

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**CONTROL DE CALIDAD DE VACUNAS DE USO EN ANIMALES DE
PRODUCCIÓN**

Por

URSE FERNÁNDEZ, Juan Manuel

TESIS DE GRADO presentada como uno de los requisitos para obtener el título de Doctor en Ciencias Veterinarias

Orientación: Higiene, Inspección y Tecnología de los alimentos de origen animal

MODALIDAD: Revisión Monográfica

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2016**

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis aprobada por:

Presidente:

Dr. Julián Bermúdez

Segundo miembro:

Dr. Milton Cattáneo

Tercer miembro:

Dr. Martín Breijo

Cuarto miembro:

Dr. Rodrigo Puentes

24/10/16

Fecha de aprobación:

Autor:

Juan Manuel Urse

AGRADECIMIENTOS

1. A los Dres. Milton Cattáneo y Rodrigo Puentes por su dedicación y colaboración en toda instancia.
2. A las Sras. Rosina y Alejandra, del área de revisión bibliográfica de Biblioteca, por su tiempo dedicado.
3. A toda mi familia por el apoyo incondicional recibido en estos años.
4. A los amigos de estudio, con quienes compartimos tantos momentos a lo largo de esta carrera.
5. A mi novia Alejandra por apoyarme e incentivarme en estos últimos años.
6. Al grupo de amigos de toda la vida, quienes siempre han estado presente.

TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS	3
LISTA DE ESQUEMAS	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
1. RESUMEN.....	12
2. SUMMARY	12
3. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN.....	14
4. OBJETIVOS	17
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	17
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES	18
4.2.1 Describir y comparar las técnicas utilizadas para comprobar la pureza o esterilidad de los lotes/series de cada vacuna en particular.	18
4.2.1.1 Vacunas contra Clostridios	18
4.2.1.2 Vacunas contra Leptospiras.....	22
4.2.1.3 Vacunas contra Carbunco.....	22
4.2.1.4 Vacunas contra Diarrea Viral Bovina (DVB).....	24
4.2.1.5 Vacunas contra Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR)	30
4.2.1.6 Vacunas contra la Rabia	31
4.2.1.7 Vacunas contra la Fiebre Aftosa	35
4.2.2 Describir y comparar los ensayos de inocuidad que se aplican en las vacunas a estudiar, revisando los procedimientos internacionales, regionales y nacionales.	35
4.2.2.1 Vacunas contra Clostridios	35
4.2.2.2 Vacunas contra Leptospiras.....	37
4.2.2.3 Vacunas contra Carbunco.....	38
4.2.2.4 Vacunas contra Diarrea Viral Bovina (DVB).....	39
4.2.2.5 Vacunas contra Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR)	40

4.2.2.6 Vacunas contra la Rabia	40
4.2.2.7 Vacunas contra Fiebre Aftosa	41
4.2.3 Describir y comparar las técnicas que se llevan a cabo para probar la potencia de cada vacuna tanto a nivel internacional, regional como nacional.	
.....	42
4.2.3.1 Vacunas contra Clostridios	42
4.2.3.2 Vacunas contra Leptospiras.....	54
4.2.3.3 Vacunas contra Carbunco.....	57
4.2.3.4 Vacunas contra Diarrea Viral Bovina (DVB).....	59
4.2.3.5 Vacunas contra Rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR).....	61
4.2.3.6 Vacunas contra Fiebre Aftosa	63
4.2.3.7 Vacunas contra la Rabia	68
4.2.4 Pruebas de potencia in vitro como alternativa para el control de vacunas contra clostridios y leptospiras.	73
4.2.4.1 Definición y aplicación de las “3Rs”	73
a) <i>Reemplazo</i>	73
b) <i>Refinamiento</i>	73
c) <i>Reducción</i>	74
4.2.4.2 Ensayos in vitro.	74
1) <i>Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)</i>	74
2) <i>Toxin-binding-inhibition test (ToBI test)</i>	90
3) <i>Prueba de Seroneutralización en cultivos celulares</i>	91
4) <i>Test de inhibición del crecimiento in vitro (TICIV)</i>	94
5) <i>Test de seroaglutinación</i>	96
4.2.5 Revisar la normativa vigente que rige el control de las vacunas en Uruguay y proceder a un análisis comparativo con las normativas internacionales y regionales.	98
5. CONCLUSIONES	99
6. BIBLIOGRAFÍA	101
7. ANEXO	116

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Algunas cepas de la Colección Americana de Cultivos (ATCC) con sus respectivos medios y condiciones de incubación	19
Tabla II. Volumen de vacuna a probar según el contenido total del envase.....	20
Tabla III. Criterio utilizado en función de los resultados de la prueba según la OIE.....	22
Tabla IV. Método de preparación de mezclas aplicado por la Norma SDA N° 23.....	45
Tabla V. Preparación de mezclas para titular la actividad anti-beta en el suero.....	46
Tabla VI. Preparación de mezclas para titular la actividad anti-ε en el suero según el CFR.....	47
Tabla VII. Mezclas y diluciones utilizadas en el test de seroneutralización.....	48
Tabla VIII. Preparación de mezclas para titular la actividad anti-α en el suero según lo establecido en el CFR.....	49
Tabla IX. Preparación de mezclas suero-toxina en el ensayo de neutralización in vivo, recomendación del CFR.....	50
Tabla X: Comparativo de la prueba de neutralización en ratones para los distintos antígenos (Ag) clostridiales.....	51
Tabla XI. Tipos de pruebas y valores de potencia exigidos para las toxo-bacterinas o toxoides de <i>Clostridium spp</i> según el CFR, la BP13 y la Norma Mercosur N° 77/96.....	52
Tabla XII. Puntos de corte (en una curva dosis - respuesta) determinados por neutralización viral y ELISA.....	62
Tabla XIII: Interpretación del ensayo en función de los valores promedios de EPPs obtenidos para cada tipo de antígeno.....	67
Tabla XIV: Interpretación de la prueba en relación al promedio de títulos de anticuerpos según la Resolución SENASA 351/2006.....	67

Tabla XV: Enzimas utilizadas frecuentemente para constituir un conjugado, con sus principales sustratos y los colores desarrollados según la longitud de onda aplicada.....	75
Tabla XVI. Resumen de los coeficientes de correlación para los resultados de ELISA y MNT.....	78
Tabla XVII: ELISAs estudiados para probar la potencia de vacunas anti-clostridiosis y anti-leptospirosis.....	89
Tabla XVIII: Tipos de líneas celulares utilizadas para probar la potencia de toxoides/ toxo-bacterinas de <i>C. novyi B</i> , <i>C. septicum</i> y <i>C.perfringens D</i>	94
Tabla XIX: Bacterinas de <i>Leptospira pomona</i> y <i>canicola</i> en prueba de TICIV.....	95
Tabla XX. Procedimiento de dilución del suero para un test de aglutinación en placa.....	96
Tabla XXI. Interpretación del título para el test de aglutinación en placa.....	97
Tabla A.I. Vacunas clostridiales registradas en nuestro país.....	116
Tabla A. II. Vacunas anticarbuncosas registradas en nuestro país.....	118
Tabla A.III. Vacunas registradas en Uruguay para prevenir enfermedades reproductivas (DVB, IBR y Leptospirosis), respiratorias (DVB e IBR) y la leptospirosis.....	119
Tabla A. IV. Vacunas antirrábicas registradas en nuestro país.....	121
Tabla A.V. Vacunas antiaftosa registradas en el Uruguay.....	121
Tabla A.VI. Expectativas Porcentuales de Protección (EPP) – Virus O ₁ Campos.....	121
Tabla A.VII. Expectativas Porcentuales de Protección (EPP) – Virus A ₂₄ Cruzeiro.....	122
Tabla A. VIII. Expectativas Porcentuales de Protección (EPP) – Virus C3 Indaial.....	122

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Titulación de anticuerpos de fiebre aftosa. Prueba de control de potencia.....	66
Esquema 2: Placa de titulación de los controles utilizada en la validación del método RFFIT.....	71
Esquema 3: Placa de titulación de los sueros a testear utilizada en la validación del método RFFIT.....	72
Esquema 4: Placa de ELISA en sándwich mostrando las diluciones correspondientes.....	85
Esquema 5: Placa de un ELISA competitivo mostrando las diluciones correspondientes.....	88

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Tinción Steiner-Steiner Silver.....	55
Figura 2: Microscopía electrónica y de inmunofluorescencia.....	56
Figura 3: Cultivo de células MDBK mostrando el efecto citopático (EC) causado por el BHV tipo 1 (Herpesvirus bovino tipo 1).....	62
Figura 4: Modo de tinción de foco fluorescente en RFFIT.....	72
Figura 5: Esquema de un ELISA indirecto.....	77
Figura 6: Especificidad del ELISA flagelar de <i>C. chauvoei</i>	80
Figura 7. Especificidad de un ELISA de <i>C. chauvoei</i> a base de células sonicadas.....	80
Figura 8. Preparación de hibridomas que secretan AcMc contra un antígeno en particular.....	82
Figura 9. Esquema del ELISA en sándwich indirecto.....	84
Figura 10. Estudio de correlación entre el ELISA y MNT para la determinación del nivel de anticuerpos contra toxoide beta en el suero de conejos.....	86
Figura 11. Principio de un ELISA competitivo indirecto.....	87
Figura 12. Valores de potencia relativa calculados para cada suero a testear, representando el valor medio de cuatro mediciones realizadas en cada laboratorio.....	89
Figura 13. Tinción con cristal violeta de la monocapa de células VERO.....	92

LISTA DE ABREVIATURAS

AcMc: anticuerpo(s) monoclonal (es)

AcPc: anticuerpo (s) policlonal (es)

AR: antitoxina de referencia

BHK: riñón de hámster recién nacido

BP13: Farmacopea Británica del año 2013

CAM: membrana alantocoriónica

CFR: Código Federal de Regulaciones de Estados Unidos (EE. UU)

CO₂: dióxido de carbono

DI₅₀: dosis infecciosa 50%

DICT₅₀: dosis infectiva cultivo de tejidos 50%

DLM: dosis letal mínima

DL₅₀: dosis letal 50%

DO: densidad óptica

DP₅₀: dosis paralítica 50%

ELISA: ensayo inmuno-adsorbente ligado a enzimas

ELISA/CFL: ensayo inmuno-adsorbente ligado a enzimas/ competición fase líquida

EMJH: Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris

EPP: expectativas porcentuales de protección

FC: fijación de complemento

FTM: medio de tioglicolato líquido

FTMB: medio de tioglicolato líquido con extracto de carne

Ig: inmunoglobulina

IgA; inmunoglobulina A

IgG: inmunoglobulina G

IgM: inmunoglobulina M

Log₁₀: logaritmo en base 10

MAT: test de aglutinación microscópica

MDBK: riñón bovino Madin-Darby

MDCK: riñón canino Madin- Darby

µg: microgramo (s)

µL: microlitro (s)

MNT: test de neutralización en ratones

O₂: oxígeno

PBS: buffer fosfato salino

PBST: solución al 0,05 % de Tween 20 en buffer fosfato salino

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

RFFIT: test rápido de inhibición del foco fluorescente

SCDM: medio de soja-caseína hidrolizada

TICIV: test de inhibición de crecimiento in vitro

ToBI: test de inhibición de unión de la toxina

UFC: Unidades Formadoras de Colonias

UI: Unidades internacionales

VERO: células epiteliales de riñón de mono verde africano

1. RESUMEN

A lo largo de la historia, las vacunas veterinarias han sido una herramienta fundamental para prevenir las enfermedades en los animales, así como también en el hombre (enfermedades zoonóticas). Hoy en día con el avance de la tecnología, las vacunas se producen a escala industrial, tanto a nivel internacional como nacional, lo cual implica rigurosos controles de calidad durante toda la línea de producción para, por ejemplo, asegurar la homogeneidad entre los distintos lotes; dichos controles se basan en distintas normas de referencia. Uno de los objetivos de esta revisión monográfica fue describir los distintos protocolos (actualizados) para controlar la esterilidad/pureza, la seguridad y potencia de las vacunas en su presentación final (último eslabón de la cadena). Los productos que se seleccionaron para el estudio, fueron aquellos destinados a proteger contra enfermedades de importancia en la producción animal nacional como lo son; las clostridiosis, la leptospirosis, el carbunco, la diarrea viral bovina, la rinitraqueitis infecciosa bovina, la fiebre aftosa y la rabia. Revisando los distintos procedimientos, se observó que las normativas indican probar la esterilidad/pureza de las vacunas mediante la detección de microorganismos contaminantes, utilizando normalmente, métodos de cultivo en medios de enriquecimiento. Por su parte, para la evaluación de seguridad y potencia, los ensayos se llevan a cabo en animales, ya sea en las especies de destino o especies de laboratorio. En lo que refiere particularmente a las pruebas de potencia, se determinó que los ensayos más utilizados son el test de desafío y el test de neutralización en ratón, en donde, en general, los animales no protegidos y los controles desarrollan signos significativos de la enfermedad, muriendo posteriormente. Debido al gran número de animales requeridos, al sufrimiento que se les produce, y en un intento de promover el bienestar animal, en este trabajo se describieron distintas pruebas *in vitro* planteadas como reemplazo a los ensayos *in vivo*. Otro de los objetivos fue el de revisar la legislación Uruguaya sobre los productos veterinarios, y se concluyó que la misma carece de procedimientos técnicos de control de calidad actualizados, lo que hace difícil contar con un sistema de contralor oficial adecuado.

2. SUMMARY

Throughout history, veterinary vaccines have been important in the prevention of diseases in animals, as well as in humans (zoonotic diseases). Today with the progress of technology, vaccines are produced on industrial scale, both internationally and nationally, which implies rigorous quality controls throughout the production line, for example, to ensure homogeneity between the different batches; these controls are based on different reference standards. One of the objectives of this monographic review was to describe the different current protocols for controlling sterility/purity, safety and potency of vaccines in their final presentation (last link in the production's chain). The products selected for the study were those intended to protect against diseases of importance in national livestock production such as; clostridial diseases, leptospirosis, anthrax, bovine viral diarrhea, infectious bovine rhinotracheitis, foot and mouth disease and rabies. Reviewing the various procedures, it was observed that the regulations prove sterility/purity of vaccines by detecting contaminating microorganisms, using

normally cultivation methods in enrichment media. Meanwhile, for the evaluation of safety and potency, tests are carried out on animals, either in the target species or laboratory species. Related to the potency tests, it was observed that the most commonly used tests are the challenge assay and mouse neutralization test, where, in general, unprotected and control animals develop significant signs of disease and subsequently die. Due to the large number of animals required, the suffering caused, and in an attempt to promote animal welfare, this work described various *in vitro* tests that have been proposed as a replacement for the *in vivo* assays. Another objective was to review the Uruguayan legislation on veterinary products, and it was concluded that it lacks of updated technical quality control procedures, making it difficult to have an adequate official control system.

3. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

La primera vacuna de la que se dispone de datos científicos la ideó Edward Jenner (1749-1823) en 1796 frente a la viruela humana. Jenner observó que las personas que habían sufrido la viruela vacuna (enfermedad mucho más benigna que la viruela humana) no padecían la viruela humana, por lo que decidió hacer un preparado, con las vesículas de vacas infectadas, que, inoculado a personas sanas las protegía frente a la viruela humana. Por haber sido originada en un vacuno, al proceso se le dio el nombre de vacuna, y al virus que se empleó "*vaccinia*". (Sánchez-Vizcaíno, 2006)

El uso de la palabra vacuna como término para designar a todas las vacunas existentes y las del futuro, entró en uso en la comunidad científica internacional alrededor del año 1880 antes de ser incluido en el diccionario francés.

Al rastrear el origen de las vacunas modernas es necesario hablar de Louis Pasteur (1822-1895), un químico francés que junto a su equipo multidisciplinario dio origen a las primeras vacunas de importancia en medicina humana y veterinaria. Pasteur demostró que se podía inducir inmunidad, más o menos duradera, utilizando microorganismos homólogos modificados, en su virulencia, así como por su inactivación total. En el año 1881 junto a su equipo, llevaron a cabo una serie de investigaciones que permitieron desarrollar la vacuna contra el *Bacillus anthracis* (ántrax) y la erisipela porcina. La primera consistía en un cultivo atenuado por calor con el agregado de un antiséptico que inhibía la formación de esporas, y la segunda en una vacuna atenuada por pases in vivo en conejos. En 1881 y 1882 crearon una vacuna anti rábica atenuada utilizando nuevamente pasajes en conejos; vacuna que fue durante mucho tiempo utilizada para proteger humanos y animales. (Sánchez-Vizcaíno, 2006; Lombard y col., 2007)

En 1924, el Dr. Gastón Ramón (1886-1962) realizó el tratamiento de la toxina tetánica con formaldehído y calor, obteniendo "la antitoxina" (toxóide). Él también propuso que la eficacia de esta 'antitoxina' podría mejorarse mediante el uso de, además de los antígenos específicos, sustancias conocidas como adyuvantes de la inmunidad, tales como hidróxido de aluminio, creando así la primera vacuna con adyuvante.

Existe una relación muy estrecha entre la historia de la vacuna contra la fiebre aftosa y el desarrollo tecnológico de producción de vacunas a escala industrial. Sin dudas, una de las novedades en la fabricación de dicha vacuna fue la utilización de la línea celular Baby Hámster Kidney (BHK 21), primero en monocapas (Macpherson y Stocker) y luego en suspensión (Capstick y Telling en 1962). (Lombard y col., 2007)

En los años posteriores hubo innovaciones tales como; la utilización de adyuvante oleoso en la vacuna para bovinos (Mc Kercher en 1970) y el descubrimiento de la proteína no estructural del virus de la fiebre aftosa (NSP) en la década del 90. Era posible utilizar una vacuna que no contenía NSP, y por tanto a la hora de diagnosticar, diferenciar un animal vacunado de uno infectado.

Los brotes repetidos de fiebre aftosa en Alemania, debido a vacunas con virulencia residual y a escapes del virus de las plantas de elaboración (reportados por Beck y Strohmaier) llevó a que la comunidad europea e internacional promulgaran normas en lo referente a la bioseguridad, buenas prácticas de manufactura y autorizaciones de comercialización; era necesario producir vacunas que garantizaran la inmunización, pero sin producir efectos nocivos o adversos en los animales. (Lombard y col., 2007)

En la actualidad es imprescindible la administración de vacunas de calidad, puras, inocuas, potentes y eficaces para el mantenimiento de la salud de los animales y el funcionamiento satisfactorio de los programas de Sanidad animal.

Los fabricantes deben utilizar procedimientos validados que aseguren la calidad de las vacunas y que garanticen la uniformidad y consistencia del proceso de producción. El control de la calidad depende de dichos fabricantes y se basa en tres componentes: el control de las materias primas, el control del proceso de producción y el control del producto final (lotes/series). (Dellepiane y col., 2000)

El control en los lotes/series consiste en diversos ensayos previamente validados que comprueban, la pureza, inocuidad y potencia de la vacuna (requisitos básicos); otras pruebas descritas en el esquema de producción de la empresa o en cualquier otro documento relativo al proceso de elaboración también se realizarán.

Existen normas internacionales y regionales que rigen el control de las vacunas. La OIE en su manual plantea los protocolos para la producción y control de vacunas; la Directiva 2001/82/CE (revisada) de la comunidad europea establece procedimientos en cuanto a las pruebas de control del producto terminado tomando como referencia las monografías específicas de la Farmacopea europea o de Farmacopeas nacionales de los Estados miembros. Por otro lado, EE. UU tiene implementado un Código Federal de Regulaciones (CFR) el cual reglamenta los requerimientos estándares que deben cumplir las vacunas en ese país. A nivel de la región, encontramos las Resoluciones 11/93 y 39/96 del MERCOSUR que regulan los productos veterinarios, resolviendo normas de control de calidad de la vacuna final. En Uruguay el Decreto 160/997 implementa ambas Resoluciones y establece que la Autoridad Sanitaria Oficial (División Laboratorio Veterinarios «Miguel C. Rubino» -DILAVE-) realizará un control permanente, es decir, se procederá a un muestreo periódico de los lotes de las vacunas previo a su comercialización y se las someterá a análisis de comprobación de calidad.

(Unión Europea, 2001; Uruguay Ministerio de Gandarería, Agricultura y Pesca)

En el ámbito nacional también encontramos la Resolución de la DGSG del 26 de mayo de 1998 por la que se aprueba el reglamento técnico para el control de vacunas contra el carbunco sintomático, gangrena gaseosa, enterotoxemia y tétanos.

En el caso de Brasil, legisla sobre los productos veterinarios, imponiendo determinadas normativas y ordenanzas. La normativa SDA N° 23 del 2002 aprueba el reglamento técnico para el control de la vacuna contra el Botulismo y la normativa MAPA N° 50 del 2008 reglamenta el control de la vacuna contra la Fiebre Aftosa. Dentro de las ordenanzas cabe destacar: la SDA N°49 de 1997 por la cual se aprueba el reglamento técnico para el control de vacunas contra el Carbunco Sintomático, Gangrena Gaseosa, Enterotoxemia y Tétano; la DNPA N° 88 de 1975 que reglamenta el control de la vacuna contra carbunco hemático y la ordenanza MA N° 228 de 1988 que establece las instrucciones referentes al control de las vacunas y suero anti- rábicos. (Brasil Ministério da Agricultura, Pecária e Abastecimento, 2012)

La esterilidad/pureza del producto final se determina mediante el análisis de una variedad de contaminantes. Se procede a la detección de virus, bacterias, mycoplasmas y hongos extraños, incluyendo, por ejemplo: Salmonella, Brucella, los agentes clamidiales, los virus hemoaglutinantes, agentes citopáticos y hemoabsorbentes, los patógenos detectados mediante enzimoimmunoensayo (ELISA), la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o la técnica de los anticuerpos fluorescentes (IF), entre otros.

Una vacuna inocua es aquella que induce una respuesta inmunitaria controlada, sin producir reacciones locales y sistémicas adversas. Los procedimientos estandarizados aplican ensayos de inocuidad con ratones, cobayos, gatos, perros, caballos, cerdos, ovejas y bovinos.

Las pruebas de potencia para los productos víricos o bacterianos inactivados, se pueden realizar en animales de laboratorio, en animales hospedadores, o por métodos cuantitativos in vitro que se hayan validado de forma fiable para establecer una correlación entre la cuantificación in vitro del antígeno o antígenos importantes con la eficacia in vivo. Normalmente, la potencia de las vacunas vivas se estima mediante recuentos bacterianos o titulación de virus. (OIE, 2015)

Otras pruebas requeridas pueden relacionarse con el nivel de humedad que hay en los productos desecados, el nivel residual de inactivación de los productos muertos, la inactivación completa de los productos muertos, el pH, el nivel de conservantes y antibióticos permitido, la estabilidad física de los adyuvantes, la retención del vacío en los productos desecados y un examen físico general de la vacuna final. (OIE, 2015)

A medida que se han ido desarrollando las tecnologías de producción de vacunas, también lo han hecho las tecnologías de análisis y conjuntamente las normativas que regulan el control de las vacunas; por esta razón, es que este trabajo pretende realizar una revisión bibliográfica actualizada sobre las pruebas llevadas a cabo en los lotes/series (producto terminado) de las vacunas de importancia en nuestro país, analizando los protocolos internacionales, regionales y nacionales.

Cabe destacar que existen diversas vacunas registradas en nuestro país para la prevención de las principales enfermedades en los animales de producción, como las clostridiosis, enfermedades reproductivas y respiratorias, la leptospirosis, el carbunco, la rabia y la fiebre aftosa. (Ver Anexo, **Tabla A. I, A. II, A.III, A.IV, A.V**).

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

4.1.1 Realizar una revisión bibliográfica actualizada sobre el control de calidad practicado en los lotes/series de vacunas bacterianas (carbunco, clostridios, leptospiras) y víricas (diarrea viral bovina, rinotraqueitis infecciosa bovina, rabia, fiebre aftosa) de importancia en los programas sanitarios a nivel nacional.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

4.2.1 Describir y comparar las técnicas utilizadas para comprobar la pureza o esterilidad de los lotes/series de cada vacuna en particular.

4.2.2 Describir y comparar los ensayos de inocuidad que se aplican en las vacunas a estudiar, revisando los procedimientos internacionales, regionales y nacionales.

4.2.3 Describir y comparar las técnicas que se llevan a cabo para probar la potencia de cada vacuna tanto a nivel internacional, regional como nacional.

4.2.4 Pruebas de potencia in vitro como alternativa para el control de vacunas contra clostridios y leptospiras.

4.2.5 Revisar la normativa vigente que rige el control de las vacunas en Uruguay y proceder a un análisis comparativo con las normativas internacionales y regionales.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

4.2.1 Describir y comparar las técnicas utilizadas para comprobar la pureza o esterilidad de los lotes/series de cada vacuna en particular.

Las técnicas para detectar microorganismos contaminantes o agentes extraños deben llevarse a cabo en condiciones adecuadas de asepsia (utilización de materiales estériles, guantes desechables, etc.). Las condiciones de trabajo se monitorean regularmente y se lleva un control apropiado de las mismas. (Great Britain The Department of Health, 2013)

4.2.1.1 Vacunas contra Clostridios

Para comprobar la esterilidad de la vacuna, cada lote/serie es sometido a ensayos en medios de cultivos artificiales para detectar bacterias y hongos viables.

- 1) Muestras; la Farmacopea Británica del año 2013 (BP13) determina el número de unidades que se deben analizar según el tamaño del lote. Cuando el tamaño es de hasta 100 unidades se testea el 10% o 4 envases, cualquiera sea el mayor. Si el lote contiene entre 100 y 500 envases, se prueban 10. Si son más de 500 envases, entonces el 2% o 20 envases, cualquiera sea el menor, deberían ser sometidos a ensayo. (Great Britain, 2013)

El Código Federal de Regulaciones de EE. UU (CFR) dispone que se utilizaran 10 envases como muestra representativa del lote. (USA Department of Agriculture, 2012).

En el caso de Uruguay, la autoridad regulatoria exige la extracción de tres frascos de cada serie, de los cuales la DILAVE se queda con dos (se le otorga número de entrada) y uno permanece lacrado con fecha de retiro y firma del funcionario de la DILAVE en el laboratorio productor/importador hasta el vencimiento de la misma; en caso de no aprobar las pruebas pertinentes se analizará esta contramuestra. Una vez retirados los frascos y aprobados los controles se le otorga un número de registro. (Bermúdez y col., 2013)

- 2) Medios de cultivo: los medios de cultivos se preparan en el laboratorio o bien se pueden usar medios de cultivo comerciales equivalentes, siempre que cumplan con la prueba de promoción de crecimiento de aerobios, anaerobios y hongos.

El medio de tioglicolato líquido solo (FTM) o suplementado con 0,5% de extracto de carne (FTMB) es adecuado para el cultivo de bacterias aerobias y anaerobias. Para el cultivo de hongos y bacterias aerobias se indica el medio de soja caseína hidrolizada (SCDM). (OIE, 2008; USA, 2012; Great Britain, 2013)

El reglamento técnico para el control de vacunas contra el carbunco sintomático, gangrena gaseosa, enterotoxemia y tétanos a nivel regional (norma MERCOSUR N° 77/96) establece que para el control de anaerobios se utilizará el medio FTM, el medio infusión cerebro corazón (BHI) o el caldo de carne cocida (CMM); para las bacterias aerobias se indica el medio FTM, el medio BHI o el agar tripteína de soya (TSA) y para la detección de hongos se usará el medio Sabouraud (Sab). (MERCOSUL, 1996)

Respecto a la temperatura de incubación, para la detección de contaminación bacteriana, todos los medios se incuban a 37 °C, salvo el FTM/FTMB y SCDM cuyo rango es de 30-35 °C. En el caso de los hongos, los medios se colocan a una temperatura de entre 20-25 °C.

Es importante destacar que si la vacuna contiene como conservante un agente biológico distinto al Timerosal (mertiolato), como por ejemplo el fenol, se usa el medio FTM/FTMB y el medio SCDM, en cambio si contiene Timerosal se utiliza solo el medio FTM/FTMB y se incuba a 30-35 °C (para la determinación de bacterias) y a 20-25 °C (para la determinación de hongos). (OIE, 2008)

3) Test de esterilidad y promoción de crecimiento de los medios de cultivo:

Ambas pruebas se llevan a cabo antes o en paralelo al análisis de la vacuna.

Para el *ensayo de esterilidad* se incuban porciones del medio (recipientes representativos) por 14 días a la temperatura correspondiente. Los medios superan la prueba si no hay evidencia de crecimiento de microorganismos.

El *test de promoción de crecimiento* de bacterias y hongos se lleva a cabo en cada lote de medio preparado, deshidratado o en sus ingredientes. Se utiliza una porción de medio de cultivo y se inocula con 10 a 100 microorganismos control viable, incubándose a la temperatura y condiciones especificadas en el siguiente cuadro:

Tabla I. Algunas cepas de la Colección Americana de Cultivos (ATCC) con sus respectivos medios y condiciones de incubación. (*Extraído y adaptado de OIE, 2008*)

Medios	Microorganismo de referencia	INCUBACIÓN	
		Temperatura(°C)	Condición
FTM ¹	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC no. 6633	30–35	Aerobiosis
FTM	<i>Cándida krusei</i> ATCC no. 6258	20–25	Aerobiosis
FTM/ TSA ²	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC no. 9027	30-35/ 37	Aerobiosis
SCDM ³ Sab ⁴	<i>Cándida albicans</i> ATCC no. 10231	20-25	Aerobiosis
SCDM	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC no. 6633	30–35	Aerobiosis
SCDM	<i>Cándida kursei</i> ATCC no. 6258	20–25	Aerobiosis
SCDM	<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC no.16404	20-25	Aerobiosis
FTMB ⁵ / CMM ⁶	<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC no. 11437	30–35/ 37	Anaerobiosis
FTMB/ BHI ⁷ AS ⁸	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC no. 6538/ 25923	30–35/ 37	Aerobiosis

FTM¹ = medio de tioglicolato líquido. TSA² = agar tripteína de soya. SCDM³ = medio de soja caseína hidrolizada. Sab⁴ = agar Sabouraud. FTMB⁵ = medio de tioglicolato líquido con extracto de carne. CMM⁶ = caldo de carne cocida. BHI⁷ = infusión cerebro corazón.

AS⁸ = agar sangre

El medio se incuba por no más de 3 días para el caso de determinación de bacterias y no más de 5 días para el caso de detección de hongos. El medio cumple con la prueba si existe un crecimiento claro y visible de los microorganismos. Es recomendable proceder a la realización de un frotis y tinción para así poder confirmar que se trata del microorganismo inoculado. (OIE, 2008; Great Britain, 2013)

- 4) Test de esterilidad de la vacuna: el ensayo puede llevarse a cabo usando la técnica de filtración en membrana o la inoculación directa a los medios de cultivo. Para aquellas vacunas líquidas que vienen en presentaciones mayores de 100 mL, se recomienda, si es posible, la primera técnica. (OIE, 2008; Great Britain, 2013)

En la técnica de filtración en membrana se usan membranas filtrantes que tengan un poro nominal no mayor a 0.45 µm y un diámetro de al menos 47 mm. Si la vacuna es una solución acuosa u oleosa se usan filtros de nitrato de celulosa. El filtro se humedece con 20-25 mL del diluyente A o B inmediatamente antes de volcar el contenido del envase.

Tabla II. Volumen de vacuna a probar según el contenido total del envase (*extraído y adaptado de Great Britain, 2013*)

Cantidad por envase	Mínima cantidad que se utiliza por cada medio
<1,0 mL	Todo el contenido del envase
1,0-40 mL	La mitad del contenido del envase, pero no menos de 1,0 mL
40-100 mL	20 mL
>100 mL	10 % del envase, pero no menos de 20 mL

El diluyente A se utiliza para las soluciones acuosas y consiste en una solución neutra de 1g/L de hidrolizado péptico de caseína o carne ajustada a un pH de $7.1 \pm 0,2$; se distribuyen en frascos alícuotas de 100 mL y se esterilizan.

El diluyente B consiste en el agregado de 1mL de polisorbato 80 a 1 litro de diluyente A, ajustándose a un pH de 7.1 ± 0.2 y también se distribuyen alícuotas de 100 mL en frascos para luego ser esterilizados. Este diluyente se usa para soluciones oleosas ya que el polisorbato actúa como agente emulsificante.

Para anular el efecto de los agentes conservantes, la membrana se lava tres veces con aproximadamente 100 mL del diluyente apropiado (A o B) luego de que se filtró el contenido del envase.

Luego lo que se hace es transferir la membrana al medio de cultivo o se corta asépticamente en 2 partes iguales y se transfiere cada una a los medios adecuados.

La siembra directa a los medios de cultivo consiste en la transferencia de un volumen determinado de la vacuna en forma directa a los medios de cultivo, utilizando una pipeta o jeringa estéril.

Al igual que en la técnica de filtración en membrana, la actividad antimicrobiana de la vacuna debe ser tomada en cuenta. El CFR recomienda pipetear 1,0 mL de vacuna de cada envase e inocularlo en un recipiente de ensayo individual, el cual debe tener la suficiente cantidad de medio líquido para anular la actividad bacteriostática o fungistática en el inóculo. Por lo tanto, es necesario calcular, previo a la prueba, la proporción entre el volumen de inóculo y el volumen de medio de cultivo, de manera que haya una suficiente dilución del producto. (USA, 2012, 2012a)

Según lo determinado por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), para calcular el volumen correcto de medio se usan 100 UFC de los microorganismos control que se indican en la **Tabla I**.

Los medios se inoculan simultáneamente con la vacuna a testear y con los microorganismos control. El número de recipientes de ensayo que se usa debería ser por lo menos la mitad de lo usado para ensayar el producto.

El volumen del medio es satisfactorio si a los 7 días de incubación existe clara evidencia del crecimiento de los microorganismos control en todos los recipientes de ensayo. (OIE, 2008)

La BP13, por otro lado, plantea la opción de utilizar una sustancia que neutralice al conservante, o bien la transferencia de un volumen de inóculo que no supere el 10% del volumen del medio.

El reglamento técnico para el control de vacunas contra el carbunco sintomático, gangrena gaseosa, enterotoxemia y tétanos propone que el volumen de inóculo debe encontrarse en una proporción de 1/20 respecto al volumen de medio de cultivo (0,5 mL de vacuna en 10 mL de medio). Dicho reglamento aclara que para aquellas vacunas con adyuvante oleoso, primero se debe romper la emulsión transfiriendo 1,0 mL de la vacuna en un tubo con 9,0 mL de Teepol al 0,5 %. (MERCOSUL, 1996)

Para la vacuna contra el *Clostridium botulinum* la legislación brasileña establece que la proporción será de 1/40 (0,5 mL de vacuna en 20 mL de medio). (Brasil, 2012a)

- 5) Observación e Interpretación de los resultados de la prueba de esterilidad: para las pruebas de esterilidad tanto por filtración en membrana como por inoculación directa, los medios se incuban durante por lo menos 14 días. Se examinan los recipientes de ensayo con intervalos durante la incubación y después de los 14 días para evidenciar el crecimiento de microorganismos. (MERCOSUL, 1996; USA, 2012) Cuando el inóculo (en el caso de la técnica de siembra directa) genera turbidez en el medio, lo cual no permite visualizar la ausencia de microorganismos, se deberá hacer subcultivos del día 7 al 11 de incubación. Se transfiere un volumen de no menos de 1,0 mL desde el medio turbio a 20-25 mL de medio fresco, y se incuba hasta el día 14 del período. (USA, 2012)

Si no se encuentra crecimiento en los recipientes de ensayo, el lote cumple los requerimientos de la prueba.

En caso de sospechas por la posible turbidez de los medios líquidos, estos deben ser repicados al final de la prueba en agar sangre (determinación de bacterias) y agar Sabouraud (determinación de hongos) para confirmar. Las placas de agar sangre se incuban en anaerobiosis estricta, microaerofilia y en aerobiosis a 37 °C y el medio Sabouraud de 20 a 25 °C, por un período de hasta 5 días respectivamente.

Se sugiere la realización de frotis y tinción (Gram) para visualizar la presencia del/los microorganismo/s. (MERCOSUL, 1996)

En algunas ocasiones se puede encontrar crecimiento microbiano atribuible a fallos en la técnica, problemas en las instalaciones y defectos en los medios de cultivo (crecimiento de microorganismos en controles negativos), por lo que el test se considera inválido. Cuando se confirma la invalidez de la prueba, la misma se repite analizando el mismo número de frascos que en el test inicial.

Si en un primer ensayo se detecta crecimiento microbiano en cualquiera de los recipientes de ensayo o placas y no hay evidencia que lo invalide, se hace una segunda prueba.

En tal caso, el número mínimo de envases de vacuna, recipientes de ensayo, placas y filtros de membrana es el doble del número utilizado en la primera prueba. Si en la segunda prueba hay crecimiento en cualquier recipiente de ensayo o placa, el lote de vacuna es declarado insatisfactorio. Sin embargo, cuando se demuestre mediante controles que dicha prueba fue inválida, debe procederse a una nueva repetición. (OIE, 2008)

Tabla III. Criterio utilizado en función de los resultados de la prueba según la OIE

Nº de prueba	Envases a ensayar	Resultado de la prueba	Decisión
1ª	n ¹ envases	Inválida	Repetición
		Crecimiento de m.o ²	2ª prueba
		Ausencia de m.o	Aprobación del lote
2ª	2n envases	Inválida	Repetición
		Crecimiento de m.o	Rechazo del lote
		Ausencia de m.o	Aprobación del lote

n¹= número

m.o²= microorganismos

4.2.1.2 Vacunas contra Leptospiras

Para el control de esterilidad de las vacunas contra la leptospirosis se aplica lo descrito en el ítem 4.2.1.1.

4.2.1.3 Vacunas contra Carbunco

Las vacunas contra el Carbunco hemático consisten en un cultivo vivo (atenuado) de esporas de *Bacillus anthracis*, por lo que la esterilidad no es aplicable, sin embargo, se debe comprobar si los lotes están contaminados con bacterias y hongos extraños viables.

- 1) Muestra: se procede como se describe en el punto 1 del ítem 4.2.1.1 (USA, 2012; Great Britain, 2013)

- 2) Medios de Cultivo; según el Código Federal de Regulaciones de EE. UU se debe utilizar el medio de tioglicolato líquido (FTM) para la detección de bacterias y el medio de soja-caseína hidrolizada (SCDM) para los hongos. (USA, 2012b)

El manual para la producción de vacunas de ántrax propone la utilización del FTM, el caldo nutritivo (CN), agar nutritivo (AN) y el agar semisólido (ASS) para determinar la ausencia de crecimiento bacteriano extraño. (Misra, 1991).

- 3) Test de esterilidad y promoción de crecimiento de los medios de cultivo; este test se lleva a cabo como se plantea en el ítem 4.2.1.1 punto 3. (OIE, 2008; Great Britain, 2013)

- 4) Test de pureza de la vacuna; en el análisis de esta vacuna se utiliza la técnica de siembra o inoculación directa en medios de cultivo.

Antes de iniciar la prueba, la vacuna que se presenta liofilizada se rehidrata como se recomienda en el etiquetado con el diluyente que la acompaña o con agua purificada estéril. Para la prueba de detección de contaminación bacteriana se pipetea 0,2 mL de vacuna de cada envase y se siembra en un recipiente de ensayo individual (matraz de Erlenmeyer) conteniendo al menos 40 mL de CN o FTM, incubándose posteriormente a una temperatura de 37°C durante 7 o 14 días. (Misra, 1991; USA, 2012b)

Otra metodología consiste en sembrar el mismo volumen en placas con agar nutriente e incubarlas a 37 °C durante 24 a 48 hs.

Un ensayo complementario que es importante para comprobar la ausencia de contaminación bacteriana es la de evaluación de la motilidad en agar semisólido. Lo que se hace es inocular con un alambre de platino recto, puncionando hacia abajo hasta llegar a la mitad de la profundidad del medio. Luego se incuba a 37 °C durante 18 hs. (Misra, 1991)

Cuando se buscan hongos contaminantes, se procede a inocular 0,2 mL de vacuna en un matraz de Erlenmeyer individual que contenga al menos 40 mL de SCDM. La incubación será de 20 a 25 °C durante 14 días.

También se puede utilizar el agar Sabouraud, el cual se incuba a la misma temperatura por 10 días.

- 5) Observación e interpretación de resultados de la prueba de pureza:

- a) *Medios líquidos*; el inóculo o el crecimiento de *B. anthracis* puede volver el medio turbio, de tal manera que no es posible determinar la ausencia de crecimiento microbiano atípico. En tal caso se deberá hacer subcultivos a partir de los recipientes de ensayo turbios, transfiriendo 0,1 o 1,0 mL a medios diferenciales líquidos y sólidos. También es importante realizar frotis y tinción de Gram. (Misra, 1991; USA, 2012b)

Los frotis teñidos (del CN o FTM) deben demostrar la presencia única de *B. anthracis* (bacilos Gram positivos).

- b) *Medio sólido y semisólido*; si se usan placas de AN, luego de finalizado el período de incubación, se examina la morfología de las colonias a simple vista y a través de una lupa.

Posteriormente se prepara un frotis, se realiza la tinción de Gram y se examina bajo microscopio. El crecimiento de bacterias no móviles en el ASS, como es el caso del *B. anthracis*, se limita a la línea de punción y tiene márgenes definidos, dejando el medio circundante claramente transparente.

Las bacterias móviles suelen dar crecimientos difusos, borrosos que se propagan a través del medio y lo dejan ligeramente opaco. (Misra, 1991).

Con respecto a la decisión final de aceptar o rechazar el lote, los protocolos recomiendan proceder de la misma manera que la planteada en la **Tabla III**.

4.2.1.4 Vacunas contra Diarrea Viral Bovina (DVB).

Las vacunas contra la DVB se basan en una cepa citopatogénica del virus y son de dos clases: *vacunas con virus vivos modificados o vacunas inactivadas*. (OIE, 2015a)

4.2.1.4.1 Vacunas con virus vivos modificados

En este caso la prueba de pureza consistirá, por un lado, en la determinación de bacterias y hongos contaminantes, y por otro, en la detección de contaminación por *Mycoplasmas*. (USA, 2012b, 2012e).

Las muestras se toman conforme a lo que se establece en el punto 1 del ítem 4.2.1.1

A) *Detección de Bacterias y Hongos contaminantes*

- 1) Medios de cultivo: según lo establecido por el CFR, se sembrará solo en el medio de soja-caseína hidrolizada (SCDM), incubándose a una temperatura de 30 a 35 °C y 20 a 25 °C, para la detección de bacterias y hongos respectivamente. (USA, 2012b)
- 2) Test de esterilidad y promoción de crecimiento del medio de cultivo: esta prueba se realiza como se explica en el ítem 4.2.1.1 punto 3.
- 3) Test de determinación de bacterias y hongos: cuando se utiliza la técnica de siembra directa, para la detección de contaminación bacteriana se extrae, con una pipeta o jeringa estéril, 0,2 mL de vacuna obtenida de cada envase y se descarga en un matraz individual conteniendo al menos 120 mL de SCDM. Finalmente se colocan los matraces sembrados en la estufa a una temperatura de 30 a 35 °C durante 14 días. (USA, 2012b)

En la determinación de contaminación fúngica, se procede de la misma manera salvo que se utiliza 40 mL de SCDM y la temperatura de incubación es de 20 a 25 °C.

Es importante aclarar que, en determinadas ocasiones, cuando sea necesario, se usara medio adicional para diluir aún más la vacuna.

4) Observación e interpretación de resultados de la prueba: al final del periodo de incubación se examinan macroscópicamente todos los recipientes de ensayo, evaluando si existe crecimiento microbiano.

Si no puede ser determinado en forma segura, la confirmación se realiza a través de subcultivos, examen microscópico o ambos (véase cómo se procede en caso de sospecha en el punto 5 del ítem 4.2.1.1). En cuanto a la interpretación de los resultados, los protocolos recomiendan el criterio utilizado por la OIE (**Tabla III**). (OIE, 2008)

B) Detección de contaminación por Mycoplasma

El método oficial para la detección de *Mycoplasma* consiste en la utilización de medios de cultivo, aunque el mismo puede ser sustituido por técnicas de amplificación de ácido nucleico. (Great Britain, 2013a)

B.1 Método de cultivo

1) Medios de cultivo: el medio de cultivo recomendado para la detección general de *Mycoplasmas* es el caldo infusión corazón y el agar infusión corazón. (USA, 2012c; Great Britain 2013a)

Caldo Infusión corazón (caldo HI)

a) Composición: la preparación y los ingredientes añadidos pueden presentar algunas variaciones, pero básicamente se compone de caldo infusión corazón, suero de caballo, extracto de levadura, peptona, rojo fenol, penicilina, cloruro de sodio, ácido desoxirribonucleico.

b) pH final: 7,8

c) Temperatura de incubación: 33-38 °C

Agar Infusión Corazón (agar HI)

a) Composición: los ingredientes utilizados son los mismos que para la elaboración del caldo, salvo que este último se sustituye por agar infusión corazón. Sin embargo, también se puede agregar el caldo HI, pero en menor proporción.

b) pH final: 7,8

c) Temperatura de incubación: 33-38 °C

2) Test de promoción de crecimiento de los medios de cultivo: para cada lote de medio preparado se tiene que llevar a cabo este ensayo.

Una placa con agar HI y un recipiente de ensayo con 100 mL de caldo HI se siembra con 100 UFC de un microorganismo control respectivamente.

Los medios se incuban y se hacen subcultivos desde el caldo a placas de agar con determinada frecuencia (el mismo procedimiento que se hace para el test de detección de *Mycoplasma* explicado más adelante). El agar cumple con la prueba si se observa crecimiento adecuado del microorganismo control.

El caldo cumple con el ensayo si existe crecimiento en por lo menos una de las placas subcultivadas. (Great Britain, 2103a)

Los microorganismos control son; el *Acholeplasma laidlawii* (ATCC 23206), *Mycoplasma hyorhinis* (ATCC 17981) y el *Mycoplasma orale* (ATCC 23714).

- 3) Test de detección de sustancias inhibitorias en la vacuna: esta prueba se lleva a cabo una sola vez y se repite cuando hay cambios en el método de producción de la vacuna. (Great Britain, 2013a)

La misma consiste en realizar la prueba de promoción de crecimiento en presencia y ausencia de la vacuna.

Por un lado, tendremos un caldo sembrado con el microorganismo control (control positivo) y por otro, un caldo inoculado con dicho microorganismo y con 1,0 o 10 mL de vacuna (caldo de prueba). Si las placas subcultivadas desde el control positivo muestran por lo menos 20 UFC mas (o bien un crecimiento más rápido) que aquellas sembradas desde el caldo de prueba, entonces podemos decir que la vacuna presenta sustancias inhibitorias.

En estos casos se buscará neutralizar esas sustancias o bien contrarrestar su efecto mediante, por ejemplo, pasajes en sustratos que no contengan inhibidores o por dilución (el volumen de vacuna a inocular se divide en varios matraces con 100 mL de caldo).

- 4) Test de detección de *Mycoplasma* en la vacuna: antes de comenzar el ensayo, la vacuna que viene liofilizada se rehidrata con el caldo HI hasta llegar al volumen que se recomienda en la etiqueta.

Se pipetea 1 o 10 mL de vacuna de un envase y se inocula en un matraz individual conteniendo 100 mL de caldo HI. Los caldos se incuban a la temperatura correspondiente por un período de 14 o 21 días conjuntamente con un control negativo (caldo sin sembrar) y positivo (caldo sembrado con un microorganismo control). (USA, 2012c; Great Britain, 2013a)

Del 2º a 4º día (3er día) de incubación de los caldos, se extrae de cada matraz 0,1 o 0,2 mL y se siembra en una placa de agar HI.

Las placas subcultivadas se colocan en la estufa en condiciones de microaerofilia (5-10 % de CO₂) y suficiente humedad, por un período de 14 días. También se incuba un control negativo.

Este procedimiento de subcultivo se repite entre el 6º y 8º día (7º), al 10º y 14º día de incubación de los caldos. Si los matraces se colocan en estufa por 21 días, en vez de hacer los subcultivos al 10º y 14º día, se realizan entre el 13º y 15º y entre el 19º y 21º día de incubación. (USA, 2012c; Great Britain, 2013a)

El número total de placas de agar HI subcultivadas por matraz es de 4.

Cuando sea posible, se recomienda rotar el uso de la especie de mycoplasma que se utilizan como control.

5) Observación e interpretación de resultados del test: al final del período de incubación se examinan todas las placas de agar HI (en microscopio estereoscópico o convencional) para determinar la presencia/ausencia de colonias típicas de mycoplasma. La mayoría de las especies de este género crecen en el agar formando colonias con aspecto granular tipo “huevo frito”. La prueba es válida cuando hay crecimiento en al menos una placa utilizada como control positivo y si no se detecta crecimiento en los controles negativos. En caso contrario la prueba se considera inválida y debe repetirse.

El producto cumple con la prueba si no se observa crecimiento de colonias típicas de este microorganismo. La vacuna no cumple con el test si existe crecimiento de colonias de *Mycoplasma* en el agar. (USA, 2012c; Great Britain, 2013a)

B.2 Método Alternativo (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) consiste en un procedimiento que permite la amplificación in vitro de segmentos de ADN del genoma del *Mycoplasma*. Si bien indica la presencia de una secuencia de ácido nucleico en particular, no necesariamente significa que existen mycoplasmas viables.

Este método debe someterse a pruebas de validación y estudios de comparación respecto al método de cultivo (método oficial). (Great Britain, 2013a)

Las pruebas de validación tomarán en cuenta la especificidad, el límite de detección y la solidez del método.

La especificidad es la habilidad de detectar la secuencia de ácido nucleico objetivo en presencia de otros componentes. Para ello se utilizan las siguientes especies de *Mycoplasma*, las cuales representan una buena selección en términos de frecuencia como contaminantes y relaciones filogenéticas:

- *M. laidlawii*
- *M. fermentans*
- *M. hyorhinis*
- *M. orale*
- *M. pneumoniae* o *M. gallisepticum*
- *M. arginini*

Al ser un método de alta sensibilidad, es probable que detecte otros géneros bacterianos, por lo tanto, debe documentarse la potencial reacción cruzada. Se probarán bacterias Gram positivas como el género *Clostridium*, *Lactobacillus* y *Streptococcus*.

En cuanto al límite de detección o punto de corte, es una característica muy importante, ya que es el número mínimo de copias de secuencias de ADN por volumen de muestra, que el PCR puede detectar en el 95 % de las veces que se realiza.

Para determinar este punto de corte, se procede a hacer una serie de diluciones (calibradas en UFC o copias de ácido nucleico) de las especies de *Mycoplasma* mencionadas anteriormente.

La solidez del proceso analítico es la medida de su capacidad para no verse afectado por pequeñas variaciones en los parámetros del método. Se probarán variaciones en la concentración de reactivos, cebadores y/o desoxirribonucleótidos.

Una vez que el PCR es validado, para que pueda sustituir al método de cultivo, debe compararse el desempeño de los mismos (especificidad, límite de detección y solidez).

Los dos se prueban en paralelo de manera de evaluar en forma simultánea el límite de detección de ambos utilizando la misma muestra de cepas calibradas (en UFC o copias de ácido nucleico). La relación entre UFC y copias de secuencia de ADN se debe establecer previo a realizar la comparación. Para dicho límite de detección, el criterio de aceptación es que el PCR debe ser capaz de detectar 10 UFC/mL para cada especie de *Mycoplasma* control. (Great Britain, 2013a)

A continuación, se describen las etapas de este método analítico:

- 1) Preparación de la mezcla maestra (master mix): los reactivos en esta preparación son agua, el buffer de reacción, un ADN polimerasa termoestable (Taq), cebadores oligonucleótidos, desoxirribonucleótidos (dNTPs) e iones de magnesio (MgCl₂). Dichos reactivos se mezclan en un solo tubo, con un volumen suficiente según el número de reacciones que se vayan a realizar. Luego esta mezcla maestra se distribuye en alícuotas en microtubos o en la placa de PCR (un microtubo será utilizado como control negativo en la prueba). (Great Britain 2013a; Tamay de Dios y col., 2013)
- 2) Preparación de la muestra: se utilizan diversos protocolos, destacándose los procedimientos de enriquecimiento con la posterior extracción fisicoquímica de las secuencias de ADN a amplificar. Luego de esto se coloca un volumen determinado de la muestra en el microtubo correspondiente conteniendo la mezcla maestra. (Great Britain, 2013a).

Ambas preparaciones deberían realizarse en sectores separados, utilizando una campana de flujo laminar con luz UV. Es imprescindible cumplir con las normas de desinfección y asepsia, utilizando siempre materiales estériles.

- 3) Amplificación: una vez preparados los microtubos de reacción, se introducen en el termociclador.

En un principio la temperatura se eleva a 95 °C durante 20-30 segundos, ocurriendo la fase de desnaturalización del ADN de doble cadena en 2 cadenas simples. Posteriormente el equipo disminuye la temperatura a 55-65 °C para permitir la hibridación de los cebadores a la secuencia complementaria y finalmente la extensión (síntesis de ADN) se da a una temperatura de 72 °C durante 1 minuto.

El aparato repite este ciclo entre 23-35 veces lo cual permitirá amplificar la secuencia de ADN buscada; cabe destacar que previo a comenzar los ciclos se hace una desnaturalización inicial por 5 minutos. (Tamay de Dios y col., 2013)

- 4) Análisis de Amplificación: para saber si la reacción transcurrió eficientemente, los amplicones (copias de la secuencia de ADN) son visualizados a través de una electroforesis en gel de agarosa. Cuando dichos amplicones se corren en el gel, estos deben ser cargados junto con un marcador molecular que contenga un número determinado de segmentos de ADN conocidos, lo que facilita la identificación de amplicones y si su tamaño corresponde con el esperado. Finalmente se toma una foto digital al gel de agarosa expuesto a la luz UV, y adicionalmente un procesador de imágenes se encarga de analizar las bandas observadas. (Tamay de Dios y col., 2013)
- 5) Evaluación e interpretación de los resultados: el resultado se considera válido si el control positivo resulta positivo y el control negativo es inequívocamente negativo. Debido a la alta sensibilidad del método de PCR y al riesgo inherente de contaminación, es necesario confirmar resultados positivos. Para ello lo correcto sería realizar el método tradicional.
- 6) Control del proceso: para minimizar el riesgo de contaminación y asegurar una adecuada sensibilidad, deberá analizarse un control positivo y uno negativo. El control positivo contiene un número definido de copias de la secuencia de ADN objetivo o UFC de una o más especies de *Mycoplasma* utilizadas durante la validación, debiéndose encontrar cerca del punto de corte. El control negativo es una muestra que no contiene secuencias de ácido nucleico o UFC de *Mycoplasmas*. Este control puede ser una vacuna que resulto negativa o un microtubo que contenga solamente la mezcla maestra. (Great Britain, 2013a).

Una alternativa al PCR de punto de corte es el PCR REAL TIME, el cual permite detectar y cuantificar los segmentos amplificados en cada ciclo de reacción.

Los reactivos químicos son los mismos que los que se utilizan en el PCR punto final, salvo que, generalmente, la enzima, los dNTPs (desoxirribonucleótidos), MgCl₂ (cloruro de magnesio), el buffer y el sistema marcador de fluorescencia para detectar la secuencia de ADN amplificada se venden juntos en una solución conocida como “master mix”, el agua es proporcionada por separado. El termociclador además de realizar los ciclos de temperatura, tiene la tecnología que permite excitar al marcador, capturar la señal de emisión y realizar el análisis cuantitativo. Dicho equipo se conecta a una computadora con un software que genera una serie de gráficas que permiten conocer si la reacción fue exitosa. (Tamay de Dios y col., 2013)

4.2.1.4.2 Vacunas con virus inactivados

- 1) Muestras: se aplica el mismo muestreo que lo descrito en el ítem 4.2.1.1 punto 1.
- 2) Medios de cultivo: para el análisis de este tipo de vacunas se utilizarán el FTM/FTMB (para la determinación de bacterias) y el medio SCDM (para determinar hongos). (OIE, 2008; USA, 2012; Great Britain, 2013)

- 3) Test de esterilidad y promoción de crecimiento de los medios de cultivo: esta prueba se realiza como se plantea en el ítem 4.2.1.1 punto 3.
- 4) Test de esterilidad de la vacuna: se lleva a cabo mediante la técnica de filtración en membrana o por siembra directa en medios de cultivo. Ambas metodologías se explican en el ítem 4.2.1.1 punto 4. (OIE 2008; USA, 2012; Great Britain, 2013)
- 5) Observación e Interpretación de los resultados de la prueba de esterilidad: ídem a lo descrito en el ítem 4.2.1.1 punto 5, salvo que cuando el inóculo genera turbidez de los medios líquidos, se hacen subcultivos en medio fresco entre el 3^{er} y 7^o día de incubación. (USA, 2012)

4.2.1.5 Vacunas contra Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR)

Actualmente se dispone de varias vacunas contra el virus de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina. Las mismas pueden ser atenuadas o inactivadas. (OIE, 2010)

4.2.1.5.1 Vacunas con virus vivos atenuados

El ensayo de pureza consiste en la determinación de bacterias, hongos, agentes extraños y en la detección de *Mycoplasmas*. Antes de comenzar la prueba es necesario rehidratar la vacuna liofilizada. (USA, 2012b, 2012c; Great Britain, 2013, 2013a, 2013b) El procedimiento de muestreo se lleva a cabo como se explica en el ítem 4.2.1.1 punto 1.

A. *Detección de Bacterias y Hongos contaminantes*

- 1) Medios de cultivo: los medios utilizados serán el medio de tioglicolato fluido (FTM) y el medio de soja-caseína hidrolizada (SCDM). El CFR establece la utilización única del SCDM, el cual se incubará de 30 a 35 °C (para detección de bacterias) y a 20-25 °C (para detección de hongos). (USA, 2012b; Great Britain, 2013)
- 2) Test de esterilidad y promoción de crecimiento del medio de cultivo: esta prueba se realiza como se explica en el ítem 4.2.1.1 punto 3.
- 3) Test de detección de bacterias y hongos: se va a utilizar la técnica de filtración en membrana o la inoculación directa en medios de cultivo. Ambas técnicas se describen en el ítem 4.2.1.1 punto 4, pero es necesario puntualizar que, en este caso, el CFR aplica la misma metodología que la utilizada en el control de las vacunas vivas atenuadas contra la DVB (ítem 4.2.1.4.1 apartado A.). (USA, 2012b; Great Britain, 2013)
- 4) Observación e interpretación de resultados: se procede de la misma manera que para las vacunas vivas contra la DVB.

B. Detección de Agentes Extraños

Se neutraliza el virus de la vacuna con un antisuero monoespecífico contra el Herpesvirus bovino. Posteriormente se inocula en cultivos celulares susceptibles (células de riñón bovino -MDBK-) a virus patógenos del bovino. A los 7 días se lleva a cabo un pasaje y se mantienen los cultivos hasta el día 14 de iniciada la prueba. La vacuna cumple con el test si no se desarrolla efecto citopático y si no hay presencia de agentes hemoadsorbentes. (Great Britain, 2013b)

C. Detección de contaminación por Mycoplasma

Este análisis se realiza como se describe en el ítem 4.2.1.4.1 apartado *B*

4.2.1.5.2 Vacunas con virus inactivados

- 1) Muestras: el muestreo se realiza como se explica en el ítem 4.2.1.1 punto 1.
- 2) Medios de Cultivo: en este caso, al igual que para las vacunas inactivadas contra la DVB, se utiliza el medio FTM/FTMB para detectar bacterias y el medio SCDM para detectar hongos.
- 3) Test de esterilidad y promoción de crecimiento de los medios de cultivo: esta prueba se realiza como se plantea en el ítem 4.2.1.1 punto 3.
- 4) Test de esterilidad de la vacuna: se realiza como se explica en el punto 4 del ítem 4.2.1.1.
- 5) Observación e Interpretación de los resultados de la prueba de esterilidad: se aplica el mismo procedimiento que en el ítem 4.2.1.1 punto 5. Los subcultivos del medio turbio al fresco se hacen entre el 3º y 7º día de incubación.

4.2.1.6 Vacunas contra la Rabia

Las vacunas contra la rabia se definen como una formulación estandarizada que contiene cantidades definidas de inmunógenos. Estos inmunógenos pueden estar inactivados (muertos) o vivos atenuados, o bien pueden derivar de la ingeniería genética. (OIE, 2013).

4.2.1.6.1 Vacunas con virus vivos atenuados

En general las vacunas se ensayan para determinar la posible presencia de bacterias, hongos y *Mycoplasmas* contaminantes, realizando el muestreo conforme a lo presentado en el punto 1 del ítem 4.2.1.1. Sin embargo, puede ser necesario agregar pruebas extras en función del origen del material utilizado para la producción de la vacuna.

A. Detección de Bacterias y Hongos contaminantes

- 1) Medios de cultivo: aplicando lo establecido por el CFR, se va a utilizar el medio SCDM para la detección de bacterias y hongos. (USA, 2012b)
- 2) Test de esterilidad y promoción de crecimiento del medio de cultivo: este medio se prueba como se describe en el ítem 4.2.1.1 punto 3.
- 3) Test de detección de bacterias y hongos: se utiliza el mismo método que para el control de las vacunas vivas atenuadas contra la DVB (véase el ítem 4.2.1.4.1 apartado A.) (USA, 2012b)
- 4) Observación e interpretación de los resultados: ídem al criterio utilizado cuando se ensayan las vacunas vivas contra la DVB.

B. Detección de contaminación por *Mycoplasma*

Los procedimientos analíticos utilizados para detectar este microorganismo, se explican en el apartado B. del ítem 4.2.1.4.1.

Es importante aclarar que se agrega al *Mycoplasma Synoviae* y *Gallisepticum* a la lista de microorganismos controles, cuando se analizan vacunas preparadas a partir de material de origen aviar. (Great Britain, 2013a)

Según el CFR, cuando se utiliza tejido de origen aviar para cultivar y atenuar el virus, el producto final también debe ser testeado para comprobar que está libre de *agentes patógenos extraños*, de *leucosis linfoide aviar* y de *virus hemoaglutinantes*. (USA, 2012e).

Si bien se recomienda que estas pruebas se realicen sobre muestras de la vacuna a granel, podría también llevarse a cabo tomando como muestras los envases finales.

C. Detección de patógenos por el test de inoculación en huevos embrionados.

En primer lugar, se lleva a cabo una seroneutralización del virus vacunal. Esto consiste en mezclar la vacuna con el antisuero específico (estéril e inactivado por calor) manteniendo una proporción de un volumen del producto en nueve volúmenes de antisuero. Es importante demostrar, por test de neutralización viral, que dicho antisuero no inhibe otros virus que se sabe que pueden ser contaminantes. (USA, 2012I)

Se van a utilizar al menos 20 huevos embrionados susceptibles (de 9 a 11 días de edad), los cuales son inoculados (cada uno de ellos) con 0,2 mL de la mezcla vacuna-suero. Dicho volumen se divide en dos dosis de 0,1 mL, inyectándose en la membrana alantocoriónica (CAM) y en el saco alantoideo respectivamente.

Posteriormente los huevos son examinados diariamente a trasluz por 7 días; las muertes que ocurran durante las primeras 24 hs post inoculación no se toman en cuenta, pero tienen que sobrevivir por lo menos 18 embriones para que el test sea válido.

Todos los embriones muertos luego del primer día, serán examinados junto a sus CAM's y cuando sea necesario se realizarán subcultivos a partir de estos con la finalidad de confirmar la causa de muerte.

El test concluye el séptimo día post inoculación y los embriones que sobreviven se examinan (incluyendo las CAM's).

Si la muerte y/o la anormalidad se atribuyen al inóculo, el lote de vacuna se declara insatisfactorio, pero hay que tener en cuenta que, si el virus de la vacuna no fue neutralizado, el test deberá repetirse. En el ensayo de repetición deberá usarse un antisuero con mayor título de anticuerpos. (USA, 2012I)

D. Detección de leucosis linfoide aviar

Esta prueba consiste en permitir la propagación (si lo hubiese) del virus de la leucosis linfoide aviar en cultivos celulares de embrión de pollo (células fibroblásticas) para luego detectarlos mediante el test de fijación del complemento (FC). (USA, 2012j)

El primer paso es inactivar, separar o neutralizar el virus rábico de la dosis vacunal; después de esto ya se puede inocular dicha dosis en el cultivo celular.

Es importante introducir en la prueba controles negativos (células fibroblásticas sin inocular) y controles positivos (un set de células inoculadas con virus del subgrupo A y otro con el virus del subgrupo B). Todos los cultivos celulares se incubarán a una temperatura de 35 – 37 °C por al menos 21 días y si es necesario durante este período se harán pasajes.

Previo al test de microtitulación del complemento, las muestras cosechadas (de cada pasaje) deberán congelarse y descongelarse tres veces para disrupir las células intactas y así liberar el grupo antigénico específico (más cantidad de virus al medio).

Luego de este paso, se procede a realizar el test de FC. Dicho test consiste en incubar el antisuero específico (4 unidades de antisuero) con las muestras (en sus diluciones respectivas) y el complemento (5 unidades hemolíticas 50 % o 2 unidades hemolíticas 100 %) para después añadir un sistema indicador, como eritrocitos de ovejas recubiertos de anticuerpos específicos (hemolisinas).

Si se lisan los eritrocitos indica que hay complemento libre que no se fijó en la primera reacción, es decir que no hay antígenos en las muestras cosechadas. (Universidad Complutense de Madrid, 2009; USA, 2012j)

En caso de que no haya hemólisis cuando se prueban muestras en una dilución 1/4 o mayor, se considera que las mismas son positivas a los virus del subgrupo A y/o B. Cuando no se lisan los eritrocitos en una dilución de 1/2 debe ser considerada sospechosa, debiéndose hacer subcultivos de esa muestra para determinar la presencia o ausencia del grupo de antigénico específico. (USA, 2012j)

En caso de que haya contaminación con virus de la leucosis linfoide, el lote se declara insatisfactorio.

E. Detección de virus hemoaglutinantes

Se extrae un volumen de la vacuna en control y se inocula en 5 huevos embrionados de la misma edad y de la misma procedencia. Es importante contar con controles negativos (5 huevos embrionados) y un control positivo (fluido alantoideo conteniendo el virus de la enfermedad de Newcastle).

Luego de 3 a 5 días post inoculación, se extrae una muestra de fluido alantoideo de cada huevo y se prueban individualmente por medio del test de hemoaglutinación en placa (se utiliza una suspensión de eritrocitos fresca de pollo al 0,5 %). (USA, 2012k)

Si existe actividad hemoaglutinante, el lote de vacuna es declarado insatisfactorio.

Cuando existe una muestra dudosa, se realiza un pasaje o dos pasajes ciego/s desde el huevo embrionado original. En caso de ser dos o más muestras que dan resultados inconclusos a la hemoaglutinación, lo que se hace es volver a extraer los fluidos de los huevos y se mezclan para luego hacer el/ los pasaje/s. Al hacer esto hay que tener en cuenta que, los fluidos de los embriones vivos y los fluidos de los embriones muertos se mezclan por separado. (USA, 2012k)

4.2.1.6.2 Vacunas con virus inactivados

Estas vacunas se preparan a partir de virus que crecen en tejido nervioso, líneas celulares o en cultivos celulares primarios de animales. Debe comprobarse que no están contaminadas con bacterias y hongos viables. (USA, 2012i; Great Britain, 2013m)

- 1) Muestras: ídem ítem 4.2.1.1 punto 1.
- 2) Medios de Cultivo: ídem ítem 4.2.1.4.2 punto 2.
- 3) Test de esterilidad y promoción de crecimiento de los medios de cultivo: ídem a ítem 4.2.1.1 punto 3.
- 4) Test de esterilidad de la vacuna: se utiliza el método de filtración en membrana o la inoculación directa en medios de cultivos (véase punto 4 de ítem 4.2.1.1). (USA, 2012; Great Britain, 2013)

- 5) Observación e interpretación de resultados: ídem a lo descrito en el ítem 2.2.1.1 punto 5, excepto que cuando el inóculo genera turbidez de los medios líquidos, se hacen subcultivos en medio fresco entre el 3º y 7º día de incubación.

4.2.1.7 Vacunas contra la Fiebre Aftosa

Las vacunas para la Fiebre Aftosa tradicionales pueden definirse como una formulación fijada que contiene cantidades definidas (límites) de una o más preparaciones de una cepa de virus de inóculo químicamente inactivadas y derivadas de cultivos celulares, mezcladas con adyuvantes y excipientes adecuados. (OIE, 2012a)

- 1) Muestras: se aplica el mismo criterio que lo descrito en el ítem 4.2.1.1 punto 1.
- 2) Medios de cultivo: ídem a ítem 4.2.1.4.2 punto 2
- 3) Test de esterilidad y promoción de crecimiento de los medios de cultivo: ídem a ítem 4.2.1.1 punto 3.
- 4) Test de esterilidad de la vacuna: se lleva a cabo como se explica en el ítem 4.2.1.1 punto 4, mediante inoculación directa en los medios o por filtración en membrana.
- 5) Observación e interpretación de resultados: ídem a punto 5 del ítem 4.2.1.1, exceptuándose que los subcultivos desde los medios turbios a medios frescos, se hacen entre el 3º y 7º día de incubación.

4.2.2 Describir y comparar los ensayos de inocuidad que se aplican en las vacunas a estudiar, revisando los procedimientos internacionales, regionales y nacionales.

4.2.2.1 Vacunas contra Clostridios

2.2.2.1.1 Vacunas contra *Clostridium botulinum* (Tipo C y/o D), *C. chauvoei*, *C. novyi* (Tipo B), *C. haemolyticum*, *C. perfringens* (Tipo A, B, C, D), *C. septicum*, *C. sordellii*.

- 1) Metodología: la BP13 propone la utilización de 2 animales de una de las especies a la que se destina la vacuna (ej.: 2 bovinos), los cuales son inyectados con el doble de la dosis máxima recomendada para dicha especie.

Se mantienen bajo observación durante 14 días (7 días para los productos contra *C. chauvoei* y/o *C. botulinum*). (Great Britain, 2013c, 2013d, 2013e, 2013f, 2013h)

Este método puede ser sustituido por pruebas en animales de laboratorio, utilizando cobayos o bien ratones (jóvenes-adultos).

En el caso del ensayo en cobayos, se deben vacunar 2 animales (deben pesar entre 350 y 450 gramos cada uno).

Cada cobayo de prueba se inyecta, vía subcutánea o intramuscular, con 2,0 mL de vacuna y posteriormente se observan por 7 días. (USA, 2012m)

Para llevar a cabo el test en ratones se debe disponer de un total de 8 ejemplares, pesando entre 17 y 22 gramos. A cada uno de ellos se le inyecta, vía intraperitoneal o subcutánea, 0,5 mL del producto y se examinan durante 7 días. El volumen puede ser distribuido en distintos puntos de inyección. La prueba en estos animales se lleva a cabo cuando la vacuna no presenta sustancias tóxicas para el ratón. (USA, 2012n)

El CFR recomienda que vacunas contra *C. novyi*, *C. haemolyticum*, *C. chauvoei* y *C. sordellii* se ensayen en cobayos, mientras que aquellas destinadas a proteger contra *C. botulinum*, *C. tetani* y/o *C. perfringens* se evalúen en ratones. (USA, 2012ñ, 2012o, 2012p, 2012q, 2012r, 2012s, 2012t)

A diferencia de lo planteado por el CFR, Brasil para el control de la vacuna contra el botulismo, exige la realización de la prueba en cobayos. La excepción es que se administran, vía subcutánea, 2 dosis de 2,5 mL en puntos distintos (el volumen total por cobayo es de 5,0 mL). (Brasil, 2012a)

- 2) Interpretación: si no se observa alteración, signos de enfermedad o la muerte de los animales debido a la vacuna, la misma se considera inocua. En caso contrario se rechaza el lote. (USA, 2012m, 2012n; Great Britain, 2013c, 2013d, 2013e, 2013f, 2013h)

Cuando existen reacciones desfavorables que no se atribuyen a la vacuna, la prueba se declara inconclusa y se repite. Cabe destacar que, si no se hace la repetición, el lote se declara insatisfactorio. (USA, 2012m, 2012n)

La normativa brasileña establece que, si existen reacciones indeseables en los cobayos, se procede a probar la vacuna en una de las especies de destino. En este caso, no deben ocurrir reacciones locales o generales debidas a la vacuna por un periodo de 21 días. (Brasil, 2012a)

4.2.2.1.2 Vacunas contra *Clostridium tetani*

Para estas vacunas por un lado se recomienda probar la seguridad en cobayos (BP13) y por otro en ratones (CFR). El test en cobayos que se describe en la monografía específica de la BP13 consiste en inmunizar 5 animales (pesando entre 350 y 450 g) con 5,0 mL de la vacuna por vía subcutánea. Este volumen se divide en 2 dosis de 2,5 mL y se inyectan en puntos distintos, luego se mantienen bajo observación durante 21 días. (Great Britain, 2013g)

El CFR quien indica ensayar estas vacunas en ratones, sigue la metodología descrita anteriormente en el ítem 4.2.2.1.1. (USA, 2012n)

El criterio para interpretar los resultados es el mismo que el utilizado para las otras vacunas clostridiales.

Aquellas vacunas preparadas a partir de toxoides o toxo-bacterinas (*C. botulinum*, *C. novyi*, *C. perfringens*, *C. tetani*, *C. septicum*, *C. sordellii*) se prueban para determinar si existió una correcta inactivación de la/s toxina/s.

Para ello se utilizan 5 ratones pesando entre 17 y 22 g, los cuales son inyectados (cada uno) por vía subcutánea con 0,5 mL de la vacuna. Los mismos son mantenidos bajo observación por 7 días. (Great Britain 2013c, 2013d, 2013e, 2013f, 2013g)

La vacuna cumple con el test si ningún animal muestra signos de enfermedad o muere a causa de la administración del producto.

4.2.2.2 Vacunas contra *Leptospiras*

4.2.2.2.1 Vacunas contra *L. interrogans* (serovares: *canicola*, *grippotyphosa*, *hardjo*, *icterohaemorrhagiae* y *pomona*).

1) Metodología: el CFR aplica para estas vacunas el test de inocuidad en cobayos (véase el ítem 4.2.2.1.1). (USA, 2012u, 2012v, 2012w, 2012x, 2012y)

La monografía de la BP13 establece que las vacunas destinadas a proteger al bovino, deben ser ensayadas en dichos animales.

El procedimiento consiste en administrarle a 2 vacunos, por la vía adecuada, el doble de la dosis recomendada; se mantienen en observación durante 14 días. Cuando el uso de la vacuna va dirigido a bovinos mayores de medio año, se utilizan animales de 6 meses o mayores. Para los productos de uso en bovinos menores de medio año, ambos animales deben tener la edad mínima recomendada para la vacunación. (Great Britain, 2013i)

2) Interpretación: si no se observan reacciones desfavorables, el lote de vacuna se declara satisfactorio en cuanto a la inocuidad. En caso contrario, se rechaza el lote.

Si dichas reacciones desfavorables no son atribuibles a la vacuna, la prueba queda inconclusa y puede repetirse. Cuando no se lleva a cabo esta repetición, el lote se declarará insatisfactorio. (USA, 2012m, Great Britain 2013i)

4.2.2.2.2 Vacunas contra *L. borgpetersenii* (serovar *hardjo*)

Estas vacunas se ensayan en bovinos, conforme a lo dispuesto por la BP13.

El criterio de aceptación o rechazo del lote de la vacuna es el mismo que el aplicado para las otras vacunas contra leptospiras.

Las vacunas contra la leptospirosis se preparan a partir de microorganismos enteros inactivados (bacterinas) y/o con extracto/s antigénico/s de una o más serovariedad. (Great Britain, 2013i).

Para saber si existió una inactivación correcta de las *Leptospiras*, se evalúa la existencia de bacterias vivas residuales.

El procedimiento consiste en inocular 1,0 mL de la vacuna en 100 mL de un medio de cultivo específico (ej.: medio líquido EMJH con suplemento), el cual se incuba a 30 °C por 14 días. Luego se hace un subcultivo (repique) en un volumen mayor de medio, colocando este durante 14 días más a la misma temperatura.

La vacuna cumple con la prueba si no se observa crecimiento del microorganismo en los medios. (Great Britain, 2013i)

Al mismo tiempo se realiza un test de control en el cual, se inocula la vacuna conjuntamente con 100 leptospiras en un volumen de medio mayor a 100 mL. Posteriormente se incuba a 30 °C durante 14 días. El test se considera inválido si dentro de los 14 días no se observa crecimiento de la leptospiras.

4.2.2.3 Vacunas contra Carbunco

- 1) Metodología: la prueba de inocuidad, según las distintas directrices, se lleva a cabo en ovejas, cabras o cobayos.

En el caso de la utilización de caprinos u ovinos es necesario disponer de 2 animales, cada uno pesando 20 kg y con una edad de uno o dos años. Se inoculan por vía subcutánea o intradérmica con el doble de la dosis indicada y son observados durante 10 o 21 días. (Misra, 1991; USA 2012z, 2012a.1)

Cuando la vacuna se prueba en cobayos, se debe contar con 4 ejemplares de prueba y otro grupo que oficie de control (pesando entre 350 y 450 g cada uno).

De los 4 cobayos de prueba, 2 se inoculan por vía intraperitoneal con 0,2 mL de la vacuna y los otros 2 por vía subcutánea con 1,0 mL. Todos los cobayos son examinados durante 10 días. (Misra, 1991).

En todos los procedimientos, durante el período de observación, se debería tomar la temperatura de los animales 2 veces al día (en la mañana y en la tarde).

- 2) Interpretación: cuando se ensaya la vacuna en ovinos o caprinos, la misma es declarada inocua si no aparecen reacciones sistémicas y si no se observa más que un edema transitorio en el punto de inyección. Este edema suele desaparecer en 3 a 5 días post- inyección. Algunos animales pueden mostrar apatía y una elevación de 1 o 2 °C en la temperatura corporal durante 3 o 5 días, volviendo luego a la normalidad. (Misra, 1991)

En caso de haber edema persistente o progresivo, necrosis en el sitio de inyección, reacción sistémica y/o muerte de los animales, la vacuna no es satisfactoria y se rechaza el lote.

La prueba de inocuidad en cobayos resulta satisfactoria cuando no se registra signos de enfermedad. Si uno de los animales muere o muestra signos de mala salud durante el periodo de observación, se puede repetir la prueba.

El lote de la vacuna cumple con el ensayo si ninguno de los cobayos muere o muestra signos de enfermedad en la segunda prueba. (Misra, 1991)

Es importante aclarar que cuando hay reacciones adversas que no se atribuyen a la vacuna, la prueba se declara inconclusa y se repite. Si no se lleva a cabo esta repetición el lote es insatisfactorio. (USA, 2012a.1)

4.2.2.4 Vacunas contra *Diarrea Viral Bovina (DVB)*

4.2.2.4.1 Vacunas con virus vivos atenuados

- 1) Metodología: estas vacunas a base de virus vivos atenuados, se deberán probar en ratones y en terneros, según las recomendaciones del CFR. (USA, 2012a.2)
El ensayo en ratones se describe en el punto 1 del ítem 4.2.2.1 (Vacunas contra *Clostridios*). Para llevar a cabo la prueba en terneros, se deberá disponer de dos animales. Cada uno de ellos será inyectado, por la vía que se recomienda en la etiqueta, con 10 dosis de la vacuna; se mantendrán bajo observación diaria por 21 días. (USA, 2012a.3)
- 2) Interpretación: si existen reacciones desfavorables durante el período de observación, la vacuna no cumple con los requisitos y el lote se declara insatisfactorio. Si las reacciones observadas no se atribuyen al producto, la prueba se declara inconclusa y se debe repetir; en caso de no hacerlo el lote resulta insatisfactorio. (USA, 2012a.3)

4.2.2.4.2 Vacunas inactivadas

- 1) Metodología: los protocolos internacionales recomiendan la utilización de terneros para comprobar la inocuidad de estas vacunas.
La monografía de la BP13 propone ensayar la vacuna en dos terneros, siendo cada uno inyectado con 2 dosis de la vacuna. Ambos animales se examinan durante un periodo de al menos 14 días. (Great Britain, 2013k)
Por su parte el CFR, utiliza los animales de la prueba de potencia para evaluar la inocuidad. Los cinco terneros vacunados (con una dosis) en dicho test de potencia se observarán diariamente durante al menos 14 días. (USA, 2012a.4)
- 2) Interpretación: el criterio es el mismo que el aplicado en las vacunas a base de virus vivos atenuados (véase el ítem anterior).

Para verificar que existió una correcta inactivación viral, debe confirmarse mediante ensayo, que la vacuna no contiene virus vivo residual. (Argentina Ministerio de Agricultura, Ganadería y pesca, 2012; Great Britain, 2013k)

En primer lugar, si es posible, debería separarse el adyuvante de la fase líquida por un método (de elución o ruptura de emulsión) que no interfiera con la posible detección de virus vivo.

Luego de obtener la fase acuosa, se inocula 1,0 mL de la muestra en frascos roux o roller conteniendo la línea celular MDBK en monocapa, la cual es sensible a dicho virus. Después de dejar adsorber por una hora a 37 °C, se coloca el medio de mantenimiento celular y se procede a incubar los frascos a 37°C por 24 horas.

Transcurrido un día, se observan las células en busca de efecto citopático; en caso de no haberlo, los frascos se congelan, descongelan y se toma una muestra para hacer un pase a otros frascos conteniendo células (segundo pasaje). Posterior a la adsorción y colocación del medio de mantenimiento, los frascos se incuban a 37 °C por 48 horas.

Si no se presenta efecto citopático el resultado es negativo y la vacuna se considera inocua. (Argentina, 2012)

En la BP13 también se recomienda la metodología en base a cultivo celular sensible, pero a diferencia de lo anteriormente descrito, se especifica la inoculación de 10 dosis de la vacuna, incubando los frascos inoculados por una semana. Si no se observa efecto citopático, se realiza un pasaje a otros frascos (segundo pasaje). Estos últimos se incuban también por una semana, y se observan diariamente en búsqueda de efecto citopático. (Great Britain, 2013k)

4.2.2.5 Vacunas contra Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR)

Las vacunas a base de virus vivos atenuados o virus inactivados, se ensayan conforme lo descrito en el ítem 4.2.2.4.1 y 4.2.2.4.2 respectivamente. (Argentina, 2012; USA, 2012f, 2012g; Great Britain, 2013b)

4.2.2.6 Vacunas contra la Rabia

4.2.2.6.1 Vacunas vivas atenuadas

1) Metodología: según el CFR se deben seleccionar 3 animales jóvenes de la especie más susceptible para la cual se recomienda la vacuna. A cada uno se le inyecta, intramuscularmente, 10 dosis de la vacuna y posteriormente se mantienen bajo observación durante 28 días.
(USA, 2012h)

2) Interpretación: en caso de que existan reacciones desfavorables en algún animal lote de vacuna se declara insatisfactorio. (USA, 2012h)

4.2.2.6.2 Vacunas inactivadas

1) Metodología: el CFR recomienda ensayar la vacuna inactivada de la misma manera que para ensayar la vacuna atenuada, salvo que en este caso se utiliza una dosis de la vacuna como inóculo. (USA, 2012i)

Por su parte la BP13 establece que se debe utilizar dos animales de una de las especies a la cual se destina el uso de la vacuna.

A cada uno se le administra, por la vía recomendada, 2 dosis del producto. Luego son examinados diariamente por un periodo de 14 días. (Great Britain, 2013m)

En el caso de Argentina, se recomienda inocular no menos de diez ratones de 11 a 14 g de peso con 0,03 mL de la vacuna por vía intracerebral.

Por otro lado, un grupo de 16 ratones lactantes mantenidos junto con sus madres, es inyectado vía intracerebral con 0,01 mL del producto. (OIEj)

- 2) Interpretación: si los animales no presentan reacciones desfavorables (locales o sistémicas) a causa de la vacuna, la misma cumple con los requisitos de inocuidad. (USA, 2012m, 2012n; Great Britain, 2013m)

El protocolo utilizado por Argentina determina que, a los ratones que mueran luego del cuarto día post inyección, se les debe extraer muestras cerebrales. Dichas muestras se someten a la prueba de inmunofluorescencia indirecta para confirmar el diagnóstico. (OIEj)

Cabe recordar que, si existen reacciones desfavorables que no se atribuyen a la vacuna, la prueba podrá repetirse. Si no se procede al retesteo, el producto se declara insatisfactorio. (USA, 2012m, 2012n)

4.2.2.7 Vacunas contra Fiebre Aftosa

- 1) Metodología: la monografía 0063 de la BP13 recomienda el uso de tres bovinos, los cuales deben tener al menos seis meses de edad, seronegativos a la aftosa y provenir de zonas libres de Fiebre Aftosa.

Cada animal es inoculado por vía intradérmica en la superficie dorsal de la lengua con 0,1 mL de vacuna en 20 puntos (cuatro líneas de 5 puntos cada una) y se mantienen en observación por al menos 4 días. Al término de este período, se le administra a cada bovino 3 dosis completas de la vacuna en control por la vía recomendada. Posteriormente los animales se examinan durante 6 días como mínimo. (Great Britain, 2013l; OIEi)

Si la prueba de potencia se realiza en la especie de destino, la observación de la inocuidad durante esta prueba también puede considerarse una alternativa al test de inocuidad del lote (OIE, 2012a).

- 2) Interpretación: la vacuna se considera segura o inocua si no existen síntomas de fiebre aftosa (lesiones en las patas o en la lengua); si se genera una reacción en el sitio de inyección se considera insignificante. (Great Britain 2013l)

Otro punto importante, es verificar mediante ensayo en cultivos celulares o en ratones, que la vacuna no contiene virus activo residual, probando 200 dosis de la misma (OIEi). Para la prueba en cultivos celulares se recomienda, en primera instancia, la elución (extracción) del antígeno de los compuestos adsorbentes o adyuvantes de la vacuna y la posterior concentración.

Una vez obtenido el antígeno concentrado, se inocularán 3 botellas roux o roller o 100 tubos con cultivos celulares sensibles en monocapa (células BHK - 21).

Se realizará un total de tres pasajes, siendo el primero de 24-48 hs. y los siguientes de 48 horas cada uno.

No deberá observarse efecto citopático en los cultivos, y el sobrenadante del tercer pasaje debe presentar resultado negativo a la tipificación viral por ELISA y/o FC. (OIEj)
Cuando se utilizan ratones lactantes, los mismos deben ser de la cepa blanco suizo y tener entre 5 - 7 días de edad.

Cada uno (de un total de 100) será inyectado por vía intraperitoneal con 0,05 mL de la vacuna integral (siempre que no contenga sustancias tóxicas para el ratón).

Los animales son mantenidos en observación durante 7 días, periodo en el cual no debe registrarse sintomatología clínica de la enfermedad en ningún ratón. (OIEj)

En caso de observarse patología o muerte, se prepara una suspensión de macerado de las carcasas de los animales, la cual se estudia para identificación y tipificación de virus de fiebre aftosa por pruebas de ELISA y/o FC. Ante resultado negativo en la tipificación, se inocula la suspensión en al menos ocho ratones siguiendo el procedimiento de la primera inoculación. No se debe observar patología o muerte en dichos animales y el macerado de ellos debe presentar resultado negativo a la tipificación por ELISA y/o FC. (OIEj)

Los animales que se utilizan en las pruebas de inocuidad (incluyendo las pruebas de toxicidad y virulencia residual) deben ser de procedencia conocida y encontrarse en buen estado sanitario y nutricional; los mismos deben ser seronegativos al antígeno o antígenos que componen la vacuna.

Previa realización del ensayo, los animales tienen que adaptarse al entorno donde se llevara cabo el mismo. Los ejemplares de laboratorio se mantienen durante un periodo mínimo de tres días para adaptarse al nuevo cobertizo, mientras que los de la especie de destino necesitan de una semana en el galpón. (Misra, 1991)

Durante este tiempo se toma la temperatura de cada animal dos veces al día (mañana y tarde); cualquiera que tenga una temperatura por encima de lo normal no debe utilizarse y debe ser reemplazado.

4.2.3 Describir y comparar las técnicas que se llevan a cabo para probar la potencia de cada vacuna tanto a nivel internacional, regional como nacional.

4.2.3.1 Vacunas contra Clostridios

4.2.3.1.1 Toxo-bacterinas o toxoides.

La potencia de estas vacunas se evalúa mediante el test de desafío, o bien titulando el nivel de antitoxina específica en el suero individual o en la mezcla de sueros de los animales, luego de haber sido vacunados con el producto en control.

Test de desafío

En este método, animales vacunados y no vacunados (controles), son desafiados con una cantidad de dosis (pre fijada) de la toxina de prueba y mantenidos en observación por determinado período de tiempo.

Finalizado el mismo, se determina la proporción de animales inmunizados que sobreviven, dato que se puede expresar en términos de porcentaje. Para que la prueba tenga validez, generalmente debe morir por los menos el 80% de los controles.

Los protocolos, los cuales se desarrollan más adelante, utilizan alguna de las dosis de desafío que se mencionan a continuación:

DLM: es la mínima concentración de la toxina (mayor dilución) que, cuando se inocula por la vía recomendada, causa la muerte de todos los animales de prueba en un periodo de tiempo determinado.

DL₅₀: esta dosis es la cantidad de toxina que, al ser inoculada por la vía adecuada, causa la muerte del 50% de los animales de prueba en el periodo de observación especificado.

DP₅₀: la cantidad de toxina que, administrada por la vía correcta produce la parálisis del 50% de los animales de prueba en un periodo de tiempo determinado.

Titulación de la antitoxina en suero

Para determinar el nivel de anticuerpos toxi-neutralizantes primero es necesario sangrar los animales inmunizados, obtener los sueros, y posteriormente analizarlos por la prueba de seroneutralización in vivo o por métodos in vitro.

Las dosis de toxina que se utilizan en el ensayo de neutralización in vivo, según las normativas vigentes, son las siguientes:

- L+: corresponde a la menor cantidad de toxina (mayor dilución) que, en las condiciones de la prueba, cuando es mezclada con 1,0 UI de antitoxina estándar e inoculada por la vía de administración específica, causa la muerte de al menos el 80% de los animales de prueba en un periodo de tiempo dado. (USA, 2012p)
- L+/5: es la menor concentración de toxina (mayor dilución) que, al ser mezclada con 0,2 UI de antitoxina estándar e inoculada por la vía de administración adecuada, causa la muerte de por lo menos el 80% de los animales de prueba en un periodo de tiempo determinado. (OIEd)
- L+/10: la menor cantidad de toxina (mayor dilución) que, en las condiciones de la prueba, cuando es mezclada con 0,1 UI de antitoxina estándar e inoculada por la vía de administración específica, causa la muerte de al menos el 80% de los animales de ensayo en un periodo de tiempo dado. (OIEd)
- L0: es la mayor cantidad de toxina (menor dilución) que, en las condiciones de la prueba, cuando es mezclada con 1,0 UI de antitoxina estándar e inoculada por la vía de administración específica, no causa síntomas de toxicidad o muerte en los animales de prueba en un periodo de tiempo dado. (USA, 2012p)
- L0/10: corresponde a la mayor cantidad de toxina que, al ser mezclada con 0,1 UI de antitoxina estándar e inoculada por la vía de administración especificada, no produce síntomas de toxicidad o muerte en los animales de prueba en un periodo de observación estipulado. (OIEd)

La UI (Unidad Internacional) se define como la cantidad de la antitoxina específica que reacciona con dosis L0 y L+ de la Toxina estándar homóloga. (USA, 2012p)

4.2.3.1.1.1 *Clostridium botulinum*.

A. *Clostridium botulinum* tipo C

El procedimiento descrito en el CFR de EE. UU utiliza ocho visones, de los cuales cinco serán vacunados por vía subcutánea con la dosis recomendada, y los tres restantes oficiarán como controles. Transcurridos 21 días luego de la vacunación todos los animales (incluyendo los controles) son desafiados, vía intraperitoneal, con 10000 (10^4) DLM ratón de la toxina botulínica y se mantienen en observación durante 7 días. En este período se registran todas las muertes y/o signos de botulismo. (USA, 2012ñ)

En cuanto a la interpretación de los resultados, para que la prueba sea válida todos los controles deben morir luego del desafío (3/3). Una vez comprobada esta condición, la vacuna cumple con los requisitos de potencia si existe al menos un 80% de protección (4/5).

El protocolo que utiliza la comunidad europea evalúa el grado de protección que confiere la vacuna en ratones. Se debe disponer de 30 ejemplares de la cepa blanco suizo (pesando 18-20 g cada uno), de los cuales 20 son vacunados y 10 actúan de controles. (Great Britain, 2013e)

Previa inmunización, se diluye un volumen de la vacuna en 7 volúmenes de una solución de cloruro de sodio (dilución 1/8); posteriormente se inyecta, vía subcutánea, 0,2 mL de dicha dilución en cada uno de los ratones.

Después de 21 días de la vacunación, todos los ratones se desafían con 25 DP₅₀ por vía intraperitoneal y se observan durante una semana, registrando los síntomas y muertes ocurridas.

Para que la prueba sea válida, todos los ratones controles deben morir luego de la inoculación con la toxina botulínica (10/10). La vacuna se declara con potencia adecuada si al menos el 80% de los ratones inmunizados sobreviven (16/20).

Argentina también dispone de un test de desafío. El mismo consiste en vacunar no menos de 10 ratones de 18 a 20 g de peso con una dosis contenida en 0,25 mL. La dosis ratón será 1/20 de la dosis bovina, o bien, en los casos en que no se indique el bovino, 1/10 de la dosis ovina.

Los ratones se vacunan por vía intraperitoneal los días 1, 4, 7 y 10 de la prueba; luego de 21 días (contados a partir del día 1 de la vacunación) los animales vacunados y 6 testigos (de 24 a 26 g de peso cada uno) se desafían con 1000 (10^3) DL₅₀ de toxina botulínica. La prueba se considera aprobada con un mínimo de 80% de protección. (OIEf)

En Brasil la normativa específica que deberá titularse el nivel de antitoxina por la prueba de seroneutralización. En una primera instancia se vacunan 12 cobayos de 350-450 g, por vía subcutánea con dos dosis de 5,0 mL, siendo la dosis de refuerzo aplicada 21 después de la primo vacunación. (Brasil, 2012a)

La segunda etapa consiste en la colecta de suero, la cual se realiza 42 días después de la primera vacunación. En este procedimiento los cobayos se dividen en dos grupos de 6 animales denominados A y B; cada animal es sangrado por punción cardíaca y se constituye un pool de suero del grupo A, del grupo B y del grupo AB.

Para proceder a la seroneutralización es necesario disponer de la toxina C estandarizada, un suero de referencia C calibrado y un diluyente adecuado (solución salina estéril al 0,85 %). Por un lado, se realiza una dilución de la toxina hasta obtener 1 L+/mL, y por otro, una dilución del suero que contenga 5,0 UI de antitoxina /mL.

Para determinar el título de antitoxina C de los sueros, se procede como se indica en la tabla:

Tabla IV. Método de preparación de mezclas aplicado por la Norma SDA N° 23 (*extraído y adaptado de Brasil, 2012a*)

Tipo de mezcla	I	II	III	IV
UI/mL	10	5,0	2,0	1,0
Suero (mL)	1,0 (1/10)	0,2	0,5	1,0
Diluyente (mL)	-	0,8	0,5	-
Toxina (1 L+/mL)	1,0	1,0	1,0	1,0

Para que la vacuna cumpla con el requisito de potencia, la normativa establece que uno de los dos pools (A o B) tiene que presentar un título de antitoxina C de al menos 5 UI/mL; es por esta razón que se realiza la mezcla II.

Se debe disponer de tres tubos de ensayo, de los cuales dos se utilizan para los sueros analizar y uno para el suero de referencia.

A todos los tubos se les agrega 0,8 mL del diluyente para luego adicionar 0,2 mL del pool A y B en el tubo N° 1 y 2 respectivamente; en el tubo 3 (control) se agrega el mismo volumen, pero del suero de referencia. Finalmente se descarga en cada tubo 1,0 mL de la toxina C (1 dosis L+).

Cada solución es posteriormente colocada a 37 °C en baño maría durante 1 h. Transcurrido este tiempo, se inoculan 2 ratones por solución, con un peso de entre 18-22 g, por vía endovenosa; los mismos son observados durante 72 hs, registrando los resultados cada 24 hs.

En cuanto a la interpretación de los resultados, debe corroborarse que la prueba sea válida; para ello los 2 animales inoculados con la solución del tubo control deben morir.

Si los animales inyectados con la solución del tubo 1 y 2 mueren, 0,2 mL de cada pool contiene 1,0 UI de antitoxina, lo que significa que el nivel de antitoxina C es de 5,0 UI/mL.

B. Clostridium botulinum tipo D

Para probar la potencia del toxoide D, se utilizan los mismos métodos que para determinar la potencia del toxoide C. En el caso del ensayo de neutralización in vivo aplicado por Brasil, se exige que al menos uno de los pools presente un título mínimo de 2,0 UI de antitoxina D/mL. Por lo tanto, como ese observa en la tabla anterior, se realiza la mezcla III. (Brasil, 2012a)

El suero de referencia D, al estandarizarse en 5,0 UI/mL, se prueba utilizando el volumen que indica la mezcla II.

4.2.3.1.1.2 *Clostridium perfringens*

En general los protocolos aceptados a nivel internacional y regional determinan la potencia de estos productos mediante la titulación serológica de la antitoxina beta (β) y épsilon (ϵ); sin embargo, Argentina propone como prueba alternativa el test de desafío.

Para la titulación se debe producir suero antitóxico utilizando ocho a diez conejos, de 3 a 6 meses de edad, pesando entre 1,8 y 3,6 kg. Dichos animales son vacunados, por vía subcutánea, con no más de la mitad de la dosis máxima recomendada para cualquiera de las especies indicadas en la etiqueta. Se administra una segunda dosis 20 a 23 días después de la primovacuna (USA, 2012r, 2012s; Great Britain, 2013f).

Transcurrido 14 a 17 días después de la revacunación, todos los conejos que sobreviven serán sangrados (por punción cardíaca) obteniendo cantidades iguales de suero de cada conejo, los cuales se combinan y se analizan como un único pool.

Es importante aclarar que, para constituir una mezcla de sueros aceptable, se necesitan como mínimo siete conejos; en caso de que haya un número menor, el ensayo se debe repetir. (USA, 2012r, 2012s).

El nivel de antitoxina del pool de sueros se determina por la prueba de seroneutralización en ratones, para la cual se debe disponer de la toxina β o ϵ de prueba, la antitoxina β o ϵ de referencia (AR) y un diluyente adecuado. Antes de realizar las mezclas correspondientes, la toxina y la antitoxina se diluyen hasta estandarizarlas en un valor específico de L+: L0/mL y UI/mL respectivamente. (USA, 2012r)

A. Bacterina - Toxide β (*C. perfringens* tipo B y C)

Tabla V. Preparación de mezclas para titular la actividad anti-beta en el suero

N° de tubo	Tubo de prueba	Tubos controles	
	1	2	3
Suero (mL)	1,0 (pool)	1,0 (AR ¹)	1,0 (AR)
10 L0/mL	1,0	1,0	-
10 L+/mL	-	-	1,0
Volumen final (mL)	2,0	2,0	2,0

AR¹= antitoxina de referencia

En el tubo de prueba se mezcla 1,0 mL del pool de suero (sin diluir) con 10 dosis L0 de la toxina estándar diluida (1,0 mL). En el tubo 2 se combina 1,0 ml de la AR (10 UI de antitoxina β) con 10 dosis L0 de la toxina estándar (1,0 mL), mientras que en el tubo 3 se mezcla el mismo volumen de la AR con 10 dosis L + de la toxina (1,0 mL).

Luego de preparar las mezclas, las mismas se mantienen a temperatura ambiente durante una hora para que ocurra la toxi-neutralización.

Por cada mezcla se utilizan cinco ratones de la cepa blanco suizo con un peso de 16 a 20 g; estos son inyectados con una dosis de 0,2 mL por vía intravenosa y observados por un periodo de 24 hs (se registran todas las muertes). (USA, 2012r)

Respecto al resultado final, la prueba se considera válida si todos los ratones inoculados con la mezcla del tubo N° 2 sobreviven y si al menos el 80% (4/5) de los ratones inyectados con la mezcla del tubo N° 3 mueren. Si una de estas condiciones no se cumple, el ensayo no es concluyente y debe repetirse.

Cuando todos los ratones sobreviven al ser inyectados con la mezcla del tubo de prueba (N° 1), es porque 1,0 mL del pool de suero fue capaz de neutralizar 10 dosis L0 de la toxina; esto quiere decir que 1,0 mL presenta un título de por lo menos 10 UI de antitoxina β . (USA, 2012r)

En caso de que algún animal muera, se considera que el suero tiene un título menor a 10 UI de antitoxina/ mL y la serie se declara insatisfactoria.

El test de desafío que aplica Argentina, se lleva a cabo como se describe en el ítem 4.2.3.1.1.1 sección A, pero en este caso utiliza como dosis de desafío 10 DL₅₀ de la toxina β . (OIEg)

B. Bacterina - Toxoide ϵ (*C. perfringens* tipo B y D)

Para determinar la potencia de esta bacterina-toxoide, el CFR establece básicamente el mismo procedimiento que el utilizado para evaluar la potencia de la bacterina- toxoide β , pero existen algunas modificaciones (USA, 2012s)

Tabla VI. Preparación de mezclas para titular la actividad anti- ϵ en el suero según el CFR

N° de tubo	Tubo de prueba		Tubos controles	
	1	2	3	3
Suero (mL)	1,0 (diluido 1/2)	1,0 (AR ¹)	1,0 (AR)	1,0 (AR)
1 L0/mL	1,0	1,0	-	-
1 L+/mL	-	-	1,0	1,0
Volumen final (mL)	2,0	2,0	2,0	2,0

AR¹ = antitoxina de referencia

Como se observa en el cuadro, antes de agregar el pool de sueros al tubo de prueba, el mismo debe diluirse. Para esto se descarga 1,0 mL de dicho pool en un tubo de ensayo conteniendo 1,0 mL del diluyente (dilución 1/2), luego se pipetea 1,0 mL de esta solución y se adiciona al tubo N° 1.

Después de que se comprueba la validez de la prueba, (véase el criterio utilizado para el *C. perfringens* tipo B y C) si los cinco ratones inoculados con la mezcla del tubo N° 1 no muestran signos de enfermedad, significa que 1,0 mL de la dilución del suero contiene al menos 1,0 UI de antitoxina.

Para saber cuánto contiene 1,0 mL del pool sin diluir, se multiplica este resultado por el factor de dilución que es 2, por lo tanto, el título es de al menos 2,0 UI de antitoxina ϵ /mL de suero. Si algún animal muere, se considera que el título es menor a 2,0 UI de antitoxina/mL y por tanto el lote / serie de la vacuna es insatisfactorio.

El método que establece la Norma Oficial Mexicana (NOM-063-ZOO-1999), al igual que el procedimiento ya descrito, consiste en producir suero antitóxico en conejos para luego titularlo por la prueba de neutralización en ratones. (México, 1999)

En dicho ensayo de neutralización, se realizan diluciones seriadas (en base 2) del pool de sueros, las cuales se mezclan posteriormente con una dosis fija de toxina estandarizada.

Tabla VII. Mezclas y diluciones utilizadas en el test de seroneutralización. (Extraído y adaptado de México, 1999).

N° de tubo	Tubos de prueba					Tubos testigos		
	1	2	3	4	5	6	7	8
Diluyente (mL)	-	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	-	-
Suero (mL)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	-	1,5	-
Toxina (mL)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	-	-	1,5
Volumen final (mL)	3,0	4,5	4,5	4,5	4,5	1,5	1,5	1,5
Dilución final suero	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32			

En los tubos N° 2, 3, 4, 5 y 6 se descarga un volumen de 1,5 mL de diluyente (solución salina fosfatada estéril -SAF-). El tubo 6 se usa como testigo de la SAF.

Luego se adiciona a los tubos 1 y 7 1,5 mL del pool de sueros. Se agita el contenido del tubo 1 para homogeneizar y se transfiere 1,5 mL de ese tubo al tubo 2, repitiendo la operación en los tubos 2, 3, 4. El tubo 7 se utiliza como testigo del suero.

Finalmente se agrega al tubo 1, 2, 3, 4, 5 y 8 1,5 mL de la toxina previamente titulada y estandarizada en 5,0 DLRA 50 % (Dosis Letal Ratón Adulto 50 %). El tubo 8 se usa como testigo de la toxina.

Cuando ya están listas las mezclas, los 8 tubos se incuban a 37 °C durante 1 hora y después se colocan a 4 °C.

Por cada dilución se inyectan 5 ratones con 0,2 mL por vía endovenosa en la vena caudal, y se mantienen en observación durante 24 hs. Al final de este periodo se anota la relación de animales muertos en función del total inoculados en cada dilución y se calcula la dosis efectiva ratón adulto 50% (DERA 50%).

La toxo-bacterina debe presentar un título mínimo de antitoxina ϵ de por lo menos 5,0 DERA 50 % para que sea aprobada satisfactoriamente. El ensayo es válido si el testigo de la toxina (tubo 8) produce entre 80% y 100% de mortalidad y si el testigo de la SAF (tubo 6) y del suero (tubo 7) presentan 100% de viabilidad.

El test de desafío aplicado para esta toxo-bacterina equivale al descrito para el toxoide β , usando en este caso la toxina ϵ . (OIEg)

4.2.3.1.1.3 *Clostridium novyi* tipo B

El CFR de EE. UU dispone probar la potencia de esta toxo-bacterina mediante el test de neutralización en ratones. Para producir el suero neutralizante de la toxina alfa (α) se debe proceder de la misma manera que la descrita en el ítem 4.2.3.1.1.2; sin embargo, es necesario puntualizar que, para vacunar a los conejos se utiliza la mitad de la dosis bovina. Cuando el producto va destinado únicamente a los ovinos, se utiliza la mitad de la dosis recomendada para dicha especie. (USA, 2012p)

La toxina α de prueba y la antitoxina α de referencia (AR) se estandarizan en 0,1 L+: L0/mL y 0,1 UI/mL respectivamente.

Tabla VIII. Preparación de mezclas para titular la actividad anti- α en el suero según lo establecido en el CFR

Nº de tubo	Tubo de prueba	Tubos controles	
	1	2	3
Diluyente (mL)	0,8	-	-
Suero (mL)	0,2 (pool)	1,0 (AR ¹)	1,0 (AR)
0,1 L0/mL	1,0	1,0	-
0,1 L+/mL	-	-	1,0
Volumen final (mL)	2,0	2,0	2,0

AR¹ = antitoxina de referencia

En el tubo 1 se agrega 0,8 mL de diluyente para luego descargar un volumen de 0,2 mL del pool de sueros. El último paso consiste en adicionar 1,0 mL de la preparación de la toxina α estándar (0,1 dosis L0).

En cada tubo control se adiciona 1,0 mL de AR (0,1 UI) y posteriormente se agrega 0,1 dosis L0 (1,0 mL) en el tubo 2 y 0,1 dosis L + (1,0 mL) en el tubo 3 de la toxina α estándar. Después de permitir la neutralización en las mezclas, las mismas se inoculan en ratones tal como se explica en el ítem 2.2.3.1.1.2 apartado A. En este ensayo los ratones se observan por un periodo de 72 hs. (USA, 2012p)

Para que la prueba se considere válida, hay que observar los resultados de los tubos control (véase ítem 4.2.3.1.1.2 apartado A).

La vacuna se considera potente si induce un título igual o mayor a 0,5 UI de antitoxina α /mL de suero. Si los ratones inyectados con la mezcla del tubo 1 sobreviven sin haber mostrado síntomas, significa que 0,2 mL del pool de sueros contiene como mínimo 0,1 UI de antitoxina α . Para saber la cantidad presente en 1,0 mL del suero, se multiplica dicho valor por cinco, lo que arroja un resultado de al menos 0,5 UI de antitoxina. En caso de que muera alguno de los animales, se considera un título menor a 0,5 UI de antitoxina/ mL, por lo que el lote se declara insatisfactorio. (USA, 2012p)

La prueba de potencia que lleva a cabo Chile equivale a la establecida en el CFR de EE. UU, pero la Resolución N° 2620 del 20.10.78 establece otro protocolo en el cual la potencia se determina por el test de desafío. (OIEd)

En dicho método se vacunan ocho a diez cobayos (pesando 300-500 g) con 1/5 de la dosis bovina; transcurridos 21 a 23 días luego de la primo vacunación se les administra una dosis de refuerzo.

En la etapa de desafío (14 o 15 días después de la revacunación) los animales vacunados y cinco controles son inoculados, vía intramuscular, con 100 DL₅₀ de la toxina α; se mantienen bajo observación por 72 hs.

Para que la toxo-bacterina cumpla con el requisito de potencia, la misma debe proteger por lo menos el 80% de los cobayos vacunados. El test se considera válido si al menos el 80% de los animales controles mueren.

Argentina realiza la prueba alternativa como se explica en el ítem 4.2.3.1.1.1 apartado A, con la excepción de que los ratones se desafían con 100 DL₅₀ de la toxina α. (OIEd)

4.2.3.1.1.4 *Clostridium sordellii*

La normativa de EE. UU, evalúa la potencia de esta vacuna basándose en la metodología utilizada para ensayar la potencia de las toxo-bacterinas de *C. perfringens* y *Cl. novyi*, o sea, producir suero antitóxico en conejos para después titularlo en ratones.

La producción de antisuero se realiza del mismo modo que para producir suero neutralizante de la toxina α (véase ítem anterior). (USA, 2012t)

Las mezclas en los tubos de ensayo se indican a continuación:

Tabla IX. Preparación de mezclas suero-toxina en el ensayo de neutralización in vivo, recomendación del CFR.

Nº de tubo	Tubo de prueba		Tubos controles	
	1	2	2	3
Suero (mL)	1,0 (pool)	1,0 (AR ¹)	1,0 (AR)	1,0 (AR)
1,0 L0/mL	1,0	1,0	-	-
1,0 L+/mL	-	-	1,0	1,0
Volumen final (mL)	2,0	2,0	2,0	2,0

AR¹ = antitoxina de referencia

La técnica para preparar la mezcla suero- toxina es muy similar a la que se describe en ítem 4.2.3.1.1.2 apartado A, la diferencia radica en cómo se estandariza tanto la AR como la toxina de referencia. Dicha AR se estandariza en 1,0 UI de antitoxina/mL y la toxina estándar en 1 dosis L0/mL y 1 dosis L+/mL.

Las etapas posteriores de neutralización de las mezclas, inoculación en ratones y comprobación de la validez se llevan a cabo como se explica en el ítem 4.2.3.1.1.2 apartado A, salvo que el período de observación de dichos ratones en vez de ser de 24 hs es de 72 hs. (USA, 2012t)

Si la solución del tubo Nº 1 no produce síntomas de toxicidad o muerte en los animales, se puede decir que el pool de sueros contiene al menos 1,0 UI de antitoxina/mL, cumpliendo con el requisito de potencia. En caso de que el título neutralizante sea menor, la vacuna es reprobada. (USA, 2012t)

Tabla X: Comparativo de la prueba de neutralización en ratones para los distintos antígenos (Ag) clostridiales. Se muestran las distintas mezclas a realizar en el tubo, la posterior lectura y el valor final de potencia del suero.

Mezcla – lectura / Ag	<i>C.botulinum</i> C	<i>C. botulinum</i> D	<i>C.perfringens</i> β	<i>C.perfringens</i> ε	<i>C. novyi</i> α	<i>C. sordellii</i>
Diluyente (mL)	0,8	0,5	-	-	0,8	-
Pool sueros (mL)	0,2	0,5	1,0	1,0 (diluido 1/2)	0,2	1,0
Dosis toxina/ mL	1 L+	1 L+	10 L0	1 L0	0,1 L0	1 L0
Muerte	✓	✓				
Sobrevivencia			✓	✓	✓	✓
UI/mL p. sueros	5,0	2,0	≥ 10	≥ 2,0	≥ 0,5	≥ 1,0

4.2.3.1.1.5 *Clostridium septicum*

La potencia de la toxo-bacterina de *C. septicum* se evalúa, como en los casos anteriores, titulando la actividad anti-tóxica de los sueros de los conejos inmunizados en ratones. En este caso los conejos se deben vacunar con la mínima dosis indicada en la etiqueta del producto, y el valor mínimo de potencia exigido es de 2,5 UI/mL de suero (Great Britain, 2013d)

4.2.3.1.1.6 *Clostridium tetani*

La potencia del toxoide tetánico se determina mediante la cuantificación in vitro de la antitoxina.

El protocolo establecido por el CFR indica la inmunización de un grupo de diez cobayos (cinco machos y cinco hembras) pesando 450 a 550 g cada uno; los mismos serán inyectados, vía subcutánea, con 0,4 de la máxima dosis recomendada en la etiqueta. Transcurridas seis semanas post vacunación, los cobayos que sobreviven son sangrados, obteniendo de cada uno al menos 0,5 mL de suero para constituir un único pool. Para que el test sea válido, el pool deberá contener el suero de por lo menos 8 animales. (USA, 2012a.5)

La titulación de antitoxina del pool de sueros se determina en Unidades de Antitoxinas (UA) por mL utilizando un ELISA aceptado por la autoridad oficial (APHIS).

Si el título de antitoxina del pool de sueros es igual o mayor a 2,0 UA/mL, el lote de vacunas se considera satisfactorio, en caso de un título menor, el lote se puede retestear. En el test de repetición, se analizan los sueros en forma individual por el método de ELISA y si al menos el 80% de estos presentan un título de antitoxina de al menos 2,0 UA/mL el lote se declara satisfactorio. Si esto no se cumple se hace una nueva repetición, pero esta vez vacunando nuevos cobayos y siguiendo las pautas de la primera prueba. En dicho ensayo, el título del pool de sueros se promedia con la

cantidad de antitoxina del pool de sueros de los cobayos utilizados en el test inicial. Si el promedio es igual o mayor a 2,0 UA/mL, el lote cumple con los requisitos de potencia, de lo contrario se considera insatisfactorio y no podrá someterse a otra prueba. (USA, 2012a.5)

El procedimiento que se describe en la monografía específica de la BP13 (*Ph Eur monograph 0697*) indica que para las vacunas monovalentes la producción de suero antitóxico se lleva a cabo en cobayos mientras que para las vacunas combinadas se utilizan conejos. (Great Britain, 2013g)

Para producir antisuero, se vacunan al menos cinco animales, vía subcutánea, con una dosis de la vacuna y se aplica un refuerzo o “booster” 28 días después. Transcurrido 14 días de la segunda dosis, se sangra cada animal y se preparan muestras de suero.

La monografía establece que cada suero se debe titular por un método inmunoquímico adecuado, recomendando el ToBI test y comparando los resultados obtenidos con el resultado de un suero homólogo de referencia (antisuero de *C. Tetani* BRP de cobayo o de conejo).

El lote de vacunas monovalentes cumple con la prueba de potencia si el promedio del título de anticuerpos no es menor a 7,5 UI/mL. Las vacunas combinadas aprueban el ensayo si el promedio del título de anticuerpos es de por lo menos 2,5 UI/mL. (Great Britain, 2013g)

Tabla XI: Tipos de pruebas y valores de potencia exigidos para las toxo-bacterinas o toxoides de *Clostridium spp* según el CFR, la BP13 y la Norma MERCOSUR N° 77/96 (MERCOSUL, 1996; USA, 2012ñ, 2012p, 2012r, 2012s, 2012t, 2012a.5; Great Britain, 2013c, 2013d, 2013e, 2013f, 2013g).

	CFR		BP13		Res. N° 77/96	
Vacunas / ensayo de potencia	TS ¹ (UI ² /mL)	TD ³ (%S ⁴)	TS (UI/mL)	TD (%S)	TS (UI/mL)	TD (%S)
<i>C. botulinum</i> tipo C	-	≥ 80	-	≥ 80	-	-
<i>C. botulinum</i> tipo D	-	≥ 80	-	≥ 80	-	-
<i>C. perfringens</i> tipo B	β ⁵ ≥ 10 ε ⁶ ≥ 2,0	-	β ≥ 10 ε ≥ 5,0	-	β ≥ 10 ε ≥ 5,0	-
<i>C. perfringens</i> tipo C	β ≥ 10	-	β ≥ 10	-	β ≥ 10	-
<i>C. perfringens</i> tipo D	ε ≥ 2,0	-	ε ≥ 5,0	-	ε ≥ 5,0	-
<i>C. novyi</i> tipo B	α ⁷ ≥ 0,5	-	α ≥ 3,5	-	α ≥ 3,5	-
<i>C. septicum</i>	-	-	≥ 2,5	-	≥ 2,5	-
<i>C. sordelli</i>	≥ 1,0	-	-	-	≥ 1,0	-
<i>C. tetani</i>	≥ 2,0 (UA ⁸ /mL)	-	Vm ⁹ : ≥ 7,5 Vp ¹⁰ : ≥ 2,5	-	Vm: ≥ 7,5 Vp: ≥ 2,5	-

TS¹= Titulación serológica de la antitoxina. UI²= Unidades Internacionales. TD³= Test de desafío. %S⁴= porcentaje de supervivencia. β⁵= antitoxina beta. ε⁶= antitoxina épsilon. α⁷= antitoxina alfa. UA⁸= Unidades de Antitoxina. Vm⁹= vacunas monovalentes. Vp¹⁰= vacunas polivalentes.

4.2.3.1.2 Bacterinas

4.2.3.1.2.1 *Clostridium chauvoei*

Las directrices a nivel internacional, regional y nacional aplican el test de desafío en cobayos.

Uno de los procedimientos descrito establece la utilización de trece cobayos de 300 a 500 g de peso cada uno. De este grupo de animales, ocho se vacunan con 1/5 de la dosis bovina, por vía subcutánea, o intramuscular en caso de vacunas con adyuvante oleoso. Transcurridos 21 a 23 días los cobayos son revacunados con la misma dosis.

En la etapa de desafío, la cual se lleva a cabo 14 a 15 días después de la revacunación, los animales vacunados y un grupo de no vacunados (controles) se desafían, vía intramuscular, con 100 (10^2) DL₅₀ cobayo de una suspensión de esporas de *C. chauvoei* cepa MT.

El volumen de inóculo es de 0,5 mL, el cual está constituido por 0,25 mL de la suspensión de esporas y 0,25 mL de una solución de cloruro de calcio al 10%. (MERCOSUL, 1996; USA, 2012o)

Los ocho animales inoculados y los cinco controles se observan diariamente durante tres días, registrándose todas las muertes.

Para que la prueba se considere válida, debe morir por lo menos el 80% de los controles (4/5). Si se cumple este requisito, el resultado de la prueba de potencia es evaluado de la siguiente manera:

La vacuna es aprobada si al menos siete de los ocho cobayos vacunados resultan protegidos (7/8). Si sobreviven seis animales (6/8), entonces la vacuna será retesteada utilizando la misma metodología que en el ensayo inicial. Cuando protege a cinco o menos cobayos (5/8), la vacuna se declara insatisfactoria.

En la segunda prueba (retesteo), la vacuna debe ser capaz de proteger al menos seis de los ocho cobayos (6/8) inmunizados para que sea aprobada en cuanto a potencia. En caso de que sobrevivan menos de seis animales (5/8), el producto es reprobado. (MERCOSUL, 1996; USA, 2012o)

Existe otro protocolo aplicado por la comunidad europea, que, si bien es muy similar al anterior, presenta algunas variaciones en lo que refiere; a la cantidad de animales de prueba requeridos, la dosis vacunal y a la interpretación del retesteo.

En este procedimiento, se utiliza un total de quince cobayos, de los cuales diez se vacunan y cinco ofician de testigos. Cada uno de los diez cobayos se inyecta con la dosis mínima indicada en la etiqueta. (Great Britain, 2013h)

El criterio para declarar la vacuna satisfactoria (al menos nueve animales protegidos), someterla a un retesteo (ocho animales protegidos) o reprobarla (siete o menos cobayos protegidos) es el mismo que el utilizado en el protocolo ya descrito, con la diferencia de que en este caso son diez los animales inmunizados.

En la segunda prueba o retesteo, se vacunan otros diez cobayos y se observan diariamente durante cinco días. Para que la vacuna cumpla con el requisito de potencia, deben sobrevivir por lo menos nueve de los diez animales vacunados (9/10), de lo contrario el producto es reprobado.

Tanto en la primera prueba como en el retesteo, el ensayo es válido cuando muere el 100 % de los animales testigos (5/5). (Great Britain, 2013h)

4.2.3.1.2.2 *Clostridium haemolyticum*

La prueba de potencia que establece el CFR es equivalente a la descrita para el *C. Chauvoei* (ítem 4.2.3.1.2.1). Es necesario mencionar que en este caso se utiliza una suspensión de esporas de *C. hemolyticum* como material de desafío. (USA, 2012q)

4.2.3.2 Vacunas contra *Leptospiras*

4.2.3.2.1 *Leptospira interrogans serovar canicola (LSC)*, *grippothyphosa (LSG)*, *hardjo (LSH)*, *icterohaemorrhagiae (LSI)* y *pomona (LSP)*.

1) Test de desafío

Este test generalmente se realiza en hámster y la potencia se mide normalmente por la capacidad de la vacuna de impedir la muerte del animal cuando se desafía con determinada dosis letal de un cultivo de *Leptospira virulenta*.

Con algunos serovares que no son letales para el hámster (y para el cobayo), como el serovar *Hardjo*, la potencia se mide frente a la resistencia a la infección renal cuando los animales se infectan con la dosis infecciosa pre establecida (OIE, 2014).

Las normas internacionales indican vacunar entre diez y doce animales (con un peso individual de 50 a 90 g) por vía subcutánea o intramuscular, según lo indique la etiqueta. La dosis hámster corresponde a la dosis recomendada en una dilución 1/80 (para *LSC* y *LSI*) o 1/800 (para *LSG*, *LSH* y *LSP*), contenida en un volumen de 0,25 mL. Dos o tres semanas después de la vacunación, los animales vacunados y un mismo número de animales sin inmunizar (controles) son desafiados, vía intraperitoneal, con 10-10000 ($10-10^4$) DL_{50} o DI_{50} (en el caso de *LSH*) de una suspensión de *Leptospira virulenta*. (USA, 2012u, 2012v, 2012w, 2012x, 2012y)

1.A Período de observación e interpretación de la prueba para *LSC*, *LSG*, *LSI*, *LSP*.

Todos los hámsteres se observan por un período de dos semanas, registrando aquellos que desarrollan sintomatología y mueren de leptospirosis.

La vacuna es aprobada si por lo menos el 80% de los animales sobrevive al desafío en una prueba válida, en la cual muere como mínimo el 80% de los controles. Si la vacuna protege a seis o siete animales (60/70%), la misma se puede someter a un recontrol, utilizando la misma metodología que para el primer ensayo. En caso de que los supervivientes sean cinco o menos ($\leq 50\%$), la vacuna se declara insatisfactoria. (USA, 2012u, 2012w, 2012x, 2012y)

En el retesteo, el producto se considera potente si por lo menos 15 de 20 animales vacunados (número acumulado entre las dos pruebas) son protegidos frente al desafío. Si sobreviven 14 o menos hámsters, la vacuna es reprobada y no puede someterse a otro ensayo.

1.B Período de observación e interpretación de la prueba para LSH.

El período de observación post desafío es de 30 a 35 días y al final del mismo los hámsters son sacrificados para extraerles muestras de cada riñón. Dichas muestras se cultivan en un medio adecuado, como es el caso del medio semisólido de Fletcher (Gonçales y col., 2013)

Los cultivos son examinados periódicamente para determinar la presencia de la bacteria utilizando microscopía de campo oscuro. En total un test completo demora alrededor de entre 7 y 19 semanas. (Ebert y col., 1999; Zuerner y col., 2012)

Existen otros métodos que se han aplicado para identificar a este serovar en las muestras de tejidos de hámsters, como la técnica de tinción Steiner-Steiner Silver, la microscopía electrónica y el análisis microscópico de inmunofluorescencia. A continuación, las figuras muestran los distintos métodos. (Zuerner y col., 2012)

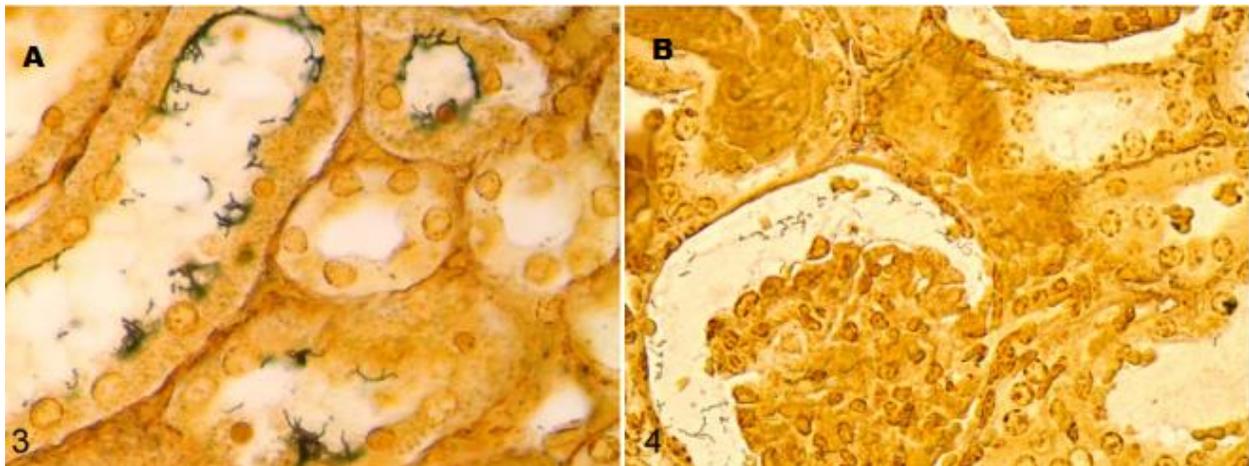


Figura 1: Tinción Steiner-Steiner Silver. **1A;** Riñón, hámster infectado intraperitonealmente con *L. borgpetersenii* serovar Hardjo cepa 203, 4 días post infección (DPI). Espiroquetas en túbulos. **1B;** Riñón, hámster infectado intraperitonealmente con *L. borgpetersenii* serovar Hardjo cepa JB197, 3 DPI. Espiroquetas en el espacio urinario dentro de la capsula glomerular. (Extraído y adaptado de Zuerner y col., 2012)

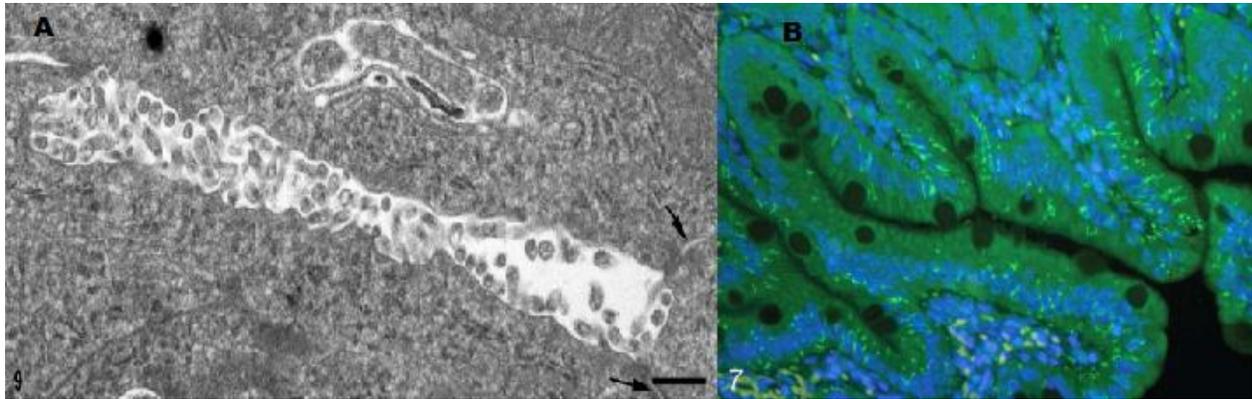


Figura 2: Microscopía electrónica y de inmunofluorescencia. **2A;** Hígado, hámster infectado intraperitonealmente con *L. borgpetersenii* serovar Hardjo cepa JB197, 4 DPI. Microscopía electrónica mostrando espiroquetas envueltas en el espacio intracelular. **2B;** Intestino delgado, hámster infectado intraperitonealmente con *L. borgpetersenii* serovar Hardjo cepa JB197, 4 DPI. Presencia de espiroquetas (verdes) en la capa mucosa. La sección fue incubada con suero de conejo anti-LipL32, seguido de un suero de burro anti-conejo, conjugado con Alexa Fluor 488. La sección fue contrateñida con DAPI. (Extraído y modificado de Zuerner y col., 2012)

Cuando no se logra re aislar la *LSH* de las muestras de riñón de al menos el 80% de los animales inmunizados, la vacuna se considera lo suficientemente potente como para proteger contra la infección renal. (Great Britain, 2013i)

Si no se puede re aislar el microorganismo en el 80% de los controles, la prueba no es válida.

2) Titulación de anticuerpos

Actualmente en la monografía 1939 de la BP13 se indica como control rutinario, para los lotes de las vacunas antileptospirosis destinadas a bovinos, un ensayo de potencia que incluye la vacunación de cobayos y la medición de anticuerpos específicos por un método *in vitro*. (Great Britain, 2013i)

Este procedimiento requiere la disponibilidad de por lo menos doce cobayos, pesando cada uno entre 250 y 350 g, los cuales deben de proceder de zonas certificadas y regularmente testeadas como libres de leptospirosis. Dichos animales no deben presentar anticuerpos contra los principales serovares de *L. interrogans* (*LSC*, *LSG*, *LSH*, *LSI*, *LSP*, sejroe, hebdomonadis, australis y autumnalis).

En la etapa de vacunación, diez cobayos son inmunizados individualmente con un 1/5 de la dosis bovina, mientras que dos de los animales son mantenidos como controles. (Ebert y col., 1999)

Transcurridos 19 a 23 días post - vacunación, se extrae sangre de cada cobayo y se preparan muestras de suero para medir los anticuerpos específicos por un test validado como el de aglutinación microscópica (MAT).

La vacuna cumple con el requisito de potencia si los niveles de anticuerpos son iguales o mayores que aquellos obtenidos con un lote que dio resultados satisfactorios en el test de eficacia llevado a cabo en bovinos.

La prueba es válida si no existe un incremento significativo en el título de anticuerpos en los animales controles. (Great Britain, 2013i)

4.2.3.3 Vacunas contra Carbunco

Si bien todos los protocolos indican el test de desafío para medir la potencia de los lotes de vacuna (test in vivo), también puede llevarse a cabo mediante la cuantificación de esporas viables por mL (test in vitro).

4.2.3.3.1 Test in vivo

En la prueba in vivo, el tipo de animal a emplear va a depender de la cepa utilizada para la producción de la vacuna. (Misra, 1991; Great Britain, 2013j; OIEh)

Cuando la cepa no es letal para el cobayo o el ratón, se recomienda llevar a cabo la prueba de potencia en cobayos, pero si la cepa es letal para dichos cobayos, se debe realizar el test en conejos. En caso de que la cepa sea mortal para algunos conejos, se sugiere determinar la potencia en ovejas.

La vacuna veterinaria que se utiliza actualmente se basa en la cepa Sterne 34F2 de *B. anthracis* la cual no es letal para los cobayos, por lo que se recomienda testear el producto en estos animales (Misra, 1991; Wright y col., 2010)

1) Test en cobayos

En una de las metodologías se procede a vacunar diez cobayos (pesando 300 a 500 g cada uno), por vía subcutánea o intradérmica, con 1/10 de la dosis mínima indicada para el ovino. Otro procedimiento determina que la dosis cobayo corresponde a 1/4 de la dosis bovina o 1/2 de la dosis indicada para especies menores. (OIEh)

Durante un periodo de 21 días post vacunación, se examinan todos los cobayos, al menos una vez por día, registrando su temperatura corporal. Ninguno de los animales debe mostrar reacciones adversas excepto por un aumento de 1,0 - 1,5 °C en su temperatura. Si hay más de dos animales que mueren por causas inespecíficas la prueba debe repetirse (Misra, 1991; OIE, 2012; Great Britain, 2013j)

Finalizado el periodo mencionado se realiza el desafío, en el que se inoculan vía subcutánea, todos los cobayos inmunizados y tres controles con una cepa patógena de *B. anthracis* para la especie, como es el caso de la cepa 17 JB (Pasteur II).

La cepa Pasteur II, antes de utilizarla en el desafío, debe ser titulada en DLM. Para ello se realizan diluciones seriadas (en base 10) de dicha cepa y cada una de ellas es inyectada en cobayos (1,0 mL vía subcutánea); la máxima dilución que aún es capaz de matar a los animales corresponde a la DLM. (Misra, 1991)

En general los protocolos utilizan como inóculo 100 o 200 DLM para los vacunados y 10 DLM para los testigos, aunque en algunos casos se recomienda el uso de 1000 DLM contenida en 0,5 mL de una suspensión de glicerina al 50%. (OIEh)

2) *Test en conejos*

El procedimiento es el mismo que el descrito para los cobayos, con la excepción de que cuando el animal de prueba es el conejo, la cepa de desafío debe titularse en esta especie, determinando la dosis letal mínima conejo. (OIEh)

3) *Test en ovinos*

En esta prueba se requiere de ocho ovejas, de las cuales cinco se vacunan con el producto a analizar y tres se mantienen como controles sin vacunar. Los animales destinados a la inmunización, son inyectados con 1/10 de la dosis mínima indicada para el ovino.

Al igual que en las pruebas anteriores, todos los animales son examinados diariamente durante 21 días post inmunización y finalizado este periodo, se procede a desafiar las ovejas inmunizadas y controles con 100 DLM y 10 DLM de la cepa patógena respectivamente. Cabe destacar que previo a la realización del test, la cepa de desafío debe ser titulada en ovinos. (Great Britain, 2013j)

Independientemente de la especie animal utilizada, la vacuna cumple con el requisito de potencia si a los diez días después del desafío todos los animales vacunados sobreviven y todos los controles mueren de ántrax.

En caso de que un animal vacunado muera después del desafío, el test debería repetirse, entendiéndose que, si en la segunda prueba un animal vacunado muere después del desafío, el lote no es aprobado. (Misra, 1991; Great Britain, 2013j; OIEh)

4.2.3.3.2 Test in vitro

El procedimiento consiste en determinar el número de esporas cultivables en placas de agar nutritivo, realizando diluciones adecuadas. (Misra, 1991)

Para evitar las posibilidades de error, se aconseja probar un mínimo de tres muestras, agitando bien los frascos antes de la toma de dichas muestras (las esporas tienden a agruparse y asentarse en el fondo del envase).

Para realizar las diluciones se utilizan 8 tubos de ensayo los cuales se rotulan adecuadamente y se descarga en cada uno de ellos 9,0 mL de diluyente (solución salina fisiológica). Posteriormente se transfiere 1,0 mL de la suspensión de esporas en el tubo N° 1 con una pipeta o jeringa estéril de tuberculina; luego de homogeneizar se extrae 1,0 mL de dicho tubo (con otra pipeta o jeringa) y se descarga en el tubo siguiente. Las diluciones decimales restantes (base 10) se realizan de la misma manera usando jeringa o pipeta estéril para cada dilución. (Misra, 1991).

De la dilución 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} se pipetea 1,0 mL y se descarga en una placa de petri (5 placas por cada dilución) para después colocar el agar nutriente fundido (a 45 °C) y mezclar el inóculo mediante movimientos de rotación de las placas (siembra incorporada).

Una vez enfriadas las placas a temperatura ambiente, las mismas se incuban a 37 °C por 24 hs. Transcurrido un día, se cuentan las colonias en las 5 placas de una dilución

en particular (aquella en la que sea contable, entre 30 y 300 colonias por placa) y se realiza el promedio, multiplicando luego el valor por el factor de dilución. Se obtiene así el número de esporas viables por mL de la suspensión original.

En términos generales la cantidad de esporas cultivables por dosis debería ser igual o mayor que en aquella vacuna que dio resultados satisfactorios en la prueba de eficacia.

Los requerimientos de distintos países especifican que la dosis de inmunización para equinos y bovinos debería contener entre 2 y 10 millones de esporas cultivables, y para ovinos, caprinos y suinos entre 1 y 5 millones de esporas cultivables. (OMS, 1967).

Por otro lado, en el manual de producción de vacunas contra ántrax (1991) se indica que la dosis no debería contener menos de 10 millones (equinos y bovinos) y 5 millones (ovinos, caprinos y suinos).

4.2.3.4 Vacunas contra Diarrea Viral Bovina (DVB)

4.2.3.4.1 Vacunas a base de virus vivos atenuados

Los lotes de vacunas vivas pueden probarse por titulación de la infectividad en cultivo celular, comparando los resultados con la prueba de inmunogenicidad llevada a cabo en terneros.

Para que el lote sea liberado, la vacuna a ensayar debe presentar un título de $10^{0.7}$ DICT₅₀ (dosis infectiva cultivo de tejidos 50%) mayor que el utilizado en dicho test de inmunogenicidad, conteniendo no menos de $10^{2.5}$ DICT₅₀ por dosis (USA 2012a.2).

4.2.3.4.2 Vacunas inactivadas

1) Modelo de ensayo en bovinos

Para determinar la potencia de estas vacunas los protocolos de referencia internacional indican, como ensayo ideal, medir la respuesta de anticuerpos en el animal hospedador inmunizado con el producto. Se seleccionan para la prueba ocho terneros, que deben cumplir con la condición de ser seronegativos y libres del virus.

La técnica que recomienda el CFR para evaluar la seronegatividad y la seroconversión luego de vacunar los animales, es la seroneutralización viral. Dicha técnica, para detectar anticuerpos contra el virus de la DVB, emplea el método suero variable-virus fijo, donde diluciones de sueros problema (seriada base 2 o base 4) se enfrentan a una cantidad establecida y fija de virus (50-300 DICT₅₀). (Argentina, 2012; USA, 2012a.4).

En general se utiliza una placa de cultivo con 96 pocillos, en la cual se lleva a cabo las diluciones de los sueros (los sueros son previamente inactivados en baño a 56 °C durante media hora). Posteriormente, se adiciona una cantidad fija del virus (en el rango mencionado) obteniendo así la mezcla suero diluido - virus. Después de una etapa de pre incubación, se le coloca a cada mezcla una cantidad adecuada de células susceptibles a la infección por el virus de la DVB (ej.: $2,5 \times 10^4$ cel. /mL), como es el caso de células de la línea MDBK. Es importante colocar siempre un suero positivo (antisuero), un suero negativo, así como un control de células.

Finalmente se incuba la placa a una temperatura de 37 °C en una atmósfera con 5% de CO₂ durante 48-72 hs. La lectura consiste en observar el estado de las células, considerándose positivo aquel pocillo en el cual se detecta efecto citopático. Para que el análisis sea válido se deben de dar las siguientes condiciones; el control de células debe mostrar células en buen estado (confluentes, refringentes, sin alteraciones morfológicas), el suero control positivo debe dar el título esperado y el suero control negativo debe ser negativo.

El título se puede determinar como aquella dilución que protege el 50% de réplicas o unidades (método de Reed Muench -título punto final 50%-). (Argentina, 2012)

En el ensayo para comprobar la seronegatividad, los sueros en una dilución 1/2 no deben de neutralizar el efecto citopático, es decir, la lectura tiene que ser positiva (USA, 2012a.4)

Cuando se comprueba tal condición, se procede a la etapa de inmunización donde cinco terneros son vacunados y los tres restantes ofician de testigos.

Cabe destacar que es importante inyectar la dosis que se recomienda en la etiqueta y tener en cuenta el intervalo sugerido cuando está indicada la aplicación de dos dosis.

Transcurridos catorce días después de la última vacunación, los terneros se sangran una vez más para obtener muestras individuales de suero y analizarlos por el test de seroneutralización.

Para que la vacuna sea considerada satisfactoria en cuanto a potencia, el suero de al menos cuatro inmunizados (4/5) debe presentar un título punto final 50% en la dilución 1/8 o mayor. Este resultado tiene validez si los controles se mantuvieron seronegativos en la dilución 1/2, en caso contrario hay que repetir la prueba. (USA, 2012a.4)

Cuando en una prueba válida, menos de cuatro animales inmunizados (3/5 o menos) presentan un título neutralizante 50 % en la dilución mencionada, se puede proceder a un test de desafío que incluye inocular los ocho animales con el virus virulento de la DVB, y observarlos diariamente por un período de 14 días.

Si al menos dos de los tres terneros controles no muestran una temperatura de por lo menos 40,3 °C y no desarrollan signos respiratorios y clínicos de DVB, el test se declara inconcluso (inválido), por lo que se debe repetir una vez más. En caso de que la prueba sea válida, cuando dos o más vacunados muestran una temperatura de al menos 40,3 °C durante dos o más días y desarrollan signos respiratorios y clínicos indicativos de la enfermedad, el lote se declara insatisfactorio. (USA, 2012a.4)

2) Modelo de ensayo en cobayos

Si bien el método ideal para probar la potencia de estas vacunas implica el uso de bovinos, hay dos grandes problemas; uno es la dificultad de contar con animales seronegativos y el otro es que la prueba es muy costosa. Por estas razones es que en Argentina se desarrolló y validó una prueba estandarizada en cobayos que permite evaluar la potencia de cada lote de vacuna. (Argentina, 2012; Fundación PROSIA, 2012)

Este modelo requiere de la disposición de 10 cobayos (pesando entre 350 y 450 g cada uno), de los cuales seis se vacunan y cuatro se mantienen como testigos/placebos. El día cero, es decir el día que se comienza el ensayo, se sangran todos los animales. La vía recomendada para sangrar los cobayos es la punción cardiaca, aunque son una alternativa la vena yugular y la vena de la oreja. (Argentina, 2012)

Luego de este procedimiento, a los cobayos de prueba se les administra, vía intramuscular o subcutánea, 1/5 de la dosis bovina y transcurridos 21 días de la primera inyección, los animales son revacunados con la misma dosis.

A los 30 días de iniciado el control se sangran los cobayos vacunados realizándoles el control serológico por el test de seroneutralización viral (ver técnica en el punto 1.). La prueba tiene validez cuando los sueros colectados el día cero pos vacunación y/o los sueros de los testigos utilizados en la prueba resultan negativos para esta prueba. (Argentina, 2012)

4.2.3.5 Vacunas contra Rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR)

Para determinar la potencia de estas vacunas (vacunas inactivadas y a base de virus vivos atenuados) se aplica la misma metodología que para las vacunas contra la DVB, es decir que para el caso de las vacunas atenuadas se realiza la titulación de la infectividad en cultivo celular, mientras que para las inactivadas se realiza el ensayo en bovinos o bien se aplica el modelo cobayo. (Argentina, 2012; USA 2012f, 2012g)

Ya sea se utilice un modelo u otro, el título de anticuerpos se determina por la técnica de neutralización viral (véase ítem 4.2.3.4.2 punto 1) o por ELISA indirecto.

Para realizar el ELISA, se utiliza una placa con 96 pocillos la cual se sensibiliza con una concentración óptima y constante del Herpesvirus bovino (obtenido a partir de células, MDBK infectadas). A continuación se realizan, en los pocillos correspondientes, las diluciones del suero problema (seis diluciones seriadas base 4 comenzando en una dilución mínima de 1/40). Es importante colocar un control positivo (suero de animal inmunizado con vacuna de referencia -de título conocido-), un control negativo (suero negativo) y blanco de reactivos (PBS). Luego de sembradas todas las muestras en la placa, la misma se incuba 1 hora a 37 °C en 5% de CO₂; después de esto, se descarta el contenido, se lava cuatro veces y se seca.

Una vez adicionado el conjugado (anti IgG con peroxidasa), con posterior incubación y lavado, se agrega el sustrato (peróxido de hidrógeno/ABTS) que reaccionará con la enzima y producirá un cambio de color. La lectura de la placa se realiza a 405 - 410 nm en un lector de ELISA y se calcula la densidad óptica (DO) de cada muestra. Según la Resolución 598/12 del SENASA, el título se expresa como el log₁₀ de la inversa de la máxima dilución cuyo porcentaje de positividad es mayor o igual al 40% del control positivo. El ensayo es válido cuando: el valor de DO del control positivo se encuentra dentro del rango establecido (0,520 a 0,960), el control negativo y el blanco de reactivos presentan porcentaje de positividad menores al 40% del control positivo, y el título del suero estándar positivo da el valor esperado (entre 2.4 y 3.0) (Argentina, 2012)

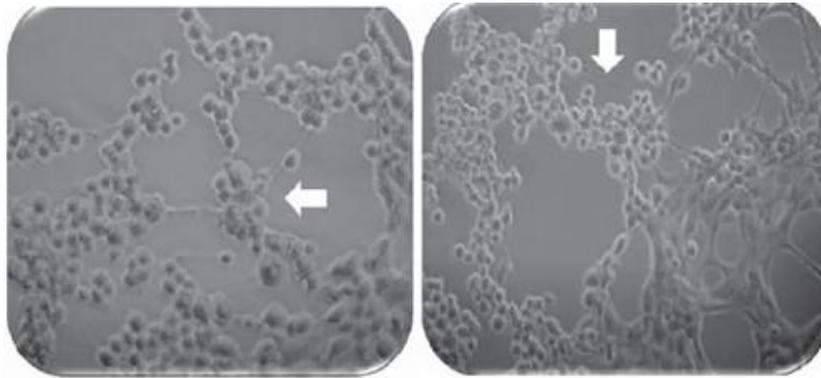


Figura 3: Cultivo de células MDBK mostrando el efecto citopático (EC) causado por el BHV tipo 1 (Herpesvirus bovino tipo 1). Las flechas muestran formación de “racimos” de células característico del EC, con discontinuidad de la monocapa. (Extraído y adaptado de Ruíz- Sáenz y col., 2010)

A continuación, se muestran títulos de anticuerpos que corresponden a vacunas muy satisfactorias, satisfactorias o no satisfactorias:

Tabla XII: Puntos de corte (en una curva dosis - respuesta) determinados por neutralización viral y ELISA. Estos puntos se expresan como títulos de anticuerpos neutralizantes (calculados por método Reed-Muench) y \log_{10} de la inversa de la dilución de suero que resulta positiva respectivamente. Título promedio de anticuerpos de grupos de 5 cobayos, evaluados a los 30 días post vacunación (dpv) y grupos de 5 bovinos seronegativos evaluados a los 60 dpv. (Extraído y adaptado de Fundación PROSAIA, 2012).

ESPECIE	VN ¹			ELISA		
	MS ²	S ³	NS ⁴	MS	S	NS
Cobayo	$2.05 \leq \bar{y}^5$	$1.31 \leq \bar{y} < 2.05$	$\bar{y} < 1.31$	$3.02 \leq \bar{y}$	$1.93 \leq \bar{y} < 3.02$	$\bar{y} < 1.93$
Bovino	$1.96 \leq \bar{Y}^5$	$1.27 \leq \bar{Y} < 1.96$	$\bar{Y} < 1.27$	$2.72 \leq \bar{Y}$	$1.69 \leq \bar{Y} < 2.72$	$\bar{Y} < 1.69$

VN¹= neutralización viral. MS²= muy satisfactorias. S³= satisfactorias. NS⁴= no satisfactorias. \bar{Y}^5, \bar{y}^5 = títulos de anticuerpos

La Resolución 598/12 del SENASA establece que en el modelo cobayo, el título promedio de anticuerpos en la prueba de VN debe ser igual o mayor a 1.31 para que la vacuna se considere satisfactoria en cuanto a potencia. En la técnica de ELISA se exige un título promedio igual o mayor a 1.96. (Argentina, 2012)

Cabe destacar que cuando se utiliza como animal de prueba al bovino, en caso de que las pruebas in vitro arrojen resultados no satisfactorios, el CFR propone proceder a un test de desafío (véase ítem 4.2.3.4. punto 1) (USA, 2012g)

4.2.3.6 Vacunas contra Fiebre Aftosa

En la década del 60, en varios países de América del Sur, los controles de potencia de la vacuna antiaftosa no eran muy frecuentes, y la inmunogenicidad en muchos casos se determinaba por los títulos fijador del complemento e infeccioso, obtenido en las suspensiones de antígeno a ser inactivado. Ya en la década del 70 se comenzó a dar énfasis en pruebas directas de potencia en bovinos e indirectas por determinación de anticuerpos en los sueros de bovinos vacunados. (Alonso y col., 1985).

Actualmente, a nivel internacional se mantiene como prueba estándar el test de desafío con vacunación. Sin embargo, en el caso de la liberación del lote se recomienda el uso de pruebas indirectas por cuestiones de practicidad y bienestar animal, siempre y cuando se haya validado una correlación con el porcentaje de protección en la especie de destino. (OIE, 2012a)

A. Pruebas directas

Las vacunas antiaftosa tienen la característica de no presentar una composición química definida. La potencia de ellas depende no solamente del contenido y calidad de antígeno sino además de la influencia del adyuvante utilizado en la formulación.

Por lo tanto, el mejor medio de evaluar cualitativamente y cuantitativamente el producto es midiendo el efecto que producen en la especie animal para la cual se destina. (Allende, 2001a)

A.1 *Protección a la generalización podal (PGP)*

La metodología considerada “gold standard” en América del Sur para evaluar la potencia de la vacuna antiaftosa es la prueba de protección a la generalización podal (PGP) realizada en bovinos. En esta prueba se mide la inmunidad protectora que consiste, entre otros, en una interacción compleja entre anticuerpos y células fagocíticas encargadas de los complejos antígeno-anticuerpos que se forman en el animal. (Allende, 2001a)

Para esta prueba se requieren de 18 a 20 bovinos que deben presentar las siguientes características; tener de año y medio a dos años de edad, vírgenes a fiebre aftosa (por prueba serológica individual y control del establecimiento), homogéneos en tamaño raza y peso, en buen estado general de salud, tratados para endo y ectoparásitos.

Luego que se seleccionan los animales se identifican adecuadamente y se transportan al establecimiento donde se llevara a cabo el ensayo. Allí se mantendrán en cuarentena previo a la prueba de vacuna (el periodo es determinado por el servicio oficial de contralor).

En la etapa de vacunación se forman grupos aleatorios de 18 animales por vacuna a testear (16 se vacunan y 2 ofician de testigos); cabe destacar que las vacunas presentadas a control, se codifican debidamente, de manera de garantizar la imparcialidad del proceso (se incluye siempre una vacuna de referencia conocida). La vacunación es llevada a cabo por el servicio oficial siguiendo las indicaciones, para la aplicación del producto, del laboratorio fabricante. Luego de cuatro semanas o del plazo

que el servicio oficial considere, los animales se transportan a las instalaciones donde se realizara el desafío.

En el desafío, los 16 bovinos vacunados y los 2 controles son desafiados vía intradermolingual con 10000 dosis infecciosas 50% del virus (10^4 DI₅₀). Siete días después, se realiza la lectura verificando que los bovinos control presenten lesiones de generalización podal. Los animales vacunados que presenten lesiones podales serán considerados como no protegidos. Posteriormente a la lectura los animales son destruidos. (Allende, 2001a)

En cuanto a la interpretación de resultados, la vacuna es aprobada cuando la misma logra proteger a 12 animales de los 16 vacunados e inoculados (potencia entre 47,62 y 92,73%). Si protege a 10 animales de los 16 vacunados y desafiados, el producto tendrá derecho a repetición de la prueba. Vacunas con menos de 10 animales protegidos a la descarga serán rechazadas. (Allende, 2001a)

A.2 Dosis Protectora Bovino 50 % (DPB₅₀)

En esta prueba en general se utiliza la vacuna pura y diluida (1/3 y 1/9 en diluyente inerte). Se vacunan cinco bovinos con la vacuna pura y con cada una de las diluciones empleadas. A los 21-30 días post vacunación se procede al desafío inoculando cada bovino, por vía intradermolingual con 10000 (10^4) DI₅₀.

A los 7 días de la inoculación se hace una lectura, se calcula la DPB₅₀ y se liberan las vacunas que proporcionan 3 o más DPB₅₀. (Alonso y col., 1985)

B. Pruebas indirectas

Las pruebas indirectas utilizadas en América del Sur en la década del 70, consistían en la prueba de seroprotección en ratones lactantes y la seroneutralización con sueros de bovinos vacunados, y los resultados se expresaban en índices (índice de seroprotección -ISP- y de seroneutralización -ISN-). Se pudo estimar entonces, para cada índice, la probabilidad que tenía un bovino de estar protegido al desafío (expectativas porcentuales de protección - EPPs-).

En 1985, Mc Cullough y col. desarrollaron la técnica de ELISA competición en fase líquida (ELISA-CFL), la cual en un principio era utilizada para caracterizar epítopes del virus, pero posteriormente Hamblin y col. (1986) la modificaron para medir anticuerpos pos infección o vacunación. Luego de esto, en PANAFITOSA, se adaptó la misma técnica para estudiar anticuerpos pos vacunación con cepas vacunales sudamericanas. (Allende, 2001).

B.1 ELISA-CFL/EEP

El ELISA-competición en fase líquida (ELISA/CFL), consiste en una prueba indirecta in vitro la cual presenta una fuerte correlación con la respuesta en prueba de PGP para las cepas vacunales prototipo América del Sur, O₁ Campos, A₂₄ Cruzeiro y C3 Indaial. Esto quiere decir que es posible asociar la probabilidad de un bovino a estar protegido o no a la descarga en PGP, con el título anticuerpos generado por la vacunación (título para cada cepa mencionada) medidos por dicha prueba.

En el desarrollo de la técnica se generaron tablas de EPPs para cada valencia estudiada, lo cual constituye un instrumento a ser utilizado para estimar la potencia de una vacuna (véase Anexo, **Tabla A.VI, A.VII, A.VIII**)

El ELISA/CFL al igual que otros ELISAs tiene la facilidad de uso, bajo costo, reproducibilidad de resultados, reducción del uso de animales (solo se toma la muestra de suero) y utiliza reactivos inactivados (bajo riesgo). Además de reactivos comunes a otras pruebas ELISA, el ensayo de ELISA/CFL, la cual identifica anticuerpos de fiebre aftosa, requiere de reactivos específicos como son los anticuerpos de captura, los anticuerpos detectores y el antígeno de prueba. (Allende, 2001)

Los anticuerpos de captura son preparados en conejos, por inmunización e hiperinmunización con virus de fiebre aftosa inactivado y purificado (140S).

Los anticuerpos detectores se producen en cobayo, por inmunización e hiperinmunización con virus adaptado a la especie.

El antígeno se obtiene del sobrenadante de cultivo de células BHK infectadas con los virus de fiebre aftosa correspondientes, clarificados e inactivados y controlados por un panel de anticuerpos monoclonales seleccionados para tal afinidad.

La prueba de ELISA/CFL consta por un lado en una “fase líquida” donde el suero en estudio es mezclado con el antígeno de prueba (seroneutralización), y una “fase sólida” o de ELISA propiamente dicho, en donde se detecta el antígeno libre no neutralizado en la mezcla suero-antígeno.

En el procedimiento de seroneutralización, en los pocillos asignados se realizan diluciones base 5 de los sueros problemas, para posteriormente adicionar a cada una de estas un volumen constante del antígeno diluido. Para permitir que ocurra la neutralización la placa se incuba a 37 °C durante una hora (con agitación los primeros 20 minutos). (Orue, 2001)

Transcurrido este tiempo, se procede a llevar a cabo el ELISA, transfiriendo un volumen determinado de la mezcla suero-antígeno a los pocillos correspondientes sensibilizados con el anticuerpo de captura. Después de una etapa de incubación (a 37 °C por media hora) y lavado (tres lavados) se agrega el anticuerpo detector, y se procede a una nueva etapa de incubación con consiguiente lavado. La colocación posterior del conjugado permite generar la señal de color, a partir de la adición del sustrato enzimático. Dicho color se mide por su DO (en lector de ELISA a longitud de onda de 492 nm) y se procesa por un software de titulación de anticuerpos para la interpretación de la placa. (Allende, 2001; Orue, 2001)

El título se determina como la inversa de la dilución del suero, expresada en \log_{10} , que proporciona una DO igual al 50% de la media de las DOs obtenidas en el control de antígeno. (Brasil, 2012b)

El test se realiza en microplacas de poliestireno (fase sólida) específicas para pruebas ELISA y cada placa lleva, además de los sueros en estudio, controles de calidad internos. Estos controles consisten en sueros positivo y negativo para el antígeno de prueba; control de color de fondo o blanco de prueba (0 % color) y control de máximo color de prueba o antígeno. (Allende, 2001)

Esquema 1: Titulación de anticuerpos de fiebre aftosa. Prueba de control de potencia
(Extraído y adaptado de Orue, 2001)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1 1:2	1:10	1:50	1: 250	1: 1250	1: 6250	S5					
B	S1 1:2	1:10	1:50	1: 250	1: 1250	1: 6250	S5					
C	S2						S6					
D	S2						S6					
E	S3						C- 1:2	1:10	1:50	1:250	Cag	Cag
F	S3						C+ 1:10	1: 1:50	1:250	1:1250	Cag	Cag
G	S4						C++ 1:200	1:100	1:5000	1:2500	Cag	Cag
H	S4						Blanc	Blanc	Blanc	Blanc	Blanc	Blanc

Los bovinos de prueba son seleccionados con el mismo criterio que para la prueba de PGP; en cuanto al número de animales a utilizar, varía según la normativa de cada país, destacando que cuantos más bovinos se incluyan en el test, mayor es la precisión de la metodología.

PANAFTOSA recomienda el uso de 32 bovinos, de los cuales 30 se vacunan (con una dosis de la vacuna) y dos son mantenidos como testigos. En países como Argentina y Brasil se vacunan 16 y 18 bovinos respectivamente, manteniendo dos animales como testigos (Allende, 2001; Argentina, 2006; Brasil 2012b)

Cuatro semanas pos vacunación (60 días pos vacunación en Argentina), se toman muestras de suero de todos los animales y se determina el nivel de anticuerpos para los serotipos O₁ Campos, A₂₄ Cruzeiro y C3 Indaial utilizando el ensayo ELISA/CFL (en Argentina se incluye el serotipo A Argentina 2001).

En lo que refiere a la interpretación de resultados, PANAFTOSA y la legislación brasileña indican calcular a partir de cada título individual en el ELISA/CFL, la EPP correspondiente y la media aritmética (promedio) de EPPs del grupo de vacunados, excluyendo los sueros con mayor y menor título. (Allende, 2001; Brasil, 2012b)

Tabla XIII: Interpretación del ensayo en función de los valores promedios de EPPs obtenidos para cada tipo de antígeno.

Serotipo /criterio	PANAFTOSA			Norma MAPA N° 50		
	aprobación	rechazo	recontrol	aprobación	rechazo	recontrol
<i>O₁ Campos</i>	$x^1 = 70 \%$	$x < 60 \%$	$60 \% \leq x < 70 \%$	$x \geq 80 \%$	$x < 80\%$	Cuando se solicite
<i>A₂₄ Cruzeiro</i>	$x = 70 \%$	$x < 60 \%$	$60 \% \leq x < 70 \%$	$x \geq 80 \%$	$x < 80\%$	Cuando se solicite
<i>C3 Indaial</i>	$x = 70 \%$	$x < 60 \%$	$60 \% \leq x < 70 \%$	$x \geq 80 \%$	$x < 80\%$	Cuando se solicite

x^1 = media de EPPs

Cuando la vacuna se somete a un retesteo, PANAFTOSA recomienda utilizar 16 nuevos bovinos, los cuales se vacunan con el mismo producto en control. Luego de cuatro semanas, los animales se sangran para determinar el título de anticuerpos individual, de la misma manera que se estudiaron los 30 sueros anteriores. El promedio de EPPs se calcula sobre las 46 EPPs individuales. Vacunas con promedio de EPPs menor a 68% se rechazan. (Allende, 2001)

La Normativa brasileña MAPA N° 50, establece que el recontrol se realiza de la misma manera que la prueba inicial, pero en este caso vacunando 18 nuevos bovinos. La decisión final de aprobar o rechazar el lote es el mismo que el aplicado en la primera prueba (véase **Tabla XII**). (Brasil, 2012b)

En Argentina, el criterio de decisión está en función del promedio de los títulos de anticuerpos obtenidos en el ELISA/CFL, no calculando los EPPs. (Argentina, 2006).

Tabla XIV: Interpretación de la prueba en relación al promedio de títulos de anticuerpos según la Resolución SENASA 351/2006.

Serotipo/ criterio	aprobación	rechazo	recontrol
<i>O₁ Campos</i>	$x^1 \geq 1.90$	$x < 1.60$	$1.60 \leq x \leq 1.89$
<i>A₂₄ Cruzeiro</i>	$x \geq 1.95$	$x < 1.65$	$1.65 \leq x \leq 1.94$
<i>A Argentina 2001</i>	$x \geq 2.20$	$x < 1.90$	$1.90 \leq x \leq 2.19$
<i>C3 Indaial</i>	$x \geq 1.95$	$x < 1.65$	$1.65 \leq x \leq 1.94$

x^1 = media de títulos de anticuerpos

Cuando la vacuna se somete a una segunda y última prueba, la misma se lleva cabo de la misma manera que el ensayo inicial, utilizando un nuevo grupo de 16 animales. Respecto a la evaluación de resultados del retesteo, es decir si se aprueba o se rechaza el lote, se siguen los lineamientos presentados en la tabla anterior. (Argentina, 2006)

4.2.3.7 Vacunas contra la Rabia

4.2.3.7.1 Vacuna viva atenuada

En cuanto a este tipo de vacunas la legislación brasileña propone llevar a cabo el test de Koprowsky (test de desafío). Para esta prueba se requieren de 20 cobayos (300-400 g), donde 10 son vacunados y los otros 10 ofician de testigos. Se toman 2 frascos de la vacuna liofilizada y cada uno se reconstituye con 2,0 mL de agua destilada estéril con 2 % de suero de equino (diluyente); luego ambos frascos se mezclan. Se toma una dosis de la vacuna y se la diluye en 18 mL de diluyente obteniendo así la dilución de prueba. (Brasil, 2012c)

Los cobayos a vacunar serán inyectados, vía intramuscular, con 0,25 mL de la vacuna diluida (en el miembro posterior derecho). Los 10 cobayos testigos no son vacunados y se separan del grupo de inmunizados. 21 días pos vacunación, los animales vacunados y los testigos se desafían vía intramuscular (miembro posterior izquierdo), con una suspensión viral capaz de matar por lo menos el 80% de los cobayos testigos (DL₈₀ cobayo). Los animales son mantenidos en observación durante 21 días luego de la inoculación con el virus.

La vacuna se considera potente si protege el 70% o más de los cobayos vacunados (mínimo 7/10) en una prueba en la cual muere por lo menos el 80% de los testigos (mínimo 8/10). (Brasil, 2012c)

4.2.3.7.2 Vacuna inactivada

La potencia de la vacuna antirrábica inactivada de uso veterinario se puede determinar mediante un test in vivo o bien a través de ensayos in vitro.

1) Test in vivo

El test in vivo o test de neutralización in vivo que establece la BP13 consiste en la vacunación de animales de laboratorio que luego se desafían con una cepa virulenta del virus de la rabia, evaluando así la habilidad de la vacuna para protegerlos contra la enfermedad. (Great Britain, 2013m)

Los protocolos de referencia indican el uso de ratones hembras como animales de prueba, las cuales deben tener cuatro semanas de edad y provenir del mismo stock.

Previo a probar la potencia de la vacuna, es necesario preparar la suspensión de desafío, inoculando un grupo de diez ratones con la cepa CVS (cepa estándar de desafío) del virus de la rabia. Una vez que los animales muestran signos de rabia, se sacrifican y se remueven los cerebros. (Great Britain 2013m; OIE, 2013)

Luego de dicha etapa, se prepara una suspensión de cerebro en un diluyente adecuado, se centrifuga y el líquido sobrenadante se utiliza como suspensión de desafío; este líquido se distribuye en pequeños volúmenes en ampollas y se almacenan a - 60 °C. Posteriormente, se descongela una ampolla y se realizan diluciones seriadas con un diluyente adecuado, designando a cada dilución, un grupo de diez animales que son inoculados con 0,03 mL de la misma vía intracerebral. (Great Britain 2013m; OIE, 2013)

Los ratones se mantienen en observación durante 14 días registrándose el número en cada grupo que, entre el quinto y decimocuarto día, desarrolla signos de rabia, calculando la DI_{50} de la suspensión no diluida.

Una vez que se obtiene dicha dosis de la suspensión de desafío, se prosigue a determinar la potencia de la vacuna, para lo que se preparan al menos 3 diluciones seriadas (diluciones en base cinco) de la vacuna a ensayar y tres diluciones similares de la preparación de referencia calibrada en UI. Para cada dilución se asigna un grupo de diez ratones y se inyecta 0,5 mL de la misma vía intraperitoneal. Catorce días después de la vacunación, todos los animales se inoculan con 0,03 mL de una suspensión del virus que contenga 50 DI_{50} . (Great Britain 2013m; OIE, 2013)

En el ensayo también se prueba la suspensión de desafío, lo que consiste en realizar tres diluciones de la misma, asignando para cada una de ellas diez ratones no vacunados. Cada ejemplar es inyectado vía intracerebral con 0,03 mL de la dilución correspondiente.

Durante catorce días, todos los animales se mantienen bajo observación y se registra el número de ratones de cada grupo que desarrolla sintomatología de rabia. El test es inválido si más de dos ratones de cualquier grupo mueren en los primeros cuatro días posteriores al desafío. La vacuna cumple con el test si la potencia estimada no es menor a 1,0 UI por dosis. (Great Britain 2013m; OIE, 2013)

Cabe resaltar que la prueba resultará no válida a no ser que:

- a) tanto en el caso de la vacuna problema como en el caso de la preparación de referencia, la dosis que resulta protectora en el 50% de los ratones expuestos se encuentre entre la dosis mínima y la máxima administradas a los ratones;
- b) la titulación de la suspensión de exposición muestre que 0,03 ml de la suspensión contienen entre 10 y 50 DI_{50} ;
- c) los límites de confianza ($p = 0,95$) no sean inferiores al 25% ni superiores al 400% de la potencia estimada; cuando este criterio de validez no se cumpla, el límite inferior de la potencia estimada debe ser al menos de 1 UI en la dosis mínima prescrita;
- d) el análisis estadístico muestre una pendiente significativa ($p = 0,95$) y desviaciones no significativas de la linealidad o paralelismo de las curvas dosis-respuesta ($p = 0,99$).

(Great Britain 2013m; OIE, 2013)

Como se ha mencionado anteriormente, no se toma como punto final la muerte de los animales, sino que se observa el desarrollo de signos clínicos; siendo considerado entonces el punto final la etapa previa a la muerte de dicho animal.

El progreso de la infección por rabia en ratones luego de la inoculación intracerebral puede representarse por cinco etapas definidas de signos clínicos típicos:

Etapas 1: piel erizada, espalda encorvada

Etapas 2: movimientos lentos, pérdida de alerta (pueden observarse movimientos circulares)

Etapa 3: movimientos temblorosos, temblores, convulsiones

Etapa 4: signos de paresia o parálisis

Etapa 5: estado moribundo

Los protocolos indican que, utilizando la etapa 3 como punto final de la prueba equivale a cuando se usa como punto final la muerte del animal. En base a esto, cuando se observan temblores y convulsiones se procede a sacrificar al animal. (Great Britain 2013m; OIE, 2013)

Por su parte la Normativa brasileña MA N° 228, indica el test de Habel, el del NIH y el test de desafío en cobayos. (Brasil, 2012c)

En el test de Habel la vacuna es diluida previa vacunación de los ratones; un 0,5 % cuando es preparada en tejido cerebral y 1/10000 para aquellas elaboradas a partir de cultivo celular. La vacuna se considera con potencia adecuada si confiere protección frente a la inoculación de 10000 (10^4) DL₅₀ del virus estándar de prueba.

El método NIH establece que el poder inmunizante de la vacuna debe ser 0,3 veces o más en relación a la vacuna de referencia.

Para las vacunas tipo Formidogel (formolizadas y adyuvantadas con hidróxido de aluminio) se describe el test de desafío en cobayos, en el cual se utilizan 20 ejemplares. Un grupo de 10 animales se vacunan con 1,0 mL del producto por vía subcutánea, mientras los 10 restantes se reservan para testigos. Luego de 7 días de la primovacunación, los cobayos son revacunados (por la misma vía de administración). Transcurridos 14 días después del “booster”, los inmunizados y los testigos se inoculan en el muslo, vía intramuscular, con una suspensión del virus capaz de matar al 80 % de cobayos no vacunados (DL₈₀).

Durante los siguientes 21 días, los animales se mantienen bajo observación esperando que por lo menos el 70 % (mínimo 7/10) de los vacunados hayan resistido el desafío viral, en una prueba en donde debe morir, con sintomatología rábica, por lo menos el 80% de los testigos (mínimo 8/10). (Brasil, 2012c)

2) *Test in vitro*

Los ensayos in vivo desarrollados anteriormente, recomendados por el NIH, la legislación brasileña y también por la Farmacopea Británica (monografía 0451), presentan la desventaja de que es muy doloroso para los animales de prueba, puede generar variabilidad de resultados (influye factores como las condiciones de cría, salud de los ratones y la técnica a la hora de inyectar) y requiere de un tiempo considerable. (Krämer y col., 2010; Cao y col., 2012).

Debido a lo anteriormente dicho, actualmente en la monografía 0451 se hace énfasis en que no es necesario realizar el test de desafío en animales para la liberación de los lotes de vacunas, cuando dicho test se llevó a cabo en un lote con potencia mínima (Great Britain, 2013m).

El test in vitro alternativo validado internacionalmente, logra reducir el número de animales y el sufrimiento de los mismos, pero aun así requiere del uso de animales de laboratorio.

En la prueba se debe disponer de cinco ratones (pesando entre 18 y 20 g), los cuales se vacunan vía subcutánea o intramuscular con 1/5 de la dosis recomendada.

Catorce días después de la inyección, se extraen muestras de sangre por punción cardíaca o bien de la yugular luego de sacrificado. Los sueros se analizan individualmente por un método validado como el test de inhibición del foco fluorescente. (Great Britain, 2013m)

El test rápido de inhibición del foco fluorescente (RFFIT), se basa en la detección de anticuerpos antirrábicos neutralizantes y el mismo ha demostrado una fuerte correlación con el test in vivo. (Cao y col., 2012).

Utilizando una placa de microtitulación de 96 pocillos, las muestras de suero y un estándar de referencia (inmunoglobulina rábica) se diluyen en diluciones seriadas, para luego adicionar una cantidad determinada del virus rábico de desafío (cepa CVS) titulado previamente en 100 DICT₅₀. Dicha mezcla suero diluido-virus se incuba a una temperatura de 37 °C durante una hora, de manera de permitir que ocurra la neutralización viral. Posteriormente a adicionar células BHK - 21 en una cantidad adecuada (2,5 X 10⁵ cel. /mL) y de incubar por 48 hs a la misma temperatura, las células infectadas (virus no neutralizado) son indirectamente detectadas por tinción fluorescente; para ello se utiliza isotiocianato de fluoresceína conjugado al anticuerpo monoclonal contra la nucleoproteína rábica (FITC). Las placas se leen en microscopio fluorescente y se anotan los resultados: inmunofluorescencia negativa (virus neutralizado), inmunofluorescencia positiva (virus no neutralizado). (Krämer y col., 2010)

Esquema 2: Placa de titulación de los controles utilizada en la validación del método de RFFIT. (Extraído y adaptado de Krämer y col., 2010)

CONTROL PLATE 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	RAI						CVS					
A	1:5	1:5	1:5	1:5	1:5	1:5	10 ⁰					
B	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	10 ⁻¹					
C	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20	10 ⁻²					
D	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	10 ⁻³					
E	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	10 ⁻⁴					
F	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160						
G	1:320	1:320	1:320	1:320	1:320	1:320	NC	NC	NC	NC	NC	NC
H	1:1600	1:1600	1:1600	1:1600	1:1600	1:1600	CC	CC	CC	CC	CC	CC

RAI=immunoglobulin standard, CVS=rabies virus, NC=negative control, CC=cell control

Esquema 3: Placa de titulación de los sueros a testear utilizada en la validación del método RFFIT. (Extraído y adaptado de Krämer y col., 2010)

CONTROL PLATE 2 AND SERUM TITRATION PLATES

				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Medium	Sera/ transfer	Dilution		CS / Low				CS / Medium				CS / High			
80 µL	20 µL	1:5	A												
50 µL	50 µL	1:10	B												
50 µL	50 µL	1:20	C												
50 µL	50 µL	1:40	D												
50 µL	50 µL	1:80	E												
50 µL	50 µL	1:160	F												
50 µL	50 µL	1:320	G												
200 µL	200 µL	1:1600	H												

CS=control sera (high, medium or low)

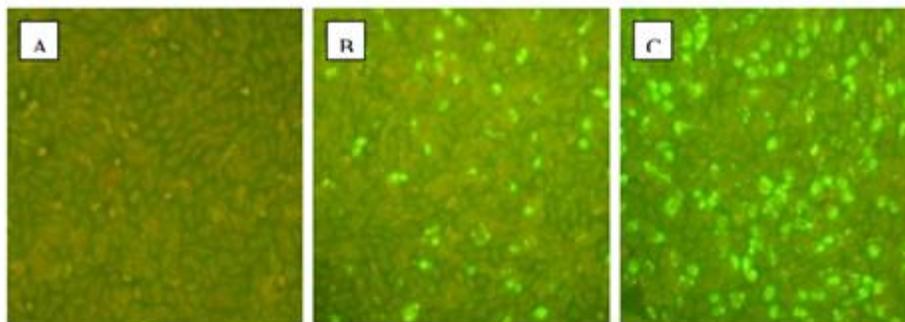


Figura 4: Modo de tinción de foco fluorescente en RFFIT. 3A: control negativo. 3B: la mayor dilución del suero que puede inhibir el 30% de cepa CVS del virus. 3C: la mayor dilución del suero que puede inhibir el 85% de la cepa CVS del virus. (Extraído y adaptado de Cao y col., 2012)

En este tipo de técnicas, es importante colocar controles de calidad internos, que incluyen; control de células, control de virus, control negativo (suero negativo) y el estándar de referencia.

El test tiene validez si todos los controles celulares se encuentran libres de células fluorescentes y si el título de la cepa CVS se encuentra dentro de lo esperado. Cuando se comprueba tal condición, si los títulos de anticuerpos generados por la vacuna a testear son mayores que los obtenidos por el estándar de referencia, la misma cumple con los requisitos de potencia; esta potencia relativa se procesa por un software, utilizando un test estadístico. (Krämer y col., 2010)

Como se mencionó anteriormente para llevar a cabo el RFFIT se requiere del anticuerpo conjugado a fluoresceína (FITC), lo cual es costoso y en algunas ocasiones difícil de conseguir. En un estudio llevado a cabo por khawplod y col. (2005), se utilizó una cepa de virus recombinante conteniendo el gen que codifica para la proteína fluorescente verde (GFP) como virus de desafío. La expresión de la GFP pudo ser detectada en las células infectadas bajo microscopio fluorescente, sin la necesidad del

uso del FITC. También demostraron que la correlación entre el RFFIT convencional y el RFFIT usando la cepa recombinante fue alta (coeficiente de correlación $r = 0,98$).

4.2.4 Pruebas de potencia in vitro como alternativa para el control de vacunas contra clostridios y leptospiras.

4.2.4.1 Definición y aplicación de las “3Rs”

Las vacunas veterinarias contribuyen tanto a la salud animal como humana previniendo enfermedades infecciosas; sin embargo, los test necesarios para asegurar la efectividad (potencia) incluyen en general el uso de un número significativo de animales, generando sufrimiento y estrés en los mismos.

Existen organismos a nivel internacional como por ejemplo el Comité de Interagencias de Estados Unidos para la Validación de Métodos Alternativos (ICCVAM) y el Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos (ECVAM) cuyo objetivo común es promover las “3Rs”, es decir el reemplazo y/o reducción de los animales de experimentación, y el refinamiento en los test de potencia. (Stokes y col., 2010)

a) Reemplazo

Uno de los objetivos primordiales de los organismos anteriormente mencionados es el reemplazar la utilización de animales en los ensayos de potencia con la implementación de pruebas in vitro, las cuales debes estar adecuadamente validadas y estandarizadas. Los ensayos in vitro aplicados a vacunas inactivadas, permiten determinar la potencia de la misma en función de la cuantificación de los antígenos protectivos que la componen.

Para poder realizar las pruebas in vitro es necesario entonces contar con el los antígeno/s protectivos identificados con el/los cual/es elaborar la vacuna, para lo que se propone investigar la clonación de genes de manera de producir antígeno/s protectivo/s purificado/s y así permitir que la cuantificación sea más fácil. Cabe destacar también, que es necesario contar con los reactivos necesarios para cuantificar dichos antígenos (ej.: anticuerpos que detecten el/los antígeno/s). (Stokes y col., 2010)

b) Refinamiento

b.1 Métodos serológicos

Tradicionalmente los test de potencia para vacunas inactivadas han utilizado los test de desafío, en donde los animales vacunados se inoculan con microorganismos vivos, determinando la cantidad de vacuna necesaria para proveer una adecuada protección. El problema con esta clase de test es que los animales protegidos en forma inadecuada y los controles se infectan y muestran signos clínicos significativos de la enfermedad.

Hace uno años se desarrollaron y validaron procedimientos de cuantificación de anticuerpos que han reemplazado los test de desafío y se encuentran descritos en los protocolos de referencia; un ejemplo de ello es el caso del test de toxi-neutralización en ratones (MNT) utilizado para evaluar la potencia de vacunas clostridiales (véase ítem 4.2.3.1.1).

Si bien este tipo de prueba provee un refinamiento significativo, es decir los animales no se exponen a patógenos vivos (se evita la infección y progresión de la enfermedad clínica), aún sigue requiriendo del uso de animales, en este caso ratones, para poder cuantificar los niveles de anticuerpos de los animales vacunados. Por esta razón tanto el ICCVAM como el ECVAM plantean la necesidad de identificar y comprender los anticuerpos involucrados en la inmunidad protectora para cada vacuna específica, de manera de poder sustituir los test de toxineutralización in vivo por técnicas de ELISA y/o métodos de toxineutralización basados en líneas celulares específicas. (Stokes y col., 2010)

b.2 Punto final de prueba humanitario

A pesar del incremento del uso de test de potencia in vitro y métodos serológicos, algunas vacunas aún se prueban por el test de desafío (ej.: vacunas contra *Leptospiras* y vacuna contra *C. chauvoei*). En el pasado para que el test de desafío fuera válido, los animales controles debían morir, pero actualmente ninguna autoridad regulatoria exige como punto final la muerte, y por tanto los manuales que describen los procedimientos ahora permiten la eutanasia humanitaria de los animales moribundos. (Stokes y col., 2010)

Los puntos finales previo a la muerte son aplicables siempre y cuando sean consistentes con el cumplimiento de los objetivos de la prueba (el animal debe haber desarrollado los signos clínicos característicos de la enfermedad causada por el microorganismo en cuestión).

c) Reducción

A lo largo de la historia ha ocurrido una reducción en el número de animales requeridos para los test de potencia, lo que puede ser atribuido en parte a una mejora en el estado sanitario de los animales, un mayor control de las variables experimentales y otros factores, como, por ejemplo, la sustitución de ensayos de multi-dilución por de dilución simple en los test de desafío. (Stokes y col., 2010)

Si bien se promueve disminuir al máximo el número de animales a utilizar tanto en los test de desafío como en los serológicos, siempre hay que tener en cuenta mantener la potencia estadística del ensayo.

4.2.4.2 Ensayos in vitro.

1) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

El ensayo inmuno-adsorbente ligado a enzimas (enzyme-linked immuno-sorbent assay - ELISA-) es una técnica bioquímica aplicada principalmente en inmunología para

detectar la presencia de un anticuerpo o un antígeno en una muestra; la misma combina la especificidad de anticuerpos con la sensibilidad de ensayos enzimáticos simples, utilizando anticuerpos o antígenos conjugados a una enzima. (ELISA encyclopedia)

El procedimiento de la técnica fue descrito en el año 1971 por los investigadores Eva Engvall y Peter Perlmann, aplicándose inicialmente en el campo de la microbiología y parasitología; Voller y Bidwell posteriormente introdujeron el uso de microplacas de 96 pocillos. (Fernández, 2007)

Para poder llevar a cabo un ELISA es necesario contar con un kit que debe incluir el soporte sólido, el conjugado, los controles, el diluyente de muestras, la solución de lavado y la solución que frena la reacción de la enzima. (ELISA encyclopedia)

El soporte sólido (placas de 96 pocillos) que normalmente se utiliza es de poliestireno, un material plástico transparente que es fuertemente adsorbente a proteínas y no reactivo, de manera que los anticuerpos o antígenos mantienen su actividad luego de haberse adsorbido a este.

Un anticuerpo ligado a una enzima, constituye un conjugado y es la clave en el ensayo, ya que es el generador de señal. Las enzimas utilizadas deben ser altamente puras, y lo que es fundamental, mantener la capacidad catalítica y de componente activo luego de convertirse en un conjugado; las más utilizadas son la peroxidasa y la fosfatasa alcalina.

A continuación, se mencionan los principales sustratos utilizados para cada una de las enzimas mencionadas. (Cultek, 2006)

Tabla XV: Enzimas utilizadas frecuentemente para constituir un conjugado, con sus principales sustratos y los colores desarrollados según la longitud de onda aplicada.

Enzima	Sustrato	Color
<i>Peroxidasa</i>	TMB (Tetrametilbencidina)	Azul ($\lambda^1=650 \text{ nm}^2$) Amarillo ($\lambda= 450 \text{ nm}$)
	ABTS (2,2'-Azino-bis- [3-Etilbenzotiazol- 6-sulfónico])	Azul verdoso ($\lambda= 405-410 \text{ nm}$)
	OPD (O-filenodiamina)	Amarillo ($\lambda= 490 \text{ nm}$)
<i>Fosfatasa alcalina</i>	p-NPP (p-nitrofenilfosfato)	Amarillo ($\lambda= 405-410 \text{ nm}$)

λ^1 : longitud de onda.

nm^2 : nanómetros

Respecto al anticuerpo, se usa la IgG altamente purificada, de manera de evitar interferencias de otras proteínas cuando se liga con la enzima. Los controles, los cuales son esenciales para determinar la validez del ensayo, deben agregarse a la placa de la misma manera y al mismo tiempo que las muestras; es importante también agregar un estándar de referencia para construir la curva estándar, y en base a ésta, calcular los resultados de dichas muestras. (ELISA encyclopedia)

El diluyente y solución de lavado que normalmente se utiliza es el tween 20 de solución salina fosfato al 0,05 % (PBST), y la sustancia aplicada para frenar la reacción enzimática en general es el ácido sulfúrico. (ELISA encyclopedia)

En cuanto al protocolo de un ELISA, si bien se reconocen cuatro formatos clásicos (ELISA directo, indirecto, en sándwich y competitivo), generalmente en un ELISA, luego de agregar cada reactivo (anticuerpo, antígeno, conjugado), se debe realizar una etapa de incubación (ej.: 37 °C/1h) para que se produzca la reacción y un posterior lavado para así quitar todo aquello que no se unió (no reaccionó). La etapa de adsorción (unión) a los pocillos, ya sea antígeno o anticuerpo, normalmente se lleva a cabo a 4 °C durante toda la noche y luego de esto, en general, se agrega una proteína que bloquea otros sitios de unión, como la albúmina (en suero bovino) o caseína (en leche descremada).

ELISA directo

Este tipo de ELISA es el más simple de todos. En primera instancia se adsorbe el antígeno a la placa de poliestireno (fase sólida), luego se adiciona una proteína extra para bloquear otros sitios de unión (normalmente albúmina de suero bovino) y en una etapa posterior se agrega el complejo anticuerpo - enzima el cual se adsorbe al antígeno (el exceso del conjugado se elimina por lavado y permanece el complejo unido al antígeno). Finalmente se adiciona el sustrato de la enzima que permite detectar la presencia de ésta, lo que ilustra la señal del antígeno. (ELISA encyclopedia)

Si bien comparado a los otros tipos de ELISAs, éste se realiza de forma más rápida (se utiliza un solo anticuerpo y se requieren pocos pasos), la señal que se genera es menos amplificada que en las otras formas, lo que significa una menor sensibilidad. (ELISA encyclopedia)

ELISA indirecto.

La modalidad del ELISA indirecto consta de dos procesos de unión, el del anticuerpo primario y el del anticuerpo secundario marcado, es decir que el anticuerpo de la muestra se encuentra atrapado entre el antígeno adherido a la superficie de la placa y la inmunoglobulina anti especie marcada con la enzima. La adición del sustrato de la enzima (reactivo cromógeno) causa el desarrollo del color, el cual es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpo de la muestra unido. (ELISA encyclopedia)

Este formato es adecuado para determinar el nivel total de anticuerpos en muestras, y es por ello que ha sido utilizado en diversos ensayos de potencia de vacunas anti-clostridiosis.

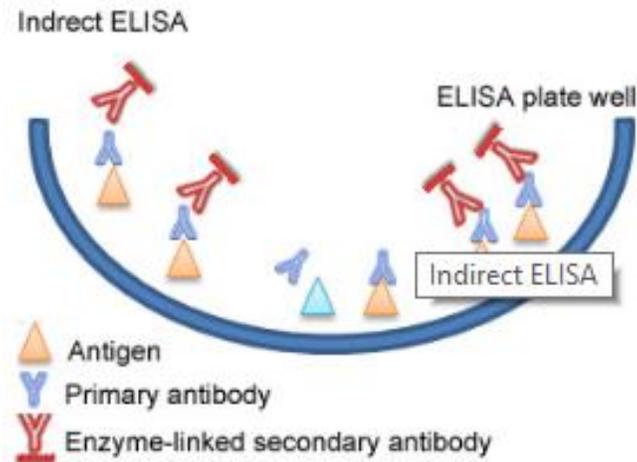


Figura 5: Esquema de un ELISA indirecto. (Extraído de *ELISA encyclopedia*)

En un estudio realizado por Wood (1991), se describieron cuatro ELISAs indirectos para determinar los niveles de antitoxina de *C. tetani*, *C. novy* tipo B, *C. septicum* y *C. perfringens* tipo D (antitoxina épsilon), presentes en pools de sueros de conejos vacunados con vacunas comerciales (de ovinos) multivalentes. A modo de simplificar las denominaciones a los ELISAs los llamaremos; ELISA Ct (*C. tetani*), ELISA CnB (*C. novy* tipo B), ELISA Cs (*C. septicum*) y ELISA CpD (*C. perfringens* tipo D).

Respecto al procedimiento de estos ELISAs, hubo tres puntos claves; la concentración de antígeno en solución, la temperatura de adsorción de este a la placa y las diluciones de los sueros a testear y las del suero de referencia.

En el ensayo para detectar la antitoxina de *C. tetani*, las placas se revistieron con una concentración de toxina en solución buffer fosfato de 5,9 µg/mL, en el ELISA CnB con una concentración de 1µg/mL y en el ELISA Cs y CpD con 2 µg/mL.

En cuanto a la temperatura de adsorción, para el primero fue a 37 °C mientras que para los restantes fue a 4 °C. (Wood, 1991)

Es importante destacar que la toxina épsilon de *C. perfringens* tipo D fue utilizada en forma de prototoxina altamente purificada (obtenida mediante proceso de centrifugación, concentración y dializaciones).

Referente a los sueros, las muestras de sueros a testear consistían en pools de sueros de 10 conejos siendo el suero de referencia de conejo preparado en el propio laboratorio.

En el ELISA Ct se aplicaron las mayores diluciones (en PBST) tanto del suero de referencia como del suero a testear (1/10000 a 1/320000 para el primero y hasta 1/5000 para el segundo); por otro lado, en el ELISA CpD se realizaron las menores diluciones (1/200 a 1/6400 para el suero de referencia y hasta 1/500 para el de testeo). En los restantes ensayos se utilizaron diluciones de 1/2000 hasta 1/32000 para la antitoxina de referencia y hasta 1/2000 para el pool de sueros.

Luego de agregar las diluciones de los sueros a los pocillos correspondientes (cada una por duplicado en la placa) y después de un período de incubación de una hora, se adicionó la anti IgG de conejo conjugada a peroxidasa (diluida en PBST).

Transcurrida una hora, se agregó el sustrato enzimático (Tetrametilbencidina en buffer conteniendo peróxido de hidrogeno) y se permitió que se desarrollara el color durante 15 minutos a temperatura ambiente, siendo la reacción luego detenida por la adición de ácido sulfúrico. La temperatura de incubación luego del agregado de los sueros y de la anti IgG conjugada fue de 37 °C, y posterior a adicionar cada nuevo reactivo, la placa se lavó tres veces con PBST.

La absorbancia del suero de referencia y de los sueros a testear fue medida a 450 nm en un espectrofotómetro relativa a una fila de pocillos blanco (todos los reactivos menos la solución de referencia y los sueros de prueba); la concentración de antitoxina de las muestras se determinó comparando la absorbancia de éstas con la de la curva estándar (potencia relativa). (Wood, 1991)

El objetivo de este proyecto fue proponer estos ensayos como alternativa a las pruebas de potencia in vivo, por lo que se estudió la reproducibilidad de cada ensayo y la correlación de los resultados obtenidos en estos con los arrojados en el MNT. En cuanto a la reproducibilidad de cada ELISA, se estudió la variabilidad intra ensayo (el mismo pool de sueros estudiado nueve o diez veces en el mismo ensayo) y la variabilidad inter ensayo (el mismo pool de sueros estudiado entre 10 y 15 veces en ensayos separados).

El rango normal de variación no debería exceder el 20 a 30%, y en esta investigación los resultados fueron muy buenos ya que el coeficiente de variación siempre se mantuvo por debajo del 10%. (Wood, 1991)

El estudio de correlación fue significativo para todos los ensayos y los resultados de los ELISAs correlacionaron bien (en forma positiva) con los resultados obtenidos el MNT.

Tabla XVI: Resumen de los coeficientes de correlación para los resultados de ELISA y MNT. (Extraído y adaptado de Wood, 1991)

	r	r ²
<i>Cl. septicum</i>	0.94	0.88
<i>Cl. tetani</i>	0.93	0.86
<i>Cl. novyi</i>	0.84	0.71
<i>Cl. perfringens</i> épsilon	0.93	0.87

r= coeficiente de correlación de Pearson.

r²= coeficiente de correlación de Pearson al cuadrado

Estos resultados concuerdan con el reporte de El –Helw y col. (2012), quienes utilizando el ELISA Cs encontraron una gran correlación entre los resultados obtenidos en éste con los del MNT.

Por otro lado, un estudio demostró que los niveles de antitoxina épsilon en suero de cobayos, medidos en un ELISA indirecto, fueron superiores a los valores obtenidos en el test de toxineutralización en ratones. (Buys y col., 2014)

Esto se debería a que los ELISAs, a diferencia de la prueba in vivo, no solo medirían anticuerpos protectivos, sino que también detectarían anticuerpos no protectivos que se unen a cualquier epítipo de la toxina. (Lima, 2009)

La modalidad de ELISA indirecto también se ha empleado para cuantificar los niveles de antitoxina C y D de *Clostridium botulinum*, así como los niveles de anticuerpos anti-*Clostridium chauvoei* post- vacunal.

Para el *C. botulinum*, se investigaron dos tipos de ELISAs (utilizando como antígeno la neurotoxina C o D purificada) para determinar el aumento en los niveles de anticuerpos en el suero de cobayos inmunizados con la vacuna monovalente C o D. (Ellis y col., 1999).

La concentración de anticuerpos específicos para la neurotoxina C, determinada con ELISA, fue correlacionada con los valores obtenidos en el MNT y se pudo demostrar una correlación aceptable para los dos ensayos ($r = 0,95$, para 27 sueros estudiados).

La correlación de los resultados obtenidos con el ELISA y el MNT para la medición de la concentración de anticuerpos para la neurotoxina D fue también aceptable ($r = 0.92$, para 75 sueros estudiados). Sin embargo, la determinación de los niveles de anticuerpos en el antisuero de cobayos, vacunados con la vacuna bivalente, resultó en valores falso - positivo y no se pudo correlacionar con los resultados del MNT; esto debido a la reacción cruzada de los anticuerpos para los antígenos C y D. (Ellis y col., 1999).

Respecto al *C. chauvoei*, si bien todavía no se han caracterizado bien los antígenos específicos protectores, se ha reportado que los antígenos celulares (antígeno flagelar y antígenos somáticos) y solubles parecen conferir inmunidad humoral frente a la vacunación y al desafío. (Hauer, 1997; Rivera, 2014).

Crichton y col. (1990) describieron un ELISA indirecto para medir la respuesta serológica a la vacunación en conejos. En este ensayo se utilizó como antígeno de fase sólida un extracto sonicado de la cepa CH4 de *C. chauvoei*, con la intención de incluir una mezcla de antígenos celulares y solubles.

El proceso de sonicación consistió en aplicar ultrasonido a la suspensión bacteriana para así generar la disrupción celular y la extracción de proteínas.

La repuesta serológica de los conejos a vacunas conteniendo *C. chauvoei* se comparó con un suero de referencia de 100 unidades arbitrarias (UA)/mL, determinando que un nivel de 50 UA/mL en el ELISA correspondía a un nivel aceptable en el test de desafío en cobayos.

Por otra parte, en otra investigación, se desarrolló un ELISA indirecto para cuantificar los anticuerpos específicos para el antígeno flagelar altamente purificado de *C. chauvoei* en conejos. En este ensayo se comparó la DO de un suero desconocido con la de un suero de referencia de varias diluciones, utilizando líneas paralelas para computar la potencia relativa. (Ferreira de Araujo, 2009)

Se estudiaron los sueros de conejos vacunados con *C. tetani*, *C. sordellii*, *C. perfringens* tipo C y D, *C. septicum*, *C. haemolyticum*, *C. novyi* y demostraron una reacción cruzada mínima (Obsérvese la **Figura 6**). Este test serológico demostró ser reproducible y sus resultados pudieron ser correlacionados con los obtenidos en el test de desafío en cobayos. (Hauer, 1997)

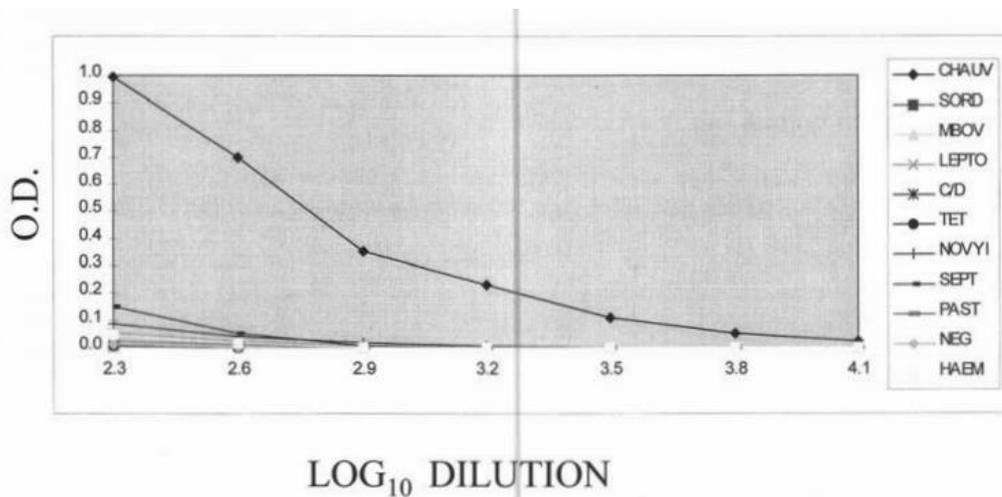


Figura 6: Especificidad del ELISA flagelar de *C. chauvoei*. (Extraído y adaptado de Hauer, 1997)

El ELISA indirecto también ha sido utilizado para medir la respuesta serológica en bovinos vacunados con vacunas conteniendo *C. chauvoei*, utilizando antígenos obtenidos por métodos de centrifugación, lavado, sonicación y tratamiento térmico. El ensayo indirecto demostró una alta sensibilidad (98,2 %), especificidad (91,4 %) y prevalencia (90 %) en la detección de anticuerpos vacunales. (Ferreira de Araujo, 2009; Rivera, 2014).

Si bien el proceso de sonicación y el tratamiento térmico han permitido obtener antígenos purificados de *C. chauvoei*, se ha reportado que el ELISA que utiliza este tipo de antígenos de fase sólida, no solo detecta anticuerpos contra *C. chauvoei*, sino que también detecta anticuerpos contra *C. septicum* y *C. perfringens*. (Hauer, 1997)

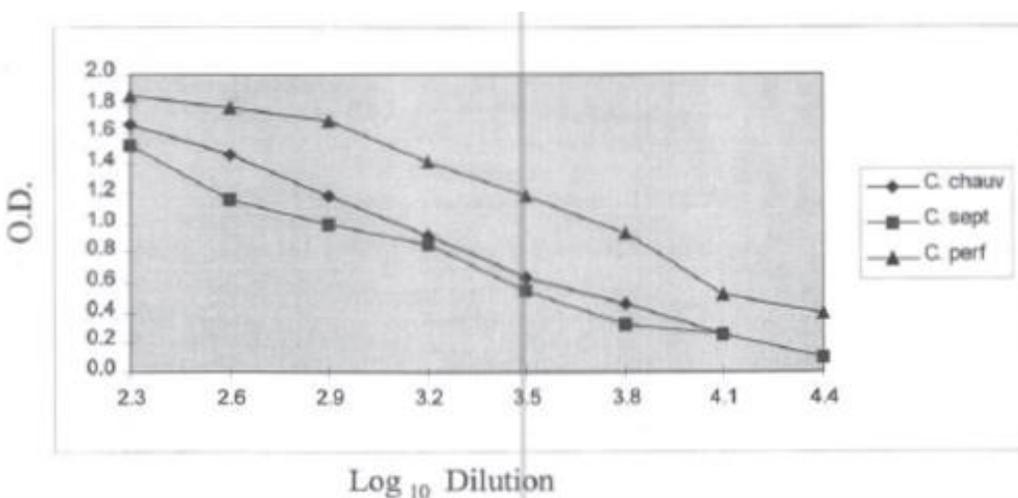


Figura 7: Especificidad de un ELISA de *C. chauvoei* a base de células sonicadas. (Extraído y adaptado de Hauer, 1997)

Como se observa en la **Figura 7**, la curva de DO vs Log₁₀ de la dilución del suero es similar en los tres casos (indicativo de reacción cruzada), lo cual muestra la baja especificidad del ensayo cuando se testean sueros de animales inmunizados con vacunas combinadas conteniendo: bacterinas de *C. chauvoei* y toxo/bacterinas de *C. septicum* y *C. perfringens* tipo C y D.

De esto se deduce que el ELISA indirecto a base del antígeno flagelar altamente purificado sería el más adecuado para detectar específicamente anticuerpos anti-flagelina de *C. chauvoei*; sin embargo, cabe aclarar, que en este test no se estarían considerando los anticuerpos anti- antígenos somáticos y anti antígenos solubles.

ELISA en sándwich.

El ELISA en sándwich es una modalidad que permite cuantificar antígenos entre dos capas de anticuerpos (anticuerpo de captura y de detección). El antígeno a ser medido debe contener al menos dos epítopes antigénicos (sitios de reconocimiento) capaces de unirse al anticuerpo, ya que dos anticuerpos actúan en el sándwich. (ELISA encyclopedia)

Si bien puede utilizarse solo el anticuerpo primario conjugado (ELISA en sándwich directo), el uso de un anticuerpo secundario conjugado (ELISA en sándwich indirecto) evita el costoso proceso de crear anticuerpos ligados para cada antígeno que se quiere detectar y además permite determinar niveles de anticuerpos en muestras.

Cabe destacar que el uso de anticuerpo específico purificado para unir el antígeno al pocillo de plástico, evita la necesidad de purificar el antígeno a partir de mezclas complejas, lo que simplifica el ensayo y aumenta la sensibilidad y especificidad (dos a cinco veces más sensible que el ELISA directo e indirecto). (ELISA encyclopedia)

Este formato permite el uso de anticuerpos monoclonales (AcMc) y/o policlonales (AcPc) tanto en la captura como en la detección. La principal diferencia entre los dos anticuerpos radica en la afinidad y especificidad que presentan para un antígeno definido y en la forma en que se producen. Los AcMc son inmunoglobulinas homogéneas secretadas por un solo clon o línea de linfocitos B, y sus reacciones con el antígeno definido son siempre las mismas (alta afinidad y especificidad). Para obtener los AcMc se necesita la unión de dos células (por medios físicos y químicos); un linfocito B de un animal (en general el ratón) previamente inmunizado con el antígeno específico, el cual aporta la capacidad de producir anticuerpos contra dicho antígeno, y una segunda célula tumoral de mieloma no secretora de anticuerpos que aporta la capacidad de división ilimitada (inmortalidad). De esta fusión se obtiene una mezcla heterogénea de células, y con un medio selectivo se seleccionan las células fusionadas que producen anticuerpos y proliferan indefinidamente, o sea los hibridomas. Los mismos se propagan como clones individuales, de manera que cada uno de ellos sirve como una fuente estable y permanente de un AcMc, el cual reconoce un único epítipo antigénico. (Gonzales; Machado y col., 2006; Segretín).

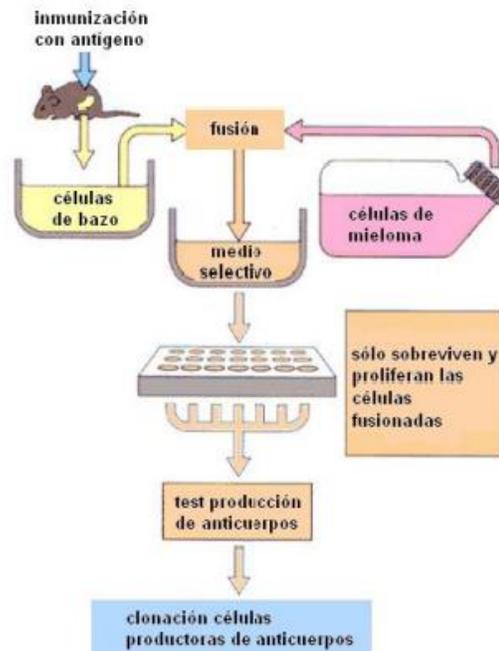


Figura 8: Preparación de hibridomas que secretan AcMc contra un antígeno en particular. *El medio de cultivo selectivo utilizado luego de la fusión celular contiene un inhibidor que bloquea las rutas de síntesis de ácidos nucleicos; solo los hibridomas sobreviven ya que pueden utilizar una vía alternativa de síntesis.* (Extraído y adaptado de Segretín).

Los AcPc, a diferencia de los AcMc, consisten en una mezcla de distintas variedades de anticuerpos producidos por distintas líneas de células B.

En los ensayos inmunológicos (reacción antígeno – anticuerpo) se requiere solo la reacción de un solo tipo de anticuerpo, por lo que en los sueros policlonales, los anticuerpos restantes vendrían a resultar en interferentes de la reacción, debido principalmente a que disminuyen la especificidad y la afinidad del anticuerpo reaccionante. (Gonzales)

En cuanto a la producción de los AcPc, básicamente se obtienen inmunizando un animal con el antígeno determinado y extrayendo luego el suero policlonal. Es importante destacar que una vez que el animal inmunizado muere, y se procede a una nueva inmunización, ésta precisa ser re estandarizada en todos los pasos que sean necesarios, con el objetivo de obtener un suero policlonal que reúna características semejantes al producido anteriormente. (Gonzales)

Dentro de los productos más estudiados utilizando el formato de ELISA en sándwich se encuentran las vacunas contra *Leptospiras*, destacándose la investigación realizada por Ruby (1999), quien logró implementar cuatro ELISAs en sándwich basados en AcMc que miden la potencia relativa de las bacterinas de los *serovares pomona, canicola, icterohaemorrhagiae* y *grippotyphosa*.

Brevemente, en el ELISA, los pocillos se sensibilizaron con un suero policlonal de conejo (anticuerpos de captura) cuya dilución fue de 1/100.

Luego de agregar el antígeno a capturar (la bacteria específica) en sus diluciones correspondientes (seriadas en base 2, comenzando en 1/2), se adicionó el AcMc en la dilución determinada:

- a) AcMc IgA para *L. pomona*: 1/4000
- b) AcMc IgM para *L. canicola*: 1/14000
- c) AcMc IgG para *L. Icterohaemorrhagiae*: 1/9000
- d) AcMc IgM para *L. grippotyphosa*: 1/4000

Como anticuerpo detector se utilizó un conjugado de cabra anti Ig de ratón diluido 1/2000.

La detección de la DO se realizó en un lector de ELISA y se comparó con la DO del ELISA de la bacterina de referencia, computando la potencia relativa por método de líneas paralelas. Cualquier bacterina produciendo una potencia relativa igual o mayor a 1.0 se consideró satisfactoria. (Hickey, 1999; Ruby, 1999)

Si bien estos ELISAs han demostrado ser sensibles, específicos, dosis dependientes y correlacionarse con el test de desafío en hámsters, es importante puntualizar que las bacterinas estudiadas consistieron en formulaciones monovalentes.

Debido a que los fabricantes, en general, producen vacunas multivalentes, fue necesario determinar la "performance" de esta modalidad de ELISA a la hora de cuantificar una bacterina específica incluida en una mezcla. La prueba consistió en evaluar si el ELISA en sándwich a base de AcMc era capaz de cuantificar, en una mezcla de bacterinas, las bacterinas de *L. pomona* sin mostrar reacción cruzada con otros serovares.

Los resultados fueron desalentadores ya que el antisuero de conejo (suero policlonal de captura), el cual parecía ser altamente específico para *L. pomona* (título aglutinante en MAT igual o mayor a 1/102400), no solo capturó el antígeno de *L. pomona*, sino que también reaccionó con el antígeno de *L. grippotyphosa*, inclusive utilizando altas diluciones del suero (1/100000). (Coe & Hauer, 2005)

Al capturar antígenos de *L. grippotyphosa*, menos bacterinas de *L. pomona* unidas, menos AcMc reaccionando con éstas y por tanto disminución de la detección (disminución de los valores de DO). Uno puede deducir que, al tratarse de un problema de especificidad, éste podría solucionarse utilizando el AcMc como anticuerpo de captura; con esta metodología el antígeno específico sería atrapado ávidamente y específicamente por el AcMc y luego los antígenos de los otros serovares se removerían por lavado, para posteriormente agregar el suero policlonal.

El ensayo en sándwich también ha sido útil para medir niveles de anticuerpos en suero, más específicamente, para medir los niveles de antitoxina beta en el suero de conejos vacunados con varias vacunas conteniendo toxoide beta (ELISA de captura de conejo). (Ebert y col., 1999)

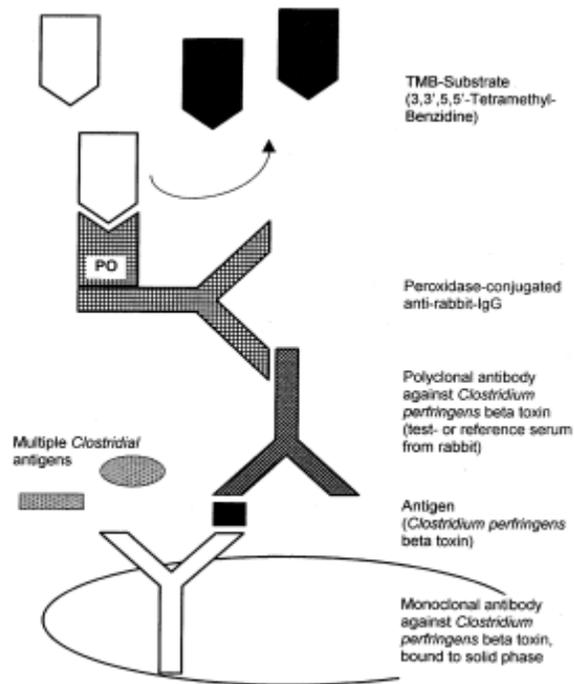


Figura 9: Esquema del ELISA en sándwich indirecto. (Extraído y adaptado de Ebert y col., 1999)

En lo que refiere al procedimiento del ensayo, para cubrir las placas de microtitulación se usó un AcMc específico (3A6) en una concentración de 0,19 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Dicho AcMc fue producido por células hibridomas y demostró neutralizar la toxina beta.

Posteriormente, se agregó el sobrenadante no purificado de un cultivo de *C. perfringens* conteniendo la toxina beta (concentración proteica de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y luego se añadió el suero de conejo (pool) a testear y el suero de referencia.

La detección se llevó a cabo con un conjugado de peroxidasa anti IgG de conejo y los valores de DO fueron medidos en un lector de ELISA, utilizando el método de líneas paralelas para computar la potencia relativa al suero de referencia (Ebert y col., 1999)

Cabe destacar que todos los reactivos se agregaron en un volumen de 100 μL por pocillo, realizando diluciones seriadas base 2 tanto del suero a testear como del de referencia.

Esquema 4: Placa de ELISA en sándwich mostrando las diluciones correspondientes. S1, S2, S3 (sueros de testeo); SR (suero de referencia); C - (suero de conejo negativo); CB (control buffer de dilución)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1 1/2	S1 1/2	S1 1/2	<u>S2</u> 1/2	<u>S2</u> 1/2	<u>S2</u> 1/2	S3 1/2	S3 1/2	S3 1/2	SR 1/2	SR 1/2	SR 1/2
B	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4
C	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8
D	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16
E	1/32	1/32	1/32	1/32	1/32	1/32	1/32	1/32	1/32	1/32	1/32	1/32
F	1/64	1/64	1/64	1/64	1/64	1/64	1/64	1/64	1/64	1/64	1/64	1/64
G	1/128	1/128	1/128	1/128	1/128	1/128	1/128	1/128	1/128	1/128	1/128	1/128
H	C -	C -	C -	C -	C -	C -	CB	CB	CB	CB	CB	CB

Se estudiaron 346 pools de sueros de conejos en este ELISA, determinando la especificidad, reproducibilidad del ensayo y la correlación de los resultados obtenidos en este con los del MNT.

En lo que refiere a la especificidad, se evaluaron sueros de animales inmunizados contra *C. chauvoei* y *C. perfringens* tipo C o D, y solo los animales vacunados con vacunas conteniendo toxoide beta mostraron niveles significativos de antitoxina beta; esto muestra que este test fue altamente específico para detectar la antitoxina beta en el suero de conejos. (Ebert y col., 1999)

La correlación entre los resultados del MNT y el ELISA fue alta (88 %) y significativa, como lo muestra la siguiente figura:

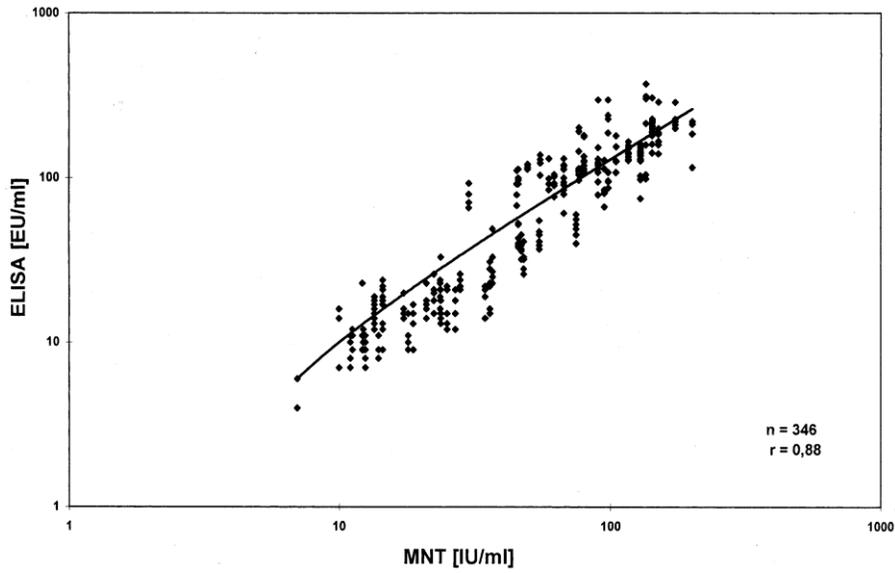


Figura 10: Estudio de correlación entre el ELISA y MNT para la determinación del nivel de anticuerpos contra toxoide beta en el suero de conejos. (Extraído y adaptado de Ebert y col., 1999)

En cuanto a la reproducibilidad del ensayo, se determinó repitiendo el ensayo de 5 a 10 veces. El coeficiente de variación intra-ensayo se ubicó siempre entre 1 y 2 % y el coeficiente de variación inter ensayo fue de 4 a 28 %, resultados que son satisfactorios según la literatura. (Ebert y col., 1999)

Esta investigación también incluyó un estudio inter laboratorios con la finalidad de pre validar el ensayo de captura, demostrando la transferibilidad y reproducibilidad entre las firmas participantes, lo que hace a este ELISA un método alternativo a la prueba in vivo (MNT).

ELISA competitivo.

El evento principal en este tipo de ELISA es el proceso de competición de unión que se da entre el antígeno/anticuerpo presente en una muestra y el antígeno/anticuerpo adicionado; cuanto mayor sea la concentración del antígeno/anticuerpo en la muestra la señal desarrollada será más débil. (ELISA encyclopedia)

Las principales ventajas del ELISA competitivo son que presenta alta especificidad, sensibilidad y además es adecuado para mezclas complejas (no se requiere purificación).

En el año 2003, en un estudio que incluyó a varios laboratorios a nivel internacional, se logró validar un ELISA competitivo estandarizado a base de AcMc específico, que permite cuantificar la antitoxina épsilon en sueros de conejos vacunados con productos conteniendo toxoide épsilon. (Roskopf-Streicher y col., 2003)

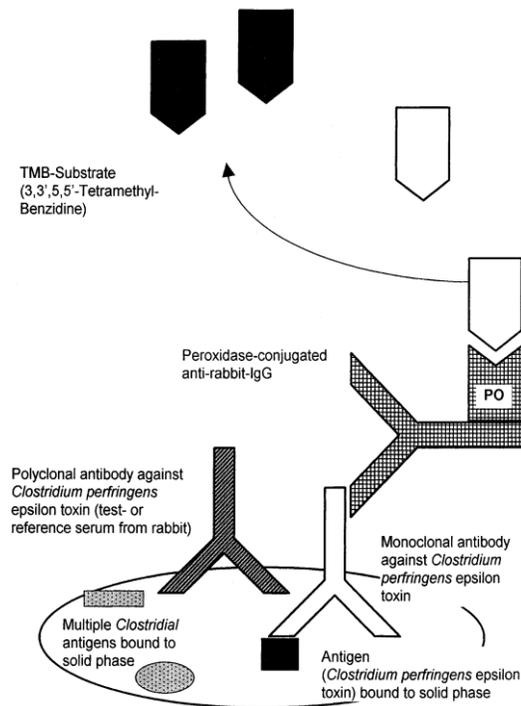


Figura 11: Principio de un ELISA competitivo indirecto. (Extraído y adaptado de Ebert y col., 1999)

En el procedimiento del ELISA competitivo, los pocillos de una placa (de 96 pocillos) fueron revestidos con una concentración de toxina épsilon de 0,02 μg . Luego se adicionaron los sueros a testear (pooles), el suero de referencia y se procedió a llevar a cabo diluciones seriadas en base 2. Después de una etapa de pre incubación, se agregó el AcMc 5B7 contra la toxina épsilon (en una concentración de 0,008 μg) para competir con el suero policlonal a ser testado. Posteriormente se adicionó el anticuerpo de cabra anti IgG de ratón conjugado a peroxidasa para unirse al AcMc. La reacción fue visualizada al agregar el sustrato de la peroxidasa (peróxido de hidrógeno/tetrametilbencidina). Los reactivos se adicionaron en cada pocillo en un volumen de 100 μL y los controles incluidos en las placas fueron un suero positivo, un suero negativo y un control del conjugado. Los valores de DO de las muestras de suero se compararon con los del suero de referencia (antisuero de clostridios de conejo BRP lote 1).

Es importante resaltar que la parte lineal de la curva estándar se encontró desde la dilución 1/16 a 1/128, por lo tanto, se usó este rango para calcular las potencias relativas (método de líneas paralelas). La linealidad indica que los títulos del ELISA son directamente proporcionales a la cantidad de anticuerpos en las muestras de suero (a mayor valor de DO, menor cantidad de anticuerpos en la muestra y viceversa). (Ebert y col., 1999; Roskopf-Streicher y col., 2003)

Esquema 5: Placa de un ELISA competitivo mostrando las diluciones correspondientes. (Se resalta el rango utilizado para la curva de titulación). S1, S2, S3 (sueros de testeo); SR (suero de referencia); C - (suero de conejo negativo); C + (suero de conejo positivo); Cc (control de conjugado)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1 1/2	S1 1/2	S1 1/2	<u>S2</u> 1/2	<u>S2</u> 1/2	<u>S2</u> 1/2	S3 1/2	S3 1/2	S3 1/2	SR 1/2	SR 1/2	SR 1/2
B	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4
C	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8
D	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16
E	1/32	1/32	1/32	1/32	1/32	1/32	1/32	1/32	1/32	1/32	1/32	1/32
F	1/64	1/64	1/64	1/64	1/64	1/64	1/64	1/64	1/64	1/64	1/64	1/64
G	1/128	1/128	1/128	1/128	1/128	1/128	1/128	1/128	1/128	1/128	1/128	1/128
H	C -	C -	C -	C -	C +	C +	C+	C+	Cc	Cc	Cc	Cc

Si bien este ensayo ya había sido pre validado (inter laboratorios), demostrando ser específico y correlacionarse con el ensayo in vivo, para ser validado necesitaba algunas modificaciones en el protocolo; esto incluyó el uso de un suero de referencia internacional, como es el caso del antisuero de clostridios de conejo (multicomponente) BRP lote 1 (estandarizado en 11 UI/mL de antitoxina épsilon), con el cual comparar la potencia de los sueros a testear. (Roskopf-Streicher y col., 2004)

Como todo ELISA basado en AcMc, uno de los factores claves es el AcMc, el cual debe ser altamente específico.

Para evaluar tal condición, se estudió el sobrenadante del cultivo de células hibridomas (productoras de AcMc 5B7) y el mismo, probado en diluciones especificadas, mostró neutralizar los efectos de la toxina épsilon tanto en cultivo celular (células MDCK) como en el test de desafío en ratones. (Roskopf-Streicher y col., 2004)

Como se dijo anteriormente, el objetivo de este estudio fue validar este ensayo, por lo que se probó la reproducibilidad entre diferentes laboratorios a nivel internacional. El test demostró buena reproducibilidad entre los mismos, ya que los resultados de potencia para los sueros a testear fueron muy similares entre los participantes, todos encontrándose por encima del mínimo exigido (5,0 UI/mL según la BP).

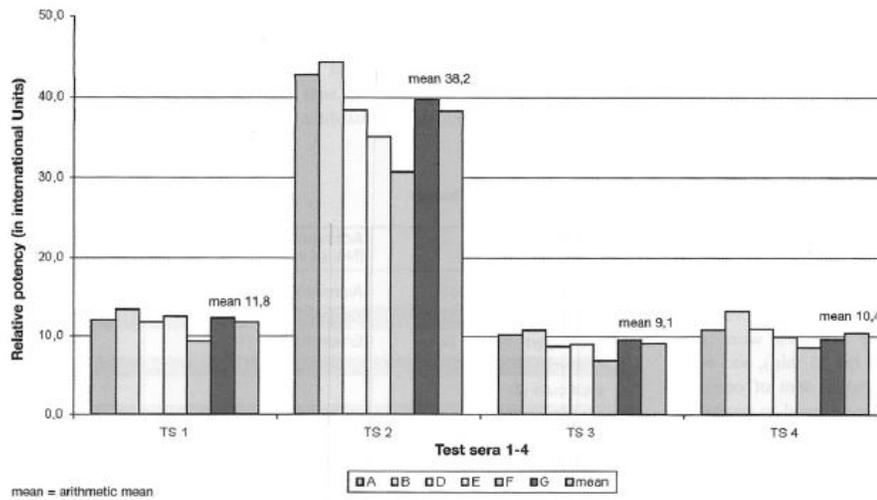


Figura 12: Valores de potencia relativa calculados para cada suero a testear, representando el valor medio de cuatro mediciones realizadas en cada laboratorio. (Extraído y adaptado de Roskopf-Streicher y col., 2004)

Este estudio confirmó la transferibilidad y reproducibilidad del ELISA competitivo, y por tanto la aplicabilidad en testear lotes de vacunas por su contenido de toxoide épsilon, ofreciendo una opción para sustituir el uso rutinario del test in vivo (MNT).

Tabla XVII: ELISAs estudiados para probar la potencia de vacunas anti-clostridiosis y anti-leptospirosis. Se detallan las muestras analizadas, las vacunas aplicadas, los Ag/Ac específicos usados y la correlación encontrada con la respectiva prueba in vivo.

ELISA indirecto	Muestras	Ag¹/Ac²	ELISA vs. Test in vivo
<i>C. tetani</i>	Sueros de conejos (Vp ⁶)	Fase sólida: toxina (purificada)	r ⁵ = 0,93 (93%)
<i>C. novyi B (α)</i>			r= 0,84 (84%)
<i>C. septicum (α)</i>			r= 0,94 (94%)
<i>C. perfringens D (ε)</i>			r= 0,93 (93%)
<i>C. botulinum C</i>	Sueros de cobayos (Vm ⁷)	Fase sólida: toxina (purificada)	r= 0,95 (95%)
<i>C. botulinum D</i>			r= 0,92 (92%)
<i>C. chauvoei</i>	Sueros de conejos (Vp)	Fase sólida: Ag flagelar (purificado)	Buena correlación
ELISA sándwich	Muestras	Ag/Ac	ELISA vs. Test in vivo
Leptospiras	Bacterinas (Vm)	Fase sólida: AcPc ³ de captura	Buena correlación
<i>LSP, LSC, LSI, LSG</i>		AcMc ⁴ detector 1°	
Clostridium	Sueros de conejos (Vp)	Fase sólida: AcMc (3A6)	r= 0,88 (88%)
<i>C. perfringens (β)</i>		Ag: toxina + otros Ag	
ELISA competitivo	Muestras	Ag/ Ac	ELISA vs. Test in vivo
<i>C. perfringens (ε)</i>	Sueros de conejos (Vp)	Ag: toxina + otros Ag	Buena correlación (validado)
		AcMc (5B7) competitivo	

Ag¹= antígeno (s). Ac²= anticuerpo (s). AcPc³ = anticuerpo (s) policlonal (es). AcMc⁴= anticuerpo (s) monoclonal (es). r⁵= coeficiente de correlación de Pearson. Vp⁶= vacunas polivalentes. Vm⁷= vacunas monovalentes.

2) *Toxin-binding-inhibition test (ToBI test)*

El test de inhibición de unión de la toxina (toxin binding inhibition test -ToBI test-), es una técnica *in vitro* que consiste en evaluar (cuantitativamente) la capacidad que tiene el suero de un animal inmunizado de neutralizar la toxina específica, y, por tanto, inhibir la unión a la antitoxina adsorbida en los pocillos de una placa de microtitulación.

El procedimiento consta entonces, de la realización de una seroneutralización seguida de un ELISA el cual detecta la toxina libre en las mezclas de suero-toxina. (Souza Matos y col., 2002; Sobrinho y col., 2011)

Este test fue desarrollado por Hendriksen (1988) en primera instancia para determinar los títulos de antitoxina contra las toxinas tetánica y diftérica en el suero de humanos.

Posteriormente, el mismo lo utilizó para determinar la potencia de las vacunas conteniendo toxoide tetánico y/o diftérico, siendo hoy en día una técnica validada internacionalmente para probar productos a base de dichos componentes.

En cuanto al protocolo de la técnica, como se mencionó anteriormente, consta de dos etapas definidas, en primer lugar, se lleva a cabo una seroneutralización y luego un ELISA.

La seroneutralización se realiza en una placa de microtitulación (de fondo redondo) la cual, previo a agregar el suero a testear (pool de sueros) y la antitoxina estándar, se bloquea, para así evitar que los anticuerpos se adsorban a la placa. Después de una serie de lavados y de la adición del diluyente, se procede a diluir los pools de sueros, comenzando desde 1/2 hasta 1/1024 por duplicado (factor de dilución 2). En paralelo se diluye la antitoxina estándar para elaborar la curva estándar y en base a ella trazar los resultados de las muestras de sueros (potencia relativa). Luego de tener las diluciones correspondientes se agrega la toxina en todos los pocillos en la concentración especificada. (Souza Matos y col., 2002)

Los controles a colocar en la placa consisten por un lado en un control positivo (toxina y diluyente PBS, lo cual representa 100% de absorbancia) y un control negativo (PBS). La placa se somete a un período de incubación de una hora a 37 °C y luego toda la noche a 4 °C.

Por otro lado, se prepara la placa de microtitulación para el ELISA, la cual se sensibiliza con la antitoxina en la concentración especificada (ej.: 20 µg/mL en el caso de la antitoxina tetánica). Luego de permitir la adsorción de la antitoxina a los pocillos durante toda la noche (a 4 °C), se realiza un bloqueo para en una etapa posterior transferir las mezclas de suero diluido-toxina a los correspondientes pocillos. Después de un período de incubación de hora y media (a 37 °C) con posterior lavado, se agrega el anticuerpo anti-toxina conjugado a peroxidasa (ej.: IgG antitetánica de caballo conjugada) para unirse a la toxina libre. Al adicionar el sustrato de la peroxidasa se genera una reacción de color, indicativa de la unión entre la toxina y la antitoxina que reviste los pocillos. A mayor valor de absorbancia menor cantidad de anticuerpos neutralizantes y viceversa. (Souza Matos y col., 2002)

Cabe destacar que en los pocillos de las placas (en la seroneutralización y ELISA) se coloca un volumen de 100 µL de los reactivos (sueros, toxina, antitoxinas, mezcla suero diluido-toxina) y del diluyente.

Si bien esta técnica ha sido empleada en diversos estudios sobre potencia de toxoide tetánico destinado al uso humano, también ha sido utilizada para evaluar la potencia de vacunas veterinarias conteniendo toxoides alfa, beta y épsilon, mostrando en cada caso una correlación altamente significativa con el test in vivo. (Souza Matos y col., 2002; Sobrinho y col., 2011)

3) Prueba de Seroneutralización en cultivos celulares

El ensayo de neutralización en cultivo celular, es una técnica que permite titular la actividad neutralizante de un suero frente a determinado agente patógeno, utilizando una línea celular que haya demostrado ser sensible y específica a los efectos de dicho agente. Esta prueba ha sido utilizada no solo para cuantificar los anticuerpos de animales inmunizados con el virus inactivado de la DVB y/o IBR, sino que también se ha estandarizado para titular antitoxinas específicas de determinadas especies de *Clostridium*.

En términos generales, el procedimiento para cuantificar antitoxinas consta en mezclar varias diluciones del suero a testear con una cantidad fija de la toxina en cuestión, para luego agregar un cultivo de células específicas las cuales indican la actividad de la toxina libre no neutralizada.

Neutralización en células VERO

La línea celular VERO, consiste en células renales de mono verde africano las cuales presentan un crecimiento continuo (línea continua). Estas células normalmente se cultivan utilizando medio esencial mínimo (MEM) (aporta aminoácidos, glucosa, vitaminas) suplementado con suero fetal bovino, antibióticos (ej.: penicilina, estreptomycin, gentamicina), glutamina y antifúngicos. La temperatura de incubación es de 37 °C y se realiza en estufa húmeda con atmósfera controlada (95% de O₂ y 5% de CO₂). (Borman & Schulze, 1997, 1999; Lima, 2009; Salvarani y col., 2010)

Este sistema celular ha demostrado ser altamente sensible a los efectos de la toxina alfa de *C. septicum* y a la toxina alfa de *C. novyi* tipo B, siendo capaz de detectar concentraciones 1140 y 3,45 veces menor que las detectada por el bioensayo en ratones respectivamente. (Lima, 2009; Salvarani y col., 2010)

En cuanto al *C. novyi* tipo B, Lima (2009) estandarizó un test de seroneutralización en cultivo de células VERO para evaluar la potencia del toxoide alfa. En esta investigación se estudiaron sueros de ovinos, caprinos y conejos vacunados con vacunas comerciales conteniendo toxoide alfa de *C. novyi* tipo B, determinando para cada especie, una alta correlación (98,38%) entre los títulos de anticuerpos obtenidos en el MNT y en cultivo celular.

Para realizar la titulación de anticuerpos en cultivo celular se utilizó una placa de 96 pocillos, en la cual se realizaron diluciones seriadas (factor de dilución 2) de los sueros a testear en MEM, con cuatro replicas para cada dilución (volumen final de 50 µL por pocillo).

Luego se agregaron 50 μL de toxina estandarizada en un nivel de test L +/200 (la menor concentración de toxina que, mezclada con 0,005 UI de antitoxina estándar homóloga, produce el 80 a 90% de efecto citopático). Luego de incubar la placa una hora a 37 °C en estufa húmeda con 5% de CO_2 , se adicionó la suspensión celular conteniendo $2,5 \times 10^4$ células en 50 μL . Las placas fueron incubadas en las mismas condiciones anteriormente mencionadas y la lectura realizada a las 48 hs.

Para llevar a cabo la lectura se descartó el sobrenadante y las placas fueron coloreadas con una solución de cristal violeta; posteriormente el colorante se eliminó y las placas se lavaron dos veces con PBS.

Los títulos de los sueros se determinaron como la primera dilución de los mismos que resulto en 80 a 90% de efecto citopático de la monocapa celular (células redondas y retraídas).

En este procedimiento se incluyó un control negativo (suspensión de células y MEM), un control positivo (toxina, MEM y células) y un control de sueros (suero puro, MEM, suspensión celular).

Respecto a la técnica de tinción, cabe destacar la existencia de otro colorante, el MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5 difenil brometo de tetrazolina) el cual detecta células metabólicamente activas indicando la viabilidad celular. Bormann & Schulze (1997) utilizaron esta metodología midiendo la DO del color desarrollado en un lector de ELISA, y en función de los valores obtenidos determinaron el porcentaje de células viables.

A diferencia de esta técnica, que, si bien es muy precisa, la tinción con cristal violeta es más rápida y práctica, permitiendo una lectura visual sin la necesidad de un lector de ELISA. (Lima, 2009)

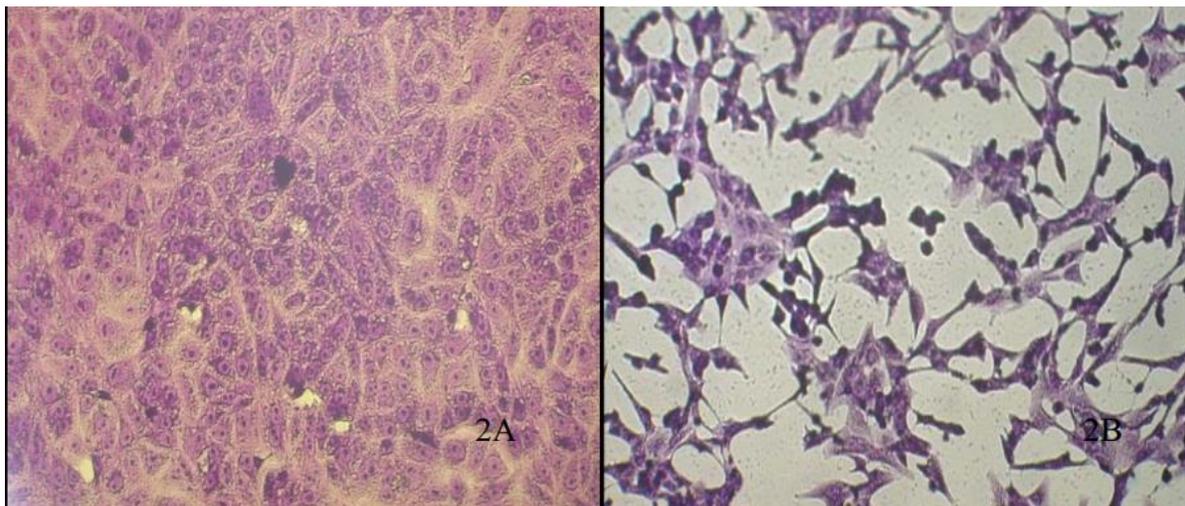


Figura 13: Tinción con cristal violeta de la monocapa de células VERO. 2A: células VERO en monocapa íntegra (control celular). 2B: células VERO en presencia de toxina alfa de *C. novyi* tipo B, mostrando retracción y redondamiento. (Extraído y adaptado de Lima, 2009)

Para el *C. septicum* también se desarrolló un test de seroneutralización en células VERO, en el cual se estudiaron 11 pools de sueros de conejos vacunados con distintas vacunas comerciales conteniendo toxoide alfa de *C. septicum*. (Salvarani y col., 2010).

El protocolo estandarizado es básicamente el mismo que el descrito para determinar los títulos de antitoxina alfa de *C. novy* tipo B, con la particularidad de que: la toxina alfa se estandarizó en un nivel de L+/25 (la menor cantidad de toxina que, al ser mezclada con 0,04 UI de antitoxina estándar homóloga, produce el 100% de destrucción de la monocapa), y los sueros se titularon como la primera dilución que provocó la destrucción del 100% de la monocapa.

La toxina alfa del *C. septicum*, a diferencia de la toxina alfa de *C. novy* tipo B, produce lisis osmótica y por lo tanto se evalúa la muerte celular.

Los títulos observados durante la seroneutralización in vivo e in vitro tuvieron una correlación de 99,12%, resultado superior al obtenido previamente por Knight (1990), el cual se ubicó en el 91%. (Salvarani y col., 2010)

Neutralización en células MDCK

Las células epiteliales de riñón de perro Madin - Darby (MDCK por su sigla en inglés) constituyen una línea celular de crecimiento continuo, la cual ha demostrado ser un indicador específico y sensible a los efectos citotóxicos de la toxina épsilon; de hecho, la sensibilidad de estas células es tan alta que, al contacto con bajas concentraciones de dicha toxina, las mismas presentan alteraciones morfológicas como ser células retraídas, redondeadas al lado de células intactas y lisadas. (Bormann & Schulze, 1997; Lima, 2009).

Para el cultivo de estas células se utiliza el mismo medio y condiciones de incubación que para cultivar las células VERO, pero en este caso debe adicionarse aminoácidos no esenciales.

En el año 2013, en un proyecto presentado por Salvarani y col., se estandarizó un test in vitro de seroneutralización a base de células MDCK para evaluar la potencia del toxoide épsilon del *C. perfringens* tipo D; también fue analizada la correlación estadística entre los resultados del test in vitro y la seroneutralización in vivo, obteniendo una correlación de un 99,73 %.

En este estudio se testearon 6 pools de sueros de conejos vacunados con vacunas conteniendo toxoide épsilon. El protocolo fue en esencia el mismo que el de los test descritos anteriormente, con la excepción de que para este ensayo la toxina épsilon fue estandarizada en el nivel L+/50 (mínima concentración de toxina que, al mezclarse con 0,02 UI de la antitoxina homóloga, produce efecto citopático en el 70 % de la monocapa celular). Los títulos de los sueros se calcularon como la mayor dilución que resultó en el 70% de destrucción de la monocapa. (Salvarani y col., 2013)

Tabla XVIII: Tipos de líneas celulares utilizadas para probar la potencia de toxoides/ toxo-bacterinas de *C. novyi B*, *C. septicum* y *C. perfringens D*.

Células VERO	Muestras	Toxina	Lectura	Neutralización celular vs. Test in vivo
<i>C. novyi B</i>	Sueros: ovinos, caprinos y conejos	(α) L+/200	Efecto citopático	$r^2= 0,9838$ (98,38 %)
<i>C. septicum</i>	Sueros de conejos	(α) L+/25	Efecto citopático	$r= 0,9912$ (99,12%)
Células MDCK	Muestras	Toxina	Lectura	Neutralización celular vs. Test in vivo
<i>C. perfringens D</i>	Sueros de conejos	(ϵ) L+/50	Efecto citopático	$r= 0,9973$ (99,73%)

r^2 = coeficiente de correlación de Pearson

4) Test de inhibición del crecimiento in vitro (TICIV)

La prueba de inhibición del crecimiento in vitro (TICIV), es una técnica desarrollada para determinar la potencia de las vacunas antileptospirosis, por la cual se evalúa los niveles de anticuerpos neutralizantes protectores (IgG) presentes en el suero sanguíneo de animales vacunados.

El test fue descrito por Tripathy (1973) y ha sido aplicado al suero de varias especies animales (conejos, bovinos, suinos, búfalos, hámsters y caninos), en todos los casos demostrando ser una prueba serológica alternativa al test de desafío en hámsters.

(Soto y col., 2008; de Nardi y col., 2010; Gonçalves y col., 2013; Rodrigues y col., 2013)

Para llevar a cabo el TICIV, en primer lugar, se recolectan los sueros de los animales vacunados para analizarlos en forma individual o bien constituyendo un pool (mezcla). Posteriormente el suero individual o el pool de sueros, se somete a un test de esterilidad, cultivándolo en medio TSB (caldo digerido de soja y caseína) a 37 °C durante 24 a 48 hs (se evalúa que no esté contaminado con bacterias saprófitas). Luego de constatada la esterilidad, los sueros se someten a un proceso de inactivación a 56 °C por 30 minutos en baño maría, quedando listos para aplicarles las diluciones correspondientes.

El pool de sueros o suero individual es diluido en PBS, utilizando diluciones seriadas con factor de dilución 2 (ej.: desde 1/2 hasta 1/32). Para cada dilución se utilizan 5 repeticiones en tubos ensayos conteniendo: 2,5 mL de medio líquido EMJH (Ellinghausen-McCulloch-Johnson- Harris), 0,2 mL de suero a ser testado y 0,1 mL de un cultivo de *Leptospiras vivas* (con 7 a 10 días de cultivo en medio EMJH). Los tubos son incubados a una temperatura de 30 °C por 10 días. Se incluyen normalmente 3 grupos de controles (de 25 tubos cada uno); el control de antígeno (2,5 mL de medio EMJH y 0,1 mL del cultivo de *Leptospiras vivas*), el control de buffer (2,5 mL de medio EMJH, 0,2 mL de solución buffer fosfato y 0,1 mL de cultivo de leptospiras vivas) y el

control de medio (solamente 2,5 mL de medio EMJH). (de Nardi y col., 2010; Gonçalves, 2012; Gonçalves y col., 2013; Rodrigues y col., 2013)

La lectura se realiza al décimo día del ensayo, y según los distintos protocolos, se puede realizar solo por el método macroscópico o bien por el método macro y microscópico. En el método macroscópico, se toma una escala de turbidez de 0 a 4, en donde los tubos que no presentan turbidez o alcanzan un valor máximo de 2 se consideran positivos para anticuerpos neutralizantes (inhibidores del crecimiento). Por su parte los tubos que muestran turbidez o un crecimiento en la escala de 3 a 4, se consideran negativos para anticuerpos inhibidores del crecimiento.

Cuando se utiliza el método macro y microscópico, los tubos en que no se observa turbidez a simple vista y con menos de 10 leptospiras por campo (aumento de 100 a 120X) en microscopía de campo oscuro, se consideran positivos a la inhibición de crecimiento.

El título final siempre se calcula como la mayor dilución del suero que produce resultado positivo (inhibición del crecimiento) en el 50 % de los tubos (calculado por método de Reed-Muench), expresando los resultados en \log_{10} . (de Nardi y col., 2010; Gonçalves, 2012; Gonçalves y col., 2013; Rodrigues y col., 2013)

En cuanto a cómo se relacionan los resultados obtenidos en el TICIV con los generados en el test de desafío, Gonçalves y col. (2013) estudiaron el desempeño de 2 bacterinas anti leptospirosis comerciales (A y B) en hámsters, determinando que un título igual o mayor a $0,77 \log_{10}$ (para *serovares canicola* y *pomona*) en el test in vitro corresponden a un nivel de aprobación en el test de desafío en hámsters.

Una investigación similar fue llevada a cabo en suinos, en donde se estableció que una bacteria de la estirpe *L. pomona* induciendo títulos de anticuerpos iguales o mayores a $0,87 \log_{10}$ e iguales o mayores a $1,22 \log_{10}$, en suinos adultos y lechones respectivamente, corresponde a una vacuna que aprueba el test de desafío en hámsters. (Gonçalves, 2012)

Tabla XIX: Bacterinas de *Leptospira pomona* y *canicola* en prueba de TICIV. Se detallan las muestras analizadas y la relación con la prueba in vivo.

TICIV	Muestras	Resultado en TICIV vs. resultado en test in vivo
<i>L.pomona</i>	Sueros de hámsters	$0,77 \log_{10}$ / aprobación
	Sueros de lechones	$1,22 \log_{10}$ / aprobación
	Sueros de suinos adultos	$0,87 \log_{10}$ /aprobación
<i>L. canicola</i>	Sueros de hámsters	$0,77 \log_{10}$ /aprobación

5) Test de seroaglutinación

El principio de esta prueba radica en la detección de anticuerpos aglutinantes en muestras de suero de animales, en donde la reacción antígeno- anticuerpo produce un fenómeno de aglutinación.

Esta metodología ha sido utilizada para medir anticuerpos en bovinos vacunados contra *C. chauvoei*. La técnica fue validada con la prueba de desafío en cobayos y se observó que cuando 0,5 µL o menos de suero problema aglutinan un antígeno estandarizado, como el antígeno flagelar de *C. chauvoei*, indica 100% de protección. (Bermúdez y col., 2013)

El procedimiento, según la literatura, consiste en mezclar en una placa de vidrio diferentes volúmenes de suero frente a 50 µL de antígeno patrón. La mezcla suero-antígeno se logra realizando unos 15 movimientos circulares (con espátulas descartables). Luego de incubar la placa a temperatura ambiente en caja oscura de Huddleson (durante 10 minutos) se realizan 30 movimientos de la placa. La lectura se realiza en un aglutinoscopio con luz indirecta (observación macroscópica).

(Ferreira de Araujo, 2009; Bermúdez y col., 2013)

Tabla XX. Procedimiento de dilución del suero para un test de aglutinación en placa. (Extraído y adaptado de Bermúdez y col., 2013)

Dilución del suero	Volúmen (µL) de suero			
No diluído	40	20	10	5
1/10	4	2	1	0,5
1/100	0,4	0,2	0,1	0,05
1/1000	0,04	0,02	0,01	0,005

La aglutinación, comparada a un control negativo, se considera positiva cuando existe una clara aglutinación (grumos) periférica y central en la mezcla suero-antígeno; la reacción es negativa cuando no se detectan grumos o bien hay solo grumos a nivel central (indica auto aglutinación bacteriana). El título del suero se determina como el mínimo volumen que aglutina 50 µL de antígeno; una vacuna generando un título menor o igual a 0.5 µL se considera aprobada en su potencia. (Ferreira de Araujo, 2009; Bermúdez y col., 2013)

El título puede ser interpretado también utilizando el protocolo de brucelosis, como se indica en la siguiente tabla:

Tabla XXI. Interpretación del título para el test de aglutinación en placa. (Extraído y adaptado de Ferreira de Araujo, 2009)

Dilución/ volumen de suero	40 µL	20 µL	10 µL	5 µL
No diluído	25	50	100	200
1/10	250	500	1000	2000
1/100	2500	5000	10000	20000
1/1000	25000	50000	100000	200000

La técnica de aglutinación microscópica (MAT), ya mencionada en el ítem 4.2.3.2 punto 2, es la principal herramienta, según la OIE, en el diagnóstico serológico de leptospirosis. (OIE, 2014)

Actualmente se propone como un test alternativo para medir la potencia de vacunas destinadas a bovinos, mediante la medición de anticuerpos vacunales en el suero de cobayos inmunizados. En cuanto al procedimiento, se utilizan placas de microtitulación de 96 pocillos en donde se preparan las diluciones de los sueros (seriada base 2); posteriormente se agrega a cada pocillo antígenos vivos estandarizados de *Leptospira* y se incuba para que ocurra la reacción. La lectura se lleva a cabo en un microscopio de campo oscuro con la finalidad de visualizar la aglutinación. (Ebert y col., 1999a)

El título de cada muestra de suero se toma como la mayor dilución que produce por lo menos el 50 % de aglutinación, comparado con un control de antígenos.

Si bien es una metodología recomendada por la BP13, diversos estudios han demostrado que los niveles de anticuerpos protectivos neutralizantes no tienen correspondencia con los títulos de anticuerpos aglutinantes medidos por esta técnica. La ausencia de anticuerpos aglutinantes no significa la ausencia de protección, por esto es que se considera un método no fiable para evaluar la potencia de vacunas antileptospirosis. (Soto y col., 2008; de Nardi y col., 2010; Gonçalves y col., 2013)

4.2.5 Revisar la normativa vigente que rige el control de las vacunas en Uruguay y proceder a un análisis comparativo con las normativas internacionales y regionales.

El control de la calidad de las vacunas en Uruguay se rige por lo establecido en el capítulo II de la Legislación Sanitaria, referente a los productos veterinarios. Dentro de este capítulo se destacan las Resoluciones del MERCOSUR 11/93 y 39/96, las cuales hacen referencia a las exigencias que deben cumplir los establecimientos elaboradores de productos veterinarios en cuanto a: instalaciones, formulaciones de productos, comercialización, registro, calidad del producto final, entre otras. (Uruguay Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca)

Centrándonos en lo que respecta a la calidad del producto biológico ya terminado (listo para salir a la venta), ambas resoluciones establecen que dicho producto deberá ser sometido a pruebas de esterilidad, inocuidad, pureza, eficacia/potencia según lo reglamentado para cada tipo y característica de producto, tomando como referencia normas de calidad del Código Federal de Regulaciones de EE. UU (CFR), de la Farmacopea Británica (BP), de la Farmacopea Europea (EP), de la OMS y de la OIE.

Si bien estas resoluciones permiten aplicar cualquiera de estas normas de referencia internacional, y por tanto brindar flexibilidad, en muchos casos existen diferencias entre un protocolo y otro, por lo tanto, no estaría rigiendo un único criterio para realizar estos test de control de calidad.

En el caso de la legislación brasileña, a diferencia de lo que plantea Uruguay, muchas de las normas referentes al control de las vacunas en estudio describen claramente los procedimientos a seguir para testear esterilidad, inocuidad, y potencia. Por ejemplo, las Normas: SDA N° 23, MAPA N° 50, MA N° 228, SDA N° 49 referentes a productos contra *C. botulinum*, fiebre aftosa, rabia y *C. chauvoei/perfringens/septicum/sordellii/tetani/novy* respectivamente. Por otro lado, como ya se ha mencionado en el presente trabajo, Argentina cuenta con un marco regulatorio (normas del SENASA) muy completo, en donde los procedimientos también se encuentran estandarizados.

También hay que destacar la existencia del Comité de las Américas para los Medicamentos Veterinarios (CAMEVET), cuyo objetivo es lograr la armonización de las normas a nivel regional, a través de la formulación de fichas técnicas. Sin embargo, para que las mismas tengan efecto regulatorio en un país, éstas deberían ser incorporadas en la legislación.

5. CONCLUSIONES

Para que los animales destinados a producción, tengan un óptimo rendimiento, los mismos deben encontrarse en adecuadas condiciones sanitarias, lo que incluye, dentro de otros aspectos, la prevención de enfermedades mediante la vacunación. Debido entonces a la importancia de las vacunas, es necesario controlar, fundamentalmente, que estos productos sean eficaces (potentes), seguros (inocuos) y estén libres de contaminantes.

Si bien los procedimientos para realizar los controles de calidad en el producto final son claves, para asegurar que la vacuna genere una respuesta inmunitaria específica, protectora y duradera en el tiempo, también son importantes otros aspectos; como, por ejemplo, una adecuada formulación (incluir los antígenos relevantes para el animal) y las buenas prácticas de vacunación, con todo lo que ello implica.

Respecto a los ensayos de inocuidad y potencia, la mayoría de las normas de referencia los plantea como test individuales, requiriendo para cada uno la utilización de animales (pruebas in vivo). Con la finalidad de reducir o reemplazar el uso de estos animales, en muchos casos, ya se recomienda que al vacunarlos se evalúe simultáneamente la inocuidad y la potencia, promoviendo además los test de potencia in vitro.

Se han estudiado distintas técnicas para probar la potencia in vitro, apuntando básicamente a productos clostridiales, (toxoides principalmente), así como también a vacunas anti-leptospirosis.

En cuanto a los productos clostridiales, la mayoría de los métodos son serológicos, basados en la medición de los niveles de anticuerpos generados por la vacunación, destacándose las pruebas de ELISA, el ToBI test y la neutralización en cultivos celulares. En general los resultados obtenidos por estas técnicas pudieron ser bien correlacionados con los resultados arrojados en la prueba in vivo, mostrando que son métodos precisos y ofreciendo una alternativa al test practicado en animales. De hecho, ya se encuentra validado a nivel internacional un ELISA competitivo y un ToBI test para evaluar la potencia del toxoide épsilon y tetánico respectivamente.

Para las vacunas anti-leptospirosis, es importante nombrar el TICIV y el MAT, métodos serológicos que se han planteado como pruebas sustitutivas al test de desafío en hámsters. Muchos de los autores, en estudios comparativos, sostienen que el TICIV sería el método más adecuado, ya que en éste se miden anticuerpos vacunales neutralizantes (IgG), relacionados al grado de protección del animal.

Distinto es lo que ocurre en el MAT, el cual detecta anticuerpos aglutinantes (IgM), los cuales no se relacionan con el grado de protección.

Además, como se menciona en el presente trabajo, se han podido relacionar los títulos obtenidos por el TICIV con el grado de protección en el test de desafío, estableciendo determinados valores en dicha técnica que corresponden a vacunas que aprueban el test in vivo.

Es de importancia mencionar también las pruebas de RFFIT y el ELISA/CFL, las cuales se encuentran validadas para probar la potencia de vacunas antirrábicas y antiaftosa respectivamente.

Como hemos visto, si bien existen muchas pruebas in vitro (estandarizadas y en algunos casos validadas) que pueden perfectamente sustituir los ensayos in vivo, las normas internacionales aún siguen describiendo protocolos que requieren el uso de animales.

Por otra parte, cabe destacar que muchos países integran los procedimientos que se han descrito con carácter de normativa (Resoluciones, Códigos, Instrucciones), lo que permite que la autoridad regulatoria tenga herramientas para realizar un correcto control. En este sentido, a nivel de la región, es importante recalcar la labor realizada por el Laboratorio Oficial de Brasil el cual establece que todos los fabricantes del país deberán hacer sus controles de esterilidad, seguridad y de potencia en dicho Laboratorio (centralización del control), abonando determinado monto de dinero por esta actividad. Además, también brinda el servicio a laboratorios de otros países, capacitando personal, otorgando protocolos y reactivos para realizar por ejemplo las pruebas de potencia.

Respecto a Uruguay, aún quedan por implementar nuevas normativas, así como mejorar el sistema de control oficial. En cuanto a dicho sistema de control, a diferencia de lo que ocurre en Brasil, la DILAVE si bien lleva a cabo algunos test, todavía no ofrece el servicio con carácter de obligatoriedad y además le falta incorporar varias pruebas de potencia. Esto hace que los laboratorios tengan que realizar las pruebas en forma particular, y al no existir un control centralizado, tampoco existe unificación de criterios.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Allende, R.M. (2001). ELISA Competición Fase Líquida (ELISA-CFL) y su uso en Control de Potencia de Vacunas Antiaftosa. VII Seminario Internacional de Control de Vacuna Antiaftosa. Rio de Janeiro, Brasil, pp.13-20. Disponible en: http://www.paho.org/panaftosa/index.php?option=com_docman&task... Fecha de consulta: 20/09/15
2. Allende, R.M. (2001a). Normas Internacionales Recomendadas para Control de Vacuna Antiaftosa. VII Seminario Internacional de Control de Vacuna Antiaftosa. Río de Janeiro, Brasil, pp.29-35. Disponible en: http://www.paho.org/panaftosa/index.php?option=com_docman&task... Fecha de consulta: 20/09/15
3. Alonso, A.; Olascoaga Casas, R.; Banhnmemann, H.G.; Astudillo, V.M.; Söndahl, M.S.; Gomes, I.; Baltar, J.; Fernández, G. (1985) Producción y control de la calidad de la vacuna antiaftosa en América del Sur. Bol Centro Panamericano Fiebre Aftosa; 51:3-12. Disponible en: <http://www.bvs1.panaftosa.org.br/local/File/textoc/Boletin51-Alonso-esp.pdf> Fecha de consulta: 20/09/15
4. Argentina. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. SENASA (2012) Vacunas virales inactivadas no vesiculares para bovinos de uso veterinario. Resolución SENASA 598/12, de 4 de diciembre de 2012. Disponible en: http://www.cac.com.ar/documentos/17_Res.%20SENASA%20598-12.pdf Fecha de consulta: 24/04/16
5. Argentina. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. SENASA (2006) Control de las vacunas destinadas a la prevención de la fiebre aftosa. Resolución SENASA 351/2006, de 28 de junio de 2006. Disponible en: <http://viejaweb.senasa.gov.ar/contenido.php?to=n&in=1029&io=9818> Fecha de consulta: 24/04/16
6. Bermúdez, J.I.; França, S.; Malaquin, C.A. (2013) Respuesta de anticuerpos en bovinos vacunados contra *Clostridium chauvoei*, usando una vacuna comercial. Tesis. Facultad de Veterinaria, Udelar, 42p.
7. Borrmann, E.; Shulze, F. (1999) Detection of *Clostridium novyi* type B α toxin by cell culture systems. FEMS Immuno Med Microbiol; 24(3):275-280.
8. Borrmann, E.; Shulze, F. (1997) Use of Cell Culture Assays for Potency Testing of *C. Perfringens* immunobiologicals as an alternative to Mouse Toxin Neutralisation Test. Pharmeuropa bio & scientific notes 1:30-39. Disponible en: <http://pharmeuropa.edqm.eu/PharmeuropaBioSN/> Fecha de consulta: 19/09/15

9. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2012) Legislação relacionada aos productos de uso veterinário. Brasília, DF. Disponible en: http://www.cobea.org.br/arquivo/download?ID_ARQUIVO=41. Fecha de consulta: 11/11/15
10. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2012a) Legislação relacionada aos productos de uso veterinário. Instrução Normativa SDA Nº 23, de 18 de março de 2002. Brasília, MAPA. Disponible en: http://www.cobea.org.br/arquivo/download?ID_ARQUIVO=41. Fecha de consulta: 11/11/15
11. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2012b) Legislação relacionada aos productos de uso veterinário. Instrução Normativa MAPA Nº 50, de 23 de setembro de 2008. Brasília, MAPA. Disponible en: www.cobea.org.br/arquivo/download?ID_ARQUIVO=41. Fecha de consulta: 11/11/15
12. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2012c) Legislação relacionada aos productos de uso veterinário. Portaria MA Nº 228, de 25 de outubro de 1988. Brasília, MAPA. Disponible en: http://www.cobea.org.br/arquivo/download?ID_ARQUIVO=41. Fecha de consulta: 11/11/15
13. Buys, A.; MacDonald, R.; Crafford, J.; Theron, J. (2014) Development of a flow cytometric bead immunoassay and its assessment as a possible aid to potency evaluation of enterotoxaemia vaccines. *J S Afr Vet Assoc*; 85(1):1-6.
14. Cao, S.; Li, J.; Shi, L.; Wang, Y.; Wu, X.; Liu, J.; Dong, G. (2012) Replacement Study on the Potency Test of Anti- rabies Inmunoglobulin in China. *J Appl Virol*; 1(1):27-33. Disponible en: <http://www.biosky.org/jav/index.php/jav/article/view/11> Fecha de consulta: 13/01/16
15. Coe Clough, N.E; Hauer, P.J (2005) Using Polyclonal and Monoclonal Antibodies in Regulatory Testing of Biological Products. *ILAR Journal*; 46(3):300-306.
16. Crichton, R.; Solomon, J.; Barton, A.M. (1990) The development of an enzyme-linked immunosorbent assay for measuring the potency of vaccines containing *Clostridium chauvoei* antigens. *Biologicals*; 18(1):49-54.
17. Cultek (2006) Fundamentos y Tipos de ELISAs. Disponible en: <http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Soluciones-ELISA-protocolos.pdf> Fecha de consulta: 06/01/16
18. Dellepiane N.; Griffiths E.; Milstien J.B. (2000). Nuevos retos para asegurar la calidad de las vacunas. *Boletín de la OMS*; 78(2):155-162

19. de Nardi, G. Jr.; Genovez, M.E.; Ribeiro, M.G.; Castro, V.; Jorge, A.M. (2010) An in vitro growth inhibition test for measuring the potency of *Leptospira* spp. Sejroe group vaccine in buffaloes. *Biologicals*; 38(4):474-478.
20. Ebert, E.; Öppling, V.; Werner, E.; Cussler, K. (1999) Development and prevalidation of two different ELISA systems for the potency testing of *Clostridium perfringens* β - and ϵ - toxoid containing veterinary vaccines. *FEMS Immuno Med Microbiol*; 24(3):299-311.
21. Ebert, E.; Reed, N.; Varney, C.; Staak, C.; Schoonberg, A.; Cussler, K. (1999a) Guinea-Pig Serology as an Alternative to the Hamsters Challenge Test for Potency Testing of *Leptospira Hardjo* Vaccines. *Pharmeuropa bio & scientific notes* 2:102-110. Disponible en: <http://pharmeuropa.edqm.eu/PharmeuropaBioSN/> Fecha de consulta: 19/09/15
22. El-Helw, H.A.; Elham El-Sergany, F.; Taha, M.M.; Abdella, Y.A.; El-Sehemy, M.M. (2012) Comparison of ELISA with traditional methods used for evaluation of blackleg and gas gangrene vaccine. *Nat Sci*; 10(11):137-144.
23. ELISA encyclopedia. Disponible en: <http://www.elisa-antibody.com/> Fecha de consulta: 06/01/16
24. Fernández, N. (2007) Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay E.L.I.S.A. Disponible en: <http://www.higiene.edu.uy/parasito/trabajos/elisa.pdf> Fecha de consulta: 06/01/16
25. Ferreira de Araujo, R. (2009) Resposta sorológica de bovinos vacinados contra o *Clostridium chauvoei* avaliada pelos Testes de Aglutinação em Placa e ELISA. Tesis. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. 58p.
26. Fundación PROSAIA (2012). Guía de Prueba de Potencia y Eficacia para Vacunas Bovinas que contengan en su formulación Herpes Virus Bovino (BoHV-1) agente causal de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR). Disponible en: <http://www.prosaia.org/wp-content/uploads/2014/09/Guia-de-Potencia-y-Eficacia-vacunas-IBR-Espanol-2.pdf> Fecha de consulta: 13/01/16
27. Gonçalves, A.P.; Souza, G.; Morato, F.; Morais, Z.M; Azevedo, S.S; Vasconcellos, S.A (2013) Controle da eficácia de bacterinas antileptospirose: relação entre os resultados dos testes de inibição de crescimento de leptospiras *in vitro* com os do desafio *in vivo* em hamsters. *Braz J Vet Res Anim Sci*; 50:370-378
28. Gonçalves, A.P. (2012) Avaliação da eficácia de bacterina antileptospirose suína: relação entre o resultado do teste de inibição de crescimento de leptospira *in vitro* aplicado ao soro de suínos com o obtido no teste de potencia *in vivo* em hamsters. Tesis. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. 110p.

29. Gonzales Dávalos, E. Anticuerpos Monoclonales. Disponible en: <http://www.ops.org.bo/textocompleto/rnbiofa93020212.pdf> Fecha de consulta: 06/01/16
30. Great Britain. The Department of Health (2013). British Pharmacopoeia (Veterinary) 2013. Monographs. Immunological products. Veterinary Vaccines. Appendix XVI A. Sterility. Disponible en: <https://www.pharmacopoeia.com/> Fecha de consulta: 15/10/15
31. Great Britain. The Department of Health (2013a). British Pharmacopoeia (Veterinary) 2013. Appendices. Appendix XVI B (Vet) 3. Test for Absence of Mycoplasmas. Disponible en: <https://www.pharmacopoeia.com/> Fecha de consulta: 15/10/15
32. Great Britain. The Department of Health (2013b). British Pharmacopoeia (Veterinary) 2013. Monographs. Immunological products. Veterinary Vaccines. Infectious Bovine Rhinotracheitis Vaccines (Live), Freeze-Dried. Disponible en: <https://www.pharmacopoeia.com/> Fecha de consulta: 15/10/15
33. Great Britain. The Department of Health (2013c). British Pharmacopoeia (Veterinary) 2013. Monographs. Immunological products. Veterinary Vaccines. *Clostridium Novyi* (Type B) Vaccine for Veterinary Use. Disponible en: <https://www.pharmacopoeia.com/> Fecha de consulta: 15/10/15
34. Great Britain. The Department of Health (2013d). British Pharmacopoeia (Veterinary) 2013. Monographs. Immunological products. Veterinary Vaccines. *Clostridium Septicum* Vaccine for Veterinary Use. Disponible en: <https://www.pharmacopoeia.com/> Fecha de consulta: 15/10/15
35. Great Britain. The Department of Health (2013e). British Pharmacopoeia (Veterinary) 2013. Monographs. Immunological products. Veterinary Vaccines. *Clostridium Botulinum* Vaccine for Veterinary Use. Disponible en: <https://www.pharmacopoeia.com/> Fecha de consulta: 15/10/15
36. Great Britain. The Department of Health (2013f). British Pharmacopoeia (Veterinary) 2013. Monographs. Immunological products. Veterinary Vaccines. *Clostridium Pefringens* (Type B, Type C, Type D) Vaccine for Veterinary Use. Disponible en: <https://www.pharmacopoeia.com/> Fecha de consulta: 15/10/15
37. Great Britain. The Department of Health (2013g). British Pharmacopoeia (Veterinary) 2013. Monographs. Immunological products. Veterinary Vaccines. Tetanus Vaccine for Veterinary Use. Disponible en: <https://www.pharmacopoeia.com/> Fecha de consulta: 15/10/15
38. Great Britain. The Department of Health (2013h). British Pharmacopoeia (Veterinary) 2013. Monographs. Immunological products. Veterinary Vaccines. *Clostridium Chauvoei* Vaccine for Veterinary Use. Disponible en: <https://www.pharmacopoeia.com/> Fecha de consulta: 15/10/15

39. Great Britain. The Department of Health (2013i). British Pharmacopoeia (Veterinary) 2013. Monographs. Immunological products. Veterinary Vaccines. Bovine Leptospirosis Vaccine (Inactivated). Disponible en: <https://www.pharmacopoeia.com/> Fecha de consulta:15/10/15
40. Great Britain. The Department of Health (2013j). British Pharmacopoeia (Veterinary) 2013. Monographs. Immunological products. Veterinary Vaccines. Anthrax Spore Vaccine (Live) for Veterinary Use. Disponible en: <https://www.pharmacopoeia.com/> Fecha de consulta:15/10/15
41. Great Britain. The Department of Health (2013k). British Pharmacopoeia (Veterinary) 2013. Monographs. Immunological products. Veterinary Vaccines. Bovine Diarrhoea Vaccine (Inactivated). Disponible en: <https://www.pharmacopoeia.com/> Fecha de consulta:15/10/15
42. Great Britain. The Department of Health (2013l). British Pharmacopoeia (Veterinary) 2013. Monographs. Immunological products. Veterinary Vaccines. Foot-And-Mouth Disease (Ruminants) Vaccine (Inactivated). Disponible en: <https://www.pharmacopoeia.com/> Fecha de consulta:15/10/15
43. Great Britain. The Department of Health (2013m). British Pharmacopoeia (Veterinary) 2013. Monographs. Immunological products. Veterinary Vaccines. Rabies Vaccine (Inactivated) for Veterinary Use. Disponible en: <https://www.pharmacopoeia.com/> Fecha de consulta:15/10/15
44. Hauer, P. (1997) Viewpoint from the USA Authorities, recent development on different Clostridia. Pharmeuropa bio & scientific notes 1:47-58. Disponible en: <http://pharmeuropa.edqm.eu/PharmeuropaBioSN/> Fecha de consulta: 19/09/15
45. Hickey, T. (1999) Leptospira Bacterin Batch Potency Testing. Pharmeuropa bio & scientific notes 2:60-76. Disponible en: <http://pharmeuropa.edqm.eu/PharmeuropaBioSN/> Fecha de consulta: 19/09/15
46. Khawplod, P.; Inoue, K.; Shoji, Y.; Wide, H.; Ubol, S.; Nishizono, A.; Kurane, I.; Morimoto, K. (2005) A novel rapid fluorescent focus inhibition test for rabies virus using a recombinant rabies virus visualizing a green fluorescent protein. J Virol Methods: 125(1):35-40.
47. Krämer, B.; Bruckner, L.; Daas, A.; Milne, C. (2010) Collaborative Study for Validation of a Serological Potency Assay for Rabies Vaccine (inactivated) for Veterinary Use. Pharmeuropa bio & scientific notes 2:37-55. Disponible en: <http://pharmeuropa.edqm.eu/PharmeuropaBioSN/> Fecha de consulta: 22/09/15
48. Lima, C.G.R.D. (2009) Padronização do teste de potencia de toxoide alfa de *Clostridium novyi* tipo B em linhagem contínua de célula. Tesis de Grado. Universidade Federal de Minas Gerais. 28p.

49. Lombard M.; Moulin A.M.; Pastoret, P.P. (2007) A brief history of vaccines and vaccination. *Rev Sci Tech Off Int Epiz*; 26(1):29-48.
50. Machado, N.P; Téllez, G.A.; Castaño, J.C. (2006) Anticuerpos monoclonales: desarrollo físico y perspectivas terapéuticas. *Infectio*; 10(3):186-197
51. MERCOSUL (1996). Reglamento técnico para o controle das vacinas contra carbunco sintomático, gangrena gaseosa, enterotoxemia e tétano, inativadas e conservadas sob refrigeração. GMC, RES N° 77/96 del 11 de octubre de 1996.
Disponible en:
<http://www.mercosur.int/innovaportal/v/3094/3/innova.front/resoluc%C3%B5es-1996>
Fecha de consulta: 25/09/15
52. México (1999). Especificaciones que deben cumplir los biológicos empleados en la prevención y control de enfermedades que afectan a los animales domésticos. NOM-063-ZOO-1999, de 2 de junio de 2003. Disponible en: www.ordenjuridico.gob.mx/Publicaciones/CDs2007/.../pdf/59NOM.pdf Fecha de consulta: 17/06/16
53. Misra, R.P. (1991) Manual for the Production of Anthrax and Blackleg Vaccines. Animal Production and Health Paper 87, Rome, FAO. Disponible en <http://www.fao.org/docrep/004/T0278E/T0278E00.HTM>. Fecha de consulta: 25/09/15
54. OIE (2015). Principles of veterinary vaccines production. En: OIE Terrestrial Manual. Paris, OIE, pp.1-15. Disponible en: http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/#oe_mainContent. Fecha de consulta: 13/09/15
55. OIE (2015a). Bovine Viral Diarrhoea. En: OIE Terrestrial Manual. Paris, OIE, pp.1-22. Disponible en: http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/#oe_mainContent Fecha de consulta: 13/09/15
56. OIE (2014). Leptospirosis. En: OIE Terrestrial Manual. Paris, OIE, pp.1-15. Disponible en: http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/#oe_mainContent. Fecha de consulta: 13/09/15
57. OIE (2013). Rabies (Infection with Rabies virus). En: OIE Terrestrial Manual. Paris, OIE, pp.1-28. Disponible en: http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/#oe_mainContent. Fecha de consulta: 13/09/15
58. OIE (2012). Anthrax. En: OIE Terrestrial Manual. Paris, OIE, pp.87-97. Disponible en: http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/#oe_mainContent. Fecha de consulta: 13/09/15

59. OIE (2012a). Foot and Mouth Disease (Infection with Foot and Mouth Disease Virus). En: OIE Terrestrial Manual. Paris, OIE, pp.1-31. Disponible en: http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/#oe_mainContent. Fecha de consulta: 13/09/15
60. OIE (2010). Infectious Bovine Rhinotracheitis/Infectious Pustular Vulvovaginitis. En: OIE Terrestrial Manual. Paris, OIE, pp.1-18. Disponible en: http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/#oe_mainContent. Fecha de consulta: 13/09/15
61. OIE (2008). Test of biological materials for sterility and freedom from contamination. En: OIE Terrestrial Manual. Paris, OIE, pp.67-76. Disponible en: http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/#oe_mainContent. Fecha de consulta: 13/09/15
62. OIEa. Comité de Las Américas de Medicamentos Veterinarios (CAMEVET). Productos Biológicos Armonizados. Diarrea Viral Bovina. Disponible en: http://www.rr-americas.oie.int/es/proyectos/Camevet/fichas/es_fichas.htm. Fecha de consulta: 13/09/15
63. OIEb. Comité de Las Américas de Medicamentos Veterinarios (CAMEVET). Productos Biológicos Armonizados. Rinotraqueitis Infecciosa Bovina. Disponible en: http://www.rr-americas.oie.int/es/proyectos/Camevet/fichas/es_fichas.htm. Fecha de consulta: 13/09/15
64. OIEc. Comité de Las Américas de Medicamentos Veterinarios (CAMEVET). Productos Biológicos Armonizados. Vacuna Antirrábica. Disponible en: http://www.rr-americas.oie.int/es/proyectos/Camevet/fichas/es_fichas.htm. Fecha de consulta: 13/09/15
65. OIEd. Comité de Las Américas de Medicamentos Veterinarios (CAMEVET). Productos Biológicos Armonizados. *Clostridium Novy B*. Disponible en: http://www.rr-americas.oie.int/es/proyectos/Camevet/fichas/es_fichas.htm. Fecha de consulta: 13/09/15
66. OIEe. Comité de Las Américas de Medicamentos Veterinarios (CAMEVET). Productos Biológicos Armonizados. *Clostridium Septicum*. Disponible en: http://www.rr-americas.oie.int/es/proyectos/Camevet/fichas/es_fichas.htm. Fecha de consulta: 13/09/15
67. OIEf. Comité de Las Américas de Medicamentos Veterinarios (CAMEVET). Productos Biológicos Armonizados. *Clostridium Botulinum*. Disponible en: http://www.rr-americas.oie.int/es/proyectos/Camevet/fichas/es_fichas.htm. Fecha de consulta: 13/09/15

68. OIEg. Comité de Las Américas de Medicamentos Veterinarios (CAMEVET). Productos Biológicos Armonizados. *Clostridium Perfringens*. Disponible en: http://www.rr-americas.oie.int/es/proyectos/Camevet/fichas/es_fichas.htm. Fecha de consulta: 13/09/15
69. OIEh. Comité de Las Américas de Medicamentos Veterinarios (CAMEVET). Productos Biológicos Armonizados. Vacuna contra carbunco. Disponible en: http://www.rr-americas.oie.int/es/proyectos/Camevet/fichas/es_fichas.htm. Fecha de consulta: 25/09/15
70. OIEi. Comité de Las Américas de Medicamentos Veterinarios (CAMEVET). Productos Biológicos Armonizados. Vacuna de Fiebre Aftosa. Disponible en: http://www.rr-americas.oie.int/es/proyectos/Camevet/fichas/es_fichas.htm. Fecha de consulta: 13/09/15
71. OIEj. Comité de Las Américas de Medicamentos Veterinarios (CAMEVET). Productos Biológicos Armonizados. Vacuna Antirrábica. Disponible en: http://www.rr-americas.oie.int/es/proyectos/Camevet/fichas/es_fichas.htm. Fecha de consulta: 13/09/15
72. OMS. World Health Organization Expert Committee On Biological Standardization (1967). Requirements for Anthrax Spore Vaccine (Live – for Veterinary Use) (Requirements for Biological Substances No. 13). World Health Organization (WHO) Technical Report Series No. 361. WHO, Geneva. Disponible en: http://www.who.int/trs/WHO_TRS_361.pdf?ua=1
Fecha de consulta: 25/09/15
73. Orue, M. (2001) Fiebre Aftosa. En: Manual de técnicas de Laboratorio para el diagnóstico en salud animal. Venezuela, IICA, pp.103-161. Disponible en: <https://books.google.com.uy/books?id=wOoqAAAAYAAJ&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false> Fecha de consulta: 11/11/15
74. Rivera, M. (2014). Caracterización de la respuesta inmune humoral anti *Clostridium chauvoei* en bovinos. Tesis. Facultad de Ciencias, Udelar, 28p.
75. Rodrigues, A.M.A.; Vasconcelos, S.A.; Gonçalves, A.P.; de Moraes, Z.; de Souza, G.O.; Hagiwara, M.K. (2013) Anticorpos revelados pelo teste de inibição do crescimento de leptospiras in vitro (TICL) contra os sorovares Canicola, Icterohamorrhagiae e Copenhageni em cães adultos revacinados anualmente com vacina comercial contendo bacterinas dos sorovares Canicola, Icterohaemorrhagiae, Grippotyphosa e Pomona. Pesq Vet Bras; 33(5):624-634.
76. Roskopf-Streicher, U.; Volkers, P.; Noeske, K.; Werner, E. (2004) Quality assurance of *C. perfringens* epsilon toxoid vaccines – ELISA versus mouse neutralization test. ALTEX; 21(3):65-69.

77. Roskopf-Streicher, U.; Volkers, P.; Werner, E. (2003) Control of *Clostridium perfringens* Vaccines using an Indirect Competitive ELISA for the Epsilon Toxin Component, Examination of the Assay by a Collaborative Study. *Pharmeuropa bio & scientific notes* 2:91-96.
Disponible en: <http://pharmeuropa.edqm.eu/PharmeuropaBioSN/>
Fecha de consulta: 03/02/16
78. Ruby, K. (1999) Development of in Vitro Assays for Measuring Relative Potencies of Leptospiral Bacterins. *Pharmeuropa bio & scientific notes* 2:33-45. Disponible en: <http://pharmeuropa.edqm.eu/PharmeuropaBioSN/> Fecha de consulta: 19/09/15
79. Ruíz-Sáenz, J.; Jaime, J.; Vera, V.J. (2010) Prevalencia serológica y aislamiento del Herpesvirus Bovino-1 (BHV-1) en hatos ganaderos de Antioquia y del Valle del Cauca. *Rev Colomb Cienc Pecu*; 23:299-307.
80. Salvarani, F.M.; Lobato, Z.I.P.; Pires, P.S.; Silva, R.O.S.; Alves, G.G.; Pereira, P.L.L.; Lobato, F.C.F. (2013) *In vitro* potency test for evaluation of *Clostridium perfringens* type D epsilon toxoid. *Arq Inst Biol*; 80(4):450-452.
81. Salvarani, F.M.; Lobato, Z.I.P.; Assis, R.A.; Lima, C.G.R.D.; Silva, R.O.S.; Lobato, F.C.F. (2010) *In vitro* evaluation of *Clostridium septicum* alpha toxoid. *Arq Bras Med Vet Zootec*; 62(4):778-783.
82. Sánchez-Vizcaíno, J.M (2006) Vacunas y sueroterapia. En: *Manual de Inmunología Veterinaria*. Pearson Educación, Madrid, pp.513-535.
83. Segretín, M.E. Los cultivos celulares y sus aplicaciones I (cultivos de células animales). Disponible en: <http://www.argenbio.org/adc/uploads/pdf/Cultivos%20celulares%20I%20Euge.pdf>
Fecha de consulta: 08/06/16
84. SINERGIA (2012). Biológicos. En: *Guía V- Vademécum de Especialidades Veterinarias del Uruguay*. Montevideo, SINERGIA Comunicaciones Integradas, pp.359-421.
85. Sobrinho E.M.; Almeida A.C.; Santos, H.O.; Cangussu, A.S.R.; Colen, F.; Brandi, I.V.; Sari, R.S.; Quintilio, W. (2011) Modified Toxin-Binding Inhibition Test for quantification of Epsilon Antitoxin in serum of immunized sheep. *Acta Veterinaria Brasílica*; 5(3):326-330.
86. Soto, F.R.M.; Pinheiro, S.R.; Morais, Z.M.; Gonçalves, A.P.; de Azevedo, S.S.; Bernardi, F.; Camargo, S.R.; Vasconcellos, S.A. (2008) Comparisson of agglutinating and neutralizing antibodies to serovar Hardjo in sows imunized with two comercial whole culture polyvalent anti-leptospira bacterins. *Braz J Microbiol*; 39(3):484-488.

87. Souza Matos, D.C.; Marcovistz, R.; Cabello, P.H.; Amaral Georgini, R.; Sakauchi, D.; Leite da Silva, L. (2002) Immunogenicity Test of Tetanus Component in Adsorbed Vaccines by Toxing Binding Inhibition Test. Mem Inst Oswaldo Cruz; 97(6):909-913.
88. Stokes, W.S.; Kulpa-Eddy, J.; Brown, K.; Srinivas, G.; McFarland, R. (2010) Recent Progress and Future Directions for Reduction, Refinement, and Replacement of Animal Use in Veterinary Vaccine Potency and Safety Testing: A report from the 2010 NICEATM-ICCVAM. Proceedings of an International Scientific Workshop PEI, EDQM, IABS. Langen, Germany, pp.9-21. Disponible en: <http://www.epsjv.fiocruz.br/upload/d/silviovalle/VaccineforAnimals.pdf>
Fecha de consulta: 03/02/16
89. Tamay de Dios, L.; Ibarra, C.; Velasquillo, C. (2013) Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. Investigación en Discapacidad; 2(2):70-78.
90. Universidad Complutense de Madrid. (UCM) (2009) Tema 13: Técnicas Inmunológicas IV. Reacciones secundarias. Precipitación. Inmunodifusión. Aglutinación. Inhibición de la hemaglutinación. Fijación del complemento. Neutralización y seroneutralización. Disponible en: <http://pendientedemigracion.ucm.es/info/saniani/troncales/inmunologia/documentostemas/Tema%2013.pdf> Fecha de consulta: 20/06/16
91. Unión Europea. Parlamento Europeo (2001). Código comunitario sobre medicamentos veterinarios. Directiva 2001/82/CE del Parlamento Europeo y Consejo (revisada), de 6 de noviembre de 2001. Disponible en: http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol5/dir_2001_82_cons2009/dir_2001_82_cons2009_es.pdf. Fecha de consulta: 13/09/15
92. Uruguay. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. Legislación Sanitaria Animal. Productos Veterinarios, V.1, pp.298-371. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/portal/page.aspx?2,dgsg,dgsg-legislacion-sanitaria,O,es,0>, Fecha de consulta: 14/05/16
93. USA. Department of Agriculture (USDA) (2012). Code of Federal Regulations (CFR). Title 9. Animal and Animal products. Part 113 Standard requirements. Section 26. Detection of viable bacteria and fungi except in live vaccine. Disponible en: <https://www.gpo.gov/fdsys/browse/collectionCfr.action?collectionCode=CFR>
Fecha de consulta: 13/01/16
94. USA. Department of Agriculture (USDA) (2012a). Code of Federal Regulations (CFR). Title 9. Animal and Animal products. Part 113 Standard requirements. Section 25. Culture media for detection of bacteria and fungi. Disponible en: <https://www.gpo.gov/fdsys/browse/collectionCfr.action?collectionCode=CFR>
Fecha de consulta: 13/01/16

95. USA. Department of Agriculture (USDA) (2012b). Code of Federal Regulations (CFR). Title 9. Animal and Animal products. Part 113 Standard requirements. Section 27. Detection of extraneous viable bacteria and fungi in live vaccines. Disponible en:
<https://www.gpo.gov/fdsys/browse/collectionCfr.action?collectionCode=CFR>
Fecha de consulta: 13/01/16
96. USA. Department of Agriculture (USDA) (2012c). Code of Federal Regulations (CFR). Title 9. Animal and Animal products. Part 113 Standard requirements. Section 28. Detection of mycoplasma contamination. Disponible en:
<https://www.gpo.gov/fdsys/browse/collectionCfr.action?collectionCode=CFR>
Fecha de consulta: 13/01/16
97. USA. Department of Agriculture (USDA) (2012d). Code of Federal Regulations (CFR). Title 9. Animal and Animal products. Part 113 Standard requirements. Section 200. General requirements for Killed virus vaccines. Disponible en:
<https://www.gpo.gov/fdsys/browse/collectionCfr.action?collectionCode=CFR>
Fecha de consulta: 13/01/16
98. USA. Department of Agriculture (USDA) (2012e). Code of Federal Regulations (CFR). Title 9. Animal and Animal products. Part 113 Standard requirements. Section 300. General requirements for live virus vaccines. Disponible en:
<https://www.gpo.gov/fdsys/browse/collectionCfr.action?collectionCode=CFR>
Fecha de consulta: 13/01/16
99. USA. Department of Agriculture (USDA) (2012f). Code of Federal Regulations (CFR). Title 9. Animal and Animal products. Part 113 Standard requirements. Section 310. Bovine Rhinotracheitis Vaccine. Disponible en:
<https://www.gpo.gov/fdsys/browse/collectionCfr.action?collectionCode=CFR>
Fecha de consulta: 13/01/16
100. USA. Department of Agriculture (USDA) (2012g). Code of Federal Regulations (CFR). Title 9. Animal and Animal products. Part 113 Standard requirements. Section 216. Bovine Rhinotracheitis Vaccine, Killed Virus. Disponible en:
<https://www.gpo.gov/fdsys/browse/collectionCfr.action?collectionCode=CFR>
Fecha de consulta: 13/01/16
101. USA. Department of Agriculture (USDA) (2012h). Code of Federal Regulations (CFR). Title 9. Animal and Animal products. Part 113 Standard requirements. Section 312. Rabies Vaccines, Live Virus. Disponible en:
<https://www.gpo.gov/fdsys/browse/collectionCfr.action?collectionCode=CFR>
Fecha de consulta: 13/01/16

102. USA. Department of Agriculture (USDA) (2012i). Code of Federal Regulations (CFR). Title 9. Animal and Animal products. Part 113 Standard requirements. Section 209. Rabies Vaccine, Killed Virus. Disponible en: <https://www.gpo.gov/fdsys/browse/collectionCfr.action?collectionCode=CFR>
Fecha de consulta: 13/01/16
103. USA. Department of Agriculture (USDA) (2012j). Code of Federal Regulations (CFR). Title 9. Animal and Animal products. Part 113 Standard requirements. Section 31. Detection of avian lymphoid leucosis. Disponible en: <https://www.gpo.gov/fdsys/browse/collectionCfr.action?collectionCode=CFR>
Fecha de consulta: 19/02/16
104. USA. Department of Agriculture (USDA) (2012k). Code of Federal Regulations (CFR). Title 9. Animal and Animal products. Part 113 Standard requirements. Section 34. Detection of hemagglutinating viruses. Disponible en: <https://www.gpo.gov/fdsys/browse/collectionCfr.action?collectionCode=CFR>
Fecha de consulta: 19/02/16
105. USA. Department of Agriculture (USDA) (2012l). Code of Federal Regulations (CFR). Title 9. Animal and Animal products. Part 113 Standard requirements. Section 37. Detection of pathogens by the chicken embryo inoculation test. Disponible en: <https://www.gpo.gov/fdsys/browse/collectionCfr.action?collectionCode=CFR>
Fecha de consulta: 19/02/16
106. USA. Department of Agriculture (USDA) (2012m). Code of Federal Regulations (CFR). Title 9. Animal and Animal products. Part 113 Standard requirements. Section 38. Guinea pig safety test. Disponible en: <https://www.gpo.gov/fdsys/browse/collectionCfr.action?collectionCode=CFR>
Fecha de consulta: 13/01/16
107. USA. Department of Agriculture (USDA) (2012n). Code of Federal Regulations (CFR). Title 9. Animal and Animal products. Part 113 Standard requirements. Section 33. Mouse safety test. Disponible en: <https://www.gpo.gov/fdsys/browse/collectionCfr.action?collectionCode=CFR>
Fecha de consulta: 13/01/16
108. USA. Department of Agriculture (USDA) (2012ñ). Code of Federal Regulations (CFR). Title 9. Animal and Animal products. Part 113 Standard requirements. Section 110. *Clostridium Botulinum* Type C Bacterin-Toxoid. Disponible en: <https://www.gpo.gov/fdsys/browse/collectionCfr.action?collectionCode=CFR>
Fecha de consulta: 13/01/16
109. USA. Department of Agriculture (USDA) (2012o). Code of Federal Regulations (CFR). Title 9. Animal and Animal products. Part 113 Standard requirements. Section 106. *Clostridium Chauvoei* Bacterin. Disponible en: <https://www.gpo.gov/fdsys/browse/collectionCfr.action?collectionCode=CFR>
Fecha de consulta: 13/01/16

110. USA. Department of Agriculture (USDA) (2012p). Code of Federal Regulations (CFR). Title 9. Animal and Animal products. Part 113 Standard requirements. Section 108. *Clostridium Novyi* Bacterin-Toxoid. Disponible en: <https://www.gpo.gov/fdsys/browse/collectionCfr.action?collectionCode=CFR>
Fecha de consulta: 13/01/16
111. USA. Department of Agriculture (USDA) (2012q). Code of Federal Regulations (CFR). Title 9. Animal and Animal products. Part 113 Standard requirements. Section 107. *Clostridium Haemolyticum* Bacterin. Disponible en: <https://www.gpo.gov/fdsys/browse/collectionCfr.action?collectionCode=CFR>
Fecha de consulta: 13/01/16
112. USA. Department of Agriculture (USDA) (2012r). Code of Federal Regulations (CFR). Title 9. Animal and Animal products. Part 113 Standard requirements. Section 111. *Clostridium Perfringens* Type C Toxoid and Bacterin-Toxoid. Disponible en:
<https://www.gpo.gov/fdsys/browse/collectionCfr.action?collectionCode=CFR>
Fecha de consulta: 13/01/16
113. USA. Department of Agriculture (USDA) (2012s). Code of Federal Regulations (CFR). Title 9. Animal and Animal products. Part 113 Standard requirements. Section 112. *Clostridium Perfringens Type D* Toxoid and Bacterin-Toxoid. Disponible en:
<https://www.gpo.gov/fdsys/browse/collectionCfr.action?collectionCode=CFR>
Fecha de consulta: 13/01/16
114. USA. Department of Agriculture (USDA) (2012t). Code of Federal Regulations (CFR). Title 9. Animal and Animal products. Part 113 Standard requirements. Section 109. *Clostridium Sordelli* Bacterin-Toxoid. Disponible en: <https://www.gpo.gov/fdsys/browse/collectionCfr.action?collectionCode=CFR>
Fecha de consulta: 13/01/16
115. USA. Department of Agriculture (USDA) (2012u). Code of Federal Regulations (CFR). Title 9. Animal and Animal products. Part 113 Standard requirements. Section 104. *Leptospira Grippotyphosa* Bacterin. Disponible en: <https://www.gpo.gov/fdsys/browse/collectionCfr.action?collectionCode=CFR>
Fecha de consulta: 15/06/16
116. USA. Department of Agriculture (USDA) (2012v). Code of Federal Regulations (CFR). Title 9. Animal and Animal products. Part 113 Standard requirements. Section 105. *Leptospira Hardjo* Bacterin. Disponible en: <https://www.gpo.gov/fdsys/browse/collectionCfr.action?collectionCode=CFR>
Fecha de consulta: 15/06/16

117. USA. Department of Agriculture (USDA) (2012w). Code of Federal Regulations (CFR). Title 9. Animal and Animal products. Part 113 Standard requirements. Section 101. *Leptospira Pomona* Bacterin. Disponible en: <https://www.gpo.gov/fdsys/browse/collectionCfr.action?collectionCode=CFR>
Fecha de consulta: 15/06/16
118. USA. Department of Agriculture (USDA) (2012x). Code of Federal Regulations (CFR). Title 9. Animal and Animal products. Part 113 Standard requirements. Section 102. *Leptospira Ictero-hamorrhagiae* Bacterin. Disponible en: <https://www.gpo.gov/fdsys/browse/collectionCfr.action?collectionCode=CFR>
Fecha de consulta: 15/06/16
119. USA. Department of Agriculture (USDA) (2012y). Code of Federal Regulations (CFR). Title 9. Animal and Animal products. Part 113 Standard requirements. Section 103. *Leptospira Canicola* Bacterin. Disponible en: <https://www.gpo.gov/fdsys/browse/collectionCfr.action?collectionCode=CFR>
Fecha de consulta: 15/06/16
120. USA. Department of Agriculture (USDA) (2012z). Code of Federal Regulations (CFR). Title 9. Animal and Animal products. Part 113 Standard requirements. Section 66. Anthrax Spore Vaccine- Non- encapsulated. Disponible en: <https://www.gpo.gov/fdsys/browse/collectionCfr.action?collectionCode=CFR>
Fecha de consulta: 13/01/16
121. USA. Department of Agriculture (USDA) (2012a.1). Code of Federal Regulations (CFR). Title 9. Animal and Animal products. Part 113 Standard requirements. Section 45. Sheep safety test. Disponible en: <https://www.gpo.gov/fdsys/browse/collectionCfr.action?collectionCode=CFR>
Fecha de consulta: 13/01/16
122. USA. Department of Agriculture (USDA) (2012a.2). Code of Federal Regulations (CFR). Title 9. Animal and Animal products. Part 113 Standard requirements. Section 311. Bovine Virus Diarrhea Vaccine. Disponible en: <https://www.gpo.gov/fdsys/browse/collectionCfr.action?collectionCode=CFR>
Fecha de consulta: 13/01/16
123. USA. Department of Agriculture (USDA) (2012a.3). Code of Federal Regulations (CFR). Title 9. Animal and Animal products. Part 113 Standard requirements. Section 41. Calf safety test. Disponible en: <https://www.gpo.gov/fdsys/browse/collectionCfr.action?collectionCode=CFR>
Fecha de consulta: 13/01/16
124. USA. Department of Agriculture (USDA) (2012a.4). Code of Federal Regulations (CFR). Title 9. Animal and Animal products. Part 113 Standard requirements. Section 215. Bovine Virus Diarrhea Vaccine, Killed Virus. Disponible en: <https://www.gpo.gov/fdsys/browse/collectionCfr.action?collectionCode=CFR>
Fecha de consulta: 13/01/16

125. USA. Department of Agriculture (USDA) (2012a.5). Code of Federal Regulations (CFR). Title 9. Animal and Animal products. Part 113 Standard requirements. Section 114. Tetanus Toxoid. Disponible en: <https://www.gpo.gov/fdsys/browse/collectionCfr.action?collectionCode=CFR>
Fecha de consulta: 13/06/16
126. Wood, K.R. (1991) An Alternative to the Toxin Neutralization Assay in Mice for the Potency Testing of the *Clostridium tetani*, *Clostridium septicum*, *Clostridium novyi* Type B and *Clostridium perfringens* Type D epsilon Component of Multivalent Sheep Vaccines. *Biologicals*; 19(4):281-286.
127. Wright, J.G.; Quinn, C.P.; Shadomy, S.; Messonnier, N. (2010) Use of Anthrax Vaccine in the United States: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2009. *Recommendation and Reports*; 59(06):1-30. Disponible en: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5906a1.htm>
Fecha de consulta: 25/09/15
128. Zuerner, R.L; Alt, D.P; Palmer, M.V. (2012) Development of Chronic and Acute Golden Syrian Hamster Infection Models With *Leptospira borgpetersenii* Serovar Hardjo. *Vet Pathol*; 49(2):403-411.

7. ANEXO

Tabla A.I. Vacunas clostridiales registradas en nuestro país. (Extraído y adaptado de Bermúdez y col., 2013)

Laboratorio	Nombre	Composición	Adyuvante	Estado	Dosis	Vía	Especie
Bayer	BAY BAC VISION MC	<i>Bacillus anthracis</i> y <i>Clostridium chauvoei</i>	Acuoso	Atenuada / inactivada	2 mL	SC	Bovinos, ovinos y caprinos
	BAY BAC VISION EMG PLUS	<i>Clostridium chauvoei</i> , <i>septicum</i> , <i>novyi</i> B y D, <i>perfringens</i> D	Acuoso	Inactivada	5 mL	SC	Bovinos
2 mL					SC	Ovinos y caprinos	
Biogénesis	BIOCLOSTRIGEN J5	<i>Clostridium chauvoei</i> , <i>septicum</i> , <i>perfringens</i> C y D, <i>E. coli</i> J5	Acuoso	Inactivada	5 mL	SC	Bovinos
					2 mL	SC	Ovinos
	POLICLOSTRIGEN	<i>Clostridium chauvoei</i> , <i>septicum</i> , <i>novyi</i> B, <i>perfringens</i> C y D, <i>sordellii</i> , <i>haemolyticum</i> y <i>E. coli</i> J5	Acuoso	Inactivada	5 mL	SC	Bovinos
					3 mL	SC	Ovinos
Hipra -Invet	TOXIPRA-S7	<i>Clostridium chauvoei</i> , <i>septicum</i> , <i>novyi</i> , <i>perfringens</i> B, C y D, <i>sordellii</i>	Oleosa	Inactivada	4 mL	SC	Bovinos
					2 mL	SC	Ovinos
Merial	SINTOXAN 9th	<i>Clostridium chauvoei</i> , <i>septicum</i> , <i>novyi</i> B, <i>perfringens</i> B y D, <i>sordellii</i> , <i>haemolyticum</i> y <i>tetani</i>	Acuoso	Inactivada	3 mL	SC	Bovinos, caprinos y ovinos
	ULTRAVAC	<i>Clostridium chauvoei</i> , <i>septicum</i> , <i>novyi</i> B, <i>perfringens</i> D	Acuoso	Inactivada	4 mL	SC	Bovinos
2 mL					SC	Caprinos y ovinos	
Microsules	CLOSTRIDIAL H+ HEMOGLOBINURIA	<i>Clostridium haemolyticum</i>	Doble emulsión	Inactivada	-	-	Bovinos
Nutritec	CARBUMAN	<i>Bacillus anthracis</i> y <i>Clostridium chauvoei</i>	Acuoso	Atenuada / inactivada	-	SC	Bovinos, ovinos y suinos
	MANCHA Y GANGRENA GASEOSA PLUS	-	-	Inactivada	-	SC	Bovinos y ovinos
Pfizer	ULTRACHOICE 8	<i>Clostridium chauvoei</i> , <i>septicum</i> , <i>novyi</i> , <i>perfringens</i> C y D, <i>sordellii</i> , <i>haemolyticum</i>	Acuoso	Inactivada	2 mL	SC	Bovinos
					1 mL	SC	Ovinos
Rosenbusch	BACTERINA HEMOGLOBINURIA BACILAR	<i>Clostridium haemolyticum</i>	Acuoso	Inactivada	-	SC	Bovinos y ovinos
	IR9	<i>Clostridium chauvoei</i> , <i>septicum</i> , <i>novyi</i> A, B y D <i>perfringens</i> B, C y D,	Acuoso	Inactivada	-	-	Bovinos, caprinos y ovinos

	MANCHA, GANGRENA GASEOSA Y ENTEROTOXE- MIA	<i>Clostridium chauvoei,</i> <i>septicum, perfringens C</i> <i>y D</i>	Acuoso	Inactivada	-	SC	Bovinos y ovinos
Santa Elena	DUPLEX	<i>Bacillus anthracis y</i> <i>Clostridium chauvoei</i>	Acuoso	Atenuada / inactivada	2 mL	SC	Bovinos y suinos
					1 mL	SC	Ovinos
	CLOSTRISAN	<i>Clostridium chauvoei,</i> <i>septicum, novyi B,</i> <i>perfringens D, sordellii,</i> <i>haemolyticum</i>	Acuoso	Inactivada	4 mL	SC	Bovinos
					2 mL	SC	Caprinos y ovinos
	CLOSTRISAN 9+T	<i>Clostridium chauvoei,</i> <i>septicum, novyi B,</i> <i>perfringens A, B, C y D,</i> <i>sordellii, haemolyticum</i> <i>y tetani</i>	Acuoso	Inactivada	5 mL	SC	Bovinos
					2 mL	SC	Caprinos y ovinos
	CLOSTRISAN Adyuvac	<i>Clostridium chauvoei,</i> <i>septicum, novyi B,</i> <i>perfringens D, sordellii,</i> <i>haemolyticum</i>	Oleoso	Inactivada	4 mL	SC	Bovinos
	CLOSTRISAN T	<i>Clostridium chauvoei,</i> <i>septicum, novyi B,</i> <i>perfringens D, sordellii,</i> <i>haemolyticum y tetani</i>	Acuoso	Inactivada	4 mL	SC	Bovinos
					2mL	SC	Caprinos y ovinos
	TETANIC	<i>Clostridium tetani</i>	Acuoso	Inactivada	3 mL	SC	Bovinos
2 mL					SC	Caprinos y ovinos	
Uruguay	CARMANVET	<i>Bacillus anthracis y</i> <i>Clostridium chauvoei</i>	Acuoso	Atenuada / inactivada	-	-	Bovinos, caprinos, ovinos y suinos
	POLIVET	Mancha, gangrena gaseosa y otras clostridiosis	-	Inactivada	-	SC	Bovinos y ovinos
	TETANIVET	<i>Clostridium tetani</i>	Acuoso	Inactivada	-	SC	Bovinos, caprinos y ovinos

Tabla A. II. Vacunas anticarbunclosas registradas en nuestro país

Laboratorio	Nombre	Composición	Adyuvante	Estado	Dosis	Vía	Especie
Bayer	BAY BAC VISION MC	<i>Bacillus anthracis</i> y <i>Clostridium chauvoei</i>	Acuoso	Atenuada / inactivada	2 mL	SC	Bovinos, ovinos y caprinos
Biogénesis	BIOCARBOGEN 2	<i>Bacillus anthracis</i>	Acuoso	Atenuada	2 mL	SC	Bovinos y equinos
					1 mL	SC	Ovinos, caprinos y suinos
Merial	CARBOVAC	<i>Bacillus anthracis</i>	Acuoso	Atenuada	2 mL	SC	Bovinos
					1 mL	SC	ovinos
Microsules	CARBUNCLO	<i>Bacillus anthracis</i>	Acuoso	Atenuada	-	SC	Bovinos, ovinos, suinos y equinos
Nutrítec	CARBUMAN	<i>Bacillus anthracis</i> y <i>Clostridium chauvoei</i>	Acuoso	Atenuada / inactivada	-	SC	Bovinos, ovinos y suinos
	CARBUNCLO COOPER	<i>Bacillus anthracis</i>	Acuoso	Atenuada	-	SC	Bovinos y ovinos
Rosenbusch	ANTI CARBUNCLOSA	<i>Bacillus anthracis</i>	Acuoso	Atenuada	-	SC	Bovinos, ovinos, caprinos, suinos y equinos
Santa Elena	DUPLEX	<i>Bacillus anthracis</i> y <i>Clostridium chauvoei</i>	Acuoso	Atenuada / inactivada	2 mL	SC	Bovinos y suinos
					1 mL	SC	Ovinos
	CARBUSAN	<i>Bacillus anthracis</i>	Acuoso	Atenuada	2 mL	SC	Bovinos
					1 mL	SC	Caprinos, ovinos y suinos
Uruguay	CARMANVET	<i>Bacillus anthracis</i> y <i>Clostridium chauvoei</i>	Acuoso	Atenuada / inactivada	-	SC	Bovinos, caprinos, ovinos y suinos
	CARBUCOVET	<i>Bacillus anthracis</i>	Acuoso	Atenuada	-	SC	Bovinos, ovinos, caprinos, suinos
						IM	Equinos

Tabla A.III. Vacunas registradas en Uruguay para prevenir enfermedades reproductivas (DVB, IBR y leptospirosis), respiratorias (DVB e IBR) y la leptospirosis.

Laboratorio	Nombre	Composición	Adyuvante	Estado	Dosis	Vía	Especie
Biogénesis	BIOPOLIGEN HS	<i>Virus de IBR (BHV-1), Virus de DVB (tipos 1 y 2), Virus de Parainfluenza 3 (PI3); Pasteurella (Mannheimia) haemolytica, Pasteurella multocida y Haemophilus somnus</i>	Acuoso	Inactivada	5 mL	SC	Bovinos
	BIOABORTOGEN	<i>Virus de IBR (BHV-1), Virus de DVB (tipos 1 y 2), Campylobacter fetus fetus y venerealis, Leptospira interrogans Pomona pomona y Hemophilus somnus</i>	Acuoso	Inactivada	5 mL	SC	Bovinos
	BIOLEPTOGEN	<i>Leptospira interrogans: Pomona pomona, icterohaemorrhagiae, hardjo, canicola, grippotyphosa, tarassovi y bratislava</i>	Acuoso	Inactivada	5 mL	SC	Bovinos
3 mL					SC	Suinos	
Hipra -Invet	HIPRABOVIS-3	<i>Virus de IBR, de Parainfluenza (PI3) y de la DVB</i>	-	Inactivada	3 mL	SC IM IV	Bovinos
Merial	GESTAVAC	<i>L. interrogans Serogrupo Pomona, serovar Pomona (cepa JM); Serogrupo Sejroe serovar wolffi (cepa 3705), serovar hardjo (cepa hardjoprajitino); Serogrupo tarassovi, serovar tarassovi (cepa perepelicin); Serogrupo icterohaemorrhagiae, serovar icterohaemorrhagiae (cepa RGA); Serogrupo grippotyphosa, serovar grippotyphosa (cepa Moska V.); Serogrupo Canicola, serovar canicola (cepa Hold Utrech IV)</i>	Acuoso	Inactivada	-	-	Bovinos, ovinos y suinos
	TRANSVAC	<i>Virus de IBR (BHV-1), de la DVB, Campylobacter, Leptospira y Haemophilus somnus</i>	Acuoso	Inactivada	5 mL	SC	Bovinos
Microsules	ANTI-LEPTOSPIROSIS	-	-	Inactivada	-	SC	Bovinos
	LEPTOSPIROSIS DOBLE EMULSION	-	-	inactivada	-	SC	Bovinos
Pfizer	SPIROVAC	<i>Leptospira borgpetersenii serovar hardjo bovis</i>	-	Inactivada	-	SC	Bovinos

	STAY BRED VL5	<i>Campylobacter fetus venerealis; Leptospira interrogans serovares: canicola, pomona, hardjo, grippotyphosa e icterohaemorrhagiae</i>	Oleoso	Inactivada	2 mL	IM	Bovinos
	LEPTOFERM	<i>Leptospira interrogans serovares; canicola, Pomona, hardjo, grippotyphosa e icterohaemorrhagiae</i>	-	Inactivada	2 mL	IM	Bovinos y Suinos
Rosenbusch	IBR-PI3-BVD	<i>Virus de IBR (BHV-1); Virus de la DVB; Virus de PI3</i>	-	Inactivada	-	IM SC	Bovinos
	NEUMOCOLI ROTA PLUS	<i>Virus de IBR (BHV-1); Virus de PI3; Rotavirus serotipo 1; Pasteurella multocida y haemolytica; E. coli K99</i>	-	Inactivada	-	IM	Bovinos
	REPRO CULTIVAC	<i>Virus de IBR y DVB, Haemophilus somnus, Campylobacter, Leptospira</i>	-	Inactivada	-	IM SC	Bovinos
Santa Elena	BOVISAN LEPTO 8	<i>Leptospira interrogans: Pomona pomona, icterohaemorrhagiae, hardjo bovis y prajitno, canicola, wolffi, grippotyphosa, tarassovi</i>	Acuoso	Inactivada	3 mL	IM SC	Bovinos
					2 mL	IM SC	Ovinos y Suinos
	BOVISAN LEPTO 8 ADYUVAC	<i>Leptospira icterohaemorrhagiae, Pomona, canicola, wolffi, hardjo bovis y prajitno, tarassovi y grippotyphosa.</i>	Oleoso	Inactivada	5 mL	IM SC	Bovinos
	BOVISAN TOTAL Se	<i>Virus de IBR tipo 1 (BHV-1) y tipo 5 (BHV-5); Virus de la DVB tipo 1 y 2; Leptospiras serovares: Pomona, wolffi, hardjo prajitno y bovis, tarassovi, icterohaemorrhagiae, canicola y grippotyphosa; Campylobacter fetus venerealis intermedius, Campylobacter fetus fetus</i>	Acuoso	Inactivada	5 mL	SC	Bovinos
	NEUMOSAN V3	<i>Virus de IBR tipo 1 (BHV-1) y tipo 5 (BHV-5); Virus de la DVB y PI3; Pasteurella multocida y haemolytica; Salmonella dublin y E. coli k99</i>	Oleoso	Inactivada	5 mL	IM SC	Bovinos
Uruguay	OLEO IBR DVB	<i>Virus de IBR; Virus de la DVB</i>	Oleoso	Inactivada	-	IM SC	Bovinos
	LEPTOPLUS 7	-	-	Inactivada	-	SC	Bovinos, ovinos y suinos

Tabla A. IV. Vacunas antirrábicas registradas en nuestro país

Laboratorio	Nombre	Composición	Adyuvante	Estado	Dosis	Vía	Especie
<i>Biogénesis</i>	RABIA PARESIANTE	<i>Virus rábico</i>	Acuoso	Inactivada	2 mL	SC	Bovino
<i>Santa Elena</i>	RABAT-VAC	<i>Virus rábico (cepa PV)</i>	Acuoso	Inactivada	2 mL	IM SC	Bovinos, equinos caninos y felinos
<i>Sinervia</i>	NOBIVAC RABIES	<i>Virus rábico (clonado de cepa Pasteur RIVM)</i>	Acuoso	Inactivada	1 mL	IM	Bovinos, caprinos, ovinos, equinos, caninos y felinos

Tabla A.V. Vacunas antiaftosa registradas en el Uruguay

Laboratorio	Nombre	Composición	Adyuvante	Estado	Dosis	Vía	Especie
<i>Vecol</i>	AFTOGAN	<i>Virus de la fiebre aftosa subtipos: A24 Cruzeiro, O1 Campos</i>	Oleoso	Inactivada	2 mL	IM SC	Bovino

Tabla A.VI. Expectativas Porcentuales de protección (EPP) – Virus O₁ Campos (Extraído de Allende, 2001)

ELISA Policlonal

Título	EPP	Título	EPP	Título	EPP	Título	EPP	Título	EPP	Título	EPP	Título	EPP
0.58	0.21	1.00	2.25	1.42	20.25	1.84	73.69	2.26	96.86	2.68	99.71	3.10	99.97
0.60	0.23	1.02	2.52	1.44	22.16	1.86	75.84	2.28	97.19	2.70	99.74	3.12	99.98
0.62	0.26	1.04	2.81	1.46	24.19	1.88	77.88	2.30	97.49	2.72	99.77	3.14	99.98
0.64	0.29	1.06	3.14	1.48	26.35	1.90	79.78	2.32	97.75	2.74	99.79	3.16	99.98
0.66	0.33	1.08	3.51	1.50	28.63	1.92	81.56	2.34	97.99	2.76	99.81	3.18	99.98
0.68	0.37	1.10	3.92	1.52	31.02	1.94	83.22	2.36	98.21	2.78	99.83	3.20	99.98
0.70	0.41	1.12	4.37	1.54	33.51	1.96	84.76	2.38	98.40	2.80	99.85	3.22	99.99
0.72	0.46	1.14	4.87	1.56	36.11	1.98	86.18	2.40	98.57	2.82	99.87	3.24	99.99
0.74	0.52	1.16	5.43	1.58	38.78	2.00	87.48	2.42	98.72	2.84	99.88	3.26	99.99
0.76	0.58	1.18	6.05	1.60	41.53	2.02	88.68	2.44	98.86	2.86	99.90	3.28	99.99
0.78	0.65	1.20	6.73	1.62	44.33	2.04	89.78	2.46	98.98	2.88	99.91	3.30	99.99
0.80	0.73	1.22	7.49	1.64	47.17	2.06	90.78	2.48	99.09	2.90	99.92	3.32	99.99
0.82	0.82	1.24	8.32	1.66	50.02	2.08	91.70	2.50	99.19	2.92	99.93	3.34	99.99
0.84	0.91	1.26	9.23	1.68	52.88	2.10	92.53	2.52	99.27	2.94	99.93	3.36	99.99
0.86	1.02	1.28	10.24	1.70	55.71	2.12	93.28	2.54	99.35	2.96	99.94	3.38	99.99
0.88	1.15	1.30	11.34	1.72	58.51	2.14	93.96	2.56	99.42	2.98	99.95	3.40	100.00
0.90	1.28	1.32	12.54	1.74	61.26	2.16	94.58	2.58	99.48	3.00	99.95	3.42	100.00
0.92	1.44	1.34	13.84	1.76	63.93	2.18	95.14	2.60	99.54	3.02	99.96	3.44	100.00
0.94	1.61	1.36	15.27	1.78	66.53	2.20	95.64	2.62	99.59	3.04	99.96	3.46	100.00
0.96	1.80	1.38	16.80	1.80	69.02	2.22	96.09	2.64	99.63	3.06	99.97	3.48	100.00
0.98	2.01	1.40	18.46	1.82	71.41	2.24	96.50	2.66	99.67	3.08	99.97	3.50	100.00

Tabla A.VII. Expectativas Porcentuales de protección (EPP) – Virus A₂₄ Cruzeiro
(Extraído de Allende, 2001)

ELISA Policlonal

Título	EPP	Título	EPP	Título	EPP	Título	EPP	Título	EPP	Título	EPP	Título	EPP
0.58	0.03	1.00	0.42	1.42	6.29	1.84	51.69	2.26	94.46	2.68	99.63	3.10	99.98
0.60	0.03	1.02	0.48	1.44	7.12	1.86	54.97	2.28	95.11	2.70	99.68	3.12	99.98
0.62	0.03	1.04	0.55	1.46	8.04	1.88	58.21	2.30	95.69	2.72	99.72	3.14	99.98
0.64	0.04	1.06	0.62	1.48	9.07	1.90	61.38	2.32	96.20	2.74	99.75	3.16	99.98
0.66	0.04	1.08	0.71	1.50	10.21	1.92	64.45	2.34	96.65	2.76	99.78	3.18	99.99
0.68	0.05	1.10	0.81	1.52	11.49	1.94	67.41	2.36	97.06	2.78	99.81	3.20	99.99
0.70	0.06	1.12	0.92	1.54	12.90	1.96	70.24	2.38	97.41	2.80	99.83	3.22	99.99
0.72	0.07	1.14	1.05	1.56	14.45	1.98	72.92	2.40	97.72	2.82	99.85	3.24	99.99
0.74	0.08	1.16	1.20	1.58	16.16	2.00	75.44	2.42	98.00	2.84	99.87	3.26	99.99
0.76	0.09	1.18	1.36	1.60	18.03	2.02	77.80	2.44	98.24	2.86	99.89	3.28	99.99
0.78	0.10	1.20	1.55	1.62	20.06	2.04	80.00	2.46	98.46	2.88	99.90	3.30	99.99
0.80	0.11	1.22	1.76	1.64	22.26	2.06	82.02	2.48	98.64	2.90	99.91	3.32	99.99
0.82	0.13	1.24	2.01	1.66	24.62	2.08	83.89	2.50	98.81	2.92	99.92	3.34	100.00
0.84	0.15	1.26	2.29	1.68	27.15	2.10	85.59	2.52	98.95	2.94	99.93	3.36	100.00
0.86	0.17	1.28	2.60	1.70	29.83	2.12	87.14	2.54	99.08	2.96	99.94	3.38	100.00
0.88	0.19	1.30	2.95	1.72	32.67	2.14	88.55	2.56	99.19	2.98	99.95	3.40	100.00
0.90	0.22	1.32	3.36	1.74	35.63	2.16	89.82	2.58	99.29	3.00	99.96	3.42	100.00
0.92	0.25	1.34	3.81	1.76	38.71	2.18	90.96	2.60	99.38	3.02	99.96	3.44	100.00
0.94	0.28	1.36	4.33	1.78	41.88	2.20	91.99	2.62	99.46	3.04	99.97	3.46	100.00
0.96	0.32	1.38	4.90	1.80	45.12	2.22	92.91	2.64	99.52	3.06	99.97	3.48	100.00
0.98	0.37	1.40	5.56	1.82	48.40	2.24	93.73	2.66	99.58	3.08	99.97	3.50	100.00

Tabla A. VIII. Expectativas Porcentuales de protección (EPP) – Virus C3 Indaial
(Extraído de Allende, 2001)

Elisa Policlonal

Título	EPP	Título	EPP	Título	EPP	Título	EPP	Título	EPP	Título	EPP	Título	EPP	Título	EPP
0.40	0.47	0.88	2.84	1.30	15.37	1.72	53.03	2.14	87.53	2.56	97.76	2.98	99.63	3.40	99.94
0.48	0.51	0.90	3.09	1.32	16.53	1.74	55.19	2.16	88.45	2.58	97.94	3.00	99.66	3.42	99.95
0.50	0.56	0.92	3.36	1.34	17.77	1.76	57.33	2.18	89.31	2.60	98.11	3.02	99.69	3.44	99.95
0.52	0.61	0.94	3.65	1.36	19.08	1.78	59.44	2.20	90.11	2.62	98.27	3.04	99.72	3.46	99.95
0.54	0.68	0.96	3.97	1.38	20.45	1.80	61.52	2.22	90.86	2.64	98.41	3.06	99.74	3.48	99.96
0.56	0.72	0.98	4.32	1.40	21.91	1.82	63.56	2.24	91.56	2.66	98.54	3.08	99.76	3.50	99.96
0.58	0.79	1.00	4.69	1.42	23.43	1.84	65.55	2.26	92.21	2.68	98.66	3.10	99.78	3.52	99.96
0.60	0.86	1.02	5.10	1.44	25.03	1.86	67.49	2.28	92.81	2.70	98.77	3.12	99.80	3.54	99.97
0.62	0.93	1.04	5.53	1.46	26.70	1.88	69.37	2.30	93.37	2.72	98.87	3.14	99.82	3.56	99.97
0.64	1.02	1.06	6.01	1.48	28.43	1.90	71.19	2.32	93.89	2.74	98.96	3.16	99.83	3.58	99.97
0.66	1.11	1.08	6.52	1.50	30.24	1.92	72.94	2.34	94.37	2.76	99.05	3.18	99.85	3.60	99.98
0.68	1.21	1.10	7.07	1.52	32.10	1.94	74.62	2.36	94.81	2.78	99.13	3.20	99.86	3.62	99.98
0.70	1.32	1.12	7.66	1.54	34.03	1.96	76.23	2.38	95.23	2.80	99.20	3.22	99.87	3.64	99.98
0.72	1.43	1.14	8.30	1.56	36.01	1.98	77.77	2.40	95.61	2.82	99.27	3.24	99.88	3.66	99.98
0.74	1.56	1.16	8.99	1.58	38.04	2.00	79.24	2.42	95.96	2.84	99.33	3.26	99.89	3.68	99.98
0.76	1.70	1.18	9.72	1.60	40.11	2.02	80.64	2.44	96.28	2.86	99.38	3.28	99.90	3.70	99.98
0.78	1.85	1.20	10.51	1.62	42.22	2.04	81.96	2.46	96.58	2.88	99.43	3.30	99.91	3.72	99.99
0.80	2.02	1.22	11.36	1.64	44.35	2.06	83.21	2.48	96.86	2.90	99.48	3.32	99.92	3.74	99.99
0.82	2.20	1.24	12.27	1.66	46.51	2.08	84.39	2.50	97.11	2.92	99.52	3.34	99.92	3.76	99.99
0.84	2.24	1.26	13.24	1.68	48.68	2.10	85.50	2.52	97.35	2.94	99.56	3.36	99.93	3.78	100.00
0.86	2.61	1.28	14.27	1.70	50.85	2.12	86.55	2.54	97.56	2.96	99.60	3.38	99.94	4.00	100.00