

## MEDICIÓN DE NIVELES DE ANTIBIÓTICOS EN VACUNAS OLEOSAS ANTIAFTOSA POR MÉTODOS QUÍMICOS

J. TORROBA<sup>1</sup>, V.M. VARELA-DÍAZ<sup>2</sup>, E.C. VIVINO<sup>1</sup>, J.A. MESQUITA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis (OPS/OMS)*

Casilla 3092 - Correo Central, 1000 Buenos Aires, Argentina

<sup>2</sup>*Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (OPS/OMS)*

Caixa Postal 589, 20001-970 Rio de Janeiro, RJ, Brasil

**RESUMEN.** El control de calidad de las vacunas contra la fiebre aftosa actualmente comprende pruebas de esterilidad, inmunogenicidad e inocuidad, pero no se hacen estimaciones de componentes potencialmente alergénicos. Este artículo informa los resultados de un estudio para seleccionar las condiciones óptimas de trabajo para la utilización de la cromatografía en capa fina (TLC) en la determinación de los niveles de penicilina, neomicina y polimixina en vacunas oleosas antiaftosa. Se describen los procedimientos de elección para el quiebre de la emulsión y para extraer, purificar, concentrar, identificar y cuantificar los antibióticos. Se presentan los resultados obtenidos al examinar por TLC una serie de vacunas oleosas antiaftosa disponibles comercialmente. Los hallazgos se analizan en términos de la aplicación de esta metodología para el control de la calidad de estos inmunógenos y para el estudio de las reacciones posvacunación.

En general, los laboratorios de control de vacunas analizan básicamente tres aspectos de los inmunógenos elaborados en su esfera de influencia. En las vacunas antiaftosa, se utilizan pruebas de *potencia* que exigen que los inmunógenos sean capaces de proteger al 75 por ciento de los bovinos a los 90 días después de la primovacunación, en pruebas de descarga viral denominadas como pruebas de generalización podal (5,20). Para disminuir costos y prevenir la diseminación ambiental del virus, también se emplea la expectativa porcentual de protección, estimada a partir de pruebas de seroprotección en ratones (9).

El control de calidad de estas vacunas incluye, además, pruebas de *esterilidad* realizadas mediante la inoculación de medios de cultivo para detectar contaminantes microbianos que podrían afectar la inmunogenicidad y estabilidad de las vacunas, o bien infectar a los animales que las reciben. Finalmente, se llevan a cabo pruebas de *inocuidad* para prevenir el gran riesgo que representa una vacuna que contenga partículas virales infecciosas, así como para analizar la tolerancia de los animales a la vacunación y revacunación (1,2,5,10).

Desde los comienzos de la vacunación periódica contra la fiebre aftosa se han registrado problemas posvacunales de diversa índole, que incluyen reacciones locales o generalizadas compatibles con manifestaciones alérgicas (3,4,6-8, 11,13-16,19). Si bien su frecuencia parece ser de

---

Solicitar separatas al :  
Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (OPS/OMS).

escasa significación, estas pueden ocasionar trastornos en algunas áreas circunscriptas. Sin embargo, hasta el momento no se ha contemplado la incorporación de alguna prueba que permita determinar los niveles de los componentes potencialmente alergénicos en las vacunas. Esto sería de interés para: establecer asociaciones entre los valores de los distintos alérgenos y la aparición y frecuencia de reacciones; definir los niveles de estas sustancias que son compatibles con la ausencia o disminución de las reacciones; mejorar los procedimientos de control de calidad de vacunas y, por consiguiente, favorecer la marcha de los programas de inmunización antiaftosa.

En este informe se describen los estudios realizados a fin de disponer de un procedimiento que permita determinar los niveles de antibióticos en distintos lotes de vacunas antiaftosa. La decisión de dar prioridad a la evaluación de estos agentes antimicrobianos se fundamentó en que los mismos constituyen uno de los componentes vacunales más frecuentemente asociados (3,4,6,8,11,13-15,19) a la aparición de manifestaciones alérgicas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Dada la reconocida utilidad de la cromatografía en capa fina (TLC) para identificar y clasificar antibióticos, separarlos en mezclas, y controlar su pureza, se eligió este procedimiento para determinar los productos contenidos en las vacunas, seguido por el empleo de métodos químicos de revelado para localizar las zonas correspondientes a los distintos antibióticos. La elección del procedimiento cromatográfico se basó en su simplicidad y facilidad de ejecución; en que no requiere de instrumental costoso, y puede efectuarse con el equipamiento habitual de un laboratorio microbiológico; en que cubre una amplia gama de antibióticos, y su sensibilidad permite detectar pequeñas cantidades; y en que no requiere reactivos raros, peligrosos o costosos. Además, la repetibilidad, reproducibilidad y especificidad del procedimiento son adecuadas (17,18).

El enfoque consistió en seleccionar inicialmente las condiciones óptimas de trabajo para la ejecución de cada una de las cuatro etapas del

proceso analítico, o sea: el quiebre de la emulsión; la extracción de los antibióticos; su purificación/concentración; y finalmente, su identificación y cuantificación por TLC.

Definidas estas condiciones, el procedimiento se aplicó para estimar los niveles de los antibióticos presentes en algunos lotes de vacunas antiaftosa sometidos por los productores a los organismos oficiales de control de la Argentina y de Colombia, que gentilmente los proveyeron con este propósito.

Para la puesta a punto de estas cuatro etapas, se usaron como patrones los antibióticos (12) comúnmente agregados a las vacunas antiaftosa disponibles en el mercado, específicamente los siguientes: a) solución patrón de penicilina G potásica de 1,00-0,50 y 0,25 mg/ml; b) solución patrón de sulfato de neomicina de 2,00-1,00 y 0,50 mg/ml; c) solución patrón de polimixina B de 0,100-0,050 y 0,025 mg/ml.

Igualmente, se empleó como referencia una vacuna antiaftosa oleosa, elaborada en la Planta Piloto del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (PANAFTOSA). A esta vacuna, así como a las otras de PANAFTOSA empleadas en este estudio, se le agregó las cantidades de 250 UI de penicilina, 0,56 mg de sulfato de neomicina, 125 UI de sulfato de polimixina, y 6,2 ng de Fungizone por cada 5 ml de vacuna (consistente de partes iguales de la suspensión de virus inactivado en medio de cultivo celular, y de la fase oleosa).

Se consideró prioritario optimizar el procedimiento general de *extracción* de los antibióticos de la matriz de la vacuna antiaftosa empleada como vacuna de referencia. A tal efecto, se ensayaron procedimientos de extracción en fase líquida a pH diferentes empleando diversos sistemas de buferización. Igualmente, se ensayaron distintos sistemas de *purificación* del extracto acuoso de la vacuna mediante particiones con solventes orgánicos, y por desarrollo de TLC en sentidos opuestos (desarrollo antiparalelo), y por desarrollo múltiple en el mismo sentido.

Originalmente se había planteado que podría ser promisorio el empleo del sistema de extracción en fase acuosa, y la posterior purificación mediante desarrollo múltiple por TLC. No obstante, las

recuperaciones y la completa separación de fases no fueron satisfactorias al no lograrse el efectivo quiebre de la emulsión con cloroformo. Así, se constató la permanencia de una fase intermedia muy estable y de extensión variable, colocando al sistema en el borde del límite de detección. Esto implicaría trabajar con estandarización interna, que por lo engorroso sería impráctico, y necesitaría buscar y seleccionar una sustancia adecuada para ello. Sin embargo, estas dificultades se obviaron al efectuar el quiebre de la emulsión con diclorometano y la purificación mediante extracción en fase sólida (SPE).

Por otra parte, se procedió a concentrar los extractos con el propósito de alcanzar los niveles de concentración necesarios para el método de visualización elegido. A tal efecto, se ensayó la reducción de volumen mediante *concentración* por arrastre con aire a baja temperatura, y por destilación azeotrópica (agua/etanol y agua/acetona) también a baja temperatura, a fin de no alterar la estructura de los antibióticos. Se halló que la concentración de la fase acuosa mediante arrastre con corriente de aire a baja temperatura era más efectiva para reducir el volumen del extracto vacunal.

Con el propósito de optimizar el método para separar por cromatografía los antibióticos de interés, se ensayaron diversos sistemas de desarrollo sobre *fase normal* (siete mezclas de solventes binarios, ternarios y cuaternarios) y uno sobre *fase inversa*, concluyéndose que el más adecuado era el sistema en fase normal usando placas de silicagel 60. Se optó por una fase móvil cuaternaria para la neomicina y polimixina, y un sistema binario para la penicilina y los antibióticos relacionados. Debido a las características de estos grupos fue necesario emplear diferentes reacciones de revelado, así como distintos sistemas de desarrollo cromatográfico.

A fin de disponer de un procedimiento de visualización acorde con el problema analítico planteado, o sea, que permitiese alcanzar niveles de detección de aproximadamente 2 µg de cada antibiótico, se ensayaron dos métodos para el revelado de placas. Estos se basaron en la formación de *compuestos coloreados* (empleando azida

sódica/I<sub>2</sub>, I<sub>2</sub>/almidón o ninhidrina-ácido acético) y en la formación de *derivados fluorescentes* (por derivatización con fluorescamina) para mejorar la sensibilidad de la detección.

Sobre esta base, se seleccionó el revelado con I<sub>2</sub>/almidón para la detección de los antibióticos de la familia de las penicilinas, y a la ninhidrina/ácido acético para aquellos de las familias de la polimixina y la neomicina. Además, se concluyó que el correcto funcionamiento del sistema por fluorescencia justifica su utilización como procedimiento alternativo o complementario de la coloración.

Los antibióticos se identificaron en base a su ubicación en la placa respecto de su patrón respectivo. A su vez, la cantidad de antibiótico en la mancha cromatográfica se estimó mediante la comparación visual contra los patrones correspondientes.

La metodología para la ejecución del procedimiento cromatográfico elegido para la determinación de antibióticos en vacunas antiaftosas se describe en el cuadro 1. Además, los reactivos y los materiales (17) que se utilizan a tal efecto se indican en los cuadros 2 y 3, respectivamente.

Una vez normatizado, el procedimiento, cromatográfico fue aplicado para determinar las concentraciones de penicilina, polimixina y neomicina, respectivamente, en 10 lotes de vacuna antiaftosa oleosa. De éstos, siete fueron producidos por empresas comerciales de la Argentina y de Colombia, mientras que los tres lotes restantes habían sido elaborados en la Planta Piloto de Producción de Vacunas de PANAFTOSA. Los hallazgos sobre el particular se presentan en el cuadro 4.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En general, se constató que los valores de polimixina y penicilina registrados para todos los lotes de vacunas comerciales analizados resultaron comparables a los de las vacunas elaboradas en PANAFTOSA. En el caso de la neomicina, sin embargo, la situación fue diferente. Así, aunque las tres vacunas de PANAFTOSA y seis de las vacunas

### Cuadro 1. Procedimientos de cromatografía para la determinación de niveles de antibióticos en vacunas oleosas antiaftosa

#### 1. Extracción

Las vacunas se llevan a temperatura ambiente, se agitan por dos minutos, e inmediatamente se recolectan 3 ml para la extracción, los que se introducen en un tubo de 10 ml con tapón de vidrio esmerilado. Tras agregar 6 ml de diclorometano y 0,5 ml de agua, los tubos se tapan y se agitan tres minutos en un vortex, y se dejan reposar 3 minutos. Se centrifuga a 2000 rpm por 3 minutos. La fase superior acuosa se transfiere a un tubo de 5 ml, usando una pipeta gotero. Al residuo oleoso se le agrega 1 ml de agua y se repite el procedimiento dos veces. Los extractos acuosos se reúnen y concentran hasta aproximadamente 1 ml, bajo corriente de aire a 60°C.

#### 2. Elución

Se coloca un tubo colector (#1) bajo la columna de extracción en fase sólida. La fase acuosa proveniente de las extracciones se vierte en la columna, regulándose el vacío aplicado hasta obtener un caudal de 1-2 gotas por segundo. El recipiente de los extractos se lava con 0,5 ml de agua, la que se agrega a la columna. Se eluye con 1 ml de metanol. (cuadro 2). Se coloca otro colector (#2) bajo la columna y se eluye con 5 ml de metanol. Se cambia al próximo colector (#3), y se eluye con 3 ml de acetona. Finalmente, se coloca el último colector (#4) y se eluye con 6 ml de la Mezcla Eluyente II (cuadro 2).

#### 3. Concentración

Los recipientes conteniendo el eluato de los colectores #2 y #4 respectivamente, se colocan en un baño de agua o aire a 40°C aproximadamente. Se hace incidir una suave corriente de aire limpio y seco sobre su superficie, agitando periódicamente a medida que se concentre, con un vortex o manualmente, para lavar las paredes. Concentrar hasta 0,2 ml.

#### 4. Cromatografía en capa delgada

Para la identificación y evaluación de los antibióticos extraídos de las vacunas, se procede según se detalla a continuación.

**4.1. Siembra y elución.** Sobre la placa con fase reversa, se siembran 5 µl de los concentrados recolectados del colector #2 y de los patrones de penicilina, respectivamente. Se desarrollan utilizando la Mezcla Eluyente I (cuadro 2). Luego, sobre cromatofolio con silicagel se siembra la misma cantidad de los concentrados obtenidos del colector #4 y de los patrones de neomicina y polimixina, desarrollándolos con la Mezcla Eluyente II (cuadro 2). En cada caso, se deja un espacio de 1,5 cm entre cada siembra. Desde el punto de siembra, éstos se corren 12 cm con la mezcla eluyente correspondiente. La placa se retira de la cuba cromatográfica y se la seca exponiéndola a una corriente de aire caliente.

**4.2. Revelado.** Las placas para determinar penicilina se introducen en una cámara con pequeñas cantidades de cristales de yodo. Se las deja hasta que aparezcan las manchas amarillas en los patrones y se prolonga la exposición al vapor de yodo por dos minutos adicionales. Se las retira de la cuba y se exponen al aire hasta que solamente se vean esas manchas y el resto de la placa permanezca blanca. Para aumentar la sensibilidad, se asperja con solución de almidón. Las manchas violetas que aparecen persisten durante varias horas, mientras que las manchas amarillas formadas por el yodo desaparecen antes de una hora.

La placa para determinar polimixina y neomicina se asperja con la solución de ninhidrina (cuadro 2). Se deja reaccionar durante aproximadamente 5 minutos en una estufa a 55 °C, hasta que aparezcan manchas violetas en los puntos correspondientes a cada antibiótico.

#### 5. Identificación y evaluación

Los antibióticos se identifican en base a su posición en la placa coincidentes con el respectivo patrón. La cantidad de antibiótico se estima en la mancha cromatográfica mediante la comparación visual de las manchas de las muestras y los patrones.

#### 6. Cálculo

Los miligramos del antibiótico por ml de vacuna se determinan dividiendo los microgramos obtenidos en el punto anterior, por un factor de 75.

**Cuadro 2. Reactivos utilizados para la determinación de antibióticos en vacunas oleosas antiaftosa por cromatografía en capa fina\***

Se emplea Diclorometano PA, metanol PA, acetona PA, amoníaco PA.

*Mezcla Eluyente I:* metanol PA, solución 0,1 M de fosfato dipotásico 0,1 M 6.4.

*Mezcla Eluyente II:* metanol PA, acetona PA, cloroforno, amoníaco PA (c) 3:2:2:2.

*Solución reveladora:* Disolver 0,30 g de ninhidrina PA (Cat. Riedel de Haen 33437) en 100 ml de N-butanol. Luego, agregar 3 ml de ácido acético glacial.

*Yodo resublimado,* (Cat. Fisher 135-100).

*Solución de almidón soluble:* (Cat. Difco 0178-17) al 1% en agua destilada.

comerciales se inscribieron dentro del mismo intervalo de valores obtenidos para este antibiótico, el nivel de neomicina registrado para la restante vacuna comercial (#3) fue marcadamente superior al de todas las otras. Estos hallazgos se reprodujeron de manera idéntica, en análisis repetidos.

Esencialmente, estas observaciones demuestran que la TLC permite determinar los niveles de antibióticos presentes en vacunas oleosas antiaftosa, y que por su sensibilidad, reproducibilidad, especificidad, sencillez y bajos costos se la puede incorporar para el control de calidad de estos inmunógenos. Su empleo para el análisis del producto final brinda información fidedigna que podría ser utilizada para evaluar el proceso de producción. Así, la detección de altos niveles de antibióticos podría ser indicativo de la existencia de problemas de contaminación en la obtención del sustrato celular, y/o en la etapa de inoculación de partículas virales para la preparación del antígeno

\* La mención de firmas comerciales o de sus productos se hace con fines de identificación y no implica su endoso por los autores o sus respectivas instituciones.

vacunal. La resolución de estas dificultades puede representar también un ahorro en los gastos ocasionados por los antibióticos agregados durante la producción del inmunógeno, así como el logro de un producto de mejor calidad. Además, la disponibilidad de información sobre los antibióticos presentes en los distintos lotes de vacuna aplicados en el terreno ofrece la posibilidad de evaluar su relación con las reacciones posvacunales con las que podrían estar asociados.

Por otra parte, los hallazgos del presente estudio también sugieren la conveniencia de ampliar el espectro de los agentes antimicrobianos que se pueden detectar en vacunas antiaftosa por TLC para un control de calidad más completo. Debido

**Cuadro 3. Materiales requeridos para la determinación de antibióticos en vacunas oleosas antiaftosa\***

Tubos de 10 ml con tapón de vidrio esmerilado. Pipetas gotero Pasteur cortas de 146 mm (Cat. Fisher 13-678-70-B). Tubos de ensayo de 5 ml. Tubos de Millie de 4 ml de capacidad, graduados en su parte inferior al 0,1 ml (Cat. Kontes, N° K.570050-0425).

Columnas para cromatografía de 7 mm de diámetro interior y 80 mm de altura, con placa de vidrio sinterizado en la base. Alternativa: usar jeringas hipodérmicas con un disco de papel de filtro en su parte inferior, para impedir que pase el Silicagel. Cargadas con 600 mg de Silicagel, malla 100-120 (Cat. Fisher, 5679). Otra opción: columnas preparadas comercialmente (Worldwide Monitoring Corp, SiL 153).

Micropipetas de 5 µl o jeringas Hamilton de 10 µl (701 N). Cromatofolios de Silicagel 60, espesor de capa 0,2 mm (Cat. Merck, 5553). Cromatoplasmas con fase reversa de n-octilo (Cat. Whatman, 4808-820). Cubas para cromatografía y aspersor. Baño o bloque calefactor en condiciones de mantenerse entre 30 y 60°C.

Sistema de suministro de aire comprimido. Dispositivo que permita suministrar una corriente de aire seco, preferentemente caliente, sobre la superficie del líquido a evaporar (por ej., agujas de acero inoxidable o pipetas Pasteur). Estufa que pueda mantenerse a 55 °C de temperatura.

**Cuadro 4. Niveles de tres antibióticos detectados en 10 lotes de vacuna antiaftosa oleosa elaborados por empresas comerciales y por PANAFTOSA\***

N° Vacuna	Producto	Polimixina	Penicilina	Neomicina
1	Comercial	0,020	0,060	ND
2	Comercial	0,025	0,050	0,002
3	Comercial	0,025	0,050	0,140
4	Comercial	0,030	0,070	0,002
5	Comercial	ND	0,030	ND
6	Comercial	0,025	0,050	0,002
7	Comercial	0,035	0,070	ND
8	PANAFTOSA	0,020	0,040	ND
9	PANAFTOSA	0,028	0,085	0,003
10	PANAFTOSA	0,025	0,080	0,002

\* Los valores de cada concentración se expresan en miligramos de antibiótico por mililitro de vacuna oleosa. ND = no detectado.

a su asociación con reacciones posvacunales en el pasado (3,13,14,15), la determinación de estreptomycin y también del Merthiolate en vacunas antiaftosa se considera de particular interés para nuestros laboratorios.

## REFERENCIAS

- ALONSO FERNANDEZ, A., SONDAHL, M.S., ABARACON, D., FERREIRA, M.E. Control de inocuidad en vacunas antiaftosa hidroxido-saponinadas mediante la elución y concentración del antígeno. *Innocuity control of aluminum-hydroxide saponin foot-and-mouth disease vaccines by elution and concentration of the antigen. Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 33-34: 53-59, 1979.
- ANDERSON, E.C., CAPSTICK, P.B., MOWAT, G.N. In vitro method for safety testing of foot-and-mouth disease vaccines. *J. Hyg.*, 68: 159-172, 1970.
- AROSTEGUI, F.J., CAGGIANO, A.F., GATTO, F. Crisis anafiláctica producida por vacuna antiaftosa. Consideraciones clínicas. Segunda parte. *Gac. Vet.*, 25 (156): 308-312, 1963.
- BULMAN, G.M. Hipersensibilidad post-vacunal en la inmunización antiaftosa. Primera comprobación en Bolivia. *Gac. Vet.*, 40 (330): 285-292, 1978.
- CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA. Manual de procedimientos para el control de vacuna antiaftosa. Rio de Janeiro, PANAFTOSA, 1980. 47p. (Serie de manuales técnicos, 2).
- CHEPUKIN, A.V., ONUFRIEV, V.P., MURAV'EV, V.K., CHEKHOVSKII, G.I. Anaphylactic reactions in cattle after foot and mouth disease vaccination. *Veterinariya (Moscow)*, 5: 64-65, 1975. In: *FMD Bull.*, 14 (9): 75/105, 1975.
- FEDIDA, M., DANNACHER, G., BELLI, P., COUDERT, M. Accidents survenus apres vaccination anti-aphteuse au cours de la campagne 1984-1985: les causes possibles. *Rec. Med. Vet.*, 162 (8-9): 947-971, 1986.
- GINANNI, C., MAGLIONE, E. Contributo allo studio delle reazioni anafilattiche precoci nella vaccinazione antiaftosa dei bovini. *Att. Soc. It. Buiatria*, 4: 162-171, 1972.
- GOMES, I., ASTUDILLO, V. 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.
- HENDERSON, W.M. Significance of tests for non-infectivity of foot-and-mouth disease vaccines. *J. Hyg.*, 50 (2): 195-208, 1952.
- JOVANOVIC, D., MARINAC, M., DAVCEVSKI, T. Allergic reactions in cattle vaccinated against foot and mouth disease. *Vet. Glasn.*, 27 (12): 873-878, 1973. In: *FMD Bull.*, 14 (1): 75/3, 1975.
- MERCK INDEX. 9. ed. New Jersey, Merck & Co, 1976.
- QUIROZ, R., SUTMOLLER, P., MARROETA, M. Factors associated with anaphylactic reactions to chicken embryo foot-and-mouth disease vaccine and flury rabies vaccine in cattle of Venezuela. *Am. J. Vet. Res.*, 25 (109): 167-1634, 1964.
- RENES, I. Allergic reactions following vaccination of cattle against foot-and-mouth disease on large farms. *Magyar Allatorv. Lap.*, 31 (2): 115-117, 1976. In: *FMD Bull.*, 15 (10): 76/137, 1976.
- ROSSI, F. Crisis anafiláctica producida por vacuna anti-aftosa. Su etiología. Primera parte. *Gac. Vet.*, 25 (156): 299-307, 1963.

16. SHARMA, S.K., SINGH, G.R., MURTY, D.K. Allergic reactions in buffalo after vaccination with foot-and-mouth disease vaccine. *Indian Vet. J.*, 56: 621, 1979. In: *FMD Bull.*, 19 (6): 80/55, 1980.
17. STAHL and EGON, Thin Layer Chromatography, Oxford, Academic Press, 1965.
18. TOUCHSTONE and SHERMA. Techniques and applications of Thin Layer Chromatography. London John Wiley & Sons, 1985.
19. UBERTINI, B., BAREI, S. Anti-FMD vaccination and immediate anaphylactic reactions. *Vet. Ital.*, 21 (5-6): 366-376, 1970.
20. VIANNA FILHO, Y.L., ASTUDILLO, V., GOMES, I., FERNANDEZ, G., ROZAS, C.E.E., RAVISON, J.A., ALONSO, A. Potency control of foot-and-mouth disease vaccine in cattle. Comparison of the 50% protective dose and the protection against generalization. *Vaccine*, 11 (14): 1424-1428, 1993.

#### Información

La Comisión Sudamericana para la Lucha contra la Fiebre Aftosa (COSALFA), integrada por los Directores de Salud Animal de los países de América del Sur, se reúne anualmente y sirve de cuerpo asesor para el Director de PANAFTOSA. Es el organismo de promoción, coordinación y evaluación de los programas nacionales, proyectos subregionales y convenios de frontera de los países de la Región, en materia de fiebre aftosa y otras enfermedades vesiculares.

En marzo de 1985, la COSALFA fue institucionalizada por los Ministros de Relaciones Exteriores de los países de América del Sur como Comisión Permanente Subregional, actuando el Ministerio de Relaciones Exteriores del Brasil como depositario del Convenio. Tiene también como función la adopción de normas y medidas para evitar la introducción de enfermedades exóticas en América del Sur.

#### Anuncio

##### **Reuniones de la Comisión Sudamericana para la Lucha contra la Fiebre Aftosa (COSALFA)**

*Todos los años se realiza una Reunión de los países miembros de la COSALFA donde se discuten asuntos relacionados al combate contra la fiebre aftosa.*

*Previamente se realiza un Seminario con un tema seleccionado en el Seminario del año anterior.*

1993 - XX Reunión de la COSALFA. 25 y 26 de marzo de 1993, Montevideo, República Oriental del Uruguay  
Seminario Internacional sobre Erradicación de la Fiebre Aftosa, sus Fundamentos Técnico-Administrativos y sus Consecuencias en el Comercio de Animales, Productos y Subproductos de Origen Animal. 22 al 24 de marzo de 1993.

1994 - XXI Reunión de la COSALFA. 14 y 15 de abril de 1994, Lima, Perú  
Seminario Internacional sobre los Sistemas de Atención de la Salud Animal ante los Cambios en el Papel del Estado y de la Comunidad. 11 al 13 de abril de 1994.