y a los cultivos celulares, de los cuales los más usados son los de células renales de hamster (BHK₂₁ clon 13) y los de células renales de porcinos (IB-RS-2 clon 17).

Este capítulo tratará sobre la medida de infecciosidad de un virus en sistemas sensibles, es decir, de su titulación, que representa una estimación de su poder infectante.

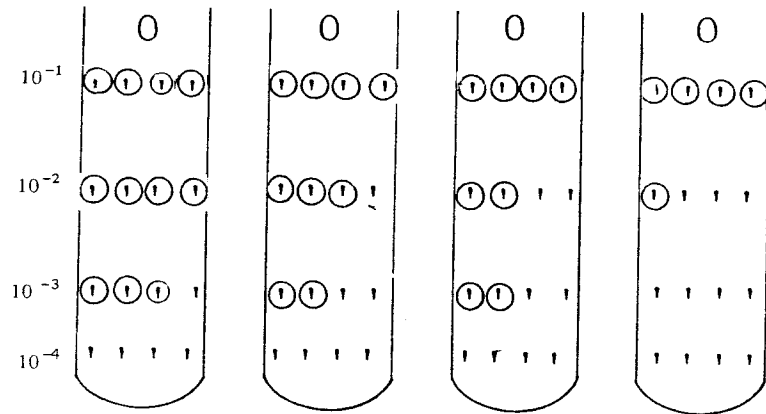
Para ser titulado, un virus debe ser diluido y la estimativa de su poder infectante será más exacta cuanto menor sea el espacio entre las diluciones que se hagan y cuanto mayor sea el número de puntos de observación, ratones o cultivos celulares inoculados.

Por ejemplo una titulación realizada utilizando las diluciones $10^{-1.7}$ (1/50), $10^{-2.4}$ (1/250), $10^{-3.1}$ (1/1250), $10^{-3.8}$ (1/6250) será más exacta que la utilizada con las diluciones 10^{-1} (1/10), 10^{-2} (1/100), 10^{-3} (1/1000), y 10^{-4} (1/10000). De la misma forma, la que utiliza las diluciones $10^{-1.3}$ (1/20), $10^{-1.4}$ (1/40), $10^{-1.8}$ (1/80), $10^{-2.2}$ (1/160), $10^{-2.5}$ (1/320), etc. será más exacta que la citada en primer lugar. En esos casos el factor de dilución en la primera titulación fue 5, en la segunda 10 y en la tercera 2, respectivamente. Por otra parte, si se usa un mayor número de observaciones por dilución (es sea 10 ratones o células de células en crecimiento) en un que se de microtitulaciones su vez de 5, se tendría una estimativa más exacta.

La decisión de usar bases logarítmicas menores entre las diluciones y mayor número de observaciones está relacionada con el grado de exactitud que se requiere de una titulación y de la disponibilidad de animales, cultivos celulares, etcétera.

Titulaciones más frecuentes utilizadas en Fiebre aftosa

Bovinos: Generalmente la titulación del virus de la FA en bovinos se hace por inoculación de las diluciones en puntos de 0,1 ml, utilizando la vía intradermolingual. Se utilizan 4 puntos de cada dilución, iniciando con la más concentrada en la base de la lengua y decreciendo con las diluciones subsecuentes en el sentido de la base hacia la punta. Generalmente se usan 4 bovinos susceptibles por titulación. La lectura se hace entre 40-48 horas después de la inoculación y se consideran positivos los puntos donde hubo formación de vesículas (Figura 1).



Puntos positivos Puntos negativos

$10^{-1} = 16$	0
$10^{-2} = 10$	6
$10^{-3} = 7$	9
$10^{-4} = 6$	16

FIGURA 1
Titulación de virus de la Fiebre aftosa

El título se calcula por el método de Reed & Muench, dando $10^{3.56}$ por milímetro = $10^{3.56}$ DI₅₀ (dosis infectantes 50 por ciento).

Ratones: Se utilizan como mínimo 6 ratones por dilución de virus, inoculando 0,05 ml en cada uno por vía intraperitoneal o intramuscular.

Ejemplos. En este ejemplo se observa que para cubrir las mismas fajas de diluciones se utilizan 30 ratones en el primer caso y 42 en el segundo:

a) Ratones			b) Ratones		
Diluciones	Muertos	Sobre-vivientes	Diluciones	Muertos	Sobre-vivientes
10^{-3}	6	0	$10^{-2,7}$	6	0
-4	6	0	-3,4	6	0
-5	4	2	-4,1	6	0
-6	2	4	-4,8	6	0
-7	0	6	-5,5	3	3
			-6,2	1	5
			-6,9	0	4
Títulos:	$10^{6,8}/ml$		$10^{6,9}/ml$		

Los títulos son representados por DL₅₀ (dosis letales 50%)

Los títulos son representados por DL₅₀ (dosis letales 50 por ciento)

Cultivos celulares

1. PLACAS DE MICROTECNICA

En el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (CPFA) se utiliza el siguiente tipo de placas: Microtiter Plate Falcon 3040. Esta placa posee 96 orificios. En la técnica utilizada por el CPFA se usan monocamadas de las células IB-RS-2 clon 17 formadas con 24 horas de antecedencia y en las cuales en cada orificio se sembró 0,1 ml de una suspensión conteniendo 300.000 células por milímetro con incubación en estufa de CO₂ a 37°C, cubiertas con tapa de vidrio para permitir la circulación del aire.

Para las titulaciones de virus, el medio de cultivo de las células debe ser retirado por simple inversión de las placas e inoculadas las diluciones de virus preparadas usándose como diluyente el medio Eagle sin suero. Generalmente se usan como mínimo 6 orificios por dilución y 4

diluciones. Por tanto, en una placa se pueden realizar 4 titulaciones. El inóculo es de 0,1 ml por orificio. Después de la inoculación las placas son incubadas a 37°C en estufa de CO₂ por 48 horas, y se hace la fijación y coloración de las células con una mezcla de formol y cristal violeta. Después de lavar las placas en agua corriente, se verifica que donde hubo efecto citopático el orificio está limpio y donde no hubo, las células están intactas y coloreadas con el cristal violeta.

Para la titulación de microplacas se pueden usar también las células BHK₂₁ clon 13, pero después de la fijación y coloración, no todas las células que presentan efecto citopático se desprenden, siendo, por tanto, necesario hacer la lectura en microscopio para certificar las lesiones.

Los títulos son generalmente estimados por los métodos Reed & Muench o Kärber y para cada dilución se cuentan los orificios positivos y negativos (dosis infectantes 50 por ciento de tejido).

2. TUBOS

En el CPFA se utilizan tubos de cultivo de células sembradas con células IB-RS-2 o BHK₂₁. Estos tubos son estacionarios, colocados en estantes apropiados que permitan una posición horizontal con ligera inclinación para evitar que el medio de cultivo moje los tapones de goma que los mantienen cerrados. Después de la siembra de las células los tubos son colocados en estufa común a 37°C para la formación de la monocamada, lo que ocurre generalmente en 48 horas. Después de la formación de la monocamada, el medio de cultivo es retirado por aspiración con bomba de vacío y se coloca 0,8 ó 0,9 de medio Eagle sin suero.

Para titular el virus se deben usar como mínimo 6 tubos por dilución y 4 diluciones. Generalmente se usa como inóculo 0.1 ó 0.2 ml de dilución de virus sobre el medio de prueba y la lectura se hace en microscopio 48-72 horas después de la inoculación.

Los títulos son calculados como ya fue citado para las titulaciones en microplacas.

3. MÉTODO DE DULBECCO

En el método de Dulbecco también se utilizan las células BHK₂₁ o IB-RS-2 en monocamadas formadas en cajas de Petri o botellas "milk dilution". Estas monocamadas son formadas a las 48 horas de la siembra, siendo que en el primer caso es necesario utilizar la estufa de CO₂

y solamente la estufa común a 37°C para las botellas "milk dilution".

Para la titulación de virus deben ser usadas como mínimo 3 cajas o botellas por dilución.

Procedimiento: Se retira el medio de cultivo (con suero) de las cajas o botellas. Se lava la monocamada de células con medio de cultivo (sin suero). Se inocula 0.1 ó 0.2 ml de las diluciones de virus por caja o botella, dejando en adsorción por 30 minutos en la estufa correspondiente, tratando de distribuir el inóculo sobre las células con intervalos de 10 minutos. Después de la adsorción se adiciona, en partes iguales, una mezcla de goma Karaya con medio Earle 2 veces concentrado, conteniendo 10 por ciento de bicarbonato de sodio al 7,5 por ciento, para que la concentración final de bicarbonato sea de 5 por ciento. El pH debe ser 7.4-7.6. En el caso de usar las botellas, no es necesario adicionar bicarbonato, siempre que el pH del medio sea satisfactorio (sistema cerrado). Se incuba en la estufa correspondiente por 48 horas. Si se trata de células IB-RS-2 se puede incubar sólo por 24 horas y hacer la lectura. En este período de incubación las cajas de Petri o botellas no deben ser tocadas para evitar la formación de placas cometa.

Generalmente con las células BHK₂₁, las placas se pueden vislumbrar con más nitidez 48 horas después de incubadas.

Lectura: Inicialmente es necesario fijar las células con una solución de formol al 20 por ciento en agua, durante 20 minutos. Luego se procede a la coloración de las células utilizando una solución de cristal violeta al 2,0 por ciento en alcohol al 20 por ciento, durante 10 minutos. Después de lavar las cajas de Petri o botellas en agua corriente se hace el recuento de las placas formadas.

Ejemplo: Inóculo de 0.2 por placa o botella.

2 por dilución

Dilución	Núm. de placas
10 ⁻³	DNPC (demasiado números para contar) normalmente placa confluyente
10 ⁻⁴	100-0
10 ⁻⁵	1-5
10 ⁻⁶	2-3
10 ⁻⁷	3-0

Ejemplo: Inóculo de 0,2 ml por caja de Petri o botella
(4 por dilución)

Diluciones de virus	Núm. de placas en cada caja de Petri o botella	Media del número de placas	Log 10 ufp/ 0,2 ml*	Título del inóculo Log 10 ufp/ 0,2 ml**
10 ^{-5,0}	85 90 80 95	87,5	6,94	7,14
10 ^{-5,7}	16 20 17 18	71,0	7,55	
10 ^{-6,4}	4 3 5 3	3,75	6,97	
10 ^{-7,1}	1 0 0 3	1,0	7,10	

* Log 10 media de placas por caja de Petri o botella + Log 10 de la concentración del inóculo.
** Media de 4 valores de la columna 4.
El título del virus por 1,0 ml será 10^{7,84}.

Representación del título de virus

Si se trata, por ejemplo, de una suspensión de epitelio bovino, músculos o carcasas de ratones o conejos, patas de cobayo, etc., los títulos son representados por mililitro o por gramo de material.

Si se hace una suspensión inicial 1/5 (peso x volumen) de cualquiera de los materiales citados para proceder a la titulación considerando la suspensión inicial como 10⁰, tendremos:

Titulación en ratones

Suspensión inicial 1/5 = 10⁰

a) 1,0 ml de suspensión + 9,0 ml diluyente = 10⁻¹

b) 0,5 ml de 10⁻¹ + 4,5 ml diluyente = 10⁻²

así hasta = 10⁻⁶

Inóculo de 0,05 ml por vía intraperitoneal por ratón.

Resultados

Diluciones	Muertos	Sobrevivientes
10 ⁻¹	6	0
-2	6	0
-3	6	0
-4	3	3
-5	2	4
-6	0	6

Título = 10^{4,31} / 0,05 ml = 10^{5,62} / ml = 10^{6,31} / gramo

Estimativa del punto final 50 por ciento en titulaciones de virus

El punto final 50 por ciento puede basarse en varios tipos de reacciones. El más usado está basado en mortalidad, representada por DL₅₀ (dosis letal 50 por ciento). DI significa dosis que infecta 50 por ciento de los animales en prueba y DP₅₀ la dosis de vacuna-suero que protege 50 por ciento de los animales, etc. La misma terminología puede ser aplicada para otros sistemas susceptibles a los virus, como por ejemplo, los cultivos de tejidos, en los cuales la DCT₅₀ representa la dosis que provoca efecto citopático en 50 por ciento de los cultivos inoculados.

Los métodos de cálculo de los puntos finales 50 por ciento de Reed & Muench (ver Cap. II, 17.2 y 18.1.5.1) y Kärber se aplican para una serie completa de reacciones que abarcan 0 por ciento (cero) a 100 por ciento de mortalidad (o infecciosidad, efecto citopático, etc.). Si los datos son erráticos, es decir, muertos o reacciones positivas dispersas en varias diluciones, la titulación debe ser repetida.

ANEXO 3. SEROPROTECCION

En esta prueba inmunológica se utilizan ratones lactantes para evaluar los anticuerpos circulantes inducidos en las especies susceptibles por la acción del virus de la Fiebre aftosa (FA) o por las vacunas con él producidas.

Los ratones lactantes son inmunizados pasivamente con sueros bovinos, porcinos, ovinos, etc. que contengan anticuerpos contra la FA y enseguida son inoculados con virus. A cada prueba se agrega un grupo de ratones inoculados con suero sin anticuerpos (control normal) y otros grupos inoculados sólo con virus.

Los resultados de las pruebas de seroprotección son expresados por *INDICES*, que consisten en la diferencia de títulos infectantes entre ratones inoculados sólo con virus y ratones inoculados con suero y virus.

Materiales

1. *Cajas de ratones:* de preferencia deben ser de material plástico para permitir la limpieza, lavado, desinfección y esterilización más adecuados.

2. *Jeringas:* son necesarias jeringas de 1.0 ml y de 1/4 de ml. Para la inoculación de los sueros se usa una jeringa de 1 ml para cada suero y para la inoculación de virus se usan jeringas de 1/4 de ml.

3. *Agujas:* deben disponerse en cantidad suficiente. Para los sueros se deben usar agujas No. 26 x 1 pulgada y para los virus No. 26 x 3/4 de pulgada (medidas de la marca BD).

4. *Pipetas:* en cantidad suficiente, de 10, 5.2 y 1 ml.

5. *Medios y soluciones:* soluciones de tampon fosfórico, medio de cultivo de células Earle o Earle para resusitar células, y suero para uso como diluyente. Otros materiales e instrumentos como se detallan en el Anexo 1.

torios, como congeladores (-20 y -70°C), heladera, baño María, centrifugas, etcétera.

Procedimiento

1. *Ratones*: de 6 ó 7 días de edad distribuidos en cajas de 12 ratones acompañados de 2 madres. Para cada suero se inoculan 24 ratones, o sea 2 cajas. También se pueden utilizar 32 ratones por suero, divididos en 4 cajas de 8 cada una, siendo necesario en este caso colocar una madre en cada caja.

2. *Suero*: después de ser preparado por los métodos convencionales, los sueros son distribuidos en tubos de ensayo en volúmenes de 15 a 20 ml y conservados en congeladores a -20°C . En el rótulo de identificación deben constar el número del animal sangrado, número del experimento y fecha de la sangría. Si el suero va a ser estudiado frente a 3 ó 4 virus, en su preparación debe ser distribuido en 3 ó 4 tubos de hemólisis en un volumen de 3 ml en cada uno, guardándose el restante en el congelador.

a) *Inactivación*: se efectúa a la temperatura de 60°C por 20 minutos en baño María. La inactivación realizada en pequeñas cantidades es más eficaz que la hecha en tubos de ensayo sobre el volumen total.

b) *Inoculación*: como fue citado, cada suero es inoculado por vía subcutánea en 24 ratones, en la cantidad de 0,1 ml por animal. El suero debe ser puro (sin diluir). Una hora después de la inoculación del virus, los ratones deben ser inoculados con diluciones de virus.

3. *Virus*: se deben usar virus de epitelio directamente o con pasajes (hasta 3 pasajes) en cultivos de células BHK₂₁ clon 13 o IB-RS-2 clon 17. No se deben utilizar virus adaptados a ratones lactantes pues pueden dar resultados erróneos, principalmente en los sueros cuya cantidad de anticuerpos no es muy elevada. Los virus de epitelio bovino dan resultados bastante coherentes, pero su uso en pruebas de rutina es impracticable debido a la falta de disponibilidad en cantidades deseables.

Desde hace algún tiempo el CPFA está utilizando en las pruebas de seroprotección virus procedentes de epitelio bovino con tres pasajes en células BHK₂₁. Durante varios años este procedimiento ha permitido trabajar con material vírico siempre homogéneo.

a) *Preparación*: Después de la tipificación y subtipificación del virus a ser utilizado, se hace una suspensión 1/5 ó 1/10 (p/v) del epitelio y se inocula en botella de Roux (estacionaria) o

Baxter (rolante) con monocamadas de células BHK. Después del efecto citopático, las botellas se congelan a -70°C para la ruptura de las células y mayor liberación de virus. A seguir sobrenadante se distribuye en ampollas en cantidades de 2 ml se descongela y centrifuga a 2 500 rpm por 15 minutos. El sobrenadante se distribuye en ampollas en cantidades de 2 ml y se guarda en congelador a -70°C o en nitrógeno líquido a -196°C . Se sigue el mismo procedimiento para el segundo y tercer pasajes; este último será el utilizado en las pruebas, siendo necesario saber su título en ratones. De ese modo, cuando termina una partida de ampollas de tercer pasaje, se recurre al stock del 2o. pasaje lo que permitirá trabajar siempre con niveles iguales de pasajes en todas las pruebas.

b) *Titulación*: La titulación en ratones se realiza utilizando diluciones con base 5 o menor. De preferencia se deben hacer 3 titulaciones simultáneas y el título del virus debe ser calculado por el método de Reed Muench o Kärber. Cada ratón es inoculado por vía intraperitoneal con 0,05 ml. Los títulos de virus de $10^{6.8}/\text{ml}$ o más elevados son los más apropiados para las pruebas de seroprotección. Si los títulos son inferiores, toda la partida de ampollas del 3er. pasaje es desechada y debe hacerse una nueva partida.

4. *Diluciones de virus a ser utilizadas en las pruebas*: Todos los sueros son enfrentados frente a 4 diluciones de virus, por lo tanto, si se tienen 24 ratones inoculados con un suero, cada dilución de virus será inoculada en 6 animales y, dependiendo de los antecedentes de los sueros en prueba, serán aplicadas diluciones más o menos concentradas. Por ejemplo, si se tiene sueros de bovinos convalecientes o de 30 días posvacunación (DPV) con una vacuna de calidad comprobada, los índices de anticuerpos deben ser altos y se usarán las diluciones de virus de mayor concentración (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4}). Si al contrario se tienen sueros de animales sin vacunación o con vacunación realizada varios meses antes, los índices de anticuerpos son bajos y en este caso las diluciones de virus a ser usadas son las de menor concentración de virus (10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7}).

Partiéndose de una ampolla de virus considerada pura ($1/1$ y 10^0) se procede a las diluciones deseadas, por ejemplo 10^{-1} ó 10^{-8} . El diluyente puede ser una solución tampón fosfatada, medio de Eagle o Earle sin suero, con pH entre 7,4-7,6. Durante la preparación de las diluciones y posterior inoculación, los tubos deben ser mantenidos en baño de hielo.

Para cada prueba se debe hacer la titulación del virus usándose una ampolla para cada día. Se considerará como título del virus el obtenido

el día de la prueba. Las dos diluciones de virus de cada caja deben ser inoculadas con 2 jeringas independientes, una para cada dilución, inoculando siempre primero las diluciones menos concentradas. De ese modo, cuando una caja es inoculada con las diluciones 10^{-4} y 10^{-3} , las diluciones son inyectadas en ese orden con jeringas separadas en los respectivos ratones.

5. *Lectura:* La lectura de la prueba se inicia al día siguiente de la inoculación y se repite diariamente durante los 7 días subsiguientes. Debe ser realizada por dos personas: una examinada cada caja y observa las reacciones (sano, enfermo, paralítico o muerto) y la otra anota el protocolo apropiado. De esa forma, para cada suero y dilución se tiene una visión diaria de la marcha de la prueba. Al final de 7 días de lectura se termina la prueba, computándose para cada suero y para la titulación del virus los ratones muertos y los sobrevivientes. Todas las alteraciones observadas en la lectura (diarrea, madre sin amamantar, madre enferma, etc.) deben ser anotadas para posterior evaluación al final de la prueba.

6. *Resultados:* Los puntos finales de las DL_{50} (dosis letales 50 por ciento) de la titulación del virus y del mismo virus en los ratones inoculados con suero son calculados por uno de los métodos ya mencionados y su diferencia expresa el índice de seroprotección. Así para cada suero se calcula un índice individual de seroprotección.

Ejemplos: protocolos de pruebas (ejemplos 1 y 2).

En el ejemplo 1 (Cuadro 1) se ensayan sueros de antes de la vacunación y de 30 DPV. Naturalmente en los primeros sueros no se esperaban valores altos de anticuerpos y por eso se utilizaron las diluciones de virus 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} y 10^{-4} , obteniéndose los índices de 0,75 y 0,25. Para los sueros de 30 DPV se utilizaron las diluciones 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} y 10^{-1} pues se esperaban índices más altos que se confirmaron dando resultados de 5,00 y 3,75.

La titulación del virus siempre debe hacerse abarcando diluciones arriba y abajo del título esperado, obteniéndose así mortalidades de ratones de 0 a 100 por ciento. El título esperado fue de $10^{-6,0}/0,05$ ml y se hicieron diluciones de 10^{-3} a 10^{-8} .

El ejemplo 2 (Cuadro 2) ilustra sobre problemas prácticos que se presentan cuando no se usan las diluciones adecuadas para un determinado suero y por esa razón no se obtienen resultados finales exactos, sino valores \geq o \leq de un determinado valor:

a) con el suero núm. 20 se pensó que no había anticuerpos altos y por eso se utilizaron las diluciones 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} y 10^{-4} . Como se puede observar no hubo mortalidad tanto en la dilución más concentrada como en las otras. En este caso el índice fue $> 2,31$. Este no es un resultado definitivo y es necesario repetir ese

suero frente a diluciones más concentradas, o sea 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} y 10^{-1} , para llegar al índice final;

- b) con el suero núm. 21 murieron solamente 2 ratones en la dilución más concentrada (10^{-2}), o sea menos de 50 por ciento. En este caso se presume que si se hubiese inyectado la dilución 10^{-1} hubieran muerto los 6 ratones y el cálculo se hizo contando con esta posibilidad. Por lo tanto, el título fue 1,75 y el índice 4,56. Habría sido más correcto inocular la dilución $10^{-1,0}$;
- c) con el suero núm. 22 se pensó que habían anticuerpos altos y por eso se hizo con las diluciones más concentradas (10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} , y 10^{-1}). Sin embargo hubo mortalidad de ratones en todas las diluciones, lo que demostró que no había anticuerpos altos y resultó en un índice de $\leq 1,81$. Este resultado tampoco es definitivo y es necesario repetir el suero frente a diluciones menos concentradas (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} y 10^{-4} , o 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} y 10^{-3});
- d) con el suero núm. 23 se pensó que había anticuerpos en niveles altos, lo que realmente ocurrió. En este caso no hubo mortalidad en la dilución más concentrada (10^{-1}). El título del virus frente al suero fue $< 1,0$ y el índice de protección $> 5,31$, que representó el resultado final. Esto demuestra que los índices de seroprotección siempre dependerán del título del virus usado en la prueba. Si en el caso anterior el título del virus fuese $10^{5,50}$ y no hubiese mortalidad, el índice de seroprotección sería de $> 4,50$.

7. *Interpretación:* 95 por ciento de bovinos que no fueron vacunados o nunca tuvieron contacto con virus de la FA y presentan índices de seroprotección de cero hasta uno (0-1,0) son susceptibles a la exposición de los virus de la FA y se infectan, enfermando clínicamente con los síntomas clásicos. Los animales vacunados que presentan índices de ese valor (0-1,0), en la mayoría de los casos no están protegidos. Sin embargo pueden haber casos en que están protegidos frente a la descarga de virus (falsos susceptibles). Los bovinos vacunados que presentan índices iguales o mayores que 2,5 ($\geq 2,5$) generalmente están protegidos, habiendo pocos casos en que eso no ocurra. La mayor faja de inestabilidad se verifica entre los índices 1,0 y 2,0.

Para una mejor interpretación del significado de los índices, en un trabajo publicado por el CPFA (Gomes y Astudillo), se correlacionan índices de seroprotección de cerca de 700 bovinos vacunados, con el estado inmunitario después de la descarga de virus por vía intradérmica. La inmunidad siempre fue comprobada entre 21-30 DPV. Por

el cálculo estadístico de "probits", los índices fueron transformados en porcentajes que fueron denominados Expectativas Porcentuales de Protección (EPP). Para los bovinos vacunados esas EPP representan la probabilidad de estar protegidos con determinado índice (Cuadro 3).

El CPFA está utilizando la prueba de seroprotección en el control de vacunas, basándose en las medias aritméticas de las EPP del grupo de bovinos vacunados con determinada vacuna, en vez de utilizar la media geométrica de los índices.

En un trabajo publicado en 1983 por el CPFA (Sutmöller) se consideraron el error estándar de la media de las EPP, el número de bovinos en cada vacuna y el valor "t" Student para las pruebas de significación, resultando así EPPs con límites inferiores de confianza (Cuadro 4), lo que significa una interpretación más integral de la información que da la prueba.

CUADRO 1

Ejemplo 1. Prueba de seroprotección, CPFA, 1/10/84
 Virus₁ Campos - BHK₃, preparado el 7/12/83
 6 ratones de 7 días de edad por dilución

Suero bovino No.	Caja No.	Dilución	Días							Resultado	Titulo por 0,05 ml	ISP
			1	2	3	4	5	6	7			
350 15-8-84	1	10-7	v	v	v	v	v	v	v	0/6	10 ^{3.5}	0.75
		-6	v	v	v	v	v	v	0/6			
	2	-5	v	v	:				6/6			
		-4	v	v	:				6/6			
351 18-8-84	3	10-7	v	v	v	v	v	v	0/6	10 ^{6.0}	0.25	
		-6	v	v	v	v	v	v	3/6			
	4	-5	v	v	:				6/6			
		-4	v	v	:				6/6			
350 15-9-84	5	10-4	v	v	v	v	v	v	0/6	10 ^{1.25}	5.0	
		-3	v	v	v	v	v	v	0/6			
	6	-2	v	v	v	v	v	v	0/6			
		-1	v	v	v	v	v	v	4/6			
351 15-9-84	7	10-4	v	v	:	v	v	v	0/6	10 ^{2.5}	3.75	
		-3	v	v	v	v	v	v	0/6			
	8	-3	v	v	v				6/6			
		-1	v	v	:				6/6			
Suero normal	9	10-7	v	v	v	v	v	v	0/6	10 ^{6.0}		
		-6	v	v	v	v	v	v	0/6			
	10	-5	v	v	v	v	v	v	6/6			
		-4	v	v	:				6/6			
Titulación virus	11	10-8	v	v	v	v	v	v	0/6	10 ^{6.25}		
		-7	v	v	v	v	v	v	0/6			
	12	-6	v	:	v	v	v	v	4/6			

v = vivo
 • = muerto
 P = paralítico

CUADRO 2

Ejemplo 2. Prueba de seroprotección. CPFA, 1/10/84
Virus A₂₄ Cruzeiro - BHK₃, preparado el 15/8/84
6 ratones de 6 días de edad por dilución

Suero bovino No.	Caja No.	Dilución	Días							Resultado	Título por 0,05 ml	ISP
			1	2	3	4	5	6	7			
20	1	10 ⁻⁷	v	v	v	v	v	v	v	0/6	-40 110	2.71
		-6	v	v	v	v	v	v	v	0/6		
	2	-5	v	v	v	v	v	v	v	0/6		
		-4	v	v	v	v	v	v	v	0/6		
21	3	10 ⁻⁵	v	v	v	v	v	v	v	0/6	1.75 10	4.56
		-4	v	v	v	v	v	v	v	0/6		
	4	-3	v	v	v	v	v	v	v	0/6		
		-2	v	v	v	v	v	v	v	2/6		
22	5	10 ⁻⁴	v	v	v	v	v	v	v	6/6	450 10	1.81
		-3	v	v	v	v	v	v	v	6/6		
	6	-2	v	v	v	v	v	v	v	6/6		
		-1	v	v	v	v	v	v	v	6/6		
23	7	10 ⁻⁴	v	v	v	v	v	v	v	0/6	-1.0 10	5.31
		-3	v	v	v	v	v	v	v	0/6		
	8	-2	v	v	v	v	v	v	v	0/6		
		-1	v	v	v	v	v	v	v	0/6		
Suero normal	9	10 ⁻⁷	v	v	v	v	v	v	v	0/6	1060	
		-6	v	v	v	v	v	v	v	4/6		
	10	-5	v	v	v	v	v	v	v	4/6		
		-4	v	v	v	v	v	v	v	6/6		
Titulación virus	11	10 ⁻⁸	v	v	v	v	v	v	v	0/6	10631	
		-7	v	v	v	v	v	v	v	2/6		
	12	-6	v	v	v	v	v	v	v	3/6		

v = vivo
• = muerto
P = paralítico

CUADRO 3

Indices de seroprotección (ISP)
Expectativas porcentuales de protección (EPP)

ISP	EPP	ISP	EPP
0,0	20	2,0	81
0,1	23	2,1	84
0,2	25	2,2	86
0,3	28	2,3	87
0,4	31	2,4	89
0,5	34	2,5	91
0,6	38	2,6	92
0,7	41	2,7	93
0,8	44	2,8	94
0,9	48	2,9	95
1,0	51	3,0	96
1,1	55	3,1	97
1,2	58	3,2	98
1,3	61	3,3	98
1,4	65	3,4	98
1,5	68	3,5	98
1,6	71	3,6	99
1,7	74	3,7	99
1,8	76	3,8	99
1,9	79	3,9	99

CUADRO 4

Control de vacuna

Núm. de bovino	A Venceslau ^a		C ₃ Indaial	
	ISP	EPP	ISP	EPP
1	3,75	99	3,96	99
2	4,00	99	4,31	99
3	3,65	99	3,71	99
4	3,25	98	4,31	99
5	2,00	81	2,71	93
6	3,42	98	4,31	99
7	1,50	68	3,96	99
8	4,00	99	4,71	99
9	1,00	51	2,31	87
10	2,69	93	3,56	99
11	2,50	91	3,61	99
12	2,51	91	2,71	93
13	1,25	61	2,06	84
14	2,00	81	3,71	99
15	0,50	34	1,81	76
16	2,75	94	1,81	76
Núm. de bovinos	16			
Medias EPP	83,6	93,7		
Desviación Standard	19,9	8,4		
Media error estándar	5	2,1		
Límite Inferior de confianza	74,8	90,0		

^a Aunque para el virus A Venceslau la media de las EPP fuese 83,6, considerándose el error estándar cae para 74,8. Si se considerara 75% como límite mínimo de aprobación, esta valencia de la vacuna estaría exactamente en este valor.

ANEXO 4. BANCO DE SUEROS

Se denomina Banco de Sueros a una determinada cantidad de muestras de suero bovino, con niveles de anticuerpos conocidos, provenientes de animales vacunados con vacunas preparadas con las cepas de virus de producción adoptadas en el país. Estos sueros deben permanecer almacenados a -20°C .

Objetivo

El objetivo del banco de sueros es dar a los laboratorios de diagnóstico y a los servicios de epidemiología subsidios o informaciones para que actúen con la rapidez necesaria en el caso de que surjan en el campo muestras de virus con características diferentes de las de producción de vacuna y que estén ocasionando problemas de inmunidad.

Formación del banco

Vacunas. La vacuna, o vacunas, a ser usada debe ser considerada padrón, esto es, producida con las cepas de virus recomendadas oficialmente y de eficacia comprobada a través de las pruebas de control de calidad. De acuerdo con la situación del país podrán ser bi o trivalentes, inactivadas y con el adyuvante que se use normalmente en la producción.

Bovinos. Para cada vacuna se deben usar como mínimo 16 bovinos, de 12 a 18 meses de edad, sin histórico de vacunación antiaftosa o contacto con virus, criados desde terneros en establecimientos sin antecedentes de Fiebre aftosa (FA). Antes de la vacunación deben ser sangrados y los sueros sometidos a prueba para confirmar la ausencia de anticuerpos neutralizantes y anti VIA.

Vacunación y revacunación. La vacunación debe ser practicada con todo cuidado y los animales deben ser sujetados individualmente. La revacunación, 4-6 meses después, debe ser realizada de acuerdo

I S P			Vol.	Retirada	Saldo	Prueba
O	A	C				

REVERSO

Acción. Con los resultados de las pruebas, en un plazo bastante corto (no más de 15 días), los servicios de epidemiología podrán orientar las acciones en el campo, como ser: revacunación inmediata con la vacuna de producción normal, producción de una vacuna monovalente específica, sustitución o inclusión en la vacuna normal de la cepa de campo emergente, control de movimiento de animales, suspensión de ferias o exposiciones, etc. A veces una vigilancia epidemiológica estrecha, con acompañamiento de la evolución de cada foco en la región afectada, indica que no se necesita tomar medidas extraordinarias con respecto a las vacunas, pues hay cepas de virus que aparecen y desaparecen con rapidez.

El CPFA como Centro de Referencia para Diagnóstico en la América, mantiene desde hace tiempo un banco de sueros formado con sueros de bovinos vacunados y revacunados con vacunas producidas con las principales cepas de virus de producción de los laboratorios de América del Sur. En varias oportunidades ha recibido solicitud, de diversos países miembros, para el estudio de cepas emergentes en el campo y su posible implicación epidemiológica.

En el Cuadro 1, sueros de bovinos revacunados con vacunas producidas con las cepas de virus A en uso en Brasil, A₂₄ Cruzeiro, A Bagé y A Venceslau, no protegieron contra la cepa de campo que apareció en el municipio Conceição de Macabú en 1977.

En esa ocasión el CPFA produjo una vacuna monovalente especifi-

ca para vacunaciones estratégicas alrededor del municipio de Conceição de Macabú. El Ministerio de Agricultura aplicó medidas extraordinarias, como control de movimiento de animales, puestos de desinfección, suspensión de ferias y exposiciones, etc., que resultaron eficientes para evitar la difusión de la enfermedad a otros municipios de Río de Janeiro.

Los Cuadros 2 y 3 muestran que sueros correspondientes a vacunas producidas con las cepas usadas en Brasil, tipo C₃ Resende y C₃ Indaial, dan una protección parcial frente a dos cepas de virus C de otro país sudamericano. En cambio los sueros de revacunación dan una sólida protección.

CUADRO 1

Vacunas trivalentes inactivadas producidas con las cepas A₂₄ Cruzeiro, A Bagé y A Venceslau. Virus en prueba A Macabú

Número suero	Índice de seroprotección – 30 DPR	
	A Cruzeiro	A Macabú
75	5,65	1,40
55	> 5,25	2,25
54	5,50	1,25
34	> 5,25	1,25
39	5,65	3,50
61	3,00	1,40
09	4,75	1,50
81	3,50	2,50
63	4,65	1,50
69	> 5,25	1,50
74	> 5,25	3,60
40	> 5,25	0,60
	<i>A Bagé</i>	<i>A Macabú</i>
77	4,50	1,50
44	4,25	1,00
28	> 4,75	1,75
03	5,00	0,85
13	1,50	2,00
43	4,35	1,65
25	> 4,75	2,50
64	> 4,75	1,75
15	> 4,75	1,75
68	5,00	1,25
36	2,75	1,76
29	1,50	1,25

	A Venceslau	A Macabú
72		
16	3,45	0,35
19	3,55	1,75
31	1,00	0,25
20	4,50	1,50
18	2,50	0,15
80	>4,25	2,15
76	3,25	1,25
11	>4,25	1,00
57	3,75	1,25
07	1,25	1,00
10	4,00	0,35
	3,58	1,15

DPR = Días posrevacunación.

CUADRO 2

Sueros originarios del banco de sueros. Vacuna trivalente inactivada con adyuvante hidróxido-saponia - Cepa de producción C₃ Resende. Virus de prueba C 43653 y C 43647.

	30 DPV		
	C ₃ Resende	C 43652	C 43647
1417 - 12.5.81			
1471	4,25	1,90	1,75
1407	2,90	1,10	1,35
1462	5,00	1,75	3,50
1456	2,50	1,50	1,00
897	>4,50	1,50	2,44
879	3,50	4,15	3,17
1405	3,00	2,25	2,88
1429	3,25	1,10	0,35
900	4,50	3,01	4,00
	2,25	<1,00	0,75
	30 DPR		30 DPR
1417 - 08.09.81			
1476	5,75	4,50	5,82
1407	5,75	4,50	6,40
1462	5,75	4,50	6,40
1456	5,75	4,50	6,40
897	5,75	4,75	6,40
879	5,75	4,50	6,15
1405	5,75	3,63	6,40
1492	5,05	3,25	6,40
900	5,75	4,50	6,40
	5,75	4,50	6,40

DPV = días posvacunación.
DPR = días posrevacunación.

CUADRO 3

Cepa de virus de producción C₃ Indaial.
Cepas de virus de prueba C 43625 y C 43647

	30 DPV		
	C Indaial	C 43652	C 43647
884 - 12.05.81	3,90	1,31	2,10
1459	3,75	1,31	2,35
1454	5,00	1,71	3,24
1419	4,60	1,71	>1,10
1473	2,35	1,31	2,35
1480	4,35	2,82	3,39
1399	3,60	1,06	3,73
1485	3,10	3,81	3,90
1373	4,10	3,44	2,00
895	2,20	<0,81	1,20
	30 DPR		
884 - 08.09.81	>4,75	4,50	>6,25
1459	>4,75	>4,25	>6,25
1454	>4,75	4,65	>6,25
1419	>4,75	4,50	>6,25
1473	>4,75	>4,25	>6,25
1480	>4,75	>4,25	>6,25
1399	>4,75	>4,25	6,25
1485	>4,50	>4,25	>6,25
1373	>4,75	>4,25	>6,25
895	>4,75	4,25	>6,25

ANEXO 5. CONTROL DE CALIDAD DE LAS VACUNAS ANTIAFTOSA CON ADYUVANTE OLEOSO*

Pautas de Orientación

Introducción

El control de calidad de una vacuna requiere conocer con precisión además de la esterilidad, inocuidad e inmunogenicidad, la estabilidad, la tolerancia por las distintas especies en las que se aplicará y la duración de la inmunidad.

La utilización en forma masiva de una vacuna sin haberla experimentado adecuadamente a nivel de laboratorio y de campo, presupone poner en riesgo la ganadería de un país y los que de ella dependen. Por tanto, la liberación de la fabricación para la comercialización de una nueva vacuna sólo será concedida después de superar los controles de admisión y de series.

Teniendo en cuenta los avances de los últimos años, como es el caso de la vacuna oleosa, la biosintética, la de síntesis bioquímica y otras que futuramente podrán surgir, se dictan pautas de orientación para el control de calidad de dichas vacunas.

Los laboratorios productores han de atender el interés de los países, preparando vacunas con propiedades biológicas superiores a las actualmente disponibles, más estables en condiciones adversas y sin que proporcionen efectos colaterales en las especies a las que se destinen.

El control de calidad de la vacuna antiaftosa se ajustará a lo expuesto anteriormente y ha de realizarse básicamente siguiendo la reglamentación disponible en los países. Para asegurar que esas vacunas proporcionan una inmunidad prolongada, se propone la realización de pruebas especiales para evaluar dicha inmunidad, la cual podrá establecerse por métodos directos y por los indirectos que determinan el nivel de anticuerpos en los sueros de los animales vacunados.

Las normas de aprobación deben de garantizar que los animales vacunados estén adecuadamente protegidos durante el tiempo indicado

* Fuente: *Informe IV Seminario Internacional de Control de Calidad de la Vacuna Antiaftosa*. Asunción, Paraguay 26/9 al 7/10/83.

por el laboratorio productor y aprobado por el organismo oficial competente.

La evaluación de las pruebas a ser realizadas y el comportamiento en el campo indicarán si los niveles de protección considerados en este documento precisan ser modificados.

Control de admisión

El laboratorio productor debidamente registrado presentará un protocolo solicitando el registro de la vacuna a ser sometida a control, el cual hará referencia a sus componentes, proceso de producción, formulación, características físico-químicas, tolerancia a las especies a las que se destinará la vacuna y propiedades biológicas. También indicará el grado de protección conferida en la primovacuna y revacunación a la especie o especies para las que es destinada, así como el modo de uso. Además, presentará resultados de pruebas a nivel de laboratorio y campo en las que demuestre la bondad del producto.

Si el organismo competente considera adecuado el protocolo de la vacuna presentada, indicará al laboratorio productor que elabore la serie de registro, la cual tendrá el número de dosis que garantice el adecuado uso del proceso industrial.

1. *Colecta de muestras*

Las muestras para realizar el control oficial serán extraídas siguiendo el mismo procedimiento utilizado en la vacuna hidróxido-saponinada, descrito en el Manual de Procedimientos para el Control de la Vacuna Antiaftosa. CPFA, Serie de Manuales Técnicos núm. 2, 1980.

2. *Controles físico-químicos*

Las características físico-químicas de la vacuna serán determinadas conforme indicado por el laboratorio productor.

3. *Controles de esterilidad*

La vacuna ha de estar libre de microorganismos viables. La metodología utilizada será similar a la aplicada para la vacuna hidróxido-saponinada.

Para determinar la esterilidad de la vacuna y del envase, es aconsejable como mínimo analizar dos frascos de vacuna de cada una de las diferentes presentaciones.

En caso necesario se utilizarán procedimientos especiales, apropiados para el tipo de vacuna bajo control.

4. *Controles de inocuidad*

La vacuna no tendrá virus activo, tampoco causará Fiebre aftosa ni provocará reacciones inaceptables en los animales vacunados, utilizán-

dola según indicado por el laboratorio productor.

a) *Control de virus activo.* El laboratorio oficial de control realizará el control de virus activo en la vacuna envasada, utilizando los métodos y procedimientos descritos para la vacuna hidróxido-saponinada. En caso necesario, podrá utilizar otras pruebas adecuadas al tipo de vacuna bajo control.

b) *Control de tolerancia.* Se realizarán pruebas de campo controladas, vacunando y revacunando no menos de 50 animales de la(s) especie(s) para la(s) que se ha preparado la vacuna, en los que se observarán reacciones locales, generales y efectos colaterales.

Además, serán sometidos a inspección veterinaria oficial y a exámenes anatómo-patológicos los animales vacunados y revacunados que se considere necesario. Esta prueba podrá extenderse a otra categoría y especie de animales de diversas áreas si así lo estima el laboratorio oficial.

5. *Control de inmunogenicidad*

a) *Métodos directos.* El control de inmunogenicidad estará orientado a determinar la protección conferida por la vacuna en la especie o especies para las que fue preparada.

El laboratorio oficial, en el momento actual y hasta que se complete la información con otras técnicas, utilizará la protección a la generalización podal (PGP) usando el siguiente procedimiento:

Bovinos: Se usarán bovinos adultos, con más de 18 meses de edad, que no hayan padecido Fiebre aftosa, ni hayan sido vacunados contra ella. Estos animales estarán en buen estado sanitario y de nutrición. Además, sus sueros no presentarán anticuerpos VIA ni neutralizantes del virus de la Fiebre aftosa, detectables en pruebas de seroprotección y/o seroneutralización.

Suinos: Se usarán suinos destetados, entre 1 1/2 y 2 1/2 meses de edad, que cumplan las exigencias establecidas para los bovinos y que no procedan de madres vacunadas.

Vacunación: Por cada vacuna sometida a control se vacunarán, siguiendo las instrucciones del laboratorio productor, como mínimo 48 bovinos y/o 32 suinos.

Revacunación: A los 3 meses después de la primovacuna serán revacunados 16 bovinos con la misma vacuna utilizada anteriormente.

Los bovinos y suinos utilizados en las pruebas de duración de inmunidad serán sangrados mensualmente para determinar el nivel de anticuerpos del suero y acompañar la evolución de la prueba.

Comprobación de bovinos: Los 32 bovinos vacunados serán divididos en dos grupos de 16 animales, uno será comprobado a los 30 DPV y el otro a los 90 DPV con la cepa oficial de control seleccionada por el

laboratorio oficial. La inoculación de todos los animales será por vía intradermolingual con 10^4 DI_{50} bovinos/ml, en cuatro puntos, a razón de 0,25 ml por punto. En cada prueba serán incluidos dos controles.

Los bovinos revacunados serán inoculados al final del período de inmunidad propuesto por el laboratorio productor en animales revacunados, siguiendo el procedimiento indicado anteriormente. Las otras valencias de la vacuna podrán ser analizadas por seroprotección y/o seroneutralización.

Comprobación en suinos: A los 30 y 120 DPV serán inoculados 16 suinos vacunados y dos testigos con la cepa oficial seleccionada por el laboratorio oficial. Las otras valencias serán analizadas determinando el nivel de anticuerpos. La comprobación de los suinos vacunados o testigos, será realizada inoculándolos en un punto de cada talón de una pata posterior, con 0,2 ml de una suspensión virulenta que contenga 10^4 DL_{50} ratón lactante/0,4 ml.

Lectura: Los bovinos y testigos inoculados serán revisados una única vez a los 7 días después de la inoculación y los suinos a los 5 días.

Interpretación: La prueba sólo tendrá validez cuando haya presentado un desarrollo normal.

La serie de admisión deberá proporcionar para cada valencia la siguiente protección:

En bovinos: A los 30 y 90 DPV protegerá para cada valencia, como mínimo, 13 de los 16 animales utilizados. Al final del período de revacunación estarán protegidos como mínimo, 8 de los 16 bovinos revacunados.

En suinos: A los 30 y 120 DPV estarán protegidos frente a la generalización podal, como mínimo, 12 y 8 animales respectivamente, de los 16 utilizados.

b) Métodos indirectos

En las pruebas de seroprotección y seroneutralización se usarán los valores propuestos en el Manual de Procedimientos para el Control de Vacuna Antiaftosa, CPFA, Serie de Manuales Técnicos núm. 2, 1980 o aquellos establecidos por el organismo oficial competente del país respectivo.

6. Estabilidad inmunogénica

La estabilidad inmunogénica de la vacuna podrá ser determinada por pruebas en cobayos al mes, 6 meses y 12 meses después de haber sido elaborada.

Interpretación: Los resultados obtenidos al mes, a los 6 y 12 meses no deberán presentar diferencias significativas entre sí.

7. Registro de producción

El organismo oficial de control otorgará el registro de producción

de la vacuna para la comercialización cuando los resultados de las pruebas por él realizadas en la serie de registro demuestren que la vacuna:

1. Es estéril
2. Es inocua
 - a) Ausencia de virus activo
 - b) Sin efectos colaterales
3. Proporciona en la especie o especies correspondientes la inmunogenicidad indicada en el protocolo que solicitó el registro.
4. Tiene estabilidad inmunogénica por lo menos de 12 meses.

Control de series

Para que el laboratorio oficial inicie los controles de series es necesario que el laboratorio productor realice y presente los protocolos de los controles físico-químicos, de esterilidad, inocuidad e inmunogenicidad de la serie a ser controlada.

1. **Control físico-químico.** Serán realizados igual que para el control de admisión.

2. **Control de esterilidad.** Se aplicará el procedimiento y criterio indicado en el control de admisión.

3. **Control de inocuidad.** Se aplicará el procedimiento y criterio expresado en el control de admisión.

4. **Control de inmunogenicidad.**

a) **Métodos directos.** Se elegirá el método utilizado en el control de admisión, y/o otros adecuadamente estudiados. En bovinos se realiza la prueba entre 1 y 3 meses después de vacunados los animales y en suinos a los 30 DPV. En bovinos se exigirá una protección del 81 por ciento y en suinos del 75 por ciento.

b) **Métodos indirectos.** Serán utilizados aplicando el criterio usado en las pruebas de admisión.

5. **Duración de la inmunidad.** El laboratorio oficial de control realizará pruebas de duración de inmunidad por métodos directos o indirectos siempre que lo considere oportuno en cualquier de las series que han superado el control de series. En caso de no alcanzar los valores de aprobación será suspendido el registro de producción.

APENDICE 1

CONTROL DE VIRUS ACTIVO

1. Vacuna con adyuvante oleoso de emulsión primaria o doble

Mezclar 200 ml de vacuna con 100 ml de cloroformo, agitar y centrifugar. Colectar la fase acuosa que contiene el antígeno e inocular tres botellas Roux o tres frascos rolantes con camadas de células BHK₂₁ de 48 horas. Si se trata de una vacuna de emulsión simple se inoculan 5 ml de antígeno y si es de emulsión doble 10 ml. El efecto citopático es observado a las 48 horas después de inocular las células. Ante resultados negativos, hacer nuevo pasaje en una botella Roux o en un frasco rolante, inoculando otros 10 ml de la mezcla de las tres botellas o frascos de 1er. pasaje. Observar aspecto de la capa celular y analizar por FC. Si nuevamente no se aprecia efecto citopático y es negativo en FC, se realiza un tercer pasaje igual al segundo. Si el tercer pasaje también es negativo, la vacuna es considerada inocua. La prueba de FC, realizada con material del primer pasaje, puede ser positiva si el antígeno inoculado tiene un alto título fijador de complemento, por lo que se recomienda suprimir esta prueba con material del primer pasaje.

2. Vacunas con Hidróxido de Aluminio y Oleo

Mezclar 100 ml de vacuna con 25 ml de cloroformo, agitar y centrifugar. Eliminar el sobrenadante y eluir el antígeno del hidróxido de aluminio con el tampón de elución (Apéndice 2), concentrar 25 veces con polietilenglicol 8000 (PEG) e inocular 3 botellas de Roux o 3 frascos rolantes con 1 ml de antígeno concentrado. Realizar los restantes pasos igual a como se ha indicado anteriormente. Para más detalles ver Manual de Procedimientos para el Control de Vacuna Antiaftosa, CPFA, Serie de Manuales Técnicos núm. 2, 1980.

APENDICE 2

BUFFER FOSFATO (P/ELUCCION DE VIRUS)

Fosfato Dipotásico	—	158,85 g (Disolver en baño María)
Fosfato Monopotásico	—	39,19 g
H ₂ O destilada c.s.p.	—	1000 ml
pH	=	7,4
Esterilizar en autoclave		
Fraccionar y guardar en 4°C.		

Dosis protectora bovino 50 por ciento (DPB₅₀) para vacunas oleosas (emulsión primaria) (Técnica en estudio).

Bovinos: Tendrán más de 18 meses de edad y presentarán las características indicadas en el control de inocuidad en bovinos: Manual de Procedimientos para el Control de las Vacunas Antiaftosas. Serie de Manuales Técnicos núm. 2 CPFA, 1980.

Dilución de la vacuna: Se prepararán las diluciones 1:4, 1:6, 1:64 y 1:256, utilizando como diluyente una emulsión primaria preparada igual que la vacuna, pero sin antígeno.

Vacunación: Con la vacuna pura y con cada dilución y para cada valencia a ser estudiada se vacunarán 5 bovinos, por vía intramuscular y con la dosis indicada por el laboratorio productor.

Comprobación: Los 5 bovinos vacunados con cada una de las diferentes diluciones y 2 testigos serán inoculados entre 30 y 90 días después de la vacunación, por vía intradermolingual con 10⁴ DI₅₀ bovino/ml, en cuatro puntos, a razón de 0,25 ml por punto. La cepa de comprobación será homóloga a la utilizada en la elaboración de la vacuna.

Lectura: Entre los 5 y 7 días después de la inoculación, se observarán las lesiones podales.

Interpretación: Las DPB₅₀ serán calculadas por Spearman-Kärber a partir de los resultados de la protección a la generalización podal. Se considerarán bovinos protegidos aquellos que no presenten lesiones podales en ninguna pata.

Para que la prueba tenga valor es necesario que haya presentado una pendiente normal.

Dosis protectora cobayo 50 por ciento (DPC₅₀) para vacunas oleosas (emulsión primaria) (Técnica en estudio)

Cobayos: Se usarán cobayos de tres o más meses de edad, con 550 ± 50 g de peso, en buen estado sanitario y con el epitelio plantar depigmentado.

Dilución de la vacuna: Se prepararán las diluciones 1:4, 1:16, 1/64 y 1:256 utilizando como diluyente una emulsión primaria preparada igual que la vacuna pero sin antígeno.

Vacunación: Con la vacuna normal y con cada una de las cuatro diluciones serán vacunados por vía intramuscular con 1:20 de la dosis bovino, 6 cobayos para cada valencia que la vacuna a ser controlada.

Comprobación: Los 30 cobayos vacunados para cada valencia y 6 testigos, 30 días después de la vacunación, serán inoculados con la cepa homóloga a la utilizada en la elaboración de la valencia a controlar. Los virus de comprobación estarán adaptados a cobayo. Cada animal será inoculado por vía intradermoplantar con 0,1 ml de una suspensión de virus que contenga 10^4 DG₅₀ cobayo/ml.

Lectura: A los 3 y 5 días después de la inoculación se observarán las lesiones podales.

Interpretación: Las DPC₅₀ serán calculadas por Spearman-Kärber a partir de los resultados de protección a la generalización podal. Se considerarán cobayos protegidos aquellos que no presenten lesiones podales en las patas no inoculadas.

Para que la prueba tenga valor es necesario que haya presentado una pendiente normal.

Dosis protectora suino (porcino) 50 por ciento (DPS₅₀) para vacunas oleosas (emulsión doble) (Técnica en estudio)

Porcinos: Se usarán porcinos de 2 a 3 meses de edad que no hayan padecido Fiebre aftosa, ni hayan sido vacunados contra ella, procediendo de plantales no vacunados. Estarán en buen estado sanitario y de nutrición. Además, esos porcinos no presentarán anticuerpos anti-VIA ni neutralizantes de Fiebre aftosa detectables por seroprotección o seroneutralización.

Dilución de la vacuna: Se preparan diluciones 1:3, 1:9 y 1:27 en diluyente inerte, pudiendo utilizarse el siguiente:

CO ₃ Na	0.53
CO ₃ HNA	16.80 g
Na Cl	85.00 g
Agua destilada	10.00 l

Vacunación: Con la vacuna normal y con cada una de las tres diluciones serán vacunados por la vía y con la dosis indicada por el laboratorio productor. 6 porcinos para cada valencia de la vacuna a ser controlada.

Comprobación: Los 24 porcinos vacunados para cada valencia y 2 testigos serán inoculados 30 días después de la vacunación con la cepa

homóloga a la utilizada en la elaboración de la vacuna. La comprobación de los porcinos vacunados y testigos será realizada inoculándolos en un punto de cada talón de una pata posterior con 0,2 ml de una suspensión virulenta de origen bovino o porcino que contenga 10^4 DL₅₀ RL/0,4 ml.

Lecturas: Los porcinos serán revisados entre los 5 y 7 días después de la inoculación, observándose las lesiones podales.

Interpretación: Las DPS₅₀ serán calculadas por el método de Spearman-Kärber a partir de los resultados de protección a la generalización podal. Se considerarán porcinos protegidos aquellos que no presenten lesiones podales en las patas no inoculadas.

Para que la prueba tenga valor es necesario que haya presentado una pendiente normal.

Dosis protectora cobayo 50 por ciento (DPC₅₀) para vacunas oleosas (emulsión doble) (Técnicas en estudio)

Cobayos: Se usarán cobayos de tres o más meses de edad, con 550 ± 50 g de peso en buen estado sanitario y con el epitelio plantar depigmentado.

Dilución de la vacuna: Se prepararán las diluciones 1:3, 1:9 y 1:27, utilizando como diluyente el PBS.

Vacunación: Con la vacuna normal y con cada una de las diluciones serán vacunados por vía intramuscular con 1:20 de la dosis bovino, 6 cobayos para cada valencia de la vacuna a ser controlada.

Comprobación: Los 24 cobayos vacunados para cada valencia y 6 testigos a los 30 días después de la vacunación será inoculados por vía intradermoplantar en una pata con 0,10 ml de una suspensión virulenta que contenga 10^4 DG₅₀ cobayo/ml. El virus de comprobación estará adaptado a cobayo y será homólogo al utilizado en la producción de vacuna.

Lectura: A los 3 y 5 días después de la comprobación se observarán las lesiones podales.

Interpretación: Las DPC₅₀ serán calculadas por Spearman-Kärber a partir de los resultados de protección a la generalización podal. Se considerarán cobayos protegidos aquellos que no presenten lesiones podales en las patas no inoculadas.

Para que la prueba tenga valor es necesario que haya presentado una pendiente normal.

Dosis protectora cobayo 50 por ciento (DPC₅₀) para vacunas hidroxido-saponinadas (Técnica en estudio)

Cobayos: Se usarán cobayos de tres o más meses de edad, con

550 ± 50 g de peso, en buen estado sanitario y con el epitelio plantar depigmentado.

Dilución de la vacuna: Se prepararán las diluciones 1:3, 1:9 y 1:27 utilizándose el diluyente:

CO ₃ Na	0.53
CO ₃ HNa	16.80 g
Na Cl	85.00 g
Agua destilada	10.00 l

Vacunación: Con la vacuna normal y con cada una de las tres diluciones serán vacunados por vía subcutánea con 1:20 de la dosis bovino, 6 cobayos para cada valencia de la vacuna a ser controlada.

Comprobación: Los 24 cobayos vacunados para cada valencia y 6 testigos serán inoculados 21 días después de la vacunación con la cepa homóloga a la utilizada en la elaboración de la valencia. Los virus de comprobación estarán adaptados a cobayo. Cada animal será inoculado por vía intradermoplantar con 0,1 ml de una suspensión de virus que contenga 10⁴ DG₅₀ Cobayo/ml.

Lectura: Los cobayos serán revisados a los tres y cinco días después de la inoculación, observándose las lesiones podales.

Intepretación: Las DPC₅₀ serán calculadas por el Spearman-Kärber a partir de los resultados de protección a la generalización podal. Se considerarán cobayos protegidos aquellos que no presenten lesiones podales en las patas no inoculadas.

Para que la prueba tenga valor es necesario que haya presentado una pendiente normal.

ANEXO 6. DIRECTIVAS PARA CONTROL OFICIAL DE CALIDAD DE VACUNAS CONTRA LA FIEBRE AFTOSA CON ADYUVANTE OLEOSO, Y DIRECTIVAS CONVENCIONALES PARA LA MAYOR DURACION DE LA INMUNIDAD*

(Ejemplo de directivas en un país dentro del área infectada)

I. SOLICITUD DE REGISTRO

El establecimiento fabricante oficial o privado solicitará registro del producto, observando lo dispuesto en la legislación vigente y haciendo contar en el Informe Técnico: la composición, el proceso de producción, la formulación, las características físico-químicas y las propiedades biológicas, indicando el grado de protección conferido en la primo y en la revacunación de la especie animal a la que se destina la vacuna, así como el modo y el esquema de vacunación, según la especie y la edad del animal.

Deberán también adjuntarse los resultados de las diversas pruebas efectuadas por la industria productora, inclusive las referentes a eficiencia del producto.

Siendo los documentos presentados sobre la vacuna adecuados y aceptados, el laboratorio productor tendrá el pedido de registro concedido y autorizada la fabricación de la partida de registro, la que no podrá contener menos de 50.000 dosis, elaboradas según el proceso industrial indicado en el Informe Técnico.

II. COLECTA DE MUESTRAS

La colecta de muestras de vacuna para la realización del control oficial de calidad será efectuado en el producto final en envase comercial, observándose el mismo procedimiento adoptado para las demás vacunas antiaftosa.

* Fuente: Directivas del Ministerio de Agricultura del Brasil, Brasilia 1981

III. CONTROL DE CALIDAD

1. Pruebas físico-químicas.

Se procederá de acuerdo con las indicaciones del laboratorio productor, y que constan en el Informe Técnico del producto.

2. Pruebas de esterilidad.

La vacuna debe ser estéril y la metodología de prueba será la misma utilizada para las vacunas hidróxido-saponinadas.

En caso necesario serán adoptados procedimientos especiales apropiados a cada vacuna.

3. Pruebas de inocuidad.

3.1. Control de virus activo.

El laboratorio productor realizará pruebas sobre la no infecciosidad del antígeno después de inactivado y el producto final terminado.

El control oficial será realizado sólo en el producto final envasado, utilizando los mismos métodos y procedimientos adoptados para las vacunas hidróxido-saponinadas. En caso necesario serán utilizadas otras pruebas adecuadas al tipo de vacuna bajo control.

3.2. Control de tolerancia.

Será realizado en animales vacunados, sometidos a las pruebas de inmunidad y de experimentos a nivel de campo. Tendiendo a la observación de reacciones locales, generales y a los efectos colaterales, inclusive con inspección de carcasas en matadero bajo Inspección Federal, para efectos de verificación de lesiones. Deberán constar en los respectivos rótulos e instrucciones de uso, con el fin de alertar al criador, sobre el apareamiento de posibles reacciones o efectos colaterales atribuibles al producto.

4. Pruebas de inmunidad.

Este control tiene por objeto determinar la protección conferida por la vacuna, a corto y a largo plazo.

Hasta que se disponga de informaciones con otras técnicas, será utilizada la protección a la generalización podal, adoptándose los siguientes procedimientos:

4.1. Pruebas en bovinos.

4.1.1. Pruebas a los 30 días post-vacunación (30 DPV).

a) *Vacunación*: Serán utilizados bovinos adultos entre 18 y 24 meses de edad y vacunados por vía intramuscular profunda, en la tabla del pescuezo, en la dosis de 5 ml.

b) *Comprobación*: 30 DPV.

c) *Lectura*: única al 7o. día después de la comprobación.

d) *Interpretación*: Para que la prueba tenga valor es necesario que haya presentado un desarrollo normal, y para que la vacuna sea conside-

rada aprobada debe proteger como mínimo 13/16 animales vacunados.

Observación: Tratándose de vacunas cuyo vehículo utilizado en su formulación permita el uso del mismo diluyente usado en las vacunas convencionales, las mismas serán aferidas en términos de inmunidad a los 30 DPV a través de la prueba de Potencia bovina (Pb) observándose los criterios vigentes para aprobación.

4.1.2. Pruebas de duración de inmunidad.

a) *Vacunación*: bovinos jóvenes entre 6 y 12 meses de edad, vacunados por vía intramuscular profunda, en la tabla del pescuezo, con una dosis de 5 ml.

b) *Revacunación*: a los 90 DPV.

c) *Comprobación*: 180 DPR.

d) *Lectura*: revisión única al 7o. día después de la comprobación.

e) *Interpretación*: la prueba sólo será considerada válida si presenta desarrollo normal y la vacuna será considerada aprobada cuando proteja como mínimo 08/16 animales revacunados.

4.2. Pruebas en porcinos.

a) *Vacunación*: serán vacunados porcinos de 2 a 3 meses de edad de acuerdo con las indicaciones del laboratorio productor.

b) *Comprobación*: a los 30 y 120 DPV.

c) *Lectura*: revisión única al 5o. día después de la comprobación.

d) *Interpretación*: la prueba sólo será considerada válida si presenta desarrollo normal y la vacuna será considerada aprobada cuando proteja 12/16 y 08/16 animales a los 30 y 120 DPV, respectivamente.

4.3. Pruebas por métodos indirectos.

Concomitantemente con los métodos directos se realizarán pruebas en cobayos determinando el nivel de anticuerpos por seroprotección y/o neutralización, en sueros de bovinos en el momento de la comprobación, para conocimiento del comportamiento de los métodos indirectos con la nueva vacuna.

4.4. Estabilidad inmunogénica.

Podrá ser determinada mediante pruebas en cobayos, a los 30, 180 y 360 días después de fabricada la vacuna. Los resultados obtenidos en las tres pruebas no podrá presentar diferencias significativas entre sí.

IV. ESQUEMA DE VACUNACION

1. Bovinos.

a) edad de primovacuna = a partir de los 4 meses;

b) revacunación de los primovacunados = 4 meses después de la primera dosis (primovacuna) y a seguir, de 6 en 6 meses;

- c) revacunaciones = de 6 en 6 meses para los demás.
2. *Porcinos.*
- a) dosis y vía indicadas por el productor.
- b) esquemas de vacunación: vacunar los porcinos a partir de los 60 días de edad y revacunar de 4 en 4 meses los reproductores y matrices.
3. En caso de que el laboratorio tenga interés en aumentar el intervalo de revacunaciones, el registro quedará condicionado al resultado de las pruebas oficiales.

V. DISPOSICIONES GENERALES.

1. Considerando la diversidad de dosis y vías de aplicación de las vacunas destinadas a bovinos, presentadas por las industrias de la especialidad, el Ministerio de Agricultura resolvió establecer la dosis única de 5 ml por vía intramuscular profunda, en la tabla del pescuezo.
2. Los bovinos y porcinos a ser utilizados en las diferentes pruebas deberán estar en buen estado sanitario y de nutrición, no haber padecido de Fiebre aftosa ni haber sido vacunados contra ella y que sus sueros no presenten anticuerpos VIA, ni neutralizantes de la virosis, detectables en pruebas de seroprotección y/o seroneutralización.
3. Las pruebas de duración de la inmunidad en bovinos y porcinos, solamente serán iniciadas después de los resultados de las pruebas a los 30 DPV. Con esta finalidad será permitido para vacunas destinadas a bovinos, el resultado mínimo de 12/16 animales protegidos a 3,00 P_b respectivamente en las pruebas de protección a la generalización podal y potencia bovina.
4. Será concedido registro provisorio a la vacuna para bovinos para bovinos y porcinos que proteja respectivamente 13/16 y 12/16 animales, en las pruebas a los 30 DPV, quedando ese registro condicionado a los resultados de las pruebas de duración de inmunidad.
5. El registro definitivo del producto solamente será concedido después de la evaluación de la repetibilidad del proceso de producción mediante aferición de tres (3) diferentes partidas de vacunas presentadas al control oficial, comprobándose esterilidad, inocuidad, estabilidad inmunogénica e inmunogenicidad a los 30 DPV y 180 DPR en bovinos y a los 30 y 120 DPV en porcinos.
6. El registro provisorio previsto en el ítem cuatro (4), permite apenas el uso experimental a nivel de campo de la partida examinada por el control oficial sin finalidad comercial además de las facilidades de los procesos de la importación de materia prima. Los experimentos a

nivel de campo sólo serán iniciados después de la autorización previa de la Secretaría de Defensa Sanitaria Animal (SDSA), mediante análisis del protocolo presentado por las empresas interesadas.

7. La comercialización del producto será permitida sólo después de la conclusión de las pruebas de duración de la inmunidad previstas en el ítem tres (3).

8. Las partidas subsecuentes y de registro serán evaluadas en términos de inmunidad sólo a los 30 DPV y para efectos de liberación será considerada la protección mínima de 13/16 y 12/16 bovinos y porcinos respectivamente. Para las vacunas sometidas a las pruebas de potencia bovina será considerado el resultado mínimo de tres (3) dosis protectoras.

Brasilia, 16 de diciembre de 1983

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. ABARACON, D. *Algunos ensayos sobre producción de vacunas antiaftosa inactivadas a partir de virus replicados en conejos neonatos*. Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa 13-16: 30-49, 1974.
2. ABARACON, D., CASAS OLASCOAGA, R. *Vacinas contra a febre aftosa. A Hora Veterinária*. Año 3, núm. 17 Jan/Fev. 1984.
3. ABARACON, D., MESQUITA, J.A., GIACOMETTI, H., SALLUA, S., PEREZ RAMA, S. *Preparación de vacuna antiaftosa con adyuvante oleoso usando antígenos absorbidos sobre hidróxido de aluminio*. (Formulation of oil adjuvanted foot-and-mouth disease vaccines containing antigen adsorbed to aluminum hydroxide). Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa 45-46: 43-46, 47-50, 1982.
4. ABARACON, D., MESQUITA, J.A., SALLUA, A., PEREZ RAMA, R. *Emulsificante Montanide 888 para la preparación de vacuna antiaftosa con adyuvante oleoso*. (Montanide 888 emulsifying agent for preparation of oil adjuvanted foot-and-mouth disease vaccine). Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa 45-46: 51-53, 55-57, 1982.
5. ABARACON, D., SALLUA, S., PEREZ RAMA, S. *Inmunidad en ovinos producida por vacuna con adyuvante oleoso y evaluada por anticuerpos* (en preparación).
6. ABARACON, D., GIACOMETTI, H., MESQUITA, J.A. *El uso de la etilenimina binaria (BEI) como inactivante del virus de la fiebre aftosa producido por diferentes técnicas semi-industriales*. (The use of binary ethylenimine (BEI) for the inactivation of foot-and-mouth disease virus produced by different semi-industrial techniques). Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa 33-34: 1-5, 7-11, 1979.
7. AUGÉ DE MELLO, P. *Consideraciones sobre la profilaxis de la fiebre aftosa en la especie porcina*. (Reflections on the prevention of foot-and-mouth disease in swine). Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa 35-36: 55-58, 59-61, 1979.
8. AUGÉ DE MELLO, P., ASTUDILLO, V.M., GOMES, I., CAMPOS GARCIA, J.T. *Aplicación en el campo de vacuna antiaftosa oleosa e inactivada: Vacunación y revacunación de bovinos jóvenes*. (Field application of inactivated oil adjuvanted foot-and-mouth disease vaccines: vaccination and revaccination of young cattle). Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa 19-20: 31-38, 39-47, 1975.
9. AUGÉ DE MELLO, P., GOMES, I., ALFONSO FERNANDEZ, A., MASCARENHAS, J. *Vacuna antiaftosa con adyuvante oleoso para cerdos. II. Vacunación intraperitoneal de cerdos jóvenes con emulsión doble*. (Foot-and-mouth disease oil adjuvanted vaccine for pigs II. Intraperitoneal vaccination of young pigs with double emulsion vaccine). Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa 31-32: 13-19, 21-27, 1978.
10. AUGÉ DE MELLO, P. *El uso de la vacuna antiaftosa con adyuvante oleoso en áreas endémicas*. (The use of oil adjuvanted foot-and-mouth disease vaccine in endemic areas). Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa 45-46: 23-32, 33-42, 1982.
11. ASTUDILLO, V.M., AUGÉ DE MELLO, P. *Análisis del costo y de la efectividad de dos procedimientos de vacunación antiaftosa*. (Cost and effectiveness analysis of two foot-and-mouth disease vaccination procedures). Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa 37-38: 49-55, 57-63, 1980.
12. BACHRACH, H.L., HESS, W.R., CALLIS, J.J. *Foot-and-mouth disease virus: Its growth and cytopathogenicity in tissue culture*. Science 122 (3183): 1269-1270, 1955.
13. BACHRACH, H.L., MOORE, D.M., MCKERCHER, P.D., POLATNICK, J. *An experimental subunit vaccine for foot-and-mouth disease*. J. Int. Symp. FMD, Lyon, France, Dev. Biol. Standard. 35: 155-160, 1976.
14. BAHNEMANN, H.G. *Binary ethylenimine as an inactivant for foot-and-mouth disease virus and its application for vaccine production*. Arch. Virol. 47 (1): 47-56, 1975.
15. BITTLE, J.L., HOUGHTEN, R.A., HANNAH, A., SHINNICK, T.M., SURCLIFFE, J.G., LERNER, R.A., ROWLANDS, D.J., BROWN, F. *Protection against foot-and-mouth disease by immunization with a chemically synthesized peptide predicted from the viral nucleotide sequence*. Nature 298 (5869): 30-33, 1963.
16. BROWN, F., CARTWRIGHT, B., STEWART, D.L. *The effect of various inactivating agents on the viral and ribonucleic acid infectivities of foot-and-mouth disease virus and on its attachment to susceptible cells*. J. gen. Microbiol. 31: 179-186, 1963.
17. BROWN, F., SMALE, C.J. *Demonstration of three specific sites on the surface of foot-and-mouth disease virus by antibody complexing*. J. gen. Virol. 7 (2): 115-127, 1970.
18. CAPSTICK, P.B., TELLING, R.C., CHAPMAN, W.G., STEWART, D.L. *Growth of a cloned strain of hamster kidney cells in suspended cultures and their susceptibility to the virus of foot-and-mouth disease*. Nature 195 (4847): 1163-1164, 1962.
19. CASAS OLASCOAGA, R. *Summary of current research of the Pan American Foot-and-Mouth Disease Center in oil adjuvanted vaccines*. Bull. Off. int. Epiz., 1978, 89 (11-12): 1015-1054.
20. CASAS OLASCOAGA, R., SUTMOLLER, P., ALONSO FERNANDEZ, A., ABARACON, D. *FMD virus production and control of vaccines in South America*. 16e Conf. Comis. Fiebre Aftosa, OIE, Paris, 14-17 sept. 1982, pp. 109-122.
21. CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA. *Evaluación de proyectos de vacunación de bovinos con vacuna antiaftosa con adyuvante oleoso del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa*. Junio, 1981, 148 pp.
22. CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA. *Situación de los programas de control de la fiebre aftosa*. América del Sur, 1981, 148 pp.
23. CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA. *Manual de procedimientos para el control de vacuna antiaftosa*. Ser. Man. Téc. CPEA, 2, 1980, 47 pp.
24. CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA, DIRECCIÓN DE LUCHA CONTRA LA FIEBRE AFTOSA. *Prueba de potencia para vacunas contra la fiebre aftosa de adyuvante oleoso: ensayos de DP₅₀ en cerdos y en bovinos de una vacuna preparada en forma semi-industrial con una emulsión del tipo*

- agua-en-aceite*. (Potency testing of oil adjuvanted foot-and-mouth disease vaccine: PD₅₀ assays of a semi-industrial water-in-oil type emulsion in guinea pigs and cattle) Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa 29-30: 55-59, 61-65, 1978.
25. COSALFA. *Política y estrategias del combate de la Fiebre aftosa en Sudamérica para la década 1981-1990*. Elaborado por los países de la Comisión Sudamericana para la Lucha contra la Fiebre Aftosa (COSALFA) en 1981 y aprobado por la COSALFA IX en 1982.
 26. CUNLIFFE, H.R., GRAVES, J.H. *Formalin-treated foot-and-mouth disease virus: Comparison of two adjuvants in cattle*. Can. J. comp. Med. vet. Sci. 27 (8): 193-197, 1963.
 27. CUNHA, R.G., BAPTISTA Jr., J.A., SERRAO, U.M., TORTURELLA, I. *El uso de los ratones lactantes en la evaluación de los anticuerpos contra el virus de la fiebre aftosa y su significación inmunológica*. Gac. vet., B. Aires, 19 (110): 243-267, 1957.
 28. ESPINET, R.G. *Nuevo tipo de vacuna antiaftosa a complejo glucovirico*. Gac. Vet. (Buenos Aires) 13 (74): 265-276, 1951.
 29. FRENKEL, H.S. *La culture du virus de la fièvre aphteuse sur l'épithélium de la langue des bovines*, Bull. Off. int. Epizoot. 28: 155-162, 1947.
 30. FREUND, J., CASALS, J., HOSMER, E.P. *Proc. Soc. Exper. Biol.* 37: 509, 1937.
 31. GOIC M., R. *Febre Aftosa: a enfermidade e suas complicações*. Hora Vet. 3 (17): 5-8, 1984.
 32. GOMES, I. *Persistencia de anticuerpos circulantes en porcinos revacunados con vacuna antiaftosa con adyuvante oleoso*. Comunicación breve. (Persistence of circulating antibodies in swine revaccinated with oil-adjuvanted foot-and-mouth disease vaccine. Short communication). Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa 39-40: 43-45, 47-49, 1980.
 33. GOMES, I., ASTUDILLO, V.M. *Foot-and-mouth disease: Evaluation of mouse protection test results in relation to cattle immunity*. Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa 17-18: 9-16, 1975.
 34. GOMES, I., STUMOLLER, P., CASAS OLASCOAGA, R. *Respuesta en bovinos a la exposición del virus de la Fiebre aftosa un año después de inmunizados con vacuna con adyuvante oleoso*. (Response of cattle to foot-and-mouth disease (FMD) virus exposure one year after immunization with oil-adyuvanted FMD vaccine). Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa 37-38: 25-29, 31-35, 1980.
 35. GOMES, I., AUGÉ DE MELLO, P. *Anamnestic response in cattle after revaccination with oil-adyuvanted foot-and-mouth disease vaccine*. Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa 27-28: 55-60, 1977.
 36. GRAVES, J.H., McKERCHER, P.D., FARRIS Jr, H.E., KOWAN, K.M. *Early response of cattle and swine to inactivated foot-and-mouth disease virus*. Res. vet. Sci. 9 (1): 35-40, 1968.
 37. HERBERT, W.J. *Multiple emulsions. A new form of mineral-oil-antigen adjuvant*. The Lancet. October 16, 1965, 771 pp.
 38. KLEID, D.G., YANSURA, D., SMALL, B., DOWBENKO, D. *et al. Cloned viral protein vaccine for foot-and-mouth disease: Responses in cattle and swine*. Science 214 (4125): 1125-1139, 1981.

39. KNUDSEN, R.C. *Adjuvant effect of two formulations of CP20961, a synthetic lipidamine for FMD virus vaccine in guinea pigs*. 16e Conf. OIE. Fiebre Aftheus. Vol. 1, 179-184, 1982.
40. LUCAM, F., FEDIDA, M., DANNACHER, G., PERRAUD, J. *What may be expected concerning foot-and-mouth disease vaccination in pigs*. Annual meeting of the Research Group held at the Animal Virus Research Institute, Pirbright 14-16 Sept., 1966.
41. Mac PHERSON, I., STOCKER, M. *Polyoma transformation of hamster cell clones - an investigation of genetic factors affecting cell competence*. Virology 16: 147-151, 1962.
42. MARTINSEN, J.S. *Inactivation of foot-and-mouth disease virus by glycidaldehyde*. Am. J. vet. Res. 25 (108): 1417-1423, 1962.
43. McKERCHER, P.D. *Response to swine to oil adjuvanted vaccine*. International Symposium on Foot-and-Mouth Disease 8: 151-160, 1967.
44. McKERCHER, P.D., FARRIS Jr., H.E. *Foot-and-mouth disease in swine: Response to inactivated vaccines*. Arch. ges. Virusforsch. 22 (3-4) 451-461, 1967.
45. McKERCHER, P.D., GRAVES, J.H. *A review of the current status of oil adjuvants in foot-and-mouth disease vaccines*. Inter Symp. Foot Mouth Dis. Lyon 1976. Develop. biol. Standard 35: 107-112, 1977.
46. McKERCHER, P.D., GAILIUNAS, P. *Response of swine to inactivated foot-and-mouth disease vaccine. Duration of Immunity and local tissue reaction*. Arch. ges. Virusforsch. 28 (2): 165-176, 1969.
47. McKERCHER, P.D., GAILIUNAS, P., BURROWS, R., CAPSTICK, P.B. *Reaction of swine to oil-adjuvanted inactivated foot-and-mouth disease virus vaccine inoculated by intramuscular and subcutaneous routes*. Arch. ges. Virusforsch. 35 (4): 364-377, 1971.
48. MOWAT, G.N., CHAPMAN, W.G. *Growth of foot-and-mouth disease virus in a fibroblastic cell line derived from hamster kidneys*. Nature 194 (4825): 253-255, 1962.
49. OBIAGA, J.A., ROSENBERG, F.J., ASTUDILLO, V.M. GOIC M., R. *Las características de la producción pecuaria como determinantes de los ecosistemas de fiebre aftosa*. (Characteristics of livestock production as determinant of foot-and-mouth disease ecosystems). Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa 33-34: 33-42, 43-52, 1979.
50. PEREIRA DE CASTRO, M. *Clonal variation in the swine kidney cell line, IBRS-2, in relation to morphology, caryotype and susceptibility to the foot-and-mouth disease virus (FMD)*. Arch. Inst. Biol., São Paulo, 37 (2): 103-127, 1970.
51. RIVENSON, SCHOLEIN y otros. *Estudio comparativo en bovinos de dos vacunas antiaftosa, oleosa e hidroxidosaponinada*, Rev. Méd. (Bs. As.) 5 (63), 1982.
52. SCHMIDT, S. *Compte rendu Soc. Biol.* T123:721, 1936.
53. SELLERS, R.F. *Growth and titration of the viruses of foot-and-mouth disease and vesicular stomatitis in kidney monolayer tissue culture*. Nature 176 (4481): 547-549, 1955.
54. SEMINARIO DE DIVULGACION DE LOS MECANISMOS TECNICOS Y OPERATIVOS PARA EL USO DE LA VACUNA CON ADYUVANTE OLEOSO EN LOS PROGRAMAS DE LUCHA CONTRA LA FIEBRE AFTOSA EN

- AMERICA DEL SUR. *Actividad inicial del Subprograma I: Vacunas Oleosas* – Programa de Adiestramiento en Sanidad Animal en América Latina (PROASA), junio, 1982.
55. SEMINARIO INTERNACIONAL DE EVALUACION DEL USO DE LA VACUNA CON ADYUVANTE OLEOSO EN LOS PROGRAMAS DE LUCHA CONTRA LA FIEBRE AFTOSA EN AMERICA DEL SUR. *Actividad final del Subprograma I: Vacunas Oleosas* – Programa de Adiestramiento en Sanidad Animal (PROASA), mayo, 1984.
56. TORRES, S. *Profilaxia da Febre Aftosa pela vacinação*. Anais II Congr. Bras. Vet., B. Horizonte, Brasil, 7-12 set. 1943.
57. UBERTINI, B., NARDELLI, L., SANTERO, G., PANINA, G. *Process Report: Large-scale production of foot-and-mouth disease virus*. J. Biochem. Microbiol. Technol. Engin. 2 (3): 327-338, 1960.
58. UBERTINI, B., NARDELLI, L., DEL PRATO, A., PANINA, G., SANTERO, G. *Large-scale cultivation of foot-and-mouth disease virus on calf kidney cell monolayers in rolling bottles*. Zentralbl. Veterin. 10: 93-101, 1963.
59. WALDMANN, O., KOBE, Z., PYL, G. Zbl. Bakt. I. Orig. 138: 401, 1937.

INDICE

Prefacio	5
Programa de Adiestramiento en Salud Animal para América Latina	7
Contenido	19
Autores	21
1. Introducción	23
2. Estructuración del Curso de producción, control de calidad y uso de vacunas con adyuvante oleoso contra la fiebre aftosa	25
I. ASPECTOS GENERALES	33
3. Aspectos generales sobre la fiebre aftosa	35
4. Perjuicios económicos	36
5. Formas de lucha	37
6. Inmunidad por medio de vacunas	38
7. Vacunas de virus vivos atenuados contra la fiebre aftosa	39
8. Vacunas inactivadas contra la fiebre aftosa	39
9. Uso de las vacunas con adyuvante oleoso en América del Sur	65
II. METODOLOGIA DE PRODUCCION DE VACUNAS CON ADYUVANTE OLEOSO	67
Antecedentes	69
10. Requerimientos básicos en un laboratorio de producción de vacunas contra la fiebre aftosa	69
11. Lavado, preparación y esterilización de material	75
12. Unidad de producción por medio de cultivo	82
13. Unidad de mantenimiento de células - banco de células	107
14. Cultivos celulares para replicación industrial de virus. Producción de suspensiones víricas para vacunas	132
15. Inactivación	149
16. Formulación de la vacuna con adyuvante oleoso	152

III. CONTROLES DE PROCESO Y PRODUCTO FINAL	165
17. Controles de proceso	167
18. Controles de producto final	186
ANEXOS	195
Anexo 1. Infección de cultivos celulares BHK con mycoplasma	197
Anexo 2. Titulación del virus de la fiebre aftosa	215
Anexo 3. Seroprotección	223
Anexo 4. Banco de sueros	233
Anexo 5. Control de calidad de la vacuna antiaftosa con adyuvante oleoso	241
Anexo 6. Directivas para control oficial de calidad de vacunas contra la fiebre aftosa con adyuvante oleoso y directivas convencionales para la mayor duración de la inmunidad	251