



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

PRODUCCIÓN DE VACUNAS VETERINARIAS

**REPORTE DE TRABAJO
PROFESIONAL**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA

FERNANDO GUADARRAMA ROMERO

TUTOR

M EN C. ALFONSO JOSÉ VILCHIS PELUYERA



2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

PERFIL DE LA INSTITUCIÓN

Holland de México S.A. de C.V. es una empresa privada que se dedica a la fabricación y comercialización de productos farmacéuticos y biológicos de interés veterinario. La empresa fue fundada por el MVZ Humberto Andonegui Luna (actual Director General) en 1983 en una vieja casona de la colonia Roma de la Ciudad de México. En 1987 la empresa se trasladó a sus actuales instalaciones en Morelos, y actualmente se encuentra en construcción una más amplia y moderna planta de producción en CIVAC Jiutepec Morelos.

La estructura general de Holland de México S.A. de C.V. es la siguiente:

- Área de Producción de Farmacéuticos. En esta área se elaboran productos antibióticos, vitamínicos, cosméticos, productos para combatir ectoparásitos y endoparásitos.
- Departamento de Control de Calidad de Farmacéuticos
- Área de Producción de Biológicos. En esta área se elaboran vacunas virales para pequeñas especies.
- Departamento de Control de Calidad de Biológicos
- Departamento Administrativo y Contable
- Fuerza de Ventas

El área de Producción de Biológicos cuenta con del siguiente personal;

- Jefe de Producción: Fernando Guadarrama Romero
- Operarias: Nora Morales Cortés
Leticia Hernández García
Alejandra Ojeda Mazón

HOLLAND DE MEXICO, S.A. DE C.V.

22 de Octubre de 2007

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Por medio del presente escrito la Dirección General de Holland de México S.A. de C.V manifiesta que el señor Fernando Guadarrama Romero ha laborado en ésta empresa desempeñando el puesto de Jefe de Producción de Biológicos. En marzo de 1995 fue él quien implementó e inició los trabajos de producción y control de calidad de la nueva área de Biológicos de la empresa. Desde entonces, y hasta la fecha, Fernando ha mostrado alta capacidad técnica, honestidad, profesionalismo y lealtad hacia ésta empresa.

Esta dirección tiene conocimiento de los elementos documentales que Fernando Guadarrama requiere para continuar con los trámites necesarios para la obtención de su título de Biólogo. Uno de tales documentos es un Informe de Trabajo Profesional, el cual, a pesar de su contenido altamente técnico, no revela secretos industriales de ésta empresa. En dicho Informe, Fernando describe su trayectoria profesional en el área de la biotecnología veterinaria desde marzo de 1995.

Esta empresa manifiesta su apoyo a Fernando, en lo relacionado con los trámites escolares que conducirán a la emisión de su Título y Cédula Profesional.

Atentamente:


M.V.Z. Humberto Andonegui Luria
Director General de Holland de México S.A. de C.V

PRESENTACIÓN PERSONAL

El presente Informe de Trabajo Profesional da cuenta de mis actividades como profesional laborando en la empresa Holland de México S.A. de C.V., desempeñando el puesto de Jefe de Producción de Biológicos. El informe abarca dos períodos: el primero, que va de 1995 al 2000, durante el cual participé en la producción de cuatro vacunas caninas líquidas; y el segundo, que abarca desde el año 2001 hasta hoy, durante el cual se incorporaron a la producción tres vacunas liofilizadas.

Como Jefe de Producción de Biológicos tengo a mi cargo la operación técnica y administrativa del Área de Biológicos de Holland de México. Es mi responsabilidad, que la producción de los siete biológicos de la empresa se lleve a cabo con la calidad y en la cantidad requerida por la compañía.

El 01 de marzo de 1995 ingresé a Holland de México. Después de dirigir el equipamiento del área de biológicos, recién construida, inicié, con la colaboración de tres operarias, los trabajos de producción y control de calidad de las cuatro vacunas líquidas de la compañía.

Con base en los Manuales de Producción y Control de Calidad de *Parvomune*, *Rabimune*, *Canomune DHL* y *Coronamune-P*, propiedad de Holland de México S.A. de C.V., yo implementé y estandaricé todos los procesos de producción que menciono en este informe.

En el transcurso del período 2000 - 2003, en colaboración con el MVZ Javier Basurto Alcántara, asesor técnico de la empresa, y junto con el MVZ Francisco Liljehult Fuentes, en ese entonces jefe de Control de Calidad de Holland, participé en el desarrollo de las vacunas de virus vivos liofilizados *Canomune puppy DP*, *Canomune puppy DHA2P* y *Canomune puppy DHA2PPi*. Mi contribución en esta actividad de desarrollo fue:

- La adaptación del virus de distemper canino cepa Lederle a la línea celular VERO. El virus proveniente de ATCC estaba adaptado para multiplicarse en fibroblastos de embrión de pollo (FEP) y era necesario, por motivos prácticos y para evitar las eventuales contaminaciones que ocasionalmente incuban los embriones, adaptar el virus a la línea celular estable y controlada VERO. Yo le practiqué al virus un pasaje en FEP y tres pasajes posteriores en células VERO, con lo cual el virus quedó adaptado a esta última.
- La invención del estabilizador térmico de las vacunas para su liofilización.
- La formulación y fabricación de los lotes piloto para constatación y registro.

Junto con el MVZ Javier Basurto Alcántara y el MVZ Francisco Liljehult Fuentes, yo también participé en la implementación, estandarización y ejecución de los siguientes métodos de Control de Calidad:

- Titulación viral en cultivo celular por efecto citopático.
- Titulación viral *in vivo*.
- Titulación viral por hemoaglutinación.
- Titulación viral por inmunofluorescencia.
- Titulación viral por plaqueo.
- Identidad viral por inmunofluorescencia.
- Pureza viral mediante la prueba de inmunofluorescencia.
- Inactivación viral mediante la prueba de inmunofluorescencia.
- Inactivación *in vivo*.
- Inmunogenicidad mediante la prueba de inhibición de la hemoaglutinación.
- Inmunogenicidad mediante la prueba de virus-suero neutralización.
- Potencia *in vivo*.
- Inocuidad *in vivo*.
- Esterilidad.

Actualmente las actividades que yo desempeño rutinariamente son:

- Planeación, organización y coordinación de la producción.
- Control administrativo de la producción.
- Cultivo celular: descongelación celular y producción masiva de cultivos celulares (con el apoyo de alguna operaria).
- Repoblación del cepario viral y producción de semillas virales de trabajo.
- Producción masiva de cultivos virales (con el apoyo de alguna operaria).
- Inactivación viral.
- Diaria revisión microscópica de todos los cultivos que se encuentren en incubación.
- Repoblación del banco de células (crioalmacenaje).
- Fabricación del estabilizador para las vacunas liofilizadas.
- Mezcla y terminación de los graneles (con el apoyo de alguna operaria).

- Asesoría y apoyo al departamento de Control de Calidad cuando se requiere.
- Capacitación y entrenamiento técnico para las operarias.
- Documentación. Elaboración de procedimientos normalizados de operación con el fin de lograr la certificación ISO.

El personal que colabora conmigo son tres operarias, a quienes he entrenado para realizar las siguientes actividades.

- Elaboración del medio de cultivo celular.
- Elaboración de la solución tripsina-EDTA.
- Elaboración del adyuvante de carbopol.
- Elaboración del diluyente para vacuna.
- Descongelación, cosecha y clarificación de los fluidos virales.
- Dosificación, retapado, revisión óptica, etiquetado y acondicionado de los biológicos
- Actividades de apoyo en cultivo celular, producción viral y mezcla.
- Lavado y esterilización de materiales.
- Limpieza y desinfección de las áreas de trabajo.

Yo superviso todos estos procesos.

A lo largo de mi práctica profesional me he enfrentado con problemas técnicos asociados a la producción de las vacunas. A continuación menciono algunos de ellos y cómo los solucioné:

- En los primeros procesos de inactivación viral que yo practiqué utilicé la betapropiolactona (BPL), compuesto químico que actualmente se sigue usando en la fabricación de muchas vacunas muertas para humanos y animales. Sin embargo el BPL es cancerígeno, es muy caro y es muy difícil su importación. Ante esta problemática, implementé en México un nuevo método de inactivación (mediante la aziridina BEI), el cual resultó ser muy eficiente, barato y seguro (9).
- Pobre, e incluso nulo crecimiento celular a causa de cierta toxicidad proveniente de la solución de bicarbonato de sodio, la cual se agrega al medio para neutralizar su pH ácido. La solución de bicarbonato la esterilizaba por autoclave, entonces las altas temperaturas del proceso descomponían parte del bicarbonato y se formaban compuestos tóxicos para las células. Solución: comencé a esterilizar la solución de bicarbonato mediante filtración por membrana de acetato de celulosa.
- Bajos niveles de viabilidad después de la descongelación celular a causa de un efecto tóxico del crioprotector DMSO. El DMSO esterilizado por filtración lo almacenaba en refrigeración en un vial de 50 mililitros, el cual se abría cada vez que se realizaba un proceso de crioalmacenaje celular. Esa manipulación iba incrementando paulatinamente el volumen de aire dentro del vial. El aire oxida el DMSO y los productos de la oxidación son citotóxicos. Solución: después de esterilizar el DMSO lo fraccioné en viales de un mililitro (que después de abiertos ya no se reutilizan), procurando que dentro del vial quede la menor cantidad de aire posible.
- Uno de los requisitos de las vacunas muertas es que sean producidas con semillas de virus patógenos. El virus de distemper cepa Rockborn forma parte de *Canomune DHL*. En el quinto pase de la semilla madre de este virus dejó de ser patógeno en perros, es decir, se estaba atenuando. Las cepas no patógenas de virus de moquillo recuperan su virulencia cuando se les realiza una secuencia de pases en linfocitos de perro (4). Con el fin de reactivar la virulencia del virus Rockborn en pase 5, le di siete pases en

cultivos de linfocitos periféricos de perro. Los pases 6 y 7 resultaron patógenos en perro.

- Durante el desarrollo de la vacuna *Canomune puppy DHA2PPi*, detecté una baja (en algunos perros nula) inmunogenicidad del virus de parainfluenza. En un ensayo de plaqueo (38), noté que el virus producía placas chicas y placas grandes. Con el fin de aumentar la antigenicidad del virus seleccioné la placa más grande y a partir de ella preparé una nueva semilla, la cual, probada en perros, inducía en ellos la respuesta protectora que se requería.
- Los primeros lotes de las vacunas liofilizadas salían con alrededor de 15 % de pastillas fracturadas. Solución: incrementé la concentración de gelatina al estabilizador.
- Cerca del 5 % de las dosis de los primeros lotes de las vacunas liofilizadas carecían de vacío. Solución: apliqué una pequeña cantidad de silicón líquido al tapón para que éstos resbalaran con facilidad y se produjera un perfecto sellado de los viales en la última etapa del proceso de liofilización.

GLOSARIO

Anclaje–dependientes: Células que proliferan adheridas a un soporte.

Aneuploide: Célula con un número de cromosomas que no es múltiplo exacto del número haploide. Ejemplos son las trisomías ó monosomías.

La mayoría de las líneas celulares continuas son aneuploides, pero además exhiben una marcada heterogeneidad genética (heteroploidia), es decir, dentro de un cultivo hay subpoblaciones celulares con diferente cariotipo **(50)**. Por ejemplo: CRFK es una línea celular continua derivada de gato ($2n = 38$); se le realizó un cariotipo en el subcultivo número 181 y la distribución de las frecuencias cromosómicas de 50 células fue la siguiente:

Número de células	31	16	3
Número de cromosomas	36	37	38

ATCC- American type culture collection

Atenuación viral. Es un proceso por medio del cual, mediante decenas de pasajes seriados *in vitro*, una cepa patógena silvestre reduce su virulencia y deja de ser patógena para la especie de la que fue aislado.

Confluencia: Estadio de un cultivo en el que toda la superficie cultivable se encuentra cubierta por una monocapa celular.

Conteo celular: Es la determinación del número de células en un cultivo. Ejemplo: si se quiere saber la cantidad de células en un cultivo confluyente de 25 cm^2 , se decanta el medio del cultivo, se agrega a la monocapa 2 ml de solución tripsina-EDTA para desprender las células. Después del desprendimiento se agregan 8 ml de medio de cultivo y se homogeniza la suspensión mediante pipeteo suave. Hasta aquí tenemos 10 ml de suspensión celular. Posteriormente se toma un mililitro de la suspensión y se realiza una dilución 1:10, se toma una pequeña alícuota de la dilución y se deposita en un portaobjetos de conteo celular (cámara de Neubauer). Se realiza el conteo (60 células). Si el espacio de conteo tiene un volumen de un microlitro (1 mm^2 por 0.1 mm), tendremos que el cultivo tenía $(60)(1000)(10)(10) = 6$ millones de células.

DICC₅₀: Es el título viral expresado en términos de la dosis infectante en cultivo celular que infectará al 50% de las monocapas desafiadas con un inóculo definido. Por ejemplo: si se tiene una suspensión viral con título de 10^3 DICC₅₀/0.2 ml, significa que cuando se toman inóculos de 0.2 ml de la dilución 1:1000 del virus para infectar 4 cultivos de células susceptibles a ese virus, se espera que solo dos cultivos queden infectados.

Efecto citopático: Son los cambios morfológicos y de adherencia que sufre una célula al ser infectada por un virus.

MOI: Multiplicidad de infección. Durante una infección viral, es la relación virus/células.

$$\text{MOI} = \frac{\text{UFP's}}{\text{Número de células}}$$

Número de pase: Partiendo del tejido de origen, es la cantidad de subcultivos consecutivos que se le ha dado a una línea celular.

Pasaje: también se le conoce como pase ó subcultivo.

Pasaje de mantenimiento: Las células de un monoestrato confluyente se separan enzimáticamente de su soporte (botella de cultivo), se resuspenden en medio de cultivo y después se resiembrá solo una fracción de ellas en el mismo soporte. Con esto se evita el envejecimiento del monoestrato inicial.

Pasaje de propagación: Transferencia de una población celular de un soporte a otro(s) con mayor superficie cultivable.

Placa: Pequeña área (generalmente redonda e incolora) de un monoestrato celular, la cual está formada por células lisadas debido a infección viral.

Relación UFP - DICC₅₀: La práctica experimental (y estadística) nos muestra que cada DICC₅₀ equivale a 0.7 UFP (**57**). Es decir, si se infectaran, por ejemplo, 100 cultivos de células CRFK, cada uno con 10 DICC₅₀ del coronavirus canino, se tendría en promedio, la formación de 7 placas por cultivo.

Sincitio: Célula gigante polinucleada derivada de la fusión de las membranas plasmáticas de células adyacentes infectadas por algún paramixovirus.

UFP: Unidad formadora de placa. Es una partícula viral infectiva.

Hoja de Datos del Jurado

<p>1. Datos del alumno Guadarrama Romero Fernando 01777 3 21 68 76 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 081545726</p>
<p>2. Datos del tutor M en C Vilchis Peluyera Alfonso José</p>
<p>3. Datos del sinodal 1 Dr. Camacho Carranza Rafael</p>
<p>4. Datos del sinodal 2 Dr. Cárdenas Vázquez René de Jesús</p>
<p>5. Datos del sinodal 3 Dra. Torres Maldonado Leda Carolina</p>
<p>6. Datos del sinodal 4 M en C Rodarte Murguía Beatriz</p>
<p>7. Datos del trabajo escrito Producción de Vacunas Veterinarias 62 p 2007</p>

INDICE

	PAGINA
PERFIL DE LA INSTITUCIÓN	1
PRESENTACIÓN PERSONAL	2
GLOSARIO	7
INTRODUCCIÓN	9
PRIMER PERÍODO. VACUNAS LÍQUIDAS	17
SEGUNDO PERÍODO. VACUNAS LIOFILIZADAS	38
EVALUACIÓN CRÍTICA	45
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
ANEXOS	51

1. INTRODUCCIÓN

Las vacunas o inmunógenos son aquellos productos biológicos empleados en la prevención de enfermedades tanto de los animales como de los seres humanos.

La vacunación consiste en la aplicación de antígenos iguales o similares a los agentes infecciosos, desprovistos de las características que les confieren capacidad patógena, pero que conservan la facultad de estimular mecanismos inmunológicos **(39, 70)**.

La vacunología humana, centrada sobre todo en el individuo, parece estar muy alejada de la medicina veterinaria, que se ocupa esencialmente de la salud de rebaños y animales de compañía. Sin embargo, en el pasado ha habido numerosos episodios (de viruela, cólera aviar, carbunco bacteriano, erisipela porcina, rabia o tuberculosis, por ejemplo) que han puesto de relieve los estrechos vínculos que existen entre la investigación sobre las vacunas humanas y la dedicada a las vacunas veterinarias. En algunos casos la vacuna humana ha precedido a la animal, mientras que en otros ha ocurrido lo contrario **(46, 59)**.

1.1 LA VACUNACIÓN ANTIRRÁBICA EN PERROS

La rabia es una de las enfermedades más antiguas de la humanidad y su conocimiento se remonta aproximadamente 4 mil años A.C **(6, 42)**. Es una enfermedad aguda del sistema nervioso central que afecta a los mamíferos y es causada por un virus *Rhabdovirus* que se transmite por la saliva **(30, 69)**. Sólo se identificaba con las especies silvestres como zorros, lobos, mapaches, tejones y al transcurrir los años, estos animales fueron difundiendo el virus por el mundo; más tarde llegó a las especies domésticas, y en consecuencia al hombre que convive con ellas **(42, 46)**. El virus ataca a casi todos los mamíferos, aunque actualmente el perro sea el transmisor más frecuente. Cerca del 90% de los casos de rabia en el hombre son debidos a la transmisión por el perro; el gato es el responsable de solo un 5%. Pero prácticamente todos los animales domésticos son susceptibles a la rabia, incluyendo las vacas, cerdos, cabras, ovejas, ratones, conejos y monos **(6, 42, 55)**.

En el siglo XIX, con el avance de la microbiología se llega a las investigaciones científicas sobre el tratamiento para la rabia, y en 1804 el investigador alemán G. Zinke, demostró que ésta se podía transmitir a perros sanos por inoculación de saliva de animales rabiosos. Posteriormente, Galtier (1879) utilizó inicialmente el conejo como modelo experimental inoculándolo con saliva de un perro rabioso demostrando su transmisión **(6)**.

Estos estudios sirvieron de base para que Luis Pasteur en la década de los ochenta del siglo XIX sugiriera que el agente etiológico de la rabia no era una bacteria, sino un virus y que no solo se encontraba en la saliva, sino en el sistema nervioso central.

Pasteur comprueba que el germen no se desarrolla en medios de cultivo para bacterias; pero por el contrario, lo hace fácilmente si es inyectado en el sistema nervioso del perro o del conejo y señala que “uno se ve inclinado a creer que la causa es un microbio de infinita pequeñez, que no tiene la forma de bacilo ni de micrococo” (67). Pasteur efectúa, con la colaboración de Chamberland y Roux, pasajes sucesivos del germen en el tejido nervioso de esos animales llegando a obtener un virus de virulencia fija, a diferencia del encontrado en la naturaleza que es de virulencia variable. Las médulas infectadas por ese germen fijo dejadas en contacto del oxígeno y en atmósfera desecada pierden su virulencia, y al ser inoculado un extracto de ellas a perros, Pasteur comprueba que esos animales se habían vuelto resistentes a ataques posteriores del virus virulento (42,46).

Pasteur necesitaba hacer la comprobación de esta técnica en el ser humano. Es así como el 6 de Julio de 1885, Pasteur inocular su vacuna a un niño de 9 años de edad, Joseph Meister, que había sido mordido 14 veces por un perro rabioso. Aplica bajo un pliegue cutáneo en el hipocondrio derecho, media jeringa de una suspensión de médula de un conejo rabioso preservada en un frasco con aire seco durante 15 días. Se le hicieron, en un lapso de 11 días, 13 inoculaciones sucesivas con médulas de virulencia progresiva (42, 67). José Meister sobrevivió.

El método de vacunación desarrollado por Pasteur permaneció vigente hasta 1908, cuando Fermi desarrolló una vacuna, parcialmente inactivada con fenol, la cual consistía en una suspensión de cerebros infectados con rabia, obtenidos de una gran variedad de especies animales que incluían caballos, cabras, conejos y monos. La virulencia residual de esta vacuna provocó varios casos de infección rábica en humanos y en perros. En 1919, Semple siguió usando el fenol y logró la inactivación total de la vacuna. Sin embargo estas vacunas preparadas a partir de tejido nervioso provocaban severas encefalopatías en muchos de los animales vacunados (15).

Para mejorar esa situación, en 1948 Koprowsky y Cox adaptaron la cepa Flury (virus rábico aislado de un humano) en embriones de pollo. Inicialmente le dieron al virus 136 pases. El virus producto de los pases 40 al 50 en embrión de pollo fue designado como *low-egg-passage* (LEP). Esta vacuna de virus atenuado ocasionalmente provocaba rabia en cachorros vacunados. Para incrementar la seguridad de esta vacuna, se siguió pasando el virus en embriones de pollo hasta que, en el pase 205, dejó de ser patógeno en perros cuando se les inoculaba vía intracerebral el virus, denominado *high-egg-passage* (HEP). Esta vacuna era totalmente segura para perros de tres meses de edad (15).

En 1960 Fenje adaptó la cepa SAD (virus aislado de un perro rabioso en 1935 en Alabama) a células de riñón de hamster. El virus había sido mantenido varios años por medio de pases seriados en cerebro de ratón. Posteriormente el virus fue atenuado en células de riñón porcino para la producción de una vacuna que era efectiva en perros, gatos, borregos, vacas y caballos (31).

En 1963 Kissling desarrolló una vacuna antirrábica propagando uno de los virus de Pasteur (CVS-11) en cultivo primario de riñón de hamster. La inactivó con fenol y le adicionó hidróxido de aluminio como adyuvante **(43)**.

En la actualidad la mayoría de las vacunas antirrábicas para perros y gatos son producidas en cultivos de líneas celulares continuas (BHK). Utilizan las cepas de Pasteur (CVS, PM, RIV), u otras como la SAD y Flury LEP. Son inactivadas con betapropiolactona o etilenimina binaria (BEI), y son adyuvantadas con hidróxido de aluminio **(20, 44)**.

1.2 LA VACUNACIÓN CONTRA EL MOQUILLO CANINO.

La enfermedad del moquillo (distemper) canino está considerada como una de las enfermedades infecciosas mas importantes en los perros. Se trata de una enfermedad sistémica, altamente contagiosa y generalmente fatal **(30, 69)**.

La enfermedad se notificó por primera vez en Europa en 1760, pero no fue sino hasta 1809 que Jenner la describió con mayor exactitud. En 1905 Carré demostró que el agente etiológico era un virus **(7, 30)**. En 1924 Puntoni confirmó que la enfermedad era de origen viral e inició los ensayos para la inmunización; transmitió el agente por inoculación intracerebral, y encontró que el agente reaislado del cerebro e inactivado con formalina protegía a los perros después de enfrentarlos al virus virulento **(7, 21, 36,)**. Lebailly repitió los experimentos de Puntoni en 1927, pero utilizó bazo en vez de cerebro. Dunkin y Laidlow confirmaron la teoría de Carré en 1926, y desarrollaron el primer método exitoso para la inmunización artificial contra el moquillo, haciendo de la vacunación un procedimiento cotidiano **(7, 56)**.

Sin embargo, las vacunas inactivadas no conferían una eficiente inmunización, y por lo tanto, en los años treintas y cuarentas eran muy comunes los casos de moquillo canino en perros que previamente habían recibido ese tipo de vacunas **(5)**.

En los años cincuentas, las cepas Onderstepoort y Lederle del virus de distemper fueron atenuadas mediante decenas de pases, primero en embrión de pollo y después en cultivos de fibroblastos de embrión de pollo **(61)**. En los años sesentas la cepa Rockborn fue adaptada y atenuada mediante pases en cultivos primarios de células de riñón de perro **(16, 64)**. Desde entonces, y hasta la fecha, esas tres cepas se han usado para la producción de eficientes vacunas de virus vivo atenuado contra el distemper canino **(17, 61, 64, 65)**.

1.3 LA VACUNACIÓN CONTRA EL PARVOVIRUS CANINO.

En 1970 un equipo de investigadores encabezado por Binn logró el primer aislamiento de un parvovirus de los perros. Los autores denominaron al virus “*minute virus of canine*” (MVC). Actualmente se le conoce como parvovirus canino tipo 1 (CPV-1) y se sabe que es un virus no patógeno **(14, 30, 32)**. El CPV-1 es totalmente diferente al parvovirus canino tipo 2 (CPV-2).

El interés por el CPV-2 surgió en 1978, cuando en los Estados Unidos se empezó a identificar un síndrome caracterizado por vómito y diarrea hemorrágica severa, el cual tuvo una aparición súbita, causando un fuerte impacto económico en criaderos de perros debido a las elevadas tasas de mortalidad de la enfermedad. La epidemia se extendió a todo el mundo y en 1980 ocurrieron los primeros brotes de esta enfermedad canina en México **(30, 32)**.

Inmediatamente después de que se reconoció al CPV-2 como un virus altamente patógeno, laboratorios en todo el mundo comenzaron a desarrollar vacunas inactivadas y atenuadas contra el virus. Adaptaron y propagaron el virus, tanto en cultivos primarios de riñón de perro y de gato, como en líneas celulares continuas (MDCK, A72 y CRFK) **(10, 22, 29, 51, 58, 60)**

Desde el surgimiento del CPV-2, han aparecido dos nuevos tipos antigénicos, primero el CPV-2a y posteriormente el CPV-2b **(58, 51)**. Las diferencias antigénicas entre los tres virus son tan sutiles que los perros inmunizados con vacunas de virus vivo atenuado CPV-2b, quedan también protegidos contra las otras dos variantes del virus **(60, 66)**.

1.4 LAS VACUNAS CANINAS CON MÚLTIPLES ANTÍGENOS

Desde finales de los años sesentas se han producido inmunógenos caninos que combinan diferentes antígenos **(61, 62)**. El uso de vacunas combinadas o múltiples, es un buen recurso que permite aplicar simultáneamente varios antígenos virales y bacterianos, limitando el número de intervenciones y asegurando una adecuada respuesta inmune contra todos ellos **(1, 10, 11, 19, 54,)**. Muchas de las vacunas múltiples para perros incluyen, además del distemper y el parvovirus CPV2, los siguientes antígenos:

- Hepatitis infecciosa. Los perros afectados por éste virus de forma sobreaguda mueren en pocas horas y con frecuencia los dueños piensan que se debe a un envenenamiento. Algunos síntomas son: decaimiento, falta de apetito, fiebre, conjuntivitis, temblores, convulsiones, edema ocular (ojo azul), vómitos, diarrea a veces sanguinolenta. La enfermedad provoca extenso daño en el hígado, riñones y

páncreas **(69)**. Este antígeno generalmente se combina en una vacuna triple con el distemper y la bacterina leptospira **(61, 62)**.

- Coronavirus. Los perros infectados por éste virus presentan síntomas similares a la parvovirus. Cuando un perro es infectado por CPV-2 generalmente se inmunodeprime y es más susceptible a la infección de otros agentes patógenos como el coronavirus; cuando esto sucede la infección puede ser letal **(3, 69)**. Por lo anterior el coronavirus, inactivado o atenuado, generalmente se combina con el parvovirus para generar una vacuna doble canina.
- Adenovirus tipo 2. Este virus, junto con la bacteria *bordetella* y el virus de la parainfluenza, son los causantes de la traqueobronquítis infecciosa canina (tos de las perreras). La enfermedad se caracteriza por tos seca y áspera la cual se agrava con la excitación o el ejercicio, puede haber secreciones nasales y conjuntivitis, dificultad respiratoria, pérdida de peso, fiebre y disminución del apetito. En los casos más graves los animales mueren **(69)**. Debido a que el virus vacunal de la hepatitis canina atenuado, puede provocar edema ocular (ojo azul), los laboratorios productores de vacunas caninas lo han ido sustituyendo por el adenovirus tipo 2, ya que los perros vacunados con éste virus quedan protegidos, por inmunidad cruzada, contra el virus de la hepatitis **(11)**. El adenovirus tipo 2 generalmente se combina con el distemper, el parvovirus, el virus de parainfluenza y la bacterina leptospira **(1, 10, 19, 54)**
- Bacteria *Leptospira* (serotipos canicola e icterohemorragica). A excepción del “ojo azul”, los síntomas de la Leptospirosis en perros son muy similares a los de la hepatitis canina **(69)**. Usualmente la bacterina inactivada se combina con el adenovirus tipo 2, el distemper, el parvovirus y el virus de parainfluenza **(1, 10, 11, 19, 54)**.

1.5 VACUNAS ATENUADAS VERSUS VACUNAS INACTIVADAS

Las vacunas vivas están compuestas virus vivos modificados (también conocidos como virus activos modificados ó virus atenuados). Tales virus han sido alterados de tal manera que han perdido casi toda su virulencia. No provocan enfermedad a los animales sanos pero su virulencia residual les permite infectar a algunas células del tejido linfoide, y con esto generar una respuesta inmune (tanto celular como humoral) fuerte y de larga duración **(19, 30, 32, 35)**.

Las vacunas de virus vivo atenuado activan células presentadoras de antígeno para iniciar el procesamiento del antígeno y la producción de interleucinas **(27, 41)**. Activan

linfocitos T y B para tener una buena dotación de células de memoria, lo cual es importante ya que las células T y B efectoras tienen una vida corta, haciendo indispensable la creación de una memoria inmunológica **(28, 30)**. Las vacunas generan linfocitos T cooperadores y citotóxicos para varios epitopos **(13)**, para así contrarrestar la variación de la respuesta inmune debido al polimorfismo del complejo mayor de histocompatibilidad. La persistencia del antígeno en tejido linfoide favorece la diferenciación de células plasmáticas que continúan produciendo anticuerpos **(2, 28)**.

Sin embargo las vacunas vivas pueden generar una relativamente alta incidencia de reacciones adversas **(19, 30)**, y por lo tanto no todos los animales son buenos candidatos para ser inmunizados con estas vacunas. Generalmente son biológicos de virus activos modificados los que se usan contra el moquillo canino, la parvovirus canina y la tarqueobronquitis canina **(10, 54, 61, 62)**.

Las vacunas inactivadas están compuestas por virus patógenos que, durante el proceso de producción, son muertos mediante agentes químicos o físicos. Debido a que esos microorganismos están muertos, no pueden replicarse una vez que son inoculados en un animal y por lo tanto son incapaces de producir enfermedad alguna.

Las vacunas inactivadas inducen exclusivamente una respuesta inmunitaria de tipo humoral **(19, 35)** y tienen una potencia inmunogenica menor que las vacunas preparadas con virus vivo modificado **(5)**. Las vacunas inactivadas deben, por lo tanto, ser complementadas con sustancias que estimulan la respuesta inmune conocidos como adyuvantes inmunológicos que se agregan a las suspensiones virales previamente inactivadas. El uso de este tipo de biológicos requiere de un número mayor de aplicaciones, que las vacunas vivas, para mantener una condición de protección inmunológica en los animales.

Con respecto a la producción de reacciones adversas, las vacunas muertas representan la opción más segura en comparación con las vacunas vivas. Las vacunas contra la rabia y la leptospirosis son ejemplos de biológicos inactivados de uso extensivo en perros **(20, 44)**. Los biológicos inactivados son la elección cuando se requiere vacunar a hembras gestantes, animales inmunocomprometidos, y animales exóticos .

1.6 ZONOSIS DE RABIA EN MÉXICO

La enfermedad de la rabia presenta dos ciclos de transmisión: urbano y salvaje. La principal fuente de infección en el ciclo urbano son los perros y los gatos. En el ciclo salvaje, los murciélagos y carnívoros son los que transmiten la enfermedad. El virus de la rabia se encuentra en la saliva que entra al cuerpo a través de una mordedura o una herida abierta **(42)**. El virus inicialmente se replica en el sitio de inoculación y viaja desde allí en forma centrípeta, a través de los axones al cerebro, a una velocidad de 3 mm por hora. Una vez que el virus alcanza el cerebro, se disemina de manera centrifuga a otros órganos. La diseminación a las glándulas salivares, que representa la fase final de la infección es importante para la transmisión a otros animales o al humano **(6, 42, 69)**.

En la última década, las acciones emprendidas por el Programa Nacional de Control de la Rabia de México, han logrado reducir gradual y significativamente la incidencia de rabia en humanos y en perros. Datos oficiales referentes a los últimos años indican que en gran parte del territorio mexicano se ha logrado interrumpir la cadena de transmisión de la rabia de perro a perro y minimizar el riesgo de transmisión perro – hombre **(55)**.

El programa de vacunación canina, conjuntamente con las acciones de esterilización de caninos y felinos, ha contribuido a la reducción de la presencia de la rabia en los animales de compañía. En los últimos años se han administrado un promedio anual de 12 millones de dosis antirrábicas a perros y gatos, de las cuales 85 % se han aplicado durante las campañas nacionales de vacunación y el resto en consultorios veterinarios **(55)**.

CASOS DE RABIA EN MÉXICO		
Humanos	Perros	Gatos
8 casos en 2005	125 casos en 2005	4 casos en 2005
1 casos en 2006	80 casos en 2006	1 casos en 2006
0 casos en 2007	29 casos en 2007	3 casos en 2007

Fuente: Sistema de Información Epidemiológica. Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud. 2007.

1.7 ZONOSIS DE LEPTOSPIROSIS EN MÉXICO

La Leptospirosis es una infección producida por alguna de las variedades patógenas de *Leptospira*, esta zoonosis de distribución mundial tiene importancia en salud pública, debido a que el hombre puede infectarse durante sus actividades laborales o recreativas, al ponerse en contacto con animales infectados o con agua contaminada con la orina de los mismos **(23, 72)**. *Leptospira* posee una amplia gama de hospederos, ya que se le ha podido identificar en casi todas las especies de mamíferos terrestres **(34)**.

La Leptospirosis en humanos es una enfermedad con sintomatología que se confunde frecuentemente con gripe, dengue o hepatitis. Cuando esta infección es diagnosticada a tiempo es tratable con relativa facilidad pero si no lo es, puede llegar a afectar riñones, pulmones, corazón y hasta producir la muerte **(48, 72)**.

La identificación clínica de la leptospirosis presenta dificultades porque los médicos no la consideran en el diagnóstico diferencial por falta de información y por la carencia de equipo y personal especializado en las técnicas de laboratorio requeridas para la caracterización de las leptospiras **(72)**.

En México la leptospirosis no es una enfermedad de notificación obligatoria, y por lo tanto no existen registros epidemiológicos oficiales. Sin embargo se han realizado en México algunos estudios serológicos que demuestran la presencia de anticuerpos contra varios serotipos de *Leptospira* entre la población sana **(18, 33, 71, 73)**.

La importancia de la vacunación canina contra la leptospirosis radica en que la convivencia entre humanos y perros es un factor que contribuye a la actual prevalencia de esta zoonosis **(72, 73)**.

2. PRIMER PERÍODO. PRODUCCIÓN DE LAS VACUNAS LÍQUIDAS

VACUNAS LÍQUIDAS ELABORADAS POR HOLLAND DE MÉXICO

Rabimune

Vacuna antirrábica para perros y gatos hecha con el virus de la rabia cepa Pasteur CVS-11 inactivado. Adyuvante: Carbopol.

Parvomune

Vacuna canina hecha con Parvovirus activo modificado cepa Cornell CPV2b

Coronamune

Vacuna canina hecha con Parvovirus activo modificado cepa Cornell CPV2b, y con el Coronavirus cepa 1-71 inactivado. Adyuvante: Carbopol.

Canomune DHL

Vacuna canina hecha con Distemper (moquillo) cepa Rockborn inactivado, Hepatitis cepa Utrecht inactivado, Leptospira interrogans serovar canicola inactivada y Leptospira interrogans serovar icterhemorrágico inactivada. Adyuvante: Carbopol.

En esta sección mencionaré los principales procesos de producción de la vacuna antirrábica para perros y gatos *Rabimune*. La mayor parte de los procedimientos que se describirán, se aplican a las los siete biológicos elaborados por Holland de México.

Menciono también datos técnicos básicos sobre todas las líneas celulares y cepas virales que utilizo para la producción.

2.1 RECOMENDACIONES ESPECIALES DURANTE LA FABRICACIÓN

- Los procesos de preparación y filtración del medio de cultivo, cultivo celular, infección de los cultivos, cosecha, inactivación, mezcla del granel, mezcla del estabilizador, preparación y filtración del diluyente, el envasado (dosificado) de la vacuna y del diluyente, se realizan dentro de una cabina con flujo laminar de aire estéril, la cual se somete con frecuencia a desinfecciones y monitoreos microbiológicos.

- El personal responsable de ejecutar los procesos que requieren condiciones asépticas usa la siguiente indumentaria esterilizada:

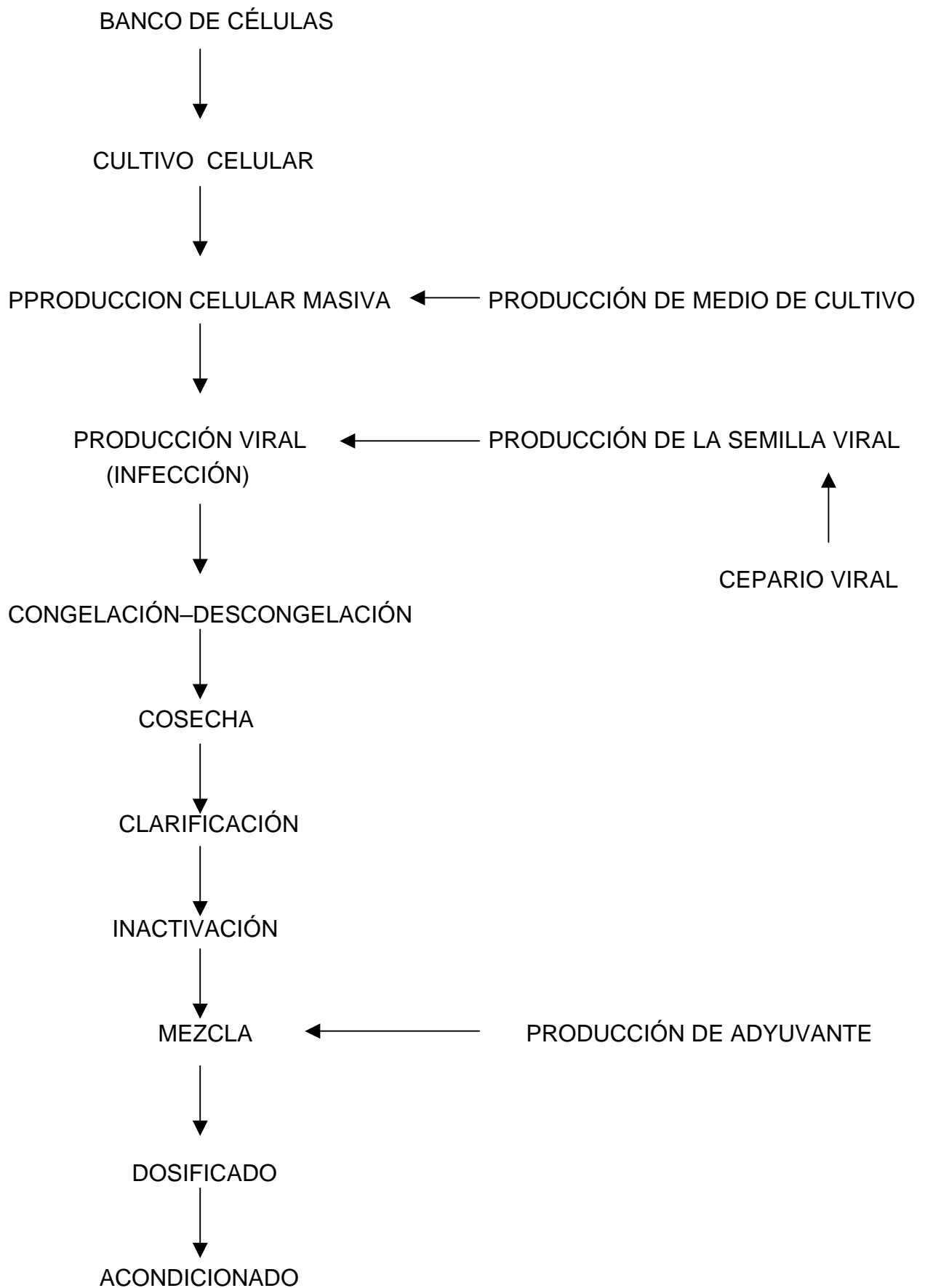
- Overol con manga larga
- Cofia y escafandra
- Doble cubreboca
- Zapatones
- Guantes de latex
- Goggles

- Todos los envases y botellas que contengan cualquier materia prima o reactivo que forman parte del biológico deberán estar perfectamente limpios y esterilizados. La cristalería se esteriliza con calor seco a 300° C durante dos horas. Las botellas Nalgene y demás material autoclavable, se esterilizan por autoclave a un kilogramo de presión durante 30 minutos.

- Todos los compuestos químicos que se usan en la elaboración de la vacuna, son grado reactivo.

- Todos los cultivos y fluidos virales que son descartados se esterilizan por autoclave a un kilogramo de presión durante 45 min.

2.2 FLUJO DE PRODUCCIÓN DE LAS VACUNAS LÍQUIDAS



2.3 PRODUCCIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

Existen diferentes tipos de medio de cultivo para células animales, como el RPMI, Leivovitz, 199, etc. El medio que se utiliza para la elaboración de nuestras 7 vacunas es el MEM (medio mínimo esencial) de Eagle con sales de Earle y aminoácidos no esenciales. Se eligió este medio por su bajo costo y porque todas las líneas celulares que utilizamos para la producción y control de calidad se desarrollan perfectamente en él. En general, este medio contiene sales minerales, aminoácidos esenciales y no esenciales, glucosa, vitaminas y rojo de fenol como indicador de pH **(52)**.

El medio que se utiliza para la propagación celular se suplementa con 10% de suero bovino (SB). El medio que se usa para la producción viral (medio de mantenimiento) es suplementado con 1 al 3% de suero bovino. El suero bovino proporciona al medio de cultivo, entre otros factores **(49)**:

- Nutrientes básicos, en solución o unidos a proteínas.
- Hormonas y factores de crecimiento que inducen multiplicación celular y funciones especializadas.
- Factores de adherencia y propagación
- Proteínas (albúmina y transferrina) que portan y acarrean hormonas, vitaminas, minerales, lípidos.
- Factores, no específicos, de protección contra daño mecánico.
- Inhibidores de proteasas.
- Actividad de amortiguamiento de pH.

PROCEDIMIENTO

Un lote de 20 litros de MEM se prepara disolviendo 193.2 gramos de MEM polvo en 20 litros de agua tridestilada en constante agitación; el medio disuelto se esteriliza haciéndolo pasar a través de una membrana de acetato de celulosa (o nitrocelulosa) de porosidad 0.22 micras previamente esterilizada. De esta manera el medio queda libre de hongos, bacterias y sus respectivas esporas.

El medio filtrado tiene un pH aproximado de 6.0 (color amarillo); para llevarlo al pH de trabajo (7.4, color rojo), se agrega a cada litro de medio, 7 mililitros de una solución esterilizada de bicarbonato de sodio al 8 %.

Se envía una muestra de 100 mililitros a control de calidad para pruebas de esterilidad y promoción de crecimiento celular.

Referencia: Cartwright T., Shah G.P. Culture media. In Basic cell culture. A Practical Approach (Davis J.M). Oxford University Press, New York, 1994, pp 57-89.

2.4 BANCO DE CÉLULAS (CRIOPRESERVACIÓN)

Los cultivos de células animales suelen ser demasiado inestables y, si se les cultiva in vitro durante un tiempo prolongado, pueden exhibir alteraciones en su morfología, patrón de crecimiento, función y cariotipo. Afortunadamente, las células que son apropiadamente congeladas, y apropiadamente almacenadas, pueden conservar casi intactas todas sus características durante muchos años **(50)**. De esta manera el banco de células representa una fuente renovable de cultivos destinados para producción, control de calidad y experimentación. Un banco celular bien controlado y abastecido amortigua el impacto de incidentes tales como contaminaciones microbianas y fallas en equipos (incubadoras).

Las líneas celulares deben congelarse en el número de pase mas bajo posible, a partir de que son enviadas por la American type culture collection (ATCC). Por ejemplo; si la línea MDCK se recibe en el pase 59, se realizan dos pases de propagación y se congelan las células en ambos pases, de manera que habrá células MDCK congeladas en los pases 60 y 61.

2.4.1 PROCEDIMIENTO GENERAL PARA LA CONGELACIÓN CELULAR

- a- Desechar el medio de un cultivo confluyente de 75 cm²
- b- Lavar la monocapa con 5 ml de solución tripsina-EDTA durante 30 segundos.
- c- Desechar la solución tripsina-EDTA
- d- Agregar 2 mililitros de tripsina-EDTA e incubar a 37°C hasta que se efectúe el desprendimiento celular.
La tripsina hidroliza las proteínas de la membrana plasmática que mantienen a la célula adherida al sustrato. El EDTA secuestra iones divalentes (calcio y magnesio) los cuales, si estuvieran presentes, provocarían que las células desprendidas formaran grumos.
- e- Por otro lado hacer la mezcla de 0.6 mililitros del crioprotector Dimetilsulfóxido (DMSO) con 3.4 mililitros de SB
- f- Después de que se han desprendido las células se agrega la mezcla DMSO-SB y se homogeniza mediante pipeteo suave.
- g- Repartir la mezcla total en 6 crioviales con identificación (un mililitro por criovial).
- h- Meter los crioviales a un congelador de -60 °C.
- i- Al día siguiente meter los crioviales al nitrógeno líquido.

El conteo celular nos dice que en cada centímetro cuadrado de un cultivo confluyente, hay aproximadamente 250 000 células, por lo tanto en cada criovial habrá aproximadamente tres millones de células.

Referencia: Mccarter J A, Davis J. Basic cell culture technique and the maintenance of cell lines. In Basic cell culture. A Practical Approach (Davis JM). Oxford University Press, New York, 1994, pp 135-141.

2.4.2 PROCEDIMIENTO GENERAL PARA LA DESCONGELACIÓN CELULAR

- Sacar del nitrógeno líquido un criovial con las células requeridas.
- Meterlo a un baño con agua a 38 °C hasta que se descongele su contenido.
- Rociar el criovial con alcohol al 70 %. Secar el criovial.
- Pasar el contenido del criovial a una botella de cultivo de 25 cm²
- Agregarle 10 mililitros de medio MEM al 10% de SB, Incubar el cultivo a 37 °C.
- Seis horas después hacerle cambio de medio (MEM al 10% de SF) al cultivo e incubarlo a 37 °C.

Referencia: Mccarter J A, Davis J. Basic cell culture technique and the maintenance of cell lines. In Basic cell culture. A Practical Approach (Davis JM). Oxford University Press, New York, 1994, pp 135-141.

2.5 CULTIVO CELULAR

La producción de virus animales para la fabricación de vacunas depende, a su vez, de la elaboración masiva de cultivos celulares específicos, así que el cultivo de células animales es una de las actividades básicas que yo realizo de manera rutinaria.

Los cultivos de células *in vitro* consisten en un sistema formado por células provenientes de un órgano o un tejido, mantenidas en medios de cultivo de composición química definida y en condiciones de temperatura, pH y aireación controladas. De esta forma se aseguran su supervivencia y multiplicación, manteniendo todas sus funciones metabólicas de una manera semejante a las que tenían en el huésped.

Cuando el cultivo proviene de células que han sido disgregadas de un tejido original tomado de un órgano o embrión, recibe el nombre de Cultivo Primario. Los cultivos primarios tienen características especiales que los diferencian de las líneas celulares: conservan la morfología de las células del órgano del que fueron aisladas, sus cromosomas tienen un número diploide ($2n$) y su crecimiento *in vitro* es limitado **(47)**.

Cuando a un cultivo primario se le hace un primer pasaje, por definición éste se convierte en línea celular. Generalmente las líneas celulares solo sobreviven a unos cuantos pasajes; al final, casi todas ellas entran en una fase de senescencia, con acumulación de numerosas anomalías y pérdida de funciones que conducen su muerte. Sólo ocasionalmente un cultivo primario se mantiene durante más generaciones (subcultivos) de las esperadas. Esto es debido a la aparición, espontánea o inducida, de una pequeña subpoblación de células "*inmortales*", que forman líneas estables y permanentes llamadas **líneas celulares continuas** (figura 1). Por lo tanto una línea celular continua es aquella que puede ser subcultivada indefinidamente **(47)**.

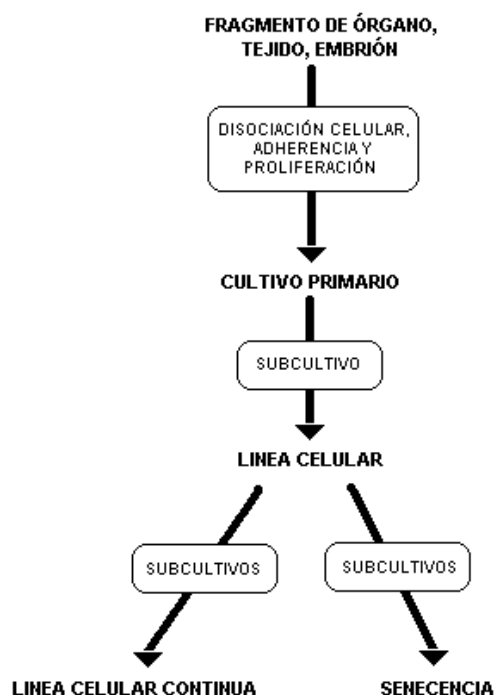


Figura 1. Desarrollo de una línea celular continua, mediante subcultivos sucesivos, a partir de un órgano, un tejido o un embrión.

Las líneas celulares que utilizo en la fabricación de los biológicos son:

- Líneas celulares continuas
- Anclaje – dependientes
- No cancerígenas

Líneas celulares usadas rutinariamente para la producción

<i>LINEA</i>	<i>ORIGEN</i>	<i>MORFOLOGÍA</i>	<i>SUCEPTIBLE AL VIRUS</i>	<i>PASAJE NÚMERO</i>
VERO	Riñón de mono verde africano	Epiteloides	Parainfluenza y Distemper	129,130
A72	Esófago de perro	Fibroblasto	Parvovirus y Panleucopenia felina.	83 y 84
MDCK	Riñón canino (cocker spaniel)	Epiteloides	Adenovirus tipos I y II	60 y 61
BHK	Riñón de hamster sirio dorado	Fibroblasto	Rabia	56 y 57
CRFK	Riñón de gato doméstico	Epiteloides	Coronavirus y Rinotraqueítis felina	188, 189

Otras líneas del banco celular. Líneas alternativas.

<i>LÍNEA</i>	<i>ORIGEN</i>	<i>MORFOLOGÍA</i>	<i>SUCEPTIBLE AL VIRUS</i>	<i>PASAJE NÚMERO</i>
CHO-K1	Ovario de hamster chino	Epiteloides	Rabia	420
MDBK	Riñón bovino	Epiteloides	DVB y parvovirus bovino	119
DK	Riñón de perro	Epiteloides	Distemper y Adenovirus tipos I y II	141
PK15	Riñón de cerdo	Epiteloides	Parvovirus porcino	134
Fibroblasto de embrión de pollo			Distemper y rabia	CP

La columna "pasaje número" indica el número de pase en el que la línea se encuentra congelada en nuestro banco celular.

DVB = Diarrea viral bovina

CP = Cultivo primario

2.6 CEPARIO VIRAL

Se consideran semillas madres virales (SMV) a los virus recibidos de ATCC. Los primeros dos pases (SMV+1 y SMV+2) en cultivo celular se usan como semillas virales de trabajo; el tercer pase (SMV+3) se utiliza como virus vacunal.

Las cepas virales que maneja rutinariamente para la producción son:

Virus patógenos:

- Virus de la rabia cepa Pasteur CVS-11
- Distemper (moquillo) cepa Rockborn
- Coronavirus cepa 1-71
- Hepatitis (adenovirus tipo 1) cepa Utrecht

Virus atenuados:

- Distemper cepa Lederle.
- Parvovirus cepa Cornell CPV2b
- Adenovirus tipo 2 cepa CAV2
- Parainfluenza cepa Cornell.

Otros virus existentes en el cepario viral.

- Distemper cepa Sinder Hill (patógeno)
- Adenovirus canino tipo 2 cepa Toronto A26/61(patógeno)
- Parainfluenza canina cepa 78-238 (patógeno)
- Panleucopenia felina cepa Philips-Roxane (patógeno)
- Rinotraqueítis felina cepa C-27 (patógeno)
- Parvovirus cepa 920916 CPV2b (patógeno)
- Distemper cepa Ondersepoort (atenuado)
- Hepatitis cepa Cornell (atenuado)

El cepario viral se encuentra ubicado dentro de termos con nitrógeno líquido.

2.7 PRODUCCIÓN DE LA SEMILLA VIRAL

PROCEDIMIENTO GENERAL

- a- Se sigue el procedimiento descrito para la descongelación celular.
- b- Cuando el cultivo de 25 cm² alcance la confluencia (3 ó 4 días después de sembrado), se procede a realizar un pase de propagación:
- c- Decantar el medio del cultivo.
- d- Lavar la monocapa con 3 ml de solución tripsina-EDTA durante 30 segundos.
- e- Retirar con pipeta la solución tripsina-EDTA.
- f- Agregar 1 mililitro de la solución tripsina-EDTA e incubar el cultivo a 37 °C hasta que las células se desprendan (el desprendimiento se verifica observando el cultivo por el microscopio invertido).
- g- Pasar con pipeta las células desprendidas a una botella Roux de 200 cm² de superficie cultivable, agregarle 50 ml de MEM al 10% de suero bovino (SB) e incubar el cultivo a 36-38 °C.
- h- Cuando la monocapa celular haya cubierto del 30 al 40% de la superficie cultivable, se procede a infectar el cultivo:
- i- Desechar el medio y agregar al cultivo 5 ml de MEM al 3% de suero bovino (SB) y 2 ml de semilla SMV+1 ó SMV+2 del virus que se quiere producir. Incubar a 36-37°C durante una hora. En el transcurso de ese tiempo, muchas de las células del monoestrato quedarán infectadas por el virus.
- j- Después del tiempo de incubación, se retira el inóculo viral y se agrega 200 ml de MEM al 3% de suero bovino. Se vuelve a incubar el cultivo infectado a 36-37°C.

Durante el período de incubación, el monoestrato celular infectado producirá los virus, los cuales se irán acumulando en el medio de cultivo. El tiempo de incubación culminará cuando más del 50% de las células del cultivo infectado evidencien efecto citopático, (de 5 a 7 días después de la infección, dependiendo del tipo de virus).

Debido a que el virus de la rabia no produce efecto citopático alguno, el tiempo de incubación de los cultivos rábicos es de 6 días.

<i>VIRUS</i>	<i>CÉLULA INFECTADA</i>	<i>EFEECTO CITOPÁTICO</i>
Distemper	VERO, DK, Fibroblasto de embrión de pollo	Formación de sincitios y lisis celular.
Parainfluenza	VERO	Formación de sincitios y lisis celular.
Adenovirus I y II	MDCK y DK	Las células se vuelven redondas y se agregan en racimos.
Parvovirus	A72	Las células se vuelven amorfas, se desprenden y se juntan formando agregados en suspensión.
Coronavirus	CRFK	Se producen focos de células granulosas que posteriormente se desprenden de la monocapa.
Rabia	BHK	No hay efecto citopático.
Panleucopenia felina	A72	Las células se vuelven amorfas, se desprenden y se juntan formando agregados en suspensión.
Rinotraqueítis felina	CRFK	Las células se vuelven redondas y se agregan en racimos.

k- Al final del período de propagación viral, el cultivo se somete a un ciclo de congelación- descongelación con el fin de romper las células y lograr así mayor liberación viral.

l- Fraccionar el fluido viral en 4 botellas de vidrio esterilizadas e identificadas. Una de ellas se envía al departamento de Control de calidad para pruebas de esterilidad y titulación. El virus de las 3 botellas restantes se congela a -20 °C.

Referencias del proceso:

- Manual de producción de *Rabimune* propiedad de Holland de México S.A. de C.V. páginas 4 y 5.
- Abelseth M.K. Vacunas de cultivo tisular para animales. En: La Rabia. Técnicas de Laboratorio. Editores: Kaplan M.M., Koprowsky H. Organización Mundial de la Salud. Ginebra 1976. Páginas 275-281.

Para que Control de calidad libere las semillas virales, estas deberán tener un título mínimo de:

SEMILLAS	REQUERIMIENTOS MÍNIMOS DE CONTROL DE CALIDAD	RANGO DE TITULOS OBTENIDOS HABITUALMENTE POR EL DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN
RABIA	10^5 DICC ₅₀ / ml.	$10^6 - 10^7$ DICC ₅₀ / ml.
DISTEMPER	10^4 DICC ₅₀ / ml.	$10^4 - 10^5$ DICC ₅₀ / ml.
PARVOVIRUS	10^5 DICC ₅₀ / ml.	$10^6 - 10^7$ DICC ₅₀ / ml.
ADENOVIRUS TIPO 2	10^4 DICC ₅₀ / ml.	$10^6 - 10^7$ DICC ₅₀ / ml.
HEPATITIS	10^4 DICC ₅₀ / ml.	$10^6 - 10^7$ DICC ₅₀ / ml.
PARAINFLUENZA	10^4 DICC ₅₀ / ml.	$10^6 - 10^7$ DICC ₅₀ / ml.
CORONAVIRUS	10^4 DICC ₅₀ / ml.	$10^5 - 10^6$ DICC ₅₀ / ml.

2.8 PRODUCCIÓN MASIVA DE CULTIVOS CELULARES

PROCEDIMIENTO GENERAL:

- a-** Se sigue el procedimiento, descrito anteriormente, para descongelar las células requeridas.
- b-** Cuando el cultivo de 25 cm² alcance la confluencia (3 ó 4 días después de sembrado) se procede a realizar un pase de propagación:
- c-** Decantar el medio del cultivo y lavar la monocapa con 3 mililitros de solución tripsina-EDTA durante 30 segundos.
- d-** Retirar con pipeta la solución tripsina-EDTA.
- e-** Agregar 1 mililitro de la solución tripsina-EDTA e incubar el cultivo a 37°C hasta que las células se desprendan (el desprendimiento se verifica observando el cultivo en el microscopio invertido).
- f-** Pasar con pipeta las células desprendidas a una botella Roux de 200 cm² de superficie cultivable, agregarle 100 ml de MEM al 10% de suero bovino (SB) e incubar el cultivo a 36-38 °C. Cuando el cultivo alcance la confluencia (4 ó 5 días después) se procede a realizar un pase de propagación:

- g-** Decantar el medio del cultivo y lavar la monocapa con 5 ml de solución tripsina-EDTA durante 30 segundos.
- h-** Retirar con pipeta la solución tripsina-EDTA.
- i-** Agregar 3 mililitros de la solución tripsina-EDTA e incubar el cultivo a 37 °C hasta que las células se desprendan.
- j-** Pasar con pipeta las células desprendidas a una botella rotatoria (“roller”) de 940 cm² de superficie cultivable, agregarle 300 ml de MEM al 10% de suero bovino (SB) e incubar el cultivo en una máquina “roller” a 36-38 °C. Cuando el cultivo alcance la confluencia (4 ó 5 días después) se procede a realizar un cultivo de propagación con relación de pase 1:4:
- k-** Decantar el medio del cultivo y lavar la monocapa con 10 ml de solución tripsina-EDTA durante 30 segundos.
- l-** Retirar con pipeta la solución tripsina-EDTA.
- m-** Agregar 5 mililitros de la solución tripsina-EDTA e incubar el cultivo a 37°C hasta que las células se desprendan.
- n-** Agregar 13 ml de MEM al 10% de SB. El volumen de la suspensión celular será de 20 ml (13 ml de MEM, 5 ml de la solución tripsina-EDTA y aproximadamente 2 ml de la monocapa celular).
- ñ-** Repartir la suspensión en 4 botellas rodadoras de 940 cm² de superficie cultivable (5 ml a cada botella).
- o-** Agregar a cada botella 300 ml de MEM al 10% de SB
- p-** Incubar los 4 cultivos en una máquina “roller” a 36-38 °C. Cuando los cultivos alcancen la confluencia (4 ó 5 días después) se procede a realizar un cultivo de propagación con relación de pase 4:40
- q-** Decantar el medio de uno de los 4 cultivos y lavar la monocapa con 10 ml de solución tripsina-EDTA durante 30 segundos.
- r-** Retirar con pipeta la solución tripsina-EDTA.
- s-** Agregar 5 mililitros de la solución tripsina-EDTA e incubar el cultivo a 37°C hasta que se desprendan las células.
- t-** Agregar 43 ml de MEM al 10% de SB. El volumen de la suspensión celular será de 50 ml (43 ml de MEM, 5 ml de la solución tripsina-EDTA y aproximadamente 2 ml de la monocapa celular).
- u-** Repartir la suspensión en 10 botellas rodadoras de 940 cm² de superficie cultivable (5 ml a cada botella).
- v-** Agregar a cada botella 200 ml de MEM al 10% de SB
- w-** Incubar los 10 cultivos en una máquina “roller” a 36-38 °C.
- x-** Con cada uno de los tres cultivos restantes se repiten los pasos del **q** al **w**, de tal manera que al final del proceso se habrán preparado 40 cultivos.

Cuando los cultivos alcancen una confluencia aproximada de 30 a 40%, (24 horas después de sembrados) se procede a infectarlos con el virus requerido.

Referencias del proceso:

- Manual de producción de *Rabimune* propiedad de Holland de México S.A. de C.V. páginas 3, 4 y 5.
- Abelseth M.K. Vacunas de cultivo tisular para animales. En: La Rabia. Técnicas de Laboratorio. Editores: Kaplan M.M., Koprowsky H. Organización Mundial de la Salud. Ginebra 1976. Páginas 275-281.

2.9 PRODUCCIÓN VIRAL (INFECCIÓN)

Calcular la multiplicidad de infección (MOI)

$$\text{MOI} = \frac{\text{Número de UFP}}{\text{Número de células}}$$

<i>SISTEMA VIRUS / CELULA</i>	<i>MOI</i>	
RABIA / BHK	0.02	Un virus por 50 células
DISTEMPER / VERO	0.04	Un virus por 25 células
PARVOVIRUS / A72	0.02	Un virus por 50 células
ADENOVIRUS TIPO 2 / MDCK	0.01	Un virus por 100 células
HEPATITIS / MDCK	0.01	Un virus por 100 células
PARAINFLUENZA / VERO	0.04	Un virus por 25 células
CORONAVIRUS / CRFK	0.02	Un virus por 50 células

DESCRIPCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE 22.8 LITROS DE FLUIDO RÁBICO.

Asumiremos que los 40 cultivos sembrados (como se describió en el capítulo anterior) son de células BHK.

Datos:

Numero aproximado de células BHK por cultivo: 8.2×10^7

Titulo de la semilla de rabia: 10^6 DICC₅₀ / ml.

MOI: 0.02 (Un virus por 50 células)

1 DICC = 0.7 UFP

Para saber el volumen de semilla rábica que infectará un cultivo BHK de 940 cm^2 con una confluencia aproximada del 35%:

$$(8.2 \times 10^7 \text{ células})(1 \text{ UFP}) / 50 \text{ células} = 1.64 \times 10^6 \text{ UFP}$$

$$(1.64 \times 10^6 \text{ UFP})(1 \text{ DICC}) / 0.7 \text{ UFP} = 2.34 \times 10^6 \text{ DICC}$$

$$(2.34 \times 10^6 \text{ DICC})(1 \text{ mililitro}) / 10^6 \text{ DICC} = 2.34 \text{ mililitros de semilla}$$

PROCEDIMIENTO:

a- En un baño de agua a temperatura ambiente, descongelar 100 mililitros de semilla de trabajo de virus rábico.

b- Decantar el medio de los 40 cultivos rodadores BHK.

c- Infectar 38 de los cultivos con 2.5 mililitros de semilla rábica y 20 mililitros de MEM sin suero bovino. A los dos cultivos restantes se les agrega 22.5 mililitros de MEM sin SB

d- Incubar los cultivos en una máquina "roller" a $36-38^\circ\text{C}$ durante 40 minutos.

e- Después del tiempo de incubación, a todos los cultivos se les retira el inóculo y se les agrega 600 ml de MEM al 3% de SB.

f- Incubar los cultivos en una máquina "roller" a $32-34^\circ\text{C}$ durante seis días.

Treinta y ocho de los cultivos quedaron infectados con el virus rábico y los dos restantes quedaron como controles no infectados.

Los cultivos BHK (infectados y controles) alcanzarán la confluencia al final del período de propagación viral (144 horas post-infección). Durante la inspección microscópica, todos los monoestratos se verán prácticamente iguales debido a que el virus de la rabia no produce ningún efecto citopático en las células BHK.

144 horas después de la infección, los 38 cultivos de rabia serán sometidos a un ciclo de congelación–descongelación con el fin de romper las células y permitir la liberación de las partículas virales intracelulares; éstas se sumarán a las acumuladas en el medio de cultivo, con lo que se logrará aumentar el título del fluido viral.

Referencias del proceso:

- Manual de producción de *Rabimune* propiedad de Holland de México S.A. de C.V. páginas 6 y 7.
- Abelseth M.K. Vacunas de cultivo tisular para animales. En: La Rabia. Técnicas de Laboratorio. Editores: Kaplan M.M., Koprowsky H. Organización Mundial de la Salud. Ginebra 1976. Páginas 275-281.

2.10 COSECHA Y CLARIFICACIÓN

La cosecha consiste en recolectar el fluido viral descongelado (22.8 litros) en un bidón de polipropileno. Los restos celulares que contiene el fluido cosechado se deben eliminar. Esto se logra haciendo pasar el virus a través de un filtro con porosidad de una micra. Después del proceso se envía una muestra de 100 mililitros al departamento de Control de Calidad para pruebas de titulación viral y esterilidad.

Referencias del proceso:

- Manual de producción de *Rabimune* propiedad de Holland de México S.A. de C.V. páginas 8 y 9.

Los fluidos virales destinados a la producción vacunal deben pasar la prueba de titulación hecha por el departamento de Control de Calidad. Los títulos mínimos requeridos son los siguientes:

FLUIDOS VACUNALES	REQUERIMIENTOS MÍNIMOS DE CONTROL DE CALIDAD	RANGO DE TITULOS OBTENIDOS HABITUALMENTE POR EL DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN
RABIA	10^6 DICC ₅₀ / ml.	$10^6 - 10^8$ DICC ₅₀ / ml.
DISTEMPER	10^5 DICC ₅₀ / ml.	$10^5 - 10^6$ DICC ₅₀ / ml.
PARVOVIRUS	10^6 DICC ₅₀ / ml.	$10^6 - 10^8$ DICC ₅₀ / ml.
ADENOVIRUS TIPO 2	10^6 DICC ₅₀ / ml.	$10^6 - 10^7$ DICC ₅₀ / ml.
HEPATITIS	10^6 DICC ₅₀ / ml.	$10^6 - 10^7$ DICC ₅₀ / ml.
PARAINFLUENZA	10^6 DICC ₅₀ / ml.	$10^6 - 10^7$ DICC ₅₀ / ml.
CORONAVIRUS	10^5 DICC ₅₀ / ml.	$10^5 - 10^6$ DICC ₅₀ / ml.

2.11 INACTIVACIÓN VIRAL

Las vacunas de virus muertos suelen inactivarse mediante procesos físicos (altas temperaturas y radiaciones) o químicos (formaldehído, fenol, betapropiolactona, aziridinas, etcétera). El inactivante químico ideal será aquel que dañe extensa e irreversiblemente al genoma viral, pero que no modifique sus epitopos inmunogénicos.

El inactivante ideal no existe aun. Sin embargo, las aziridinas como el BEI (etilenimina binaria) son una excelente opción **(40)**, puesto que poseen una alta reactividad hacia los ácidos nucleicos y alteran muy poco las proteínas superficiales de los virus, las cuales son el principal componente inmunogénico de éstos.

El inactivante que utilizo para la inactivación viral es la etilenimina binaria (BEI). El BEI es un agente alquilante (aminoetilante) que reacciona con los virus **(26, 45)** en los siguientes puntos:

- Nitrógeno 3 de la adenina, provocando la apertura de su anillo pirimidínico.
- Nitrógeno 7 de la guanina, provocando la apertura de su anillo imidazólico.
- Nitrógeno 1 de la guanina, provocando la apertura de su anillo pirimidínico
- Grupo sulfhidrilo de las glicoproteínas **(8)**.

Otras ventajas del BEI son:

- Rápida acción inactivante.
- Ausencia de infectividad residual
- Los antígenos inactivados con el BEI son altamente estables.
- No produce dolor en el sitio de aplicación de la vacuna.
- Es barato.

Fluidos virales a los cuales les aplico el proceso de inactivación:

- Rabia para *Rabimune*
- Coronavirus para *Coronamune*
- Distemper cepa Rockborn y Hepatitis para *Canomune DHL*

PROCEDIMIENTO

Ejemplo para inactivar 22.8 litros de fluido rábico:

Preparación de las siguientes soluciones:

A- 200 mililitros de una solución acuosa de 2-bromoetilamina 0.4 M

B- 80 mililitros de una solución acuosa de NaOH 0.2 M

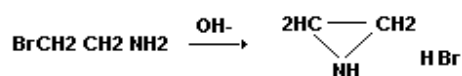
C- 30 mililitros de una solución acuosa de Tiosulfato de sodio 1.0 M

Las soluciones A y C se esterilizan por filtración en membrana de acetato de celulosa (o nitrocelulosa) de porosidad 0.22 micras. La solución B se esteriliza por filtración en membrana de politetrafluoruro de etilo de porosidad 0.22 micras.

a- Mezclar 184 mililitros de la solución A con 74 mililitros de la solución B.

b- Incubar la mezcla en agua a 38°C durante 60 minutos.

Durante la incubación se realiza la activación (ciclización) del BEI **(9)**



c- Añadir el inactivante al fluido viral y dejarlo en continua agitación durante 24 horas a temperatura ambiente.

d- Añadir 26 mililitros de la solución C y agitar durante 5 minutos.

Concluida la inactivación viral, se debe de inactivar el BEI residual mediante la adición de tiosulfato de sodio.

e- Enviar una muestra de 100 mililitros al departamento de Control de Calidad para pruebas de inactivación y esterilidad.

f- Refrigerar a 4 °C el virus inactivado.

Referencias: Bahnemann HG. Binary ethylenimine as an inactivant for foot-and-mouth disease virus and its application for vaccine production. Arch Virol. 1975;47(1):47–56.

2.12 ADYUVANTE

Se ha demostrado que el empleo de ciertas sustancias adicionadas a las vacunas, pueden mejorar considerablemente la respuesta inmunitaria. Estas sustancias son conocidas como adyuvantes. Si al inmunógeno que se aplica se le agrega otro inmunógeno, el segundo puede tener un efecto coadyuvante, con lo cual se generará una respuesta más potente contra ambos, que si se aplica el primer inmunógeno solo. A este fenómeno se le conoce como “coestimulación antigénica”. La base molecular radica en las células presentadoras de antígeno (CPA). La interacción antígeno-CPA induce, en la membrana de esta última, la síntesis de una molécula conocida como B7 **(41, 27)**. Cuando la CPA sintetiza B7, esta última puede interaccionar con la molécula de membrana CD28 de los linfocitos T y promover así la activación de estos últimos. Si no es sintetizada la molécula B7, entonces el linfocito no se activa y el resultado es una anergia clonal **(12, 13)**.

El adyuvante que adiciono a las vacunas que contienen virus inactivados (*Rabimune, Canomune DHL y Coronamune*) es una mezcla acuosa de Carbopol.

El Carbopol es un polímero del ácido acrílico entrecruzado con alilsacarosa.

Características de este adyuvante:

- I- Precipita al antígeno, y al inyectarse lo va liberando lentamente, con lo que se suministra un estímulo persistente (el antígeno dura varios días en el lugar donde se inoculó)
- II- El antígeno precipitado tiene mayor tamaño, por lo que puede ser fagocitado más fácilmente.
- III- Induce la formación de granulomas. El granuloma es una infiltración celular con una masa densa rica en macrófagos y linfocitos.

Las tres condiciones anteriores propician la amplificación del procesamiento y de la presentación del antígeno vacunal, al haber un aumento en el número de moléculas B7 en las membranas de las CPA **(35)**.

PROCEDIMIENTO DE FABRICACIÓN DEL ADYUVANTE

Siguiendo con el ejemplo de la fabricación de un lote de vacuna antirrábica, describiré la elaboración de 2.5 litros de adyuvante.

Preparar las siguientes soluciones:

- KOH 1.0 M.
- Rojo de fenol al 1%

a- Disolver, mediante agitación vigorosa, 25 gramos de carbopol en 2.5 litros de agua destilada

b- El polietilenglicol a temperatura ambiente es sólido, así que se debe derretir en un baño de agua caliente (70 -80 centígrados).

c- Agregar 2.5 mililitros de Polietilenglicol (derretido) al carbopol en agitación.

d- Agregar a la mezcla en agitación 7.5 mililitros de rojo de fenol al 1%. Hasta aquí la mezcla tendrá un pH aproximado de 5.5.

e- Adicionar KOH 1.0 M gradualmente (y mezclar manualmente con una cuchara o espátula) hasta que la mezcla tenga un pH de 7.2 a 7.4. Al final de este paso el adyuvante tendrá una consistencia de gel espeso.

f- Esterilizar el adyuvante en autoclave durante 30 minutos a un kilogramo de presión.

Referencias del proceso:

- Manual de producción de *Rabimune* propiedad de Holland de México S.A. de C.V. páginas 10 y 11.

2.13 MEZCLA

Siguiendo con el ejemplo de la fabricación de un lote de vacuna antirrábica, describiré el proceso de mezclado de la vacuna.

a- En un recipiente (de polipropileno) para bioproceso, previamente esterilizado, se depositan las siguientes fracciones:

- 22.5 litros del fluido rábico inactivado.
- 2.5 litros del adyuvante esterilizado.

b- Se homogeniza la mezcla utilizando un agitador de propela. Al final de la homogenización la vacuna tendrá un pH ligeramente ácido (6.5 - 6.8)

- c- Usando NaOH 1.0 M esterilizado por filtración en membrana de politetrafloruro de etilo de porosidad 0.22 micras, se ajusta la vacuna a un pH final de 7.2 a 7.4.
- d- Enviar una muestra de 100 mililitros al departamento de Control de Calidad para pruebas de esterilidad e inmunogenicidad.
- e- Refrigerar el biológico a 4°C.

Volumen total del granel de *Rabimune*: 25 litros.

Referencias del proceso:

- Manual de producción de *Rabimune* propiedad de Holland de México S.A. de C.V. página 12

2.14 ENVASADO (DOSIFICADO)

El envasado del biológico se realiza en viales de vidrio cuya calidad cumple con las especificaciones requeridas para productos farmacéuticos inyectables. Se esterilizan los viales con calor seco a 250 °C durante dos horas.

Se usan tapones de elastómeros para productos inyectables. Los elastómeros pueden ser de origen natural o sintético.

Los viales se engargolan con sellos flip-off de 13 milímetros de diámetro.

El envasado se realiza mediante una máquina automática llenadora de viales, cuidando durante todo el proceso que el volumen de llenado se mantenga de 1.2 a 1.3 mililitros.

Inmediatamente después de llenados, los viales serán tapados, retapados y enviados al refrigerador.

Tamaño del lote de *Rabimune*: aproximadamente 20 000 dosis.

Se envían 30 dosis a control de calidad para prueba de esterilidad.

Posteriormente el biológico es etiquetado y acondicionado en estuches para 12 dosis, cada estuche con su respectivo instructivo.

La vacuna acondicionada se almacenará 4 - 7 °C en la oscuridad.

2.15 FECHA DE CADUCIDAD

La caducidad del biológico se establece en 24 meses a partir de la fecha en que el departamento de control de calidad emite el resultado de la prueba de inmunogenicidad (la cual debe ser satisfactoria).

3. SEGUNDO PERÍODO. PRODUCCIÓN DE LAS VACUNAS LIOFILIZADAS

VACUNAS LIOFILIZADAS ELABORADAS POR HOLLAND DE MÉXICO

Canomune puppy DP

Vacuna canina hecha con Parvovirus activo modificado cepa Cornell CPV2b y Distemper activo modificado cepa Lederle.

Canomune puppy DHA2P

Vacuna canina hecha con Parvovirus activo modificado cepa Cornell CPV2b, Distemper activo modificado cepa Lederle y Adenovirus tipo 2 activo modificado cepa CAV2.

Canomune puppy DHA2PPi

Vacuna canina hecha con Parvovirus activo modificado cepa Cornell CPV2b, Distemper activo modificado cepa Lederle, Adenovirus tipo 2 activo modificado cepa CAV2 y Parainfluenza activo modificado cepa Cornell.

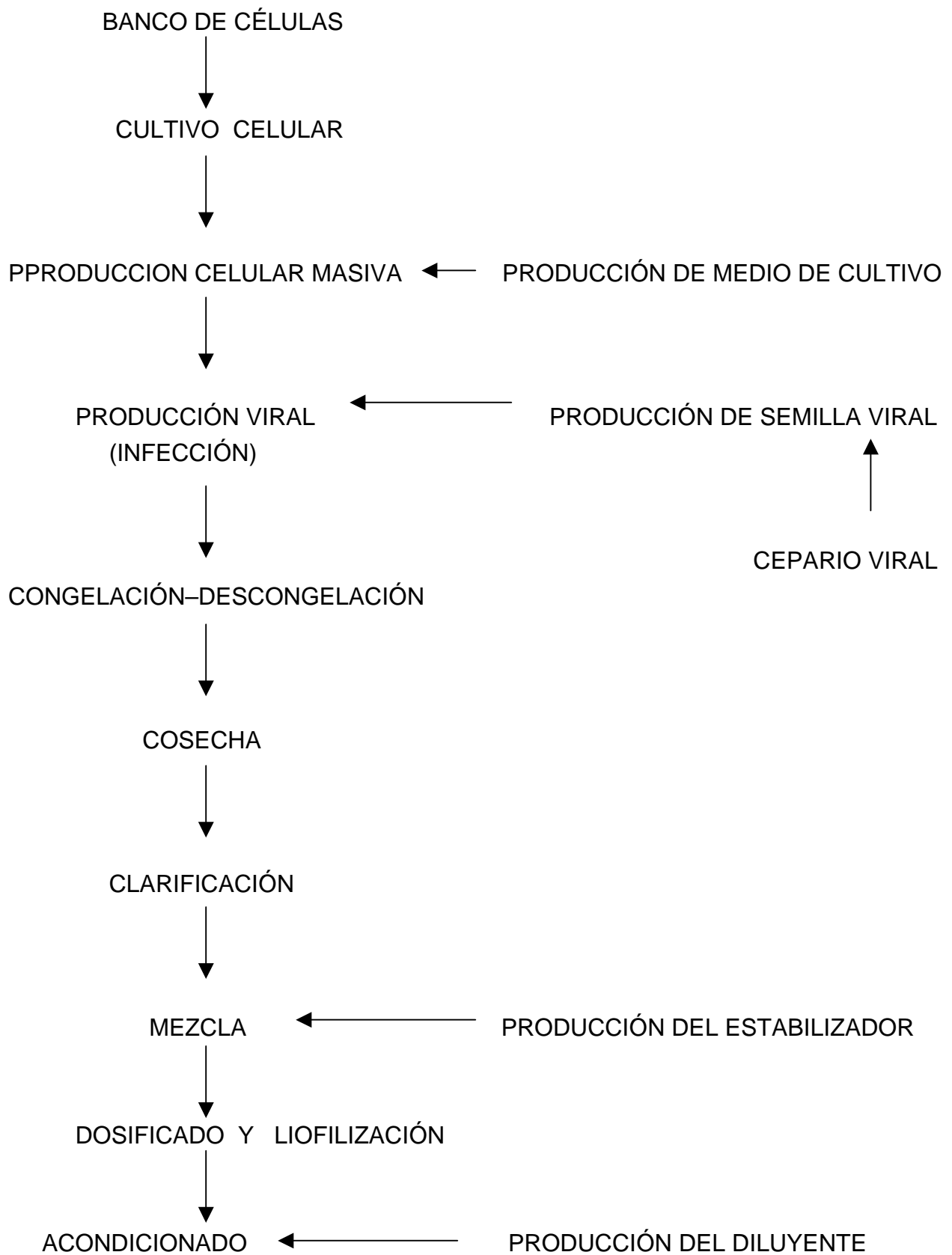
Estas tres vacunas se denominan *puppy* debido a que están indicadas para la inmunización de cachorros a partir de las 6 semanas de edad.

A continuación se describen los principales procesos involucrados en la elaboración de las vacunas liofilizadas de Holland de México S.A. de C.V.

Esta sección del informe se ejemplificará con la producción de un lote *Canomune puppy DHA2PPi* (*D* significa distemper, *H* significa hepatitis, *A2* adenovirus tipo 2, *P* parvovirus y *Pi* parainfluenza).

Aunque el biológico no contiene el virus de la Hepatitis infecciosa canina (adenovirus canino tipo 1), los perros vacunados con el adenovirus canino tipo 2 quedan protegidos, por el fenómeno de inmunidad cruzada, contra la hepatitis viral canina **(11)**.

3.1 FLUJO DE PRODUCCIÓN DE LAS VACUNAS LIOFILIZADAS



Para la producción de los cultivos celulares de VERO, MDCK y A72 se siguen los lineamientos generales enunciados en el punto 2.8.

Para la producción, tanto de las semillas como de los fluidos vacunales, del parvovirus, distemper cepa Lederle, adenovirus tipo 2 y parainfluenza, se siguen los lineamientos generales de los puntos 2.7 y 2.9, enfatizando que:

- Cultivos de células VERO serán los sustratos para propagar los virus de distemper cepa Lederle y parainfluenza.
- Cultivos de células MDCK serán los sustratos para propagar al adenovirus tipo 2
- Cultivos de células A72 serán los sustratos para propagar al parvovirus

El proceso de inactivación no se aplica a estos virus.

3.2 ESTABILIZADOR

La liofilización resulta ser un proceso que daña particularmente a virus termolábiles como el distemper y parainfluenza. Para minimizar ese daño, se suele añadir a las vacunas virales que se van a liofilizar, un estabilizador térmico, el cual es básicamente una mezcla de azúcares y productos proteínoides, los cuales van a evitar que disminuya drásticamente el título viral durante el proceso.

El estabilizador que adiciono a estas vacunas es una mezcla de sacarosa, gelatina bacteriológica y caseinato de sodio.

PROCEDIMIENTO DE ELABORACIÓN DEL ESTABILIZADOR

a- Se prepara un litro de gelatina bacteriológica al 10 % en agua destilada y se esteriliza por autoclave durante 15 minutos a un kilogramo de presión.

b- Se preparan 8 litros sacarosa al 6 % en agua destilada y se esterilizan por filtración en membrana de acetato de celulosa (o nitrocelulosa) de porosidad 0.22 micras.

c- Se preparan 4 litros de caseinato de sodio al 5 % en agua destilada y se esterilizan por autoclave durante 30 minutos a un kilogramo de presión.

d- Cuando se hayan enfriado los tres componentes, se mezclan y se ajusta el pH a 7.4 usando NaOH 1.0 M esterilizado por membrana de politetrafloruro de etilo de porosidad 0.22 micras.

e- Se toma una muestra de 10 mililitros para prueba de esterilidad y se envía el estabilizador al frigorífico.

Referencias:

- Manual de producción de *Canomune Puppy DHA2PPI* propiedad de Holland de México S.A. de C.V. página 8
- Jennings R., Potter C.W. Virus vaccines. In *Virus Culture, A practical approach*. Edited by Cann A.J. Oxford University Press. 1999. p. 156-159

Resulta particularmente interesante que el caseinato de sodio, aparte de funcionar como estabilizador térmico, sirve también de adyuvante, puesto que estimula, tanto la migración por quimiotaxis de leucocitos, como la diferenciación de células hematopoyéticas hacia el linaje monocito-macrófago los cuales, a su vez, son células profesionales presentadoras de antígeno **(24, 63)**.

3.3 MEZCLA

La formulación de *Canomune puppy DHA2PPI* es la siguiente:

- 20 % Parvovirus activo modificado cepa Cornell CPV2b
- 20 % Distemper activo modificado cepa Lederle
- 5 % Adenovirus tipo 2 activo modificado cepa CAV2
- 5 % Parainfluenza activo modificado cepa Cornell.
- 50 % Estabilizador

El tamaño de lote de esta vacuna es de 20 000 dosis. Si cada vial del biológico se dosifica con 1.3 mililitros, el volumen del granel será de 26 litros. Por lo tanto las fracciones que se van a mezclar en este granel serán las siguientes:

- 5.2 litros de parvovirus con título mínimo de 10^6 DICC₅₀ / ml.
- 5.2 litros de distemper con título mínimo de 10^5 DICC₅₀ / ml.
- 1.3 litros de adenovirus tipo 2 con título mínimo de 10^6 DICC₅₀ / ml.
- 1.3 litros de parainfluenza con título mínimo de 10^6 DICC₅₀ / ml.
- 13 litros de estabilizador

Al hacer la mezcla, los virus se diluyen y sus títulos bajan ligeramente:
Si el parvovirus entra a la mezcla con título de 10^7 DICC₅₀ / mililitros, entonces: $5.2 (10^7) / 26 = (10^{6.3})$ después de la mezcla quedaría con título de $10^{6.3}$ DICC₅₀ / mililitros
Si el distemper entra a la mezcla con título de 10^6 DICC₅₀ / mililitros, entonces: $5.2 (10^6) / 26 = (10^{5.3})$ después de la mezcla quedaría con título de $10^{5.3}$ DICC₅₀ / mililitros
Si el adenovirus tipo 2 entra a la mezcla con título de 10^7 DICC₅₀ / mililitros, entonces: $1.3 (10^7) / 26 = (10^{5.7})$ después de la mezcla quedaría con título de $10^{5.7}$ DICC₅₀ / mililitros
Si el virus de parainfluenza entra a la mezcla con título de 10^7 DICC₅₀ / mililitros, Entonces: $1.3 (10^7) / 26 = (10^{5.7})$ después de la mezcla quedaría con título de $10^{5.7}$ DICC₅₀ / mililitros
Después de que se hizo la mezcla se ajusta el pH a 7.4 usando NaOH 1.0 M esterilizado.
Cuando el granel está terminado, lo llevo a dosificar y liofilizar a PRONABIVE (Productora Nacional de Biológicos Veterinarios) debido a que nuestra empresa no cuenta con máquina liofilizadora.

Referencia: Manual de producción de *Canomune Puppy DHA2PPI* propiedad de Holland de México S.A. de C.V. páginas 9-12.

3.4 DOSIFICACIÓN Y LIOFILIZACIÓN

La dosificación se realiza mediante una máquina automática llenadora de viales, cuidando durante todo el proceso que el volumen de llenado se mantenga en 1.3 ml. Inmediatamente después de llenados, los viales serán parcialmente tapados con tapones de hule especiales para liofilización, y el lote completo del biológico será liofilizado.

Puesto que los virus vivos en medio acuoso tienden a ser inestables y por lo tanto, decrece paulatinamente su título, es conveniente liofilizarlos. La liofilización es un método de desecación en el que se elimina el agua por congelación de la vacuna líquida y posterior sublimación del hielo en condiciones de vacío. Al suministrar calor el hielo se sublima y se evita el paso por la fase líquida.

El proceso de liofilización dura 12 horas. Al finalizar este, los viales son tapados automáticamente dentro de la cámara de liofilización. Se sacan los viales y se engargolan con sellos flip-off de 13 milímetros de diámetro.

La vacuna liofilizada se envía a nuestra planta de producción, donde será revisada y etiquetada. Se tomarán las muestras correspondientes para pruebas de esterilidad, titulación, inmunogenicidad y/o potencia.

Después de la liofilización la vacuna queda con los siguientes títulos (en promedio)

VIRUS	PROMEDIO DE TÍTULOS ANTES DE LA LIOFILIZACIÓN	PROMEDIO DE TÍTULOS DESPUES DE LA LIOFILIZACIÓN	REQUERIMIENTOS DE CONTROL DE CALIDAD PARA EL PRODUCTO TERMINADO
Parvovirus	10^7 DICC ₅₀ / ml.	$10^{6.5}$ DICC ₅₀ / ml.	10^5 DICC ₅₀ / ml.
Distemper	10^6 DICC ₅₀ / ml.	$10^{4.5}$ DICC ₅₀ / ml.	$10^{3.5}$ DICC ₅₀ / ml.
Adenovirus tipo 2	10^7 DICC ₅₀ / ml.	$10^{5.5}$ DICC ₅₀ / ml.	$10^{4.5}$ DICC ₅₀ / ml.
Parainfluenza	10^7 DICC ₅₀ / ml.	10^5 DICC ₅₀ / ml.	10^4 DICC ₅₀ / ml.

3.5 PRODUCCIÓN DEL DILUYENTE

El diluyente para las vacunas liofilizadas es agua destilada grado inyectable esterilizada por filtración en membrana de acetato de celulosa (o nitrocelulosa) de porosidad 0.22 micras. Se preparan 26 litros de diluyente, que dosificados a 1.3 mililitros producirán aproximadamente 20 000 piezas. Se envía a Control de Calidad una muestra de 50 mililitros para prueba de esterilidad.

Referencia: Manual de producción de *Canomune Puppy DHA2PPI* propiedad de Holland de México S.A. de C.V. páginas 13-14.

3.6 DOSIFICADO DEL DILUYENTE

Para la dosificación del diluyente se siguen los mismos lineamientos enunciados en el punto 13 de la sección I. Al finalizar el proceso se envían 30 piezas a Control de Calidad para prueba de esterilidad.

3.7 ACONDICIONADO DE LA VACUNA

Se etiquetan los viales de los liofilizados y los del diluyente, y posteriormente se acondicionan en estuches para 12 dosis. Una dosis consta de un liofilizado más un diluyente.

La vacuna acondicionada se almacenará 4 - 7 °C en la oscuridad.

3.8 FECHA DE CADUCIDAD

La caducidad del biológico se establece en 24 meses a partir de la fecha en que el departamento de control de calidad emite el resultado de la prueba de inmunogenicidad (la cual debe ser satisfactoria).

3.9 REVERSION VIRAL

En la historia de la vacunación moderna se han reportado muchos casos de accidentes en humanos y animales, provocados por lotes de vacunas con deficiente atenuación, o por lotes mal inactivados **(25, 53)**

Con respecto a las vacunas caninas de virus vivos atenuados, hasta hoy no se ha reportado ningún caso de reversión viral detectado en campo **(32)**. La reversión a patógeno, de un virus vacunal atenuado, está determinada por la excreción, en orina y heces, del virus vacunal **(32)**. Los títulos virales de nuestras vacunas están ajustados de manera que la excreción del virus vacunal es prácticamente nula.

La reversión patogénica de virus vacunales se ha inducido de manera experimental mediante múltiples pases seriados, tanto en animales **(37)** como en sistemas celulares **(4)**.

La reversión viral, en el caso de los virus inactivados, es totalmente improbable debido a que el proceso de inactivación usado en nuestro laboratorio no deja virulencia residual, es decir, es eficiente al 100 %.

EVALUACIÓN CRÍTICA

Considero que los conocimientos que he acumulado en la práctica de mi profesión, son suficientes para desempeñar mi trabajo con un alto grado de eficiencia y calidad. Sin embargo, actualmente estoy elaborando dos proyectos biotecnológicos, los cuales impactarán, tanto en mi superación profesional como en la actualización y modernización del área de Biológicos de la empresa en la que laboro actualmente. Dichos proyectos son:

1- La implementación de los procesos de producción y control de calidad de la bacterina de *Leptospira*, producto que es crucial para la ampliación y consolidación de nuestra actual línea de biológicos. Gracias a este proyecto, voy a incursionar en una nueva área de la biotecnología: la producción de Bacterinas, las cuales son inmunógenos formados por suspensiones de bacterias.

La espiroqueta *Leptospira* es una de las bacterias más difíciles de manipular (tanto *in vivo* como *in vitro*), por lo que su manejo implica un alto grado de preparación técnica. Por esto último próximamente tomaré un curso de capacitación (teórico-práctico) en el Laboratorio de Leptospirosis de la Facultad de Veterinaria en la UNAM.

2- Para superar la laboriosa (y limitada en volumen), técnica de cultivos rotatorios, y con el fin de hacer más eficiente la producción de las vacunas virales, es necesaria la implementación de la técnica de cultivo en suspensión.

Esta técnica consiste en la producción en biorreactores, de grandes volúmenes de cultivos celulares en suspensión, los cuales, a su vez, generarán grandes volúmenes de fluidos virales. Esto reducirá tiempos de producción, mano de obra y costos en la producción de vacunas como la antirrábica.

Debido al perfil de mi puesto, desempeño también, de manera rutinaria actividades de planeación, organización y administración de la producción. Sin embargo debo decir que en este aspecto adolezco de deficiencias en conocimientos “administrativos”, lo cual me ha provocado problemas dentro de la empresa. Debo preocuparme más por mejorar en esta área.

En febrero de 1992 ingresé como aprendiz de cultivo celular en un pequeño laboratorio (que ya desapareció) de vacunas veterinarias (*Biotell*). Desde entonces, y a lo largo de 15 años, la experiencia que he acumulado se refleja directamente en la alta calidad de los biológicos de Holland de México. Pero también estoy consciente de que, para seguir creciendo en esta fascinante área de la Biotecnología, debo profundizar mis conocimientos en Virología, Vacunología veterinaria e Inmunología.

REFERENCIAS

1. Abdelmagid O.Y, Larson L, Payne L, Tubbs A, Wasmoen T, Schultz R. Evaluation of the efficacy and duration of immunity of a canine combination vaccine against virulent parvovirus, infectious canine hepatitis virus, and distemper virus experimental challenges. *Vet Ther.* 2004 Fall; 5 (3):173-86.
2. Ada GL. The immunological principles of vaccination. *Lancet.* 1990 ;335:523-6.
3. Appel M.J: Does canine coronavirus augment the effects of subsequent parvovirus infection? *Vet Med* 83:360-366, 1988.
4. Appel M.J. Reversion to virulence of attenuated canine distemper virus in vivo and in vitro. *J. gen. Virol.* 1978 (4) 385-393
5. Appel M.J, Shek WR, Shesberadaran H, Norrby E. Measles virus and inactivated canine distemper virus induce incomplete immunity to canine distemper. *Arch Virol.* 1984; 82(1-2):73–82.
6. Baer G.M., ed. (1991). *The Natural History of Rabies*, 2nd Ed. CRC Press, Boca Raton, Florida.
7. Baker J.A. Current status of distemper immunization procedures. *J.A.V.M.A.*, 149: 686-689 (1992).
8. Bahnemann HG. Inactivation of viruses in serum with binary ethyleneimine. *J Clin Microbiol.* 1976 Feb;3(2):209-10.
9. Bahnemann HG. Binary ethyleneimine as an inactivant for foot-and-mouth disease virus and its application for vaccine production. *Arch Virol.* 1975;47(1):47–56.
10. Bass E.P., Gill M.A., Beckenhauer W.H. Development of a modified live, canine origin parvovirus vaccine. *J Am Vet Med Assoc.* 1982 Nov 1;181(9):909-13.
11. Bass E.P, Gill M.A, Beckenhauer W.H. Evaluation of a canine adenovirus type 2 strain as a replacement for infectious canine hepatitis vaccine. *J Am Vet Med Assoc.* 1980 Aug 1;177(3):234-42.
12. Bender A, Bui LK, Feldman MA, Larsson M, Bhardwaj N. Inactivated influenza virus, when presented on dendritic cells, elicits human CD8+ cytolytic T cell responses. *J Exp Med.* 1995 Dec 1;182(6):1663-71.
13. Bhardwaj N, Bender A, Gonzalez N, Bui LK, Garrett MC, Steinman RM. Influenza virus-infected dendritic cells stimulate strong proliferative and cytolytic responses from human CD8+ T cells. *J Clin Invest.* 1994 Aug;94(2):797-807.
14. Binn LN, Lazar EC, Eddy GA, Kajima M. Recovery and Characterization of a Minute Virus of Canines. *Infect Immun.* 1970 May;1 (5):503-508.
15. Briggs DJ, Dreesen DW, Wunner WH. Vaccines. In: Jackson AC, Wunner WH, eds. *Rabies*. San Diego, USA: Academic Press, 2002: 371-400.
16. Bussell R.H. and Karzon D.T. Canine distemper virus in ferret, dog and bovine kidney cell cultures. *Archives of Virology.* 1965, Vol.17 (2): 163-182

17. Bussell R.H. and Karzon D.T.1965. Canine distemper virus in primary and continuous cell lines of human and monkey origin. Archives of Virology. Volume 17, Number 2, 183-202.
18. Camarena V.G., Caballero S.A., Estudios seroepidemiológicos sobre leptospirosis en los estados de Tabasco, Puebla y Chihuahua. Enfermedades infecciosas y microbiología 1998, 17 (5):87.
19. Carmichael L.E. Canine viral vaccines at a turning point, a personal perspective. Adv Vet Med 1999; 41:289-307
20. Chapman W.G., Ramshaw I.A., Crick J. Inactivated rabies vaccine produced from the Flury LEP strain of virus grown in BHK-21 suspension cells. Applied Microbiology, Dec. 1973, p.858-862.
21. Chappuis G. Control of canine distemper. Vet Microbiol. 1995 May; 44 (2-4):351-8.
22. Churchill A.E. 1987. Preliminary development of a live attenuated canine parvovirus vaccine from an isolate of British origin. Vet.120: 334-339
23. Colín O.J. ¿Es la leptospirosis una enfermedad nueva, emergente, reemergente? Higiene 2000; II, 2: 63-64
24. Córdova G, Ramírez GJ, Ledesma ME, Ramos MG, Sánchez SL , Weiss SB , Santiago OE. El caseinato de sodio induce la expresión del gen del factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF) y de su receptor (M-CSFR) en las células 32D. BA, esp.2001, vol18, No. especial, p.12.
25. Cornwell H.J.,Thompson H., McCandlish I.A., Macartney L, and Nash A.S. Encephalitis in dogs associated with a batch of canine distemper (Rockborn) vaccine. The Veterinary Record, Vol 122, Issue 3, 54-59.
26. Cussac C., Laval F. Reduction of the toxicity and mutagenicity of aziridine in mammalian cells harboring the Escherichia coli fpg gene. Nucleic Acids Res., 24: 1742-1746, 1996.
27. Ding L, Shevach EM. Activation of CD4+ T cells by delivery of the B7 costimulatory signal on bystander antigen-presenting cells (trans-costimulation). Eur J Immunol. 1994 Apr;24(4):859-66.
28. Essen D van, Dullforce P, and Gray D. Role of B cells in maintaining helper T-cell memory. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2000 March 29; 355(1395): 351–355.
29. Eugster A.K. Studies on canine parvovirus infections: development of an inactivated vaccine. Am J Vet Res. 1980 Dec; 41(12):202-4.
30. Fenner F.J., Gibbs E.P.J., Murphy F.A., Rott R., Studdert M.J., White D.O. Veterinary Virology. 2nd ed. Academic Press. EUA., 1993.
31. Fenje P (1960) Propagation of rabies virus in culture of hamster kidney cells. Can. J. Microbiol., 6, 479-484.
32. Flores C.R. Parvovirus canina y aspectos de inmunización. 1987. Ciencia Veterinaria Vol. 4: 131-153

- 33.** Gavaldon D.G, Cisneros M.A, Rojas N, Moles-Cervantes L. Significance of human leptospirosis in Mexico. Detection of *Leptospira* antibodies in a blood donor population. *Gac. Med. Mex.* 1995 May-Jun;131(3):289-92
- 34.** Goldsmith R., Heyneman D., *Parasitología y Medicina Tropical. Manual Moderno*, 1995: 205-210.
- 35.** Goodman J.W. Inmunogenicidad y especificidad antigénica. En *Inmunología Básica y Clínica* (Stites D.P. y Terr A.I) Editorial El Manual moderno, México D.F. 1993, pp 112
- 36.** Gorham J.R. Canine Distemper (La Maladie de Carré) *Advances in Veterinary Science*, 1960, (6) 287 351.
- 37.** Goto H., Shen D.T., Gorham J.R. (1976). Reversion to virulence of an attenuated distemper virus vaccine strain induced by rapid serial passage in ferrets. *Federation Proceedings*, 35, 1021 (abstract).
- 38.** Gray J. Assays for virus infection. In *Virus Culture, A practical approach*. Edited by Cann A.J. Oxford University Press. 1999. p. 81-84.
- 39.** Grossman M., Cohen S., Inmunización. En *Inmunología Básica y Clínica* (Stites D.P. y Terr A.I) Editorial El Manual moderno, México D.F. 1993, pp 859-860
- 40.** Habib M, Hussain I, Fang WH, Rajput ZI, Yang ZZ, Irshad H. Inactivation of infectious bursal disease virus by binary ethylenimine and formalin. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2006 Apr;7(4):320-3.
- 41.** Harding F.A., Allison J.P. CD28-B7 Interactions allow the induction of CD8+ cytotoxic T lymphocytes in the absence of exogenous help. *J. Exp. Med.* 177:1791-1796.
- 42.** Kaplan M., Koprowsky H. La rabia. 1980. En *Inmunología, Libros de Investigación y Ciencia*, Scientific American. Ed Labor. pag 296-305.
- 43.** Kissling R.E., Reese D.R. 1963. Anti-rabies vaccine of tissue culture origin. *J. Immunol.* 91:362-368.
- 44.** Larghi O.P, Savy V.L, Nebel A.E, and Rodriguez A., Ethylenimine-inactivated rabies vaccine of tissue culture origin. *J Clin Microbiol.* 1976 January; 3(1): 26–33.
- 45.** Li Q, Laval J, Ludlum DB. Fpg protein releases a ring-opened N-7 guanine adduct from DNA that has been modified by sulfur mustard. *Carcinogenesis.* 1997 May;18(5):1035-8.
- 46.** Lombard M., Pastoret P., & Moulin A. A brief history of vaccines and vaccination *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 2007, 26 (1), 29-48
- 47.** Macdonald C. Primary culture and the establishment of cell lines. In *Basic cell culture* (Davis JM). Oxford University Press, New York, 1994, pp 158-153
- 48.** Marotto P., Nascimento C., Eluf-Neto J., Marotto M., Andrade L., Sztajnbok J, and Seguro A Acute Lung Injury in Leptospirosis: Clinical and Laboratory Features, Outcome, and Factors Associated with Mortality. *Clinical Infectious Diseases*, volume 29 (1999), pages 1561–1563.

49. Maurer H R., Towards serum-free, chemically defined media for mammalian cell culture. In *Animal Cell Culture* (Freshney R.I) Oxford University Press, New York, 1994, pp 16-20.
50. Mcateer J A, Davis J. Basic cell culture technique and the maintenance of cell lines. In *Basic cell culture* (Davis JM). Oxford University Press, New York, 1994, pp 135-140.
51. Mochizuki M., Harasawa R., Nakatani H. Antigenic and genomic variabilities among recently prevalent parvoviruses of canine and feline origin in Japan. *Vet Microbiol.* 1993 Dec; 38 (1-2):1-10
52. Morgan J. F. Tissue culture nutrition. *Bacteriol Rev.* 1958 March; 22(1): 20–45.
53. Nathanson N, Langmuir A.D. The Cutter incident. Poliomyelitis following formaldehyde-inactivated poliovirus vaccination in the United States during the Spring of 1955. II. Relationship of poliomyelitis to Cutter vaccine. 1963. *Am J Epidemiol* 1995 Jul 15;142(2):109-40.
54. O' Brien S.E, Roth J.A, Hill B.L. Response of pups to modified-live canine parvovirus component in a combination vaccine. *J Am Vet Med Assoc.* 1986 Apr 1;188 (7):699-701.
55. Organización Panamericana de la Salud. Eliminación de la rabia humana transmitida por perro en América Latina: Análisis de la situación. Washington D.C., 2005.
56. Ott R.L. Introduction to the symposium on canine distemper immunization. *J Am Vet Med Assoc.* 1966 Sep 1;149(5):607-9.
57. Paul J. Cell and tissue culture. Ed. Livingstone, Edimburgh and London. 1965, pp 352
58. Parrish C.R, Aquadro C.F, Strassheim ML, Evermann JF, Sgro JY, Mohammed HO. Rapid antigenic-type replacement and DNA sequence evolution of canine parvovirus. *J Virol.* 1991 Dec;65(12):6544-52.
59. Parrish, H. J. Victory with Vaccines. The Story of Immunization. E. & S. Livingstone Ltd. 1968
60. Pratelli A, Cavalli A, Martella V, Tempesta M, Decaro N, Carmichael LE, Buonavoglia C. Canine parvovirus (CPV) vaccination: comparison of neutralizing antibody responses in pups after inoculation with CPV2 or CPV2b modified live virus vaccine. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2001 May; 8 (3): 612-5.
61. Pryde J. Potency of an attenuated canine distemper vaccine derived from chick embryo cell cultures. *Res. Vet. Sci.* 1968, 9, 453-457.
62. Pryde J. Studies with an attenuated canine distemper vaccine derived from Chick embryo cultures. *Res. Vet. Sci.* 1968, 9, 443-452.
63. Ramos G, Santiago O, Martínez I, Zambrano I, Manrique B, Weiss S. El caseinato de sodio induce la diferenciación de las células hematopoyéticas multipotenciales 32D. *Rev Invest Clin* 2000; 52(6) : 638-644.

- 64.** Rockborn G. An attenuated strain of canine distemper virus in tissue culture. *Nature*. 1959 Sep 12;184 (Suppl11): 822-9.
- 65.** Rockborn G., Norrby E., Lannek N. Comparison between the immunizing effect in dogs and ferrets of living distemper vaccines, attenuated in dog tissue cultures and embryonated eggs. *Res Vet Sci*. 1965 Oct ;6 (4):423-7
- 66.** Sagazio, P., M. Tempesta, D. Buonavoglia, M. De Palma G., and Buonavoglia C.. 1998. Antigenic relationship between CPV2 and CPV2b: results of a serological study, p. 43. *In Proceedings of the 1st International Meeting, Virology of Carnivores*.
- 67.** Schneider M.C., Santos – Burgoa C. Tratamiento contra la rabia humana: un poco de su historia. *Rev. Saude Pública*, 28 (6): 454-63.
- 68.** Shell, L.D. Canine distemper. *Compendium Continuing Education, Small Animal Practice*. v.12, n.2, p.173-9, 1990.
- 69.** Swango L.J. Enfermedades virales caninas. En: *Tratado de medicina interna veterinaria, enfermedades del perro y el gato*. 3ª ed. Intermédica Editorial, 1992.
- 70.** Tizard I. *Inmunología Veterinaria*. 4ª edición. Interamericana McGraw- Hill, México 1995.
- 71.** Varela G, Avendaño E, Velasco R, Zárate AM. Serología de la leptospirosis en la Republica Mexicana. *Revista de Investigación en Salud Pública* 1972; Vol. 32; 1: 53-57
- 72.** Vinetz J.M. Leptospirosis. *Curr. Opin. Infect. Dis*. 2001 Oct; 14 (5):527-38.
- 73.** Zavala VJ, Pinzón CJ, Flores CM, Damián CA. La leptospirosis en Yucatán. Estudio serológico en humanos y animales. *Revista Salud Pública de México* 1984; 26; 3: 254-259

ANEXO 1

PRUEBA DE TITULACIÓN VIRAL EN CULTIVO CELULAR

Por el parámetro de efecto citopático

FINALIDAD

La prueba de titulación se emplea para cuantificar la carga viral de una muestra de fluido viral, ó de una vacuna (producto terminado).

FUNDAMENTO

Cuando un virus se pone en contacto con una célula susceptible a ese virus, ésta resulta infectada y pierde su morfología normal, fenómeno que se denomina efecto citopático. Cuando a un determinado fluido viral se le realiza una serie de diluciones consecutivas (con un diluyente no citotóxico), habrá diluciones que ya no contendrán partícula viral alguna. Para detectar cuáles son las diluciones infectivas y no infectivas, es necesario infectar varios cultivos celulares con cada una de las diluciones del virus.

MÉTODO

Ejemplo: determinar el título de una semilla de coronavirus canino.

El día anterior a la prueba, se siembra con células CRFK, una microplaca Nunc de 48 pocillos.

1- Se hace, en tubos de ensayo, una serie de 6 diluciones decimales sucesivas del virus. Se usa como diluyente medio MEM sin suero.

2- Se infectan 7 cultivos de la microplaca con cada dilución del virus (0.2 ml en cada pocillo) como se muestra en el siguiente esquema.

c	c	c	c	c	c
10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}

3- Controles:

- C- control de células; a cada uno de estos 6 pocillos se le pondrá 0.2 mililitros de MEM al 1% de SF.

- 4- Se tapa la microplaca y se deja en incubación 30 minutos a temperatura ambiente.
- 5- Se aforan todos los pocillos con un mililitro MEM al 1% de SF.
- 6- Después de una semana de incubación a 37 centígrados, se hace la lectura microscópica de los cultivos. Se consideran positivos todos los cultivos que muestren efecto citopático. Los controles **c** no deben evidenciar efecto citopático.

El título se calcula mediante el método Reed and Muench:

Ejemplo:

DILUCION DEL VIRUS	RECIPROCO DE LA DILUCIÓN	CULTIVOS INFECTADOS	CULTIVOS <u>NO</u> INFECTADOS	ACUMULADOS INFECTADOS	ACUMULADOS <u>NO</u> INFECTADOS	PORCENTAJE DE INFECTIVIDAD
1: 10	10^{-1}	7	0	27	0	$27 / 27 = 100 \%$
1: 100	10^{-2}	7	0	20	0	$20 / 20 = 100 \%$
1: 1000	10^{-3}	6	1	13	1	$13 / 14 = 92.8 \%$
1: 10 000	10^{-4}	4	3	7	4	$7 / 11 = 63.6 \%$
1: 100 000	10^{-5}	2	5	3	9	$3 / 12 = 25 \%$
1:1000 000	10^{-6}	1	6	1	15	$1 / 16 = 6.25 \%$

INFECTIVIDAD INMEDIATAMENTE INFERIOR AL 50% = A

INFECTIVIDAD INMEDIATAMENTE SUPERIOR AL 50% =B

LOGARÍTMO DEL FACTOR DE DILUCIÓN = C

$[(B-50) / (B-A)] \times C = \text{DIFERENCIA DE LOGARÍTMO}$

C=1

$$(63.6 - 50) / (63.6 - 25) = 0.35 (1) = 0.35$$

Log 10 000 = 4

$$10^{(4 + 0.35)} = 10^{4.35} \text{ DICCC50\% / 0.2 ML}$$

ANEXO 2. PRUEBA DE INHIBICIÓN DE LA HEMOAGLUTINACIÓN

FINALIDAD

La prueba de Inmunogenicidad mediante el ensayo de inhibición de la hemoaglutinación sirve para cuantificar el nivel de anticuerpos protectores generados por una vacuna que contenga algún virus capaz de aglutinar eritrocitos, por ejemplo el parvovirus canino y el virus de la parainfluenza canina.

FUNDAMENTO

Los virus de parvo y parainfluenza tienen la capacidad de aglutinar eritrocitos (de cuye y cerdo). Cuando se mezclan los virus con los eritrocitos se lleva a cabo la reacción de (hemo) aglutinación. La reacción de hemoaglutinación se inhibe cuando, antes de la mezcla virus-eritrocito, se hace reaccionar al virus con su respectivo anticuerpo; el anticuerpo bloquea al virus y se impide la aglutinación, lo que provoca que los eritrocitos simplemente se sedimenten.

MÉTODO

Para determinar, por ejemplo, el nivel de antiparvo (anticuerpos contra el parvovirus) generados por un lote de Parvomune:

- 1- Se utiliza un perro de dos meses de edad, desparasitado y no vacunado anteriormente.
- 2- Minutos antes de la primera vacunación, se obtiene una muestra (No. 1) de sangre del perro para evaluar su nivel de antiparvo basal.
- 3- Se le aplica la primera vacunación tal y como se recomienda en el instructivo de la vacuna
- 4- Tres semanas después, se obtiene una muestra (No. 2) de sangre del perro para evaluar su nivel de antiparvo vacunal, y se le aplica una segunda dosis de la vacuna.
- 5- Tres semanas después de la aplicación del refuerzo, se obtiene una muestra (No. 3) de sangre del perro para evaluar su nivel de antiparvo vacunal.
- 6- Las tres muestras de sangre son procesadas para obtener su respectivo suero
A cada muestra de suero se le hace una prueba de inhibición de la hemoaglutinación, la cual se realiza de la siguiente manera:
 - a- Se hace, en tubos de ensayo, una serie de 12 diluciones sucesivas del suero. Se usa buffer de fosfatos (PBS) como diluyente.
Las diluciones pueden ser dobles: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16. etc.
ó quintuples: 1:5, 1:25, 1:125, 1:625. etc.
 - b- A 0.2 mililitros de cada dilución del suero se le agrega 0.2 mililitros de parvovirus (el cual debe contener 8 unidades hemoaglutinantes en 0.2 mililitros)
 - c- La mezcla suero-virus se incubaba durante 30 minutos a temperatura ambiente

d- A todas las diluciones se le agrega 0.2 mililitros de una suspensión de eritrocitos de cerdo al 1%

e- Se incluirán 4 controles:

A- control de eritrocitos: 0.2 mililitros de la suspensión de eritrocitos + 0.4 mililitros de PBS

B- control de suero: 0.2 mililitros del antisuero problema + 0.2 mililitros de PBS + 0.2 mililitros de la suspensión de eritrocitos.

C- control positivo: 0.2 mililitros de un antisuero (de referencia) de parvovirus + 0.2 mililitros del parvovirus + 0.2 mililitros de la suspensión de eritrocitos.

D- control negativo: 0.2 mililitros del parvovirus + 0.2 mililitros de la suspensión de eritrocitos + 0.2 mililitros de PBS

e- Después de dos horas de incubación a 5 centígrados, se efectúa la lectura.

El control A debe mostrar sedimentación

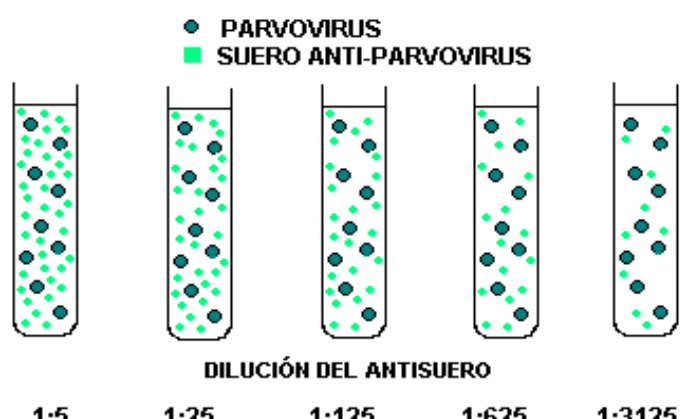
El control B debe mostrar sedimentación

El control C debe mostrar sedimentación

El control D debe mostrar aglutinación

El resultado de la prueba es igual al recíproco de la máxima dilución del suero que inhibió completamente la aglutinación de los eritrocitos. Es decir, la dilución más alta en la que se observó sedimentación de eritrocitos. Ejemplo:

125 unidades inhibitoras de la hemoaglutinación (UIH).



ANEXO 3

PRUEBA DE INMUNOGENICIDAD POR EL MÉTODO DE SERONEUTRALIZACIÓN.

FINALIDAD

La prueba de Inmunogenicidad mediante el ensayo de neutralización suero variable - virus constante, sirve para cuantificar el nivel de anticuerpos protectores generados por un inmunógeno.

FUNDAMENTO

Cuando un virus se pone en contacto con una célula susceptible a ese virus, ésta resulta infectada y pierde su morfología normal, fenómeno que se denomina efecto citopático, pero si, previamente se mezcla el virus con su respectivo anticuerpo (neutralización), tal infección no sucede y por lo tanto no se presenta el efecto citopático.

MÉTODO

Para determinar, por ejemplo, el nivel de antidiemper (anticuerpos contra el virus de diemper) generados por un lote de Canomune puppy DP:

- 1- Se utiliza un perro de dos meses de edad, desparasitado y no vacunado anteriormente.
- 2- Minutos antes de la primera vacunación, se obtiene una muestra (No. 1) de sangre del perro para evaluar su nivel de antidiemper basal.
- 3- Se le aplica la primera vacunación tal y como se recomienda en el instructivo de la vacuna
- 4- Tres semanas después, se obtiene una muestra (No. 2) de sangre del perro para evaluar su nivel de antidiemper vacunal, y se le aplica una segunda dosis de la vacuna.
- 5- Tres semanas después de la aplicación del refuerzo, se obtiene una muestra (No. 3) de sangre del perro para evaluar su nivel de antidiemper vacunal.
- 6- Las tres muestras de sangre son procesadas para obtener su respectivo suero
A cada muestra de suero se le hace una prueba de virus-suero neutralización, la cual se realiza de la siguiente manera:
El día anterior a la prueba, se siembra con células VERO, una microplaca Nunc de 48 pocillos.
a- Se hace, en tubos de ensayo, una serie de 12 diluciones sucesivas del suero. Se usa buffer de fosfatos (PBS) como diluyente.
Las diluciones pueden ser dobles: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16. etc.
ó quintuples: 1:5, 1:25, 1:125, 1:625. etc.

b- A un mililitro de cada dilución del suero se le agrega un mililitro de virus de distemper, el cual debe tener 200 DICC 50% / mililitro.

c- Las mezclas suero-virus se incuban durante 30 minutos a temperatura ambiente.

d- Se infectan 7 cultivos de la microplaca con cada dilución de la mezcla (0.2 ml en cada pocillo) como se muestra en el siguiente esquema.

v	v	v	c	c	c
1:5	1:25	1:125	1:625	1:3125	1:15625
1:5	1:25	1:125	1:625	1:3125	1:15625
1:5	1:25	1:125	1:625	1:3125	1:15625
1:5	1:25	1:125	1:625	1:3125	1:15625
1:5	1:25	1:125	1:625	1:3125	1:15625
1:5	1:25	1:125	1:625	1:3125	1:15625
1:5	1:25	1:125	1:625	1:3125	1:15625
1:5	1:25	1:125	1:625	1:3125	1:15625

e- Los controles se trabajan así:

- **c-** control de células; a cada uno de estos 3 pocillos se le pondrá 0.2 mililitros de MEM al 1% de SF.
- **v-** control de virus; cada uno de estos 3 pocillos se inoculará con 0.1 mililitros del virus de distemper + 0.1 mililitros de MEM al 1% de SF.

f- Se tapa la microplaca y se deja en incubación 30 minutos a temperatura ambiente.

g- Se aforan todos los pocillos con un mililitro MEM al 1% de SF.



h- Después de una semana de incubación a 37 centígrados, se hace la lectura microscópica de los cultivos. Se consideran positivos todos los cultivos que no muestren efecto citopático, y negativos los que sí.

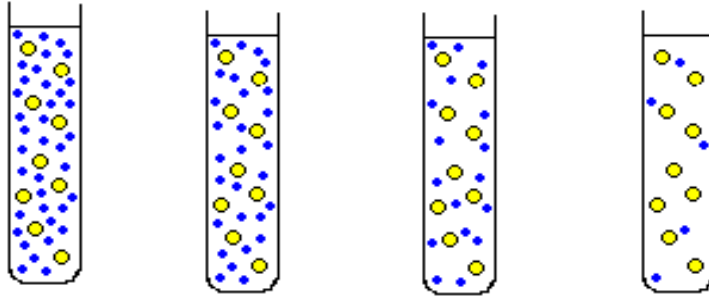
Los controles **c** no deben evidenciar efecto citopático.

Los controles **v** deben evidenciar efecto citopático.

El título se expresa como la máxima dilución del suero que neutralizó completamente 200 DICC del virus de distemper, es decir, la máxima dilución del suero que evitó el efecto citopático. Ejemplo, 1:125

VIRUS- SUERO NEUTRALIZACIÓN DEL VIRUS DE DISTEMPER

 VIRUS DISTEMPER
 SUERO ANTI-DISTEMPER



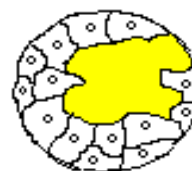
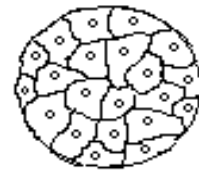
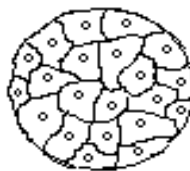
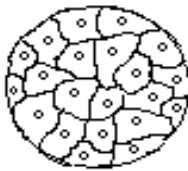
DILUCION DEL ANTISUERO

1:5

1:25

1:125

1:625



AUSENCIA DE EFECTO CITOPÁTICO

EFECTO
CITOPÁTICO

Descripción de la prueba de potencia de Canomune puppy DHA2PPi lote 07EB011.

DESARROLLO

El 27 de abril de 2007 nació una camada de 7 perros criollos sanos, de los cuales se eligieron a los 5 más fuertes para la prueba, tres hembras y dos machos, todos color "leonado" y con pesos entre 2.4 y 2.9 kilos.

Primera desparasitación: 16 de junio de 2007, con una tableta de Vermiplex puppy a cada perro

Segunda desparasitación: 23 de junio de 2007, con una tableta de Vermiplex puppy a cada perro

El 27 de junio de 2007 se tomó una muestra de sangre de cada perro para cuantificar anticuerpos basales. Minutos después se les aplicó, a todos los perros, vía subcutánea, una dosis de Canomune puppy DHA2PPi lote 07EB011.

El 23 de julio de 2007 se tomó una muestra de sangre de cada perro para cuantificar anticuerpos vacunales. Minutos después se les aplicó, a todos los perros, vía subcutánea, un refuerzo de Canomune puppy DHA2PPi lote 07EB011.

El 6 de agosto de 2007 se tomó una muestra de sangre de cada perro para cuantificar anticuerpos vacunales. Minutos después los perros fueron inoculados con virus patógenos:

Virus patógenos utilizados para el desafío:

- Adenovirus canino tipo 2 cepa Toronto A 26/61
- Parainfluenza canina cepa 78-238
- Distemper canino cepa Snyder Hill
- Hepatitis infecciosa canina cepa Utrecht
- Parvovirus cepa 920916 CPV2b

Origen de las cepas: American type culture collection (ATCC)

DESAFIO:

El perro marcado con el número 1 fue inoculado con un mililitro de distemper patógeno que tenía un título de $10^5.5$ DICC 50%/mililitro. El virus le fue inoculado con 0.5 mililitros en cada fosa nasal.

La perra marcada con el número 2 fue inoculada, vía intramuscular, con un mililitro de virus de hepatitis patógeno que tenía un título de $10^5.7$ DICC 50%/mililitro

La perra marcada con el número 3 fue inoculada con un mililitro de parainfluenza patógeno que tenía un título de $10^5.0$ DICC 50%/mililitro. El virus le fue inoculado con 0.5 mililitros en cada fosa nasal.

El perro marcado con el número 4 fue inoculado, vía oral, con un mililitro de parvovirus patógeno que tenía un título de $10^6.1$ DICC 50%/mililitro

La perra marcada con el número 5 fue inoculada con un mililitro de adenovirus patógeno que tenía un título de 10^5 DICC 50%/mililitro. El virus le fue inoculado con 0.5 mililitros en cada fosa nasal.

RESULTADOS

Hasta la fecha en que se redacta este reporte (24 de agosto) los 5 perros permanecen sanos.

La determinación de los niveles de antidiptemper, antiadenovirus y antihepatitis fue realizada por medio de la prueba de seroneutralización. La determinación de los niveles de antiparvovirus y antiparainfluenza fue realizada por medio de la prueba de inhibición de la hemoaglutinación.

B- Nivel de anticuerpos basales

P- Nivel de anticuerpos después de la primera vacunación

S- Nivel de anticuerpos después de la segunda vacunación

UIH – Unidades inhibitoras de la hemoaglutinación

DNCC- Dosis neutralizantes en cultivo celular

Perro 1

Anticuerpo	B	P	S
antidiptemper	negativo	128 DNCC	512 DNCC
antiparvovirus	4 UIHA	1024 UIHA	4 096 UIHA
antiadenovirus tipo 2	2 DNCC	128 DNCC	512 DNCC
antihepatitis	2 DNCC	128 DNCC	512 DNCC
antiparainfluenza	negativo	32 UIHA	256 UIHA

Perra 2

Anticuerpo	B	P	S
antidiptemper	negativo	64 DNCC	256 DNCC
antiparvovirus	8 UIHA	1024 UIHA	2048 UIHA
antiadenovirus tipo 2	2 DNCC	64 DNCC	512 DNCC
antihepatitis	2 DNCC	64 DNCC	512 DNCC
antiparainfluenza	4 DNCC	128 UIHA	256 UIHA

Perra 3

Anticuerpo	B	P	S
antidistemper	negativo	256 DNCC	256 DNCC
antiparvovirus	4 UIHA	4096 UIHA	4096 UIHA
antiadenovirus tipo 2	negativo	32 DNCC	512 DNCC
antihepatitis	negativo	32 DNCC	512 DNCC
antiparainfluenza	negativo	512 UIHA	512 UIHA

Perro 4

Anticuerpo	B	P	S
antidistemper	4 DNCC	32 DNCC	256 DNCC
antiparvovirus	2 UIHA	128 UIHA	4096 UIHA
antiadenovirus tipo 2	4 DNCC	64 DNCC	128 DNCC
antihepatitis	4 DNCC	64 DNCC	128 DNCC
antiparainfluenza	negativo	32 UIHA	512 UIHA

Perra 5

Anticuerpo	B	P	S
antidistemper	4 DNCC	32 DNCC	128 DNCC
antiparvovirus	negativo	512 UIHA	1024 UIHA
antiadenovirus tipo 2	negativo	32 DNCC	124 DNCC
antihepatitis	negativo	32 DNCC	124 DNCC
antiparainfluenza	negativo	128 UIHA	512 UIHA

COMENTARIOS

Ningún perro presentó efectos indeseables atribuibles a la vacunación.

Se observa un apreciable incremento en los niveles de anticuerpos después de la primera vacunación.

La segunda vacunación, en general, aumentó las concentraciones séricas de los anticuerpos contra los virus del biológico.

Los niveles de antiadenovirus y antihepatitis, en cada perro, resultaron ser iguales debido al fenómeno de cruzamiento inmunológico entre el virus de la hepatitis y el adenovirus tipo 2 **(11)**.

2006

<i>VACUNA</i>	<i>NUMERO DE LOTES</i>	<i>TOTAL (DOSIS)</i>
RABIMUNE	3	60 000
PARVOMUNE	3	60 000
CANOMINE PUPPY DHA2PPI	3	60 000
CANOMUNE DHL	3	60 000
CANOMUNE PUPPY DP	2	40 000
CORONAMUNE	1	20 000
CANOMUNE PUPPY DHA2P	1	10 000
TOTAL	16	310 000

2007 (HASTA EL 31 DE AGOSTO)

<i>VACUNA</i>	<i>NUMERO DE LOTES</i>	<i>TOTAL (DOSIS)</i>
RABIMUNE	2	40 000
PARVOMUNE	2	40 000
CANOMINE PUPPY DHA2PPI	2	40 000
CANOMUNE DHL	1	20 000
CANOMUNE PUPPY DP	2	40 000
CORONAMUNE	1	20 000
CANOMUNE PUPPY DHA2P	1	10 000
TOTAL	11	210 000

ANEXO 6

**CALENDARIO DE VACUNACIÓN
RECOMENDADO PARA PERROS**

ANTÍGENO	EDAD DE LA PRIMERA VACUNACIÓN (SEMANAS)	EDAD DEL PRIMER REFUERZO (SEMANAS)	EDAD DEL SEGUNDO REFUERZO (SEMANAS)	EDAD DEL TERCER REFUERZO (SEMANAS)	REVACUNACIÓN
PARVOVIRUS	6 - 7	8 - 10	10 -12	12 - 14	ANUAL
DISTEMPER	6 - 8	8 - 10	10 -12	12 - 14	ANUAL
ADENOVIRUS TIPO 2	6 - 8	8 - 10	10 -12	12 - 14	ANUAL
PARAINFLUENZA	6 - 8	8 - 10	10 -12	12 - 14	ANUAL
CORONAVIRUS	6 - 8	8 - 10	10 -12	12 - 14	ANUAL
LEPTOSPIRA	10 -12	12 - 14			ANUAL
RABIA	12 - 14				ANUAL