

Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria

SANIDAD ANIMAL

Resolución 351/2006

Actualízase la reglamentación que permite el control de las vacunas destinadas a la prevención de la Fiebre Aftosa.

Bs. As., 28/6/2006

VISTO el Expediente N° S01:0333752/2005 del Registro del MINISTERIO DE ECONOMIA Y PRODUCCION, y

CONSIDERANDO:

Que resulta necesario actualizar la reglamentación que permite el control de las vacunas antiaftosa.

Que la vacunación sistemática es un instrumento básico en la ejecución del Plan de Erradicación de la Fiebre Aftosa.

Que se debe actualizar la legislación de contralor atendiendo los avances científicos y técnicos sucedidos.

Que se debe dar a los productores pecuarios seguridad en cuanto al producto a aplicar.

Que la Dirección de Agroquímicos, Productos Farmacológicos y Veterinarios y la Dirección de Laboratorios y Control Técnico están en condiciones de cumplir eficientemente las distintas etapas de control que se establecen.

Que se han tenido en cuenta las sugerencias del Consejo Asesor de Virología de este Servicio Nacional y de las empresas involucradas en la elaboración y comercialización de la vacuna antiaftosa.

Que para introducir las modificaciones normativas que se pretenden promulgar se tuvieron en cuenta las recomendaciones efectuadas por la ORGANIZACION MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL (OIE) en la Quinta Edición del Manual de Test Diagnósticos y Vacunas para Animales Terrestres y el Código de Animales Terrestres, como así también las conclusiones arribadas en el Seminario de Control de Vacuna Antiaftosa - PANAFTOSA 2001 y el Grupo ad hoc de Producción y Control de Vacunas Antiaftosa - PANAFTOSA 2005.

Que el Consejo de Administración se pronunció favorablemente.

Que la Dirección de Asuntos Jurídicos emitió el correspondiente dictamen.

Que el suscripto es competente para dictar la presente resolución en función de lo normado por el inciso c), artículo 2° de la Ley de Aftosa N° 24.305, y por los incisos c) y l) del artículo 8° del Decreto N° 1585 del 19 de diciembre de 1996, sustituido por su similar N° 680 del 1 de septiembre de 2003.

Por ello,

EL PRESIDENTE DEL SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA

RESUELVE:

Artículo 1° — La elaboración, importación, exportación, tenencia, distribución y expendio de los productos destinados a combatir la Fiebre Aftosa será autorizada por el SERVICIO NACIONAL DE

SANIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA a través de sus Direcciones de Agroquímicos, Productos Farmacológicos y Veterinarios (DAPFyV) y de Laboratorios y Control Técnico (DILAB).

- DE LA CATEGORIZACION DE LOS ESTABLECIMIENTOS:

Art. 2º — A los efectos de la fabricación, importación, exportación, tenencia, distribución y expendio de vacuna antiaftosa, de la presente norma y de acuerdo a lo establecido en el Decreto N° 583 del 31 de enero de 1967 y en la Resolución N° 345 del 6 de abril de 1994 del ex-SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD ANIMAL, las personas físicas o jurídicas serán categorizadas, según corresponda, de la siguiente manera:

a. Firmas productoras de vacunas antiaftosa con establecimiento, registro, elaboración de antígenos y formulación propios.

b. Firmas productoras de vacunas que formulen con antígenos inactivados elaborados por terceros y con registro propio.

c. Firmas que no poseen establecimientos de elaboración y que acrediten fehacientemente, además del derecho de comercialización, que el producto se elabora en establecimientos habilitados, estando todo el proceso bajo la responsabilidad directa del elaborador.

d. Firmas que detenten Extensiones de Certificados de Productos elaborados por firmas incluidas en el inciso a. del presente artículo.

Art. 3º — Las firmas incluidas en las categorías a., b., c. y d. del artículo 2º de la presente resolución estarán sujetas a las exigencias que se reglamentan en el presente artículo:

i. A la habilitación del Establecimiento elaborador.

ii. Al Control de las Normas de Bioseguridad.

iii. A los controles de producción.

iv. A las pruebas de registro o autorización del producto.

v. Al control de series, previo a la venta y al uso de las vacunas.

vi. Al pago de aranceles por las vacunas presentadas a control.

Art. 4º — Los titulares o responsables jurídicos de los establecimientos de las categorías citadas en el artículo 2º de la presente resolución, serán responsables de la pureza y legitimidad de los productos elaborados, fraccionados, depositados y distribuidos.

Art. 5º — En las categorías c. y d. la totalidad de las inspecciones que se establecen en la presente norma serán realizadas en las instalaciones del laboratorio elaborador. El retiro de muestras de vacuna se efectivizará en el lugar en donde hayan sido elaboradas. Al terminar los controles oficiales de inocuidad del producto final y por pedido expreso del elaborador, el SENASA podrá autorizar el traslado del total de la partida al lugar en el que queden en caución hasta el final de los controles.

Art. 6º — La venta, cesión y traslado de antígenos inactivados deberá ser expresamente autorizado por la DILAB con posterioridad a los controles de inocuidad oficiales.

Art. 7º — Establézcase que en los casos de Transferencia de Certificados de Uso y Comercialización la firma a cuyo favor se concedió la transferencia deberá realizar la correspondiente prueba de registro, excepto que el producto se elabore en la misma planta y con iguales procedimientos. Si esos controles no resultaran satisfactorios se cancelará el Certificado.

Art. 8º — Establézcase que en todos los casos la producción se realizará en establecimientos habilitados por el SENASA.

DE LA HABILITACION Y DEL REGISTRO DE LOS LABORATORIOS:

Art. 9º — La inscripción y habilitación de los laboratorios que elaboren antígenos y vacunas destinados a prevenir la Fiebre Aftosa será gestionada ante el SENASA, llenando con carácter de Declaración Jurada, una solicitud que, además de adecuarse a los alcances de las Resoluciones Nros. 345 del 6 de abril de 1994 y 765 del 3 de diciembre de 1996, ambas del ex-SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD ANIMAL, haga constar:

1. Nombre de la firma comercial.
2. Nombre del Director y/o Responsable Técnico con Título de Profesional de las Ciencias Veterinarias, expedido, reconocido, habilitado o revalidado por Universidad Nacional.
3. Organigrama donde consten los profesionales responsables de Producción, Control de Producción, Aseguramiento de Calidad, Bioseguridad y Mantenimiento.
4. Ubicación del laboratorio, con habilitación municipal.
5. Planos de los locales, memoria descriptiva de las instalaciones y equipos destinados a la bioseguridad, producción, cuarentena, control, envase, conservación, expendio y demás controles de conformidad con el tipo de producto elaborado.
6. Capacidad de elaboración mensual de los productos terminados.
7. Si posee campo experimental deberá presentar ubicación y planos de las instalaciones.
8. Normas y procedimientos de Bioseguridad implementadas en todos los espacios donde se manipule el virus aftoso que garanticen su no diseminación.

Los puntos 5 y 6 del presente artículo deberán ajustarse a los requisitos exigidos en el Anexo I de la presente resolución. Las Condiciones y Normas de Bioseguridad tendrán que ajustarse a los requisitos establecidos en el Anexo II de la presente norma.

En ningún caso se permitirá el manejo de virus activo ni la aplicación de vacunas antiaftosa sin los correspondientes controles de inocuidad y autorización previa por parte de la DILAB.

Art. 10. — La habilitación de los laboratorios y las autorizaciones de elaboración, importación, exportación y venta de vacunas antiaftosa que se otorguen al amparo de la presente resolución, podrán ser revocadas o suspendidas sin derecho a indemnización alguna, si se demuestra con hechos fundados y protocolizados el incumplimiento de las disposiciones contenidas en la presente norma.

Art. 11. — Efectuadas las inspecciones y verificado el cumplimiento de los requisitos establecidos el SENASA concederá la habilitación, expidiendo oportunamente el Certificado de Habilitación respectivo y procediendo a registrar al laboratorio en el Registro Nacional correspondiente, previo informe favorable de la DAPFyV y la DILAB.

DE LA SEGURIDAD BIOLÓGICA

Art. 12. — La manipulación del virus aftoso se podrá realizar únicamente en los laboratorios expresamente habilitados por la DILAB:

La Comisión de Bioseguridad del SENASA establecerá y controlará las condiciones de Seguridad Biológica que deberán poseer los laboratorios de diagnóstico, producción, control e investigación y los locales para inocular animales que manipulan virus infeccioso de Fiebre Aftosa, que se enmarcarán en el nivel de Bioseguridad 3 Agricultura (NBS 3 A) Anexo II.

Art. 13. — Requisitos obligatorios con los que deberán contar las plantas elaboradoras de antígenos y vacunas:

- a) Locales aislados para la producción del virus aftoso con presión de aire negativa diferencial y sistemas de esclusa para introducción y salida de personal, materiales y residuos, que garanticen su decontaminación.
- b) Un control y registro de acceso y salida de las personas de los locales mencionados; éstas deberán ducharse y cambiar totalmente su ropa previo a su retiro.
- c) Sistemas de tratamiento de los efluentes líquidos y sólidos del área de manipulación de virus infeccioso. Como consecuencia de la manipulación de virus aftoso, los desechos generados deberán ser tratados, previo a su eliminación, con sustancias o métodos que aseguren la destrucción total del virus.
- d) Sistemas para filtrar el aire de manera que se garantice que no salga virus infeccioso al exterior.
- e) Sistemas de emergencia de suministro de corriente eléctrica.
- f) Supervisor de Seguridad Biológica.
- g) El personal deberá estar entrenado para cumplir con las normas de bioseguridad.

DE LAS NORMAS GENERALES:

Art. 14. — Las firmas debidamente inscriptas según lo establecido en los artículos precedentes deberán presentar para la aprobación de los productos destinados a la Prevención de la Fiebre Aftosa, una Solicitud de Registro de Productos Biológicos, que además de adecuarse a la normativa vigente (Resoluciones ex-SENASA Nros. 345/94 y 765/96) para el Registro y la Aprobación de Productos destinados al Diagnóstico, Prevención o Tratamiento de las enfermedades de los animales, incluya la totalidad de las respuestas que respondan a las preguntas que efectúen los funcionarios de la DILAB para asegurar que el producto cumplirá con lo requerido en esta norma.

Art. 15. — Autorízase la inscripción en el Registro Nacional De Productos Veterinarios, de las vacunas con adyuvante oleoso o cualquier otro adyuvante que en el futuro pudiera surgir y que cuente con los suficientes antecedentes científicos y/o pruebas experimentales propias, como para garantizar una duración de inmunidad de SEIS (6) meses o más en animales primovacunados y de UN (1) año o más en animales revacunados.

Art. 16. — Serán autorizadas únicamente vacunas inactivadas con inactivantes químicos de primer orden. Deberá efectuarse un procedimiento validado de doble inactivación, con cambio de tanque del antígeno durante el proceso de inactivación.

Art. 17. — Los tipos y subtipos de virus aftoso a ser utilizados para la producción y el control de las vacunas de uso en el Territorio Nacional serán establecidos por el SENASA y entregados por intermedio de la DILAB. Se informará con la debida antelación cualquier cambio en las cepas de producción y control. El SENASA autorizará expresamente en cada caso la producción de antígenos y vacunas con cepas no utilizadas en el Territorio Nacional con fines de exportación o como componentes de bancos de antígenos y vacunas.

Art. 18. — El volumen de la dosis para bovinos de toda vacuna con adyuvante oleoso no podrá ser menor a DOS (2) mililitros ni mayor a CINCO (5) mililitros.

Art. 19. — Cuando la situación epidemiológica lo requiera y ante la solicitud de la Dirección Nacional de Sanidad Animal (DNSA), la DILAB podrá disponer el control de vacunas inactivadas monovalentes, que será ejecutado de conformidad con las pautas reglamentadas en la presente resolución para las vacunas polivalentes.

Art. 20. — Podrán ser liberadas vacunas para emergencia con controles oficiales de inocuidad de fase acuosa o vacuna final, controles internos del elaborador como Declaración Jurada y controles de producción cuando la situación epidemiológica así lo requiera y la DNSA lo solicite con motivos debidamente fundamentados.

Art. 21. — La DILAB tendrá acceso a todas las etapas del proceso de elaboración de las vacunas antiaftosa y efectuará inspecciones periódicas con el fin de controlar la producción, el buen estado de los locales, de las instalaciones y de los equipos de los laboratorios habilitados, así como el cumplimiento de las normas de bioseguridad establecidas, de acuerdo a un cronograma elaborado y con una periodicidad no menor a DOS (2) veces por año.

Art. 22. — Se autoriza al personal de la DILAB para retirar muestras de los distintos componentes que integran la vacuna en las etapas de elaboración, a fin de someterlos a los controles correspondientes y al retiro de muestras del producto semielaborado y terminado.

Art. 23. — No podrá presentarse a control ni expendirse ningún envase de vacuna antiaftosa sin su correspondiente estampilla oficial numerada provista por el SENASA o por un proveedor oficializado, que certifique la serie que corresponda, su fecha de vencimiento y la cantidad de dosis que contiene.

En cada serie de vacuna para uso local se presentarán, como mínimo, DOS (2) tamaños de envase debiendo el menor tamaño representar al menos el VEINTE POR CIENTO (20 %) del total. El envase de mayor tamaño contendrá como máximo CIENTO VEINTICINCO (125) dosis de DOS (2) mililitros y el envase de menor tamaño será de CINCUENTA (50) dosis de DOS (2) mililitros como máximo.

Art. 24. — La DILAB autorizará la venta y uso de vacuna antiaftosa después de verificar:

- a) Tipo y subtipo del virus vacunal.
- b) Inocuidad.
- c) Masa antigénica.
- d) La ausencia de gérmenes viables.
- e) Controles físico-químicos.
- f) Eficacia.
- g) Tolerancia.
- h) Pureza (no inducción de anticuerpos contra proteínas no estructurales).

Queda facultada la DILAB para realizar cualquier otro control adicional que considere necesario a fin de asegurar la correcta elaboración según lo declarado en el expediente de registro, condiciones de bioseguridad y conservación de las vacunas, así como el correcto desempeño del producto una vez aplicado.

Art. 25. — Fíjase el plazo de vencimiento de las vacunas en VEINTICUATRO (24) meses, contados a partir de la fecha de inactivación del primer componente monovalente integrante de cada serie, siempre que las condiciones de conservación sean las establecidas y se hayan aprobado los controles requeridos en la presente resolución.

DE LOS PRODUCTOS A IMPORTAR:

Art. 26. — Sólo se autorizará la importación de antígenos o vacunas en cuyo proceso de producción se utilicen materias primas de origen bovino y materias primas de origen bovino importadas para producción local, que resulten autorizadas por la Resolución N° 117 del 22 de enero de 2002 y su similar modificatoria N° 1.052 del 30 de diciembre de 2002, ambas del SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA, que establecen la evaluación de la situación de riesgo de Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB) para cada país exportador.

Art. 27. — Las firmas interesadas en la importación de vacunas antiaftosa o antígenos inactivados deberán cumplir la totalidad de las exigencias y condiciones que se establecen en la presente

resolución, y deberán poseer locales e instalaciones habilitadas para la formulación, conservación y expendio, según el caso, de estos productos, acorde a lo establecido en la presente reglamentación.

La aprobación pertinente se deberá gestionar ante el SENASA, la cual se concederá, si correspondiere, previa inspección y habilitación del establecimiento elaborador por la DILAB.

Previo al inicio de los trámites de registro los interesados deberán presentar la habilitación del Ente Sanitario Oficial del país de origen para la elaboración de vacuna antiaftosa y autorización para que el laboratorio elaborador pueda trabajar con las cepas de virus aftoso establecidas por el SENASA.

Art. 28. — Las vacunas o antígenos inactivados importados serán sometidos a la totalidad de los controles establecidos en la presente reglamentación, al igual que los aplicados a las vacunas elaboradas en el país.

DE LA EXPORTACION DE VACUNAS:

Art. 29. — Las exportaciones de vacunas antiaftosa o de antígenos inactivados deberán ser autorizadas por el SENASA, previo informe favorable de la DILAB. Las autorizaciones de exportación se extenderán a laboratorios habilitados con registro aprobado de uso local o con extensión de certificado. A ese efecto, las firmas interesadas deberán formular por escrito las peticiones respectivas, fundamentadas, ante la DILAB. El SENASA efectuará, previo a la exportación, los controles de inocuidad y aquéllos que sean requeridos por el país importador.

Se autorizarán las exportaciones siempre que estén aseguradas las necesidades de abastecimiento del país.

DE LA ADMISION Y DEL REGISTRO DE LAS VACUNAS:

Art. 30. — Los productos cuyo Certificados de Uso y Comercialización se soliciten serán sometidos por la DILAB a los controles que determina esta reglamentación bajo la denominación de:

- a) Control de autorización o registro.
- b) Control de series.

Art. 31. — Las firmas con laboratorios habilitados en el Registro Nacional de Productos Veterinarios, que a tal efecto lleva la DAPFyV, deberán gestionar ante dicha dependencia la solicitud de inscripción de las vacunas destinadas a prevenir la Fiebre Aftosa que deseen elaborar, adecuando el contenido de las presentaciones a lo establecido en la normativa en vigencia (Resoluciones Nros. 345/94, 765/96, ambas del ex-SENASA, y 897/02 del SENASA) además de incluir, capacidad de inducción de anticuerpos contra proteínas no estructurales, y toda otra información que el SENASA considere necesaria.

Previo a la presentación de la primera serie de registro a control, las firmas presentarán resultados de pruebas experimentales propias en la especie de destino que demuestre la respuesta del producto, como así también antecedentes científicos y bibliográficos.

El laboratorio productor deberá presentar antecedentes que demuestren que el sistema de producción utilizado asegura la ausencia de inducción de reactores a pruebas de detección de anticuerpos contra proteínas no estructurales utilizadas oficialmente en la vigilancia epidemiológica de la Fiebre Aftosa. Como mínimo se deberán presentar datos de ensayos en primovacunados a los TREINTA (30) o SESENTA (60) días post vacunación y datos con una revacunación a los TREINTA (30) o SESENTA (60) días post vacunación y evaluados a los TREINTA (30) días post revacunación (DPR). Las pruebas deberán efectuarse con un mínimo de DIECISEIS (16) bovinos.

Se deberán acompañar los proyectos de rótulos y folletos a utilizar de acuerdo a la normativa vigente mencionada anteriormente.

DE LAS PRUEBAS DE AUTORIZACION O REGISTRO:

Art. 32. — Se considerarán pruebas de registro de vacuna antiaftosa aquellas a las que se somete a dichos inmunógenos con el fin de que las personas físicas o jurídicas recurrentes puedan obtener el Certificado de Uso y Comercialización pertinente.

Art. 33. — A fin de la aprobación de la serie de registro los laboratorios habilitados deberán:

a) Comunicar por escrito a la DILAB con una anticipación no menor a CINCO (5) días hábiles, el cronograma de producción, la formulación y el envase.

b) Presentar ante la DILAB el sistema de protocolización adoptado para registrar los procesos de producción y los controles internos que permitan una eficaz auditoría.

c) Registrar la información relativa a la constitución, al proceso de elaboración y control, debiendo consignar como mínimo lo siguiente: número del protocolo, tipo de la vacuna, número de la serie, cantidad de dosis, fechas de elaboración, y características y controles de:

- SEMILLAS VIRALES: Control de calidad de semillas, certificación de origen, pureza, control de contaminantes adventicios; perfil de anticuerpos monoclonales y secuencia.

- ANTIGENOS: Tipo y subtipo de virus, título viral, masa antigénica; número de los protocolos de los cultivos que la integran; fecha de elaboración, cantidad expresada en unidades de peso y volumen.

- INACTIVACION: composición química, concentración y preparación del inactivante, temperatura y tiempo, cinética de inactivación, control de inocuidad.

- OTROS COMPONENTES: Controles de calidad de las materias primas.

Control de calidad, certificación de origen, control de micoplasmas y otros adventicios en banco de cultivos celulares.

Control de calidad, certificación de origen y control de contaminantes adventicios en suero y otros componentes de origen animal.

Control de Calidad de adyuvantes, emulsionantes, conservadores.

Protocolos de formulación y envase.

Controles de inocuidad, de esterilidad, físico-químicos y seguridad con indicación del procedimiento utilizado y las etapas en que fueron efectuados.

Los registros de los procesos de elaboración y de los controles internos presentados por el laboratorio elaborador deberán ser rubricados por el Responsable de Producción y de Aseguramiento de Calidad, tendrán carácter de Declaración Jurada y deberán seguir normas de aseguramiento de la calidad y buenas prácticas de manufactura de conformidad con lo establecido en la Resolución N° 482 del 24 de mayo de 2002 del SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA.

Art. 34. — La totalidad de los controles internos por parte del elaborador deberán estar finalizados al momento del retiro de las muestras del producto final debidamente envasado, rotulado y estampillado según se establece en la presente.

Art. 35. — El laboratorio productor deberá comunicar por escrito, con una anticipación no menor a CINCO (5) días hábiles, el detalle del fraccionamiento y envasado de la serie a ser presentada a control, indicando el número de la serie y la fecha de su vencimiento.

El laboratorio productor deberá presentar los protocolos definitivos de fabricación y control conjuntamente con el pedido de retiro de muestras de la vacuna totalmente elaborada, envasada

y debidamente estampillada.

Art. 36. — La DILAB autorizará las vacunas antiaftosa que den cumplimiento a las siguientes especificaciones y controles:

a) Virus Aftoso: Los tipos y subtipos de virus aftoso a utilizar en la producción y el control de vacunas antiaftosa serán O 1 Campos, A 24 Cruzeiro, A Argentina 2001 y C 3 Indaial, que serán entregados por la DILAB.

Los métodos de manufactura autorizados son el cultivo celular de la línea BHK 21 clon 13 o epitelio lingual bovino en supervivencia.

b) Controles de Producción: La DILAB verificará durante el proceso de producción de cada serie:

- Tipo, subtipo.
- Título viral.
- Pureza.
- Masa antigénica.
- Cinética de inactivación.
- Inocuidad: se determinará la ausencia de virus activo en muestras de: tanques de producción, fase acuosa y producto final (Anexo V de la presente resolución). El elaborador deberá indicar el procedimiento de ruptura de emulsión más adecuado para su vacuna.
- Controles bacteriológicos: deberá estar libre de bacterias y hongos viables de acuerdo con las técnicas establecidas por el laboratorio productor.
- Físico-químicos y cualquier otro que se considere necesario.

c) Controles sobre el producto final: la DILAB realizará:

I. Inocuidad: de acuerdo al Anexo V de la presente resolución.

II. Controles bacteriológicos: Deberá estar libre de bacterias y hongos viables, de acuerdo con las técnicas establecidas por la DILAB (Anexo IV de la presente resolución).

III. Controles físico-químicos: las características físico-químicas de las vacunas serán las enunciadas por el laboratorio productor. Las determinaciones físico-químicas se efectuarán de acuerdo con las técnicas establecidas por la DILAB (Anexo IV de la presente resolución) o, en su defecto, las enunciadas por el productor.

IV. Potencia: La prueba de potencia o eficacia para los controles de autorización se efectuará en DIECISEIS (16) bovinos por el método de la Protección a la Generalización Podal (PGP) a los NOVENTA (90) días post vacunación (Anexo VIII de la presente resolución). La prueba de PGP se efectuará en las cepas O1 Campos y A Argentina 2001.

V. Las cepas A24 Cruzeiro y C3 Indaial se aprobarán según el nivel de anticuerpos por ELISA – fase líquida, acorde al artículo 46 de la presente norma.

VI. Control de tolerancia: La vacuna no debe provocar reacciones locales o generales indeseables en los animales vacunados, utilizándola según el laboratorio productor. Las pruebas de control de tolerancia se realizarán según lo establecido por la DILAB (Anexo IX de la presente resolución) la prueba de tolerancia podrá extenderse a la inspección a campo y a las especies para las cuales sea recomendado su uso en el momento en que la DILAB lo estime conveniente.

VII. Prueba de estabilidad inmunogénica: La DILAB podrá optar por su realización previa comunicación al laboratorio productor. Se procederá de acuerdo al método establecido para el control de eficacia de series y podrá ser realizada hasta la fecha de vencimiento de la vacuna.

VIII. Control de interferencia con técnicas de detección de anticuerpos contra proteínas no estructurales del virus de la Fiebre Aftosa en bovinos. Sobre los sueros de SESENTA (60) días post vacunación de los animales utilizados en la prueba de potencia, se efectuarán pruebas de detección de anticuerpos contra proteínas no estructurales iguales a las utilizadas en los monitoreos serológicos efectuados por la DNSA: ELISA 3 ABC / EITB (Anexo XI de la presente norma).

Art. 37. — Con el método establecido en el artículo 36, inciso c), numeral IV. la dosis de vacuna deberá proteger al menos al SETENTA Y CINCO POR CIENTO (75 %) de los animales vacunados. Si la vacuna no alcanzara el nivel exigido en una sola y única valencia pero protegiera en esa valencia entre el SESENTA Y DOS (62 %) y el SETENTA Y CUATRO POR CIENTO (74 %) de los animales vacunados, el laboratorio productor podrá, por única vez, solicitar la repetición del control de potencia en esa valencia, utilizándose la misma cantidad de animales. Se dará por aprobada la vacuna que en el recontrol protegiera como mínimo al SETENTA Y CINCO (75 %) por ciento de los animales vacunados. Si la vacuna protegiera menos del SESENTA Y DOS POR CIENTO (62 %) de los animales vacunados en una o más de las valencias, será desaprobada. La prueba será válida si todos los parámetros de control son considerados normales por la DILAB.

Art. 38. — En caso de muerte (por causas no atribuibles al acto de la vacunación) de hasta el TREINTA Y CINCO (35 %) de los bovinos vacunados, la prueba se considerará válida dándose como aprobada toda serie que proteja como mínimo el SETENTA Y CINCO (75 %) de los animales que puedan ser controlados. Si protegiera entre el SESENTA Y DOS (62 %) y el SETENTA Y CUATRO POR CIENTO (74%) el laboratorio productor podrá solicitar por única vez el recontrol en esa valencia. Toda serie que protegiera menos del SESENTA Y DOS POR CIENTO (62 %) será rechazada.

La DILAB dispondrá sobre cualquier otra situación derivada de la muerte de animales durante el desarrollo de la prueba.

Art. 39. — Los sueros de los bovinos de la prueba de potencia se analizarán a los CERO (0) y SESENTA (60) días post vacunación (DPV) con la técnica establecida en el artículo 36, inciso c), numeral VIII.

La vacuna será aprobada cuando haya ausencia de reactores a ELISA 3ABC/ EITB.

De presentarse bovinos reactores a los CERO (0) DPV no serán considerados para la prueba de los SESENTA (60) DPV.

De presentarse hasta DOS (2) animales reactores a los SESENTA (60) DPV se realizará un recontrol sobre un nuevo grupo de DIECISEIS (16) bovinos vírgenes.

Si a los SESENTA (60) DPV en el grupo de recontrol no hay reactores, la vacuna será aprobada en ese control.

Si en el grupo de bovinos en recontrol se detectan hasta DOS (2) reactores, ese grupo deberá ser revacunado con UNA (1) dosis, y la vacuna será aprobada si no hay nuevos reactores a los TREINTA (30) DPR, caso contrario la vacuna será rechazada y decomisada.

Art. 40. — Las series de vacunas que no aprobaran los controles de identidad, físico-químicos, inocuidad, bacteriológicos y anticuerpos contra proteínas no estructurales no podrán continuar con las siguientes etapas de control y se procederá a su decomiso.

Art. 41. — En las vacunas antiaftosa para bovinos, porcinos, ovinos y caprinos, el control de autorización se efectuará en bovinos. Para el caso de una vacuna destinada exclusivamente a otra especie, el control podrá ser efectuado en animales de dicha especie. La DILAB podrá disponer, cuando lo considere necesario, el control de eficacia y de interferencia con técnicas de detección de proteínas no estructurales en las otras especies cuando se disponga de métodos validados.

Art. 42. — Las series presentadas a los controles de autorización no podrán ser inferiores a TRESCIENTAS CINCUENTA MIL (350.000) dosis de vacuna polivalente.

Cada serie deberá ser homogénea; por ello, el laboratorio elaborador deberá poseer un tanque con capacidad suficiente para formularla.

Art. 43. — Finalizada la totalidad de los controles de autorización con resultados satisfactorios se otorgará el Certificado de Uso y Comercialización. Las series rechazadas o retiradas de control serán decomisadas en un plazo máximo de SESENTA (60) días.

Las series presentadas quedarán en cuarentena hasta la finalización de los controles oficiales y no podrán ser modificadas o reprocesadas.

Art. 44. — Una vez obtenido el Certificado de Uso y Comercialización todas las series elaboradas con posterioridad deberán ser sometidas a los controles de serie según lo descrito en la presente reglamentación.

DEL CONTROL DE SERIES:

Art. 45. — Las personas físicas o jurídicas deberán tener presentado el Control de Autorización previo a la presentación de cada una de las series de uso local y su aprobación será ad referendum de la serie de registro.

En todas las series se deberá dar cumplimiento a lo establecido en los artículos 33, 34, 35, 39, 40, 41, 42 y 43 de la presente resolución.

Cada serie presentada a control será sometida a los controles establecidos en el artículo 36, incisos a), b) y c), numerales I, II, III, VI, VIII de la presente resolución.

La fórmula cuali-cuantitativa y el proceso de producción de las series deberán ser iguales a la serie de registro aprobada.

Art. 46. — El control de eficacia de cada una de las series se realizará por los métodos indirectos establecidos en la presente resolución (Anexo X). El análisis se realizará sobre el suero de DIECISEIS (16) de los bovinos vacunados. Los sueros se analizarán por las técnicas establecidas por la DILAB: ELISA en fase líquida o cualquier otra que en un futuro demuestre similar comportamiento. Se establece como metodología estándar de trabajo los protocolos que figuran en el Anexo X de la presente resolución. La DILAB queda facultada a su modificación toda vez que los avances técnicos y metodológicos así lo aconsejen, con previo aviso a las personas físicas o jurídicas interesadas. Estas modificaciones tendrán vigencia para las series presentadas con posterioridad a los SESENTA (60) días de su reglamentación.

Art. 47. — Serán aprobadas en eficacia las series de vacunas que por la técnica de ELISA en fase líquida a título final obtengan, a los SESENTA (60) DPV mas menos CINCO (5) días, un valor igual o mayor de promedio de título de UNO COMA NOVENTA (1,90) para O1 Campos, UNO COMA NOVENTA Y CINCO (1,95) para A24 Cruzeiro, DOS COMA VEINTE (2,20) para A Argentina 2001 y UNO COMA NOVENTA Y CINCO (1,95) para C3 Indaial. Si la serie de vacuna obtuviera un promedio de título menor a UNO COMA SESENTA (1,60) para O1 Campos, UNO COMA SESENTA Y CINCO (1,65) para A24 Cruzeiro, UNO COMA NOVENTA (1,90) para A 2001 y UNO COMA SESENTA Y CINCO (1,65) para C3 Indaial, será rechazada y decomisada. Si la serie de vacuna en control obtuviera entre UNO COMA SESENTA (1,60) y UNO COMA OCHENTA Y NUEVE (1,89) para O1 Campos, UNO COMA SESENTA Y CINCO (1,65) y UNO COMA NOVENTA Y CUATRO (1,94) para A24 Cruzeiro, UNO COMA NOVENTA (1,90) y DOS COMA VEINTINUEVE (2,29) para A Argentina 2001 y UNO COMA SESENTA Y CINCO (1,65) y UNO COMA NOVENTA Y CUATRO (1,94) para C3 Indaial, el laboratorio productor podrá, por única vez, solicitar el recontrol de la serie.

Para el recontrol se utilizará un nuevo grupo de DIECISEIS (16) animales. Se dará por aprobada la vacuna que en el recontrol realizado a los SESENTA (60) DPV obtuviera un promedio de título de NOVENTA PUNTO UNO (1.90) para O1 Campos, UNO COMA NOVENTA Y CINCO (1,95) para A24 Cruzeiro, DOS COMA VEINTE (2,20) para A Argentina 2001 y UNO COMA NOVENTA Y CINCO (1,95) para C3 Indaial.

Art. 48. — Una vez aprobados los controles de autorización, y de acuerdo con la disponibilidad de boxes de desafío las primeras DOS (2) series del nuevo producto serán sometidas a los controles de eficacia por el método de Protección a la Generalización Podal (PGP), en las valencias A24 Cruzeiro y C3 Indaial.

Art. 49. — El control de pureza se realizará de acuerdo a lo establecido en el artículo 39 de la presente resolución.

Art. 50. — La DILAB podrá disponer, dentro de cada prueba, la realización de la descarga en bovinos (PGP) en una o varias de las series de vacunas controladas por pruebas indirectas.

Art. 51. — En los casos contemplados en los artículos 48 y 50 de la presente resolución los valores de aprobación, recontrol y rechazo serán los establecidos en el artículo 37 de la presente resolución.

Art. 52. — Finalizados la totalidad de los controles, con resultados satisfactorios, la DILAB otorgará el correspondiente Certificado de Uso y Comercialización de la serie en control.

DE LAS DISPOSICIONES GENERALES:

Art. 53. — Los controles de autorización y los de series serán analizados por personal del servicio oficial en las dependencias de la DILAB o en aquéllas que el SENASA determine.

Art. 54. — Cuando una serie de vacuna antiaftosa no aprobara los controles oficiales corresponderá su inutilización, quedando obligado el laboratorio productor a entregar la totalidad de la partida en donde la DILAB disponga, para su verificación y total destrucción, dentro de los SESENTA (60) días de la notificación oficial del rechazo; las series de vacunas retiradas de control por cualquier motivo que comunique el laboratorio elaborador serán consideradas como rechazadas.

Art. 55. — Las series de vacunas presentadas a control de autorización o serie quedarán interdictas en el lugar establecido y autorizado por la DILAB, desde la extracción de la muestra hasta que la DILAB lo determine. A solicitud del elaborador la DILAB podrá autorizar el traslado de las series en control, una vez aprobado el control de inocuidad, a una cámara autorizada.

Las firmas elaboradoras asegurarán bajo Declaración Jurada y con utilización de precintos o cerramientos que garanticen la inviolabilidad del producto, la permanencia de la totalidad de las dosis presentadas a control en las cámaras autorizadas durante todo el proceso.

Art. 56. — La temperatura de conservación de la vacuna antiaftosa estará comprendida entre los CUATRO GRADOS CENTIGRADOS (4° C) y OCHO GRADOS CENTIGRADOS (8° C). Se permitirá durante el transporte un máximo de QUINCE GRADOS CENTIGRADOS (15° C) por no más de SETENTA Y DOS (72) horas. No debiendo ser congelada.

Art. 57. — El laboratorio arbitrará las medidas necesarias para que los productos sean remitidos y conservados hasta que lleguen a poder del destinatario en las condiciones especificadas en la solicitud de inscripción. Serán incorporados sensores de frío que verifiquen la temperatura de conservación de las vacunas desde la salida del producto en las cámaras habilitadas por el SENASA a tal efecto, hasta los lugares de almacenamiento de los entes encargados de su aplicación (Anexo XII de la presente resolución).

Art. 58. — Las infracciones que se comprueben serán sancionados de acuerdo a lo previsto en las Leyes Nros. 23.899 y 24.305; podrá disponerse con carácter de penalidad accesoria la cancelación de la autorización, del permiso o de la habilitación del establecimiento infractor y su clausura.

Art. 59. — Las personas físicas o jurídicas que sean titulares de Certificados de Uso y Comercialización de vacunas antiaftosa deberán adoptar las medidas necesarias para que los frascos que las contengan, luego del proceso de producción y envase respectivo, presenten en su boca precinto o tapas que aseguren la inviolabilidad del producto, evitando también el posible relleno. Cada firma o persona física-jurídica recurrente tendrá asignado un color, convalidado por la DILAB.

Art. 60. — Declárense públicas las pruebas oficiales de control de vacunas antiaftosa en todas sus etapas.

Art. 61. — Cambio del tipo de método de manufactura, método de concentración, inactivante, adyuvantes y volumen de dosis implicara la realización de un nuevo registro de autorización.

Art. 62. — La DILAB será el órgano rector para la interpretación y decisión en aquellas cuestiones no contempladas en la presente norma.

Art. 63. — Déjase sin efecto la Resolución N° 219 del 7 de abril de 1995 del ex-SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD ANIMAL.

Art. 64. — Comuníquese, publíquese y dése a la Dirección Nacional del Registro Oficial y archívese. — Jorge N. Amaya.

ANEXO I

HABILITACION DE LABORATORIOS, CARACTERISTICAS EDILICIAS,

EQUIPAMIENTO Y CAPACIDAD OPERATIVA

De acuerdo con lo dispuesto por la presente resolución y sin perjuicio de lo establecido en el Decreto N° 583/67, y en las Resoluciones ex-SENASA Nros. 345/94 y SENASA 482/2002, los laboratorios que se dediquen a la elaboración de vacunas antiaftosa comprendidos en la Categoría "a" del artículo 2° de la presente resolución, deberán cumplir con las siguientes exigencias para su habilitación:

1. Contar con DOS (2) zonas debidamente separadas: la zona contaminada, que será independiente de los lugares en que se elaboren otros tipos de productos, y la zona limpia que podrá ser común a otros productos.
2. En ambas zonas, las paredes, los pisos, las mesadas y los techos serán lisos, sin juntas, de materiales lavables y que permitan el uso de desinfectantes, ácidos y álcalis y el calor moderado. Los zócalos y las uniones entre paredes deberán ser redondeados. No deberá existir diferencia de nivel entre las superficies de ventanas y paredes.
3. La zona contaminada comprenderá ambientes destinados a la replicación del virus aftoso para semilla, la producción de antígenos en reactores, su inactivación y cuarentena y áreas destinadas a los controles de producción.
4. Los productos en control de inocuidad deberán mantenerse en cuarentena hasta la finalización del control asegurándose la no contaminación.
5. La liberación de antígenos inactivados a la zona limpia deberá estar documentada y realizada bajo un procedimiento aprobado por el responsable de bioseguridad.
6. El área de control deberá contar con el equipamiento necesario para pruebas de ELISA o fijación de complemento, masa antigénica, titulación viral, inocuidad y esterilidad.
7. Toda la zona contaminada deberá estar separada del exterior y de la zona limpia por paredes de mampostería revestidas con pintura epoxi o revestimiento vinílico y elementos de seguridad que cumplimenten lo exigido en el Anexo II de la presente resolución.
8. El paso de cañerías de los distintos servicios, entre las zonas limpia y contaminada, deberá minimizarse, deberá estar sellado herméticamente y con dispositivos anti retorno.
9. Deben independizarse los sistemas y los servicios de las áreas limpia y contaminada, asegurando la hermeticidad del área contaminada.
10. La producción deberá realizarse en sistemas cerrados, evitando la formación de aerosoles y

derrames.

11. La manipulación de virus y muestras potencialmente infecciosas fuera de vasos cerrados deberá realizarse en cabinas de seguridad biológica clase II, certificadas anualmente por una empresa externa.

12. En la zona contaminada los ambientes destinados a las distintas tareas estarán distribuidos y separados de tal forma que se aseguren las condiciones adecuadas para el aislamiento requerido en la elaboración, la cuarentena y los controles de calidad. Las puertas serán de cierre automático y con cierre adecuado para permitir que se mantengan los diferenciales de presión entre ambientes.

13. Dentro del área contaminada podrá incluirse un área para animales de laboratorio, que deberá contar con un vestuario con ducha suplementario, diferencial de presión y procedimientos para la inoculación de animales y tratamiento de residuos.

14. La zona limpia estará formada por los ambientes destinados a producción de cultivos celulares, medios de cultivos, la formulación y emulsificación de las vacunas, los controles de las vacunas inactivadas, depósito de suero y materias primas, como así también las salas destinadas a envase y etiquetado de las vacunas terminadas.

15. La sala de envase deberá contar con vestuario de ingreso, área de envasado bajo flujo laminar, presión positiva e inyección de aire a través de filtros HEPA. La sala deberá estar certificada periódicamente por una empresa externa.

16. Las zonas limpia y contaminada contarán con cámaras o unidades refrigeradas independientes, con temperatura y capacidad adecuadas para la conservación de los productos en sus distintas etapas de elaboración.

17. Los equipos y elementos de elaboración, envases, conservación, etcétera, deberán contar con sistemas de esterilización y regulación de la temperatura indispensable para mantener los productos en elaboración o elaborados dentro de las especificaciones declaradas en la solicitud de inscripción del producto.

Al solicitar su habilitación, los laboratorios elaboradores de vacunas antiaftosa declararán la capacidad mensual y anual de elaboración de productos terminados de su planta de producción, calculada en base a los siguientes parámetros:

- La capacidad de elaboración y conservación de antígeno, de acuerdo al equipamiento disponible, los procedimientos de producción utilizados y la fórmula cuali-cuantitativa declarada para la elaboración de vacunas monovalentes y polivalentes.

- La capacidad de almacenamiento en cámaras frías de productos terminados que deberán guardar relación con la capacidad de producción total y que permitan cuarentenar las series en control hasta su liberación o decomiso.

- Cámaras o unidades refrigeradas para conservación de materia prima y/o en proceso de elaboración.

Toda modificación a la capacidad mensual declarada deberá estar precedida de una correspondiente ampliación de los parámetros especificados.

Los laboratorios comprendidos en la categoría b. del artículo 2º sólo deberán cumplir con lo exigido para el área limpia, la formulación y el envase que se estipulan en el presente Anexo.

ANEXO II

NORMAS DE SEGURIDAD BIOLÓGICA PARA LA MANIPULACIÓN DEL VIRUS
DE LA FIEBRE AFTOSA

I) INTRODUCCION:

El objetivo de este Anexo es establecer las normas de seguridad biológica mínimas requeridas para la manipulación del virus de la Fiebre Aftosa que deberán cumplir todos los establecimientos autorizados por el SENASA y que involucrarán, clasificándolos de mayor a menor riesgo, a las siguientes categorías:

- Instalaciones de grandes animales inoculados.
- Laboratorios productores de vacunas.
- Instalaciones de pequeños animales inoculados.
- Laboratorios de diagnóstico y control.
- Laboratorios de investigación.

Todos los laboratorios que manipulan virus aftoso deben trabajar en condiciones de contención absoluta. Las medidas de bioseguridad implementadas deben excluir toda posibilidad de fuga del virus. El nivel de bioseguridad 3 A es el exigido para dichos laboratorios.

Solo se autorizará el envío de virus activo a laboratorios de Nivel 3 A de bioseguridad habilitados por la autoridad competente.

II) MEDIDAS DE CONTENCIÓN BIOLÓGICA

INDICE

1. ESTRUCTURA FÍSICA.

1.1. Accesos (ingresos – egresos de personal y elementos).

1.1.1 Vestuarios

1.1.2 Air-lock

1.1.3 SAS o esclusa

1.1.4 Autoclave de frontera

1.2. Elementos constructivos

1.2.1 Terminaciones

1.2.1.1 Paredes

1.2.1.2 Pisos

1.2.1.3 Techos y cielorrasos

1.2.2 Puertas

1.2.3 Ventanas

1.2.4 Instalaciones de servicio

1.2.4.1 Electricidad

1.2.4.2 Agua y gas

1.2.5 Tratamiento de efluentes

1.2.6 Tratamiento del aire

1.3. Comunicaciones

1.4 Advertencias

1.5 Mantenimiento y control

2. CONDUCTA Y PROCEDIMIENTOS

2.1 Personal

2.1.1 Supervisor de seguridad biológica

2.1.2 Capacitación

2.1.3 Control de acceso

2.1.4 Visitantes y personal de mantenimiento

2.1.5 Cuarentena obligatoria

2.1.6 Emergencias

2.2 Actividades en el laboratorio

2.2.1 Manipulación de material de riesgo

2.2.2 Animales inoculados

2.2.3 Egresos de materiales y equipos

2.2.4 Medidas de higiene

2.2.5 Tratamiento de residuos

2.2.6 Cabinas de Seguridad Biológica

II.1. ESTRUCTURA FISICA:

Los requerimientos fundamentales para asegurar la BIOCONTENCION están basados en las barreras arquitectónicas funcionales que aseguren la HERMETICIDAD de todo el edificio, teniendo en cuenta los aspectos que se detallan a continuación, considerando que cuanto menor sea la superficie utilizada mayor será la posibilidad de controlarla y también, menor el personal involucrado.

Los laboratorios deberán:

a) Definir los ambientes donde se trabajará con virus infeccioso, concentrándolas en el mínimo de superficie posible.

b) El área contaminada deberá contar obligatoriamente con vestuarios limpio y sucio (dobles) con baños y duchas destinados exclusivamente al ingreso y egreso del personal de la zona de manejo de virus aftoso activo.

c) El ingreso y egreso del personal deberá efectuarse y controlarse con un sistema de clave o tarjeta individual.

d) Las puertas de las duchas interna y externa deberán estar intertrabadas eléctricamente, el sistema asegurará que cada persona que egrese del área contaminada tome una ducha de TRES (3) minutos como mínimo.

e) El edificio debe contar con ventanas con doble vidrio sellado y con SEIS (6) milímetros de espesor como mínimo, puertas señalizadas, suelos, paredes, mesadas y techos de fácil limpieza, no porosos y lavables, resistentes a ácidos, álcalis y al calor moderado.

f) La construcción deberá ser de mampostería robusta y de características tales que aseguren la hermeticidad y solidez de la edificación a través del tiempo.

g) La salida del material de la zona contaminada deberá realizarse a través de autoclave de frontera o con cabina de fumigación por formol (Air Lock o SAS) o cabina de paso con lluvia química (Pass trough) según el caso, las puertas de estos equipos deberán estar intertrabadas y ser herméticas. Estos equipos contarán con sistemas de registro.

h) Las carcasas de pequeños animales contaminados y otros efluentes sólidos como los filtros deberán ser autoclavados y luego incinerados.

i) Se efectuarán procedimientos de limpieza y descontaminación química primaria.

j) Se colocarán carteles con instrucciones y procedimientos de bioseguridad y para emergencias como: incendios, rotura de envases conteniendo material infeccioso, etcétera.

k) Se contará con salida de emergencia señalizada, con alarma y registro de apertura.

1.1. Accesos (Ingresos - Egresos de personal y elementos)

1.1.1 Vestuarios:

Constarán de una zona considerada limpia donde se dejarán todas las pertenencias; un pasaje de entrada con sistema mecánico de paso en una sola dirección y que impida el retroceso; un vestuario contaminado donde el personal calzará y vestirá indumentaria adecuada. A la salida, en el vestuario contaminado se dejará toda la ropa y calzado utilizado dentro de la zona restringida, habrá un lugar para lavarse las manos y uñas, mucosa de fauces y nariz. La ducha será obligatoria y tendrá enclavadas las puertas de manera tal que al cerrar la de entrada se conecte el agua durante TRES (3) minutos, y luego recién podrá abrirse la puerta de salida. Toda esta zona deberá ser cómoda y agradable creando buena sensación en el personal.

1.1.2 Air-lock, SAS o Cámara de Fumigación con formol:

Consiste en un local con condiciones de estanqueidad total, con DOS (2) puertas herméticas intertrabadas, con alarma sonora y lumínica contra apertura simultánea, utilizado para introducir o retirar materiales o equipos de gran volumen que por sus características no permitan ser autoclavados a efectos de su descontaminación mediante vaporización con formol y neutralización con carbonato de amonio. Deberá contar con sistema de eliminación de gases y sus puertas herméticas y burleteadas deberán estar intertrabadas con un temporizador programable para apertura. Deberá contar con controles y registros.

1.1.3 Esclusa (Pass through):

Son pequeñas cámaras de fumigación química con ácido cítrico al CERO COMA DOS POR CIENTO (0,2 %), con doble puerta para introducir o sacar materiales o elementos pequeños que por su naturaleza o contenido no permiten el autoclavado o recipientes con sustancias herméticamente cerradas a efectos de una esterilización externa del envase. Deberá contar con sistemas de control y registro.

1.1.4 Autoclave de Frontera:

Utilizada en la descontaminación y esterilización de materiales descartables, material de vidrio, residuos y eventualmente para la introducción de elementos para uso interno. Tendrán doble puerta hermética intertrabada y utilizarán calor húmedo (vapor) a CIENTO QUINCE GRADOS CENTIGRADOS (115° C) como mínimo, distribuyendo el calor uniformemente. Debe asegurarse la esterilización del material tratado, con control y registro de tiempo, presión y temperatura.

1.2. ELEMENTOS CONSTRUCTIVOS

1.2.1. Terminaciones:

1.2.1.1 Paredes:

Las paredes perimetrales de la zona contaminada deberán ser monolíticas que garanticen hermeticidad, con revoques resistentes y pinturas o revestimientos que no sean afectadas por productos químicos ni presentes irregularidades que entorpezcan la limpieza.

1.2.1.2 Pisos:

No deberán tener cámara de aire bajo el solado, el cual a su vez deberá ser resistente a productos químicos y de fácil limpieza. Deberán tener un coeficiente de dureza alto para evitar pronto desgastes y deterioros.

1.2.1.3 Techos y Cielorrasos:

Deberán ser monolíticos y su sellado con los muros lindantes deberá ser perfecto, para mantener una hermeticidad total. Si presentasen empotramiento de luminarias sus uniones deberán ser selladas con caucho siliconado.

1.2.2. Puertas:

Deberán tener un grado de cierre que permita el mantenimiento de las cascadas de presión de aire, las interiores, con sectores vidriados para visualizar del otro lado (excepto baños), de ser posible con condiciones de cierre automático. Cuando se exijan específicamente herméticas, deberán contar con doble contacto en sus CUATRO (4) costados con burletes preferentemente inflables, con estanqueidad al aire y al agua.

1.2.3. Ventanas:

De tamaño reducido cumpliendo con el mínimo requerido de superficie para iluminación natural, con paños fijos, continuos a la pared y doble vidrio, resistentes para eventuales roturas y para soportar la despresurización ambiental. Deberán presentar condiciones de hermeticidad total.

1.2.4. Instalaciones de Servicios

1.2.4.1 Electricidad:

Los tableros seccionales dentro de la zona contaminada deben ser estancos y sellados, con cargas bien repartidas y con información y esquema de circuitos para su identificación. Todas las cañerías exteriores que atraviesen un muro divisorio entre zonas, deberá ser sellado con caucho siliconado en ambos parámetros del mismo.

Se dispondrá de un grupo electrógeno que cubra las necesidades eléctricas de la zona contaminada, con tablero de transferencia automática, que asegure el mantenimiento permanente de la presión negativa. Se recomienda que los motoventiladores del sistema de tratamiento de aire y las cabinas de seguridad biológica estén conectados también a un Sistema de Alimentación Ininterrumpida (SAI / UPS).

1.2.4.2 Agua, gas y vapor:

Las cañerías al penetrar en la zona contaminada deberán estar selladas con caucho siliconado para conservar la hermeticidad. Deberán presentar, una vez entradas, un codo sifón o válvula antiretorno que impida el retroceso de aire con escape virósico en caso de un corte de suministro y si quedase vacía la cañería.

1.2.5. Tratamiento de efluentes:

a) La zona dedicada a este tratamiento será considerada contaminada por lo tanto deberá ser exclusiva y totalmente hermética, con un sistema que asegure la inactivación total del virus aftoso.

b) Las cañerías y los accesorios deberán garantizar su estanqueidad y soportar la presión negativa de las salas sin que se produzcan desifonajes.

c) El sistema completo de tratamiento de los efluentes, incluido el transporte hasta la unidad de tratamiento, debe cumplir con los requisitos de elevada contención debiendo ser las cañerías que transportan el efluente de acero inoxidable.

d) La capacidad de almacenamiento (depósitos) debe ser suficiente para los efluentes no tratados. Se recomienda contar con DOS (2) tanques de tratamiento.

e) Los tanques de recepción y tratamiento deberán estar instalados dentro del área restringida y dentro de piletas de contención.

f) Los equipos deben disponer de sistemas de controles automáticos para asegurar su debido funcionamiento. Se debe comprobar y registrar que se ha alcanzado la temperatura o el pH y el tiempo necesarios y que la instalación se detendrá automáticamente al alcanzarse los límites requeridos.

g) El proceso de tratamiento se podrá efectivizar por DOS (2) medios con exposición de todo el volumen del efluente durante el tiempo requerido:

Químico: hidróxido de sodio o carbonato de sodio u otro tratamiento alcalino con pH 12,0 durante por lo menos DIEZ (10) horas. Los materiales deben mezclarse perfectamente y después del tratamiento las muestras deben ser neutralizadas y el pH verificado antes de liberar el efluente. Se debe contar con control, registro y regulación automática y continua del pH.

Térmico: CIENTO GRADOS CENTIGRADOS (100° C) mínimo, durante UNA (1) hora, con control y registro automático y continuo de la temperatura y tiempo.

1.2.6. Tratamiento del aire:

El sistema de ventilación del área contaminada debe ser exclusivo para dicha zona.

a) El aire deberá ser extraído de la zona de manipulación del virus a través de un sistema de prefiltros y doble filtración HEPA con NOVENTA Y NUEVE COMA NOVENTA Y SIETE POR CIENTO (99,97 %) de eficiencia mínima, incluidos en la zona contaminada.

b) Se deberá garantizar una cascada de presión negativa según el riesgo de cada sala. La presión negativa será de al menos TRES COMA CINCO (3,5) milímetros de agua –TREINTA Y CINCO (35) Pascales- en las salas de laboratorios y de al menos CINCO (5) milímetros de agua – CINCUENTA (50) Pascales- en las salas de producción de virus a gran escala, salas de grandes y pequeños animales y tratamiento de efluentes líquidos. Se deberán instalar manómetros para medir la presión negativa en cada una de las salas, conectados a un sistema de telemetría que permita el registro.

c) Los filtros HEPA se deben poder instalar, probar y cambiar dentro de la zona contaminada. Se requerirá una certificación anual de su integridad.

d) Se debe contar con un sistema de filtros HEPA en paralelo que mantenga el sistema operativo

durante las maniobras de instalación y cambio de filtros. El reemplazo de los prefiltros y filtros absolutos deben seguir un procedimiento debidamente protocolizado.

e) Se debe contar con motoventilador de extracción alternativo con entrada automática.

f) Se deben instalar manómetros para medir la presión negativa y la caída de presión a través de los filtros. Los manómetros deben ser controlados y regulados periódicamente y deberán tener alarmas incorporadas. Un sistema de registro informático de las presiones de aire que permita trazabilidad, deberá estar disponible.

g) El aire de inyección deberá ingresar en todos los casos a través de prefiltros. En los locales de grandes animales y laboratorios productores de vacunas a través de prefiltros y filtros HEPA.

h) El aire extraído deberá pasar por DOS (2) etapas de filtros HEPA con eficiencia mínima del NOVENTA Y NUEVE COMA NOVENTA Y SIETE POR CIENTO (99,97 %) para partículas de CERO PUNTO TRES (0.3) micrones con sistema en paralelo y alternancia automatizada, quedando siempre uno en "stand by".

i) Los ductos del sistema serán herméticos y a su paso por zonas limpias tendrán juntas bridadas y abulonadas.

j) Todo el sistema deberá ser monitoreado y controlado con manómetros de presión diferencial.

k) La eficiencia de los filtros deberá verificarse por ensayo con aerosoles monodispersos en tamaño de CERO PUNTO TRES (0.3) micrones D.O.P (Diociltalato) o sistema validado equivalente, siendo conveniente que la instalación presente las boquillas de inyección y lectura fijas en él, para realizarse con los filtros instalados.

l) El cambio de filtros deberá realizarse desde la zona contaminada, previa fumigación con formaldehído de los mismos, se retirarán embolsados para su autoclavado dentro de la zona contaminada y posteriormente incinerados.

1.3. COMUNICACIONES:

Será imprescindible contar dentro de la zona restringida con medios de comunicación con el exterior que faciliten las tareas del personal involucrado. Deberá contarse con una línea telefónica con fax, intercomunicadores y/o una computadora personal conectada a la red exterior, como mínimo.

1.4. ADVERTENCIAS:

Deberán colocarse carteles indicadores de cada zona con el logo de bioseguridad. Además en lugares estratégicos y bien visibles otros, alertando sobre riesgos biológicos y los procedimientos a seguir.

1.5. MANTENIMIENTO Y CONTROL:

El buen funcionamiento del área de contención dependerá en gran medida del acertado mantenimiento de su estructura física, instalaciones y equipos y del correcto cumplimiento de las medidas de bioseguridad dispuestas, todo ello a cargo de personal idóneo especializado.

Se deberá implementar un plan de mantenimiento y control preventivo que incluya todos los sistemas de bioseguridad, con personal propio o externo.

Se deberán realizar y registrar pruebas de hermeticidad, de corte de energía y de cambio al sistema de extracción de aire alternativo al menos semestralmente.

2. CONDUCTA Y PROCEDIMIENTOS:

2.1. Supervisor de seguridad biológica: Será el profesional de nivel superior responsable de las condiciones de seguridad biológica.

2.1.2. Capacitación: El equipo técnico deberá tener entrenamiento específico en Virología de Fiebre Aftosa y recibir formación permanente en seguridad biológica; dicho entrenamiento deberá estar documentado y registrado debidamente.

2.1.3. Control de acceso: Sólo podrá ingresar el personal autorizado. Las entradas y salidas de las zonas restringidas deben realizarse solamente a través de los vestuarios, con cambio de ropa a la entrada y salida y ducha obligatoria a la salida. Dichas entradas y salidas deben ser registradas diariamente.

Los lugares de acceso restringido contarán con carteles de advertencia, símbolo de riesgo biológico, agente que se manipula, nombre y teléfono del supervisor de seguridad biológica.

La ropa usada por el personal en la zona contaminada será de distinto color al del área limpia. El cambio total de la ropa a la entrada de la zona contaminada y la ducha, con tiempo mínimo de TRES (3) minutos a la salida, es obligatorio para todo el personal que entre a dicha zona. La ropa deberá ser lavada dentro del área contaminada caso contrario deberá ser autoclavada antes de su egreso.

2.1.4. Visitantes y personal de mantenimiento: Deben conocer los procedimientos de las normas de bioseguridad y cumplir con ciertos requisitos: cuarentenas, descontaminación de materiales y equipos. Además deberá registrar su firma en un Registro de Visitantes con datos de hora de entrada y salida del laboratorio, dirección y teléfono.

2.1.5. Cuarentena obligatoria: El personal estable, visitantes y personal de mantenimiento deberá comprometerse a no tener contacto con animales susceptibles y a no residir en áreas en donde habitan estos animales, así como mantener un periodo de cuarentena obligatoria de TRES (3) días luego de ingresar al laboratorio y antes de entrar en contacto con animales susceptibles. En el caso de trabajar con grandes animales infectados el plazo se extenderá a SIETE (7) días.

Se deberá completar un acta de compromiso de cuarentena.

2.1.6. Emergencias: El personal debe estar debidamente capacitado y cumplir con los procedimientos operativos establecidos para un correcto accionar ante derrames, accidentes, emergencias médicas, fuego y exposición a agentes químicos e infecciosos. Deberá contar con elementos y equipos de protección ante riesgos biológicos, químicos y físicos.

2.2 ACTIVIDADES EN EL LABORATORIO:

2.2.1. Manipulación de material de riesgo: Todo el proceso de manipulación de grandes masas virales debe efectuarse dentro de sistemas cerrados. Cada vez que se trabaje fuera de vasos cerrados deberá realizarse en cabinas de seguridad biológica Clase II.

El acceso a las semillas de virus estará restringido únicamente al personal autorizado. Se llevará un registro de las semillas existentes; éstas deberán estar debidamente identificadas y contabilizadas.

2.2.2. Animales inoculados: deben ser considerados dentro de un tratamiento especial los animalarios en donde se trabaja con presión negativa mínima de MENOS CINCUENTA (-50) PASCALLES y la ropa del personal afectado deberá quedar en dicha área para su descontaminación. Luego de finalizadas las experiencias, los animales grandes serán sacrificados y sometidos a proceso de digestión. Los animales de laboratorio serán autoclavados y luego incinerados.

2.2.3. Egreso de materiales y equipos: todo material y/o equipo debe pasar por un proceso de descontaminación antes de salir del área restringida, dicho proceso dependerá de la naturaleza del material y su tamaño. Los métodos utilizados pueden ser:

- Físicos:

- Calor húmedo (autoclave) a CIENTO QUINCE GRADOS CENTIGRADOS (115° C) por TREINTA (30) minutos

- Calor seco (estufa) a CINCUENTA GRADOS CENTIGRADOS (50° C) por CUARENTA Y OCHO (48) horas.

- Químicos:

- Desinfectantes aldehídos: Formaldehído (gas) para la fumigación de cabinas de seguridad, air-locks, esclusas, etc. y formalina (líquido) en una dilución de UNO EN DIEZ (1:10) para desinfección de superficie.

- Hipocloritos: en concentraciones de QUINIENTOS (500) y MIL (1.000) partes por millón de cloro disponible.

- Alcalis: carbonato de sodio al CUATRO POR CIENTO (4 %), hidróxido de sodio.

- Acidos: ácido cítrico al CERO COMA DOS POR CIENTO (0,2 %), ácido acético al UNO POR CIENTO (1 %).

2.2.4. Medidas de higiene: dentro del área restringida las superficies de trabajo, los pisos, etcétera deben ser descontaminadas con el desinfectante apropiado por lo menos UNA (1) vez al día. Esta tarea será realizada por personal especialmente preparado para trabajar en esta área.

El lavado de la ropa debe efectuarse con agua caliente previa descontaminación, preferentemente dentro de la zona sucia.

2.2.5. Tratamiento de residuos: los residuos sean líquidos o sólidos (reciclables o no) deberán recibir en todos los casos tratamientos por calor, químico o incineración antes de su egreso.

Tratamiento de residuos sólidos:

a) Los residuos sólidos serán tratados por calor húmedo en autoclave de frontera, con puertas intertrabadas y condiciones de hermeticidad aún en estado de reposo. Deberán programarse diferentes ciclos validados según el tipo de material que aseguren su correcta esterilización.

b) La autoclave deberá contar con sistema de registro.

c) En caso de averías los sistemas deben estar protegidos contra las posibles descargas de material infeccioso al exterior.

2.2.6. Cabinas de Seguridad Biológica.

La manipulación de virus aftoso en el laboratorio fuera de vasos cerrados se realizará en cabinas de seguridad biológica de Clase II certificadas anualmente por empresas autorizadas para tal fin.

ANEXO III

INSPECCION, RETIRO Y CODIFICACION DE MUESTRAS

INSPECCION Y RETIRO DE MUESTRAS

La presentación para los retiros de series deberá hacerse de acuerdo a las fechas estipuladas en el calendario anual de Control de Vacuna Antiaftosa.

Una vez presentada la solicitud de retiro de muestra en la Mesa de Entradas de Muestras por parte del laboratorio elaborador se inicia el control de la serie de vacuna de acuerdo al Manual de Procedimientos de la DILAB.

En el laboratorio elaborador, sobre las dosis presentadas, se realiza un sorteo al azar basándose en la numeración de las estampillas de los frascos, tomándose como retiro mínimo lo siguiente:

A) Presentación de UN (1) sólo tamaño de envase:

- Frascos de más de CINCUENTA (50) dosis – VEINTICUATRO (24) unidades.
- Frascos menores a CINCUENTA (50) dosis – TREINTA Y SEIS (36) unidades.

B) Presentación de varios tamaños de envase:

- Frascos de CIEN (100) o más dosis – VEINTE (20) unidades.
- Frascos de CINCUENTA (50) a CIEN (100) dosis - VEINTE (20) unidades.
- Frascos menores a CINCUENTA (50) dosis - VEINTE (20) unidades.

En la cámara refrigerada del laboratorio elaborador se realiza el conteo total de dosis presentadas.

Una vez separados los frascos estampillados de acuerdo al sorteo se procede a distribuirlos en CUATRO (4) paquetes que luego se lacran y se firman, quedando DOS (2) paquetes como contramuestra en el laboratorio elaborador.

Se completa el acta de retiro de muestras con la cantidad de dosis, el número de estampillas de los frascos seleccionados por sorteo, firmando los responsables por laboratorio productor y por SENASA.

Si hubiera devolución de estampillas se adjunta al trámite.

Las actas se realizan por duplicado quedando una copia en el laboratorio elaborador.

Las muestras deben trasladarse refrigeradas entre los CUATRO (4° C) y QUINCE (15° C) GRADOS CENTIGRADOS.

Las muestras (Paquetes Nros. 1 y 2) y el trámite interno con su respectiva acta de retiro deberán ser entregados a la Mesa de Entrada de Muestras; ésta otorgará un N° de Orden de Análisis y será su personal el responsable de abrir el Paquete N° 1, verificar la temperatura y distribuir la muestra a las Coordinaciones de Bacteriología y de Fiebre Aftosa. El restante del Paquete N° 1 y el Paquete N° 2 lacrado serán entregados a la Coordinación de Fiebre Aftosa a fin de ser conservados entre los CUATRO (4° C) y OCHO (8° C) GRADOS CENTIGRADOS.

El Paquete N° 2 se mantiene como contramuestra hasta su vencimiento. En el caso de la determinación de la masa antigénica se remiten las muestras para ser analizadas en el Centro de Virología Animal (CEVAN) del CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS Y TECNICAS (CONICET).

CODIFICACION DE VACUNAS PARA LA PRUEBA DE EFICACIA

Las vacunas en prueba perderán su identidad mediante una codificación, en la cual se utilizan frascos metálicos numerados, donde se introduce el frasco original de vacuna y se precinta la tapa. Al momento de la codificación se confeccionan las siguientes planillas:

Planilla 1: En la cual consta el Nombre del Laboratorio elaborador, Nombre del producto, N° de serie y N° de estampilla del frasco a utilizar.

Esta planilla es firmada por los representantes de la Cámara Argentina de la Industria de Productos Veterinarios (CAPROVE) y del SENASA presentes en la codificación de la prueba y permanece en un sobre cerrado, lacrado y firmado, hasta su finalización.

Planilla 2: En la que figura la fecha de Vacunación, el N° de frasco con su N° de precinto, N° de caravana y color de caravanas.

Una vez realizada la vacunación en el Campo Experimental el personal del SENASA y de a CAPROVE firman la planilla N° 2.

En el libro de actas del Campo Experimental se asientan todas las tareas realizadas y las novedades si las hubiera, firmando la mencionada acta todos los intervinientes. Esto debe realizarse en cada prueba de vacunación y sangrado.

A los SESENTA (60) días se sangran los animales vacunados, realizándoles el Control Indirecto por Elisa FL (PI), una vez obtenidos los resultados, se informan en la Orden de análisis correspondiente.

Se eleva a Mesa de Entradas General la solicitud de retiro y las órdenes de análisis en la cual constan los resultados, confeccionando dicha área el Certificado correspondiente del Producto Biológico, firmado por el Director o el Coordinador General del Laboratorio Animal.

Una vez finalizado todo el proceso se archiva la solicitud de retiro de muestra y las órdenes de análisis con los resultados en Mesa de Entradas - Archivo.

DECODIFICACION

Una vez finalizados la totalidad de los controles se procederá a la apertura de los sobres y recipientes oportunamente lacrados o precintados a los efectos de identificar las marcas y series de las vacunas en control y confeccionar un acta.

A) CONTROLES FISICO-QUIMICOS

1. Control de tipo de emulsión (para emulsión simple)

Prueba de la Gota: Con una pipeta de UN (1) mililitro se deposita una gota de la vacuna en un envase con agua destilada. La gota deberá permanecer compacta o formará una película siempre en la superficie.

2. Control de Estabilidad de la Emulsión

a) Por centrifugación de CUARENTA (40) mililitro de vacuna durante UNA (1) hora, a DOS MIL (2.000) REVOLUCIONES POR MINUTO separándose la fase aceitosa no emulsionada en la parte superior, y la emulsión sin romper en la parte inferior. Se permitirá una pequeña separación de líquido oleoso en la superficie siendo todo el resto una emulsión uniforme.

b) Manteniendo la vacuna a diferentes temperaturas: Temperatura ambiente y a TREINTA Y SIETE GRADOS CENTIGRADOS (37° C) durante TREINTA (30) días. Sólo será permitida una separación inferior de fase acuosa de hasta un CINCO POR CIENTO (5 %) del volumen total.

3. Control de Conductividad: Se medirá con celda de conductividad del tipo de inmersión cuya constante sea no menos de SETENTA Y CINCO CENTESIMOS (0,75) micro Siemens/centímetros. La medición se realizará a VEINTE (20° C) –MAS MENOS DOS (+-2)- GRADOS CENTIGRADOS.

La exactitud del equipo para realizar la determinación debe ser no menor al UNO POR CIENTO (1 %).

El valor máximo aceptable será de CINCO (5) micro Siemens/centímetros.

4. Control de viscosidad: Se realizará utilizando un viscosímetro de Brookfield con rotor y expresada en centipoise. Se utilizará el rotor N° 2 y la determinación se efectuará a una velocidad de TREINTA (30) revoluciones por minuto.

Se aceptarán como valores mínimos y máximos QUINCE (15) y QUINIENTOS (500) centipoise respectivamente, medidos a temperatura ambiente.

B) CONTROL BACTERIOLOGICO.

1- Para cultivo de Anaerobios facultativos y Aerobios.

Se sembrará un mililitro de vacuna en medio Tioglicolato fluido USP con el agregado de Tween 80 al UNO POR CIENTO (1 %) en tubos con DIEZ (10) mililitros de medio.

2- Para hongos saprofitos y patógenos.

Se sembrará CERO COMA CINCO (0,5) mililitros de vacuna en Agar glucosa CUATRO POR CIENTO (4 %) según Sabouraud en tubos con CINCO (5) mililitros de medio.

3- Para determinación de contenido microbiano.

Se sembrará CERO COMA CINCO (0,5) mililitros de vacuna en Agar caso- Peptona de Caseína – Peptona de harina de soja USP en tubos con CINCO (5) mililitros de medio.

Se siembran DOS (2) juegos de tubos con los TRES (3) medios de cultivo y se incuban a VEINTICINCO (25° C) y a TREINTA Y CINCO (35° C) GRADOS CENTIGRADOS durante CATORCE (14) días.

INTERPRETACION: La muestra debe ser estéril para pasar a las siguientes etapas de control. Se considera el control aprobado cuando no se observa desarrollo bacteriano o fúngico en los cultivos efectuados.

C) CONTROL DE INOCUIDAD:

Las pruebas de inocuidad oficiales se realizarán exclusivamente sobre muestras de antígenos o vacunas que tengan controles de inocuidad previos con resultados satisfactorios realizados por el elaborador.

Cada elaborador deberá presentar el método de ruptura de emulsión para su producto.

Test de Inocuidad en Células

Ruptura de la emulsión para vacunas oleosas emulsión simple: Se procede a homogeneizar la vacuna colocando CIEN (100) mililitros en una probeta de QUINIENTOS (500) mililitros. Se agregan CIEN (100) mililitros de cloroformo, mezclar y trasvasar el volumen total a tubos para ser centrifugado a DOS MIL (2.000) revoluciones por minuto durante VEINTE (20) minutos y a CUATRO GRADOS CENTIGRADOS (4° C).

Posteriormente se observa la separación de las fases:

- Una capa inferior oleosa que se descarta.
- Una capa superior "sobrenadante" que es lo que se recupera.
- Preparación e Inoculación de células:

1. La línea celular utilizada es BHK 21 CLON 13, debe observarse su morfología al microscopio y verificar que la monocapa esté completa. También pueden emplearse células IBRS 2.

2. Se procede a inocular con el sobrenadante UN (1) mililitro por cada frasco Roux o frasco de CIENTO SETENTA Y CINCO (175) centímetros cuadrados. El volumen de sobrenadante restante se separa en DOS (2) tubos; uno de ellos es analizado por Test de Elisa a fin de comprobar la presencia de los antígenos que componen la vacuna quedando el otro como contramuestra.

3. Incubar las botellas inoculadas a TREINTA Y SIETE GRADOS CENTIGRADOS (37° C) durante CUARENTA Y OCHO (48) horas.

4. Congelar a MENOS VEINTE GRADOS CENTIGRADOS (-20° C) y descongelar.

5. Realizar un nuevo pasaje celular empleando DIEZ (10) mililitros del pasaje anterior. Se realizan TRES (3) pasajes en células en total, registrando cada pasaje en la planilla de Control de Productos Biológicos - Inocuidad donde constan los datos de cada serie.

6. Observar si se presenta efecto citopático.

7. Someter a Fijación de Complemento o ELISA tipificación.

Interpretación de los resultados: La serie de vacuna en control será liberada a la siguiente etapa de control cuando no se observe efecto citopático en los cultivos celulares ni sea detectado virus por Fijación de Complemento o ELISA en el sobrenadante del último pasaje.

Ruptura de emulsión para vacunas oleosas con hidróxido de aluminio.

Elución de Antígenos.

Buffer de elución 1.2 Molar:

PO4HK2	158,85 gs
PO4KH2	39,19 gs
H2O destilada c.s.p. 1.000 ml	
PH 7,4	

Esterilizar en autoclave:

	PBS 0,01M	pH 7,4
Solución A:	KH2PO4	68,04 gs/litro
Solución B:	K2HPO4	87,09 gs/litro

Tomar TRES PUNTO TREINTA Y SEIS (3.36) mililitros de la solución A y DIECISEIS (16) mililitros de la solución B y llevar a MIL (1.000) mililitros con cantidad suficiente de agua bidestilada, autoclavar QUINCE (15) minutos a UNA (1) atmósfera.

Bicarbonato SIETE PUNTO CINCO POR CIENTO (7.5 %)

CO3HNa 7.5gs

H2O destilada c.s.p. 100,00ml

Método A

1) Tomar DOSCIENTOS (200) mililitros de vacuna y agregarle VEINTE (20) mililitros de Cloroformo -DIEZ POR CIENTO (10 %)-.

2) Se centrifuga a MIL QUINIENTAS (1.500) revoluciones por minuto durante CINCO a DIEZ (5 a 10) minutos en centrífuga refrigerada a CUATRO GRADOS CENTIGRADOS (4° C).

3) Se desecha el sobrenadante y el sedimento se le agregan CIEN (100) mililitros de SOLUCION SALINA FOSFATO 0,01 Molar, se agita y se vuelve a centrifugar a MIL QUINIENTAS (1.500) revoluciones por minuto durante CINCO (5) minutos.

4) Se vuelve a desechar el sobrenadante y al sedimento se le colocan CUARENTA (40) mililitros de Buffer de elusión 1,2 UNIDAD MOLAR. Agitar la mezcla con agitador magnético durante CUARENTA Y CINCO (45) minutos a CUATRO GRADOS CENTIGRADOS (4° C).

5) Centrifugar MIL QUINIENTOS a DOS MIL (1.500 – 2.000) revoluciones por minuto durante

QUINCE MINUTOS (15) minutos a CUATRO GRADOS CENTIGRADOS (4° C).

6) Extraer el sobrenadante y conservar. Al sedimento restante agregarle CUARENTA (40) mililitros de Buffer de elusión y proceder de la misma forma que en el punto 4.

7) Se unen los sobrenadantes de las primera y segunda eluciones completando un total de aproximadamente OCHENTA (80) mililitros de antígeno eluido.

8) Llevar el volumen del eluido al doble del volumen inicial con agua destilada estéril y agregarle OCHO POR CIENTO (8 %) de POLITIMEL ETIL GLICOL 6.000.

9) Agitar CUARENTA Y CINCO (45) minutos a CUATRO GRADOS CENTIGRADOS (4° C) con agitador magnético.

10) Dejar reposar por un período mínimo de TRES (3) horas o toda la noche a CUATRO GRADOS CENTIGRADOS (4° C).

11) Centrifugar a NUEVE MIL (9.000) rpm durante DIEZ (10) minutos.

12) Desechar el sobrenadante y diluir el pellet en CUATRO (4) mililitros de Medio Eagle de mantenimiento. Se separan en fracciones para:

a) Comprobación de presencia antigénica por ELISA.

b) Contramuestra en inocuidad hasta finalización del control.

c) Siembra en cultivos celulares. Roux o frascos de CIENTO SETENTA Y CINCO CENTIMETROS CUADRADOS (175cm²), TRES (3) pasajes con incubación a TREINTA Y SIETE GRADOS CENTIGRADOS (37° C) durante CUARENTA Y OCHO (48) horas cada uno.

Observar si se presenta efecto citopático y realizar fijación de complemento o ELISA en el sobrenadante del último pasaje.

Método B

1) Tomar DOSCIENTOS (200) mililitros de vacuna y agregarle DIEZ (10) mililitros de Alcohol Bencílico – CINCO POR CIENTO (5 %)-

2) Se centrifuga a MIL QUINIENTAS (1.500) revoluciones por minuto (rpm) durante CINCO a DIEZ (5 a 10) minutos -centrífuga refrigerada a CUATRO GRADOS CENTIGRADOS (4° C)-.

3) Se obtienen TRES (3) fases. Se continúa trabajando con la interfase según lo establecido en el punto 12-c del método A.

Observación: En las vacunas oleosas con hidróxido de aluminio después de la ruptura de la emulsión, se procederá a la elusión del antígeno.

INTERPRETACION

Toda serie de vacuna será liberada a la siguiente etapa de control cuando no se observe efecto citopático en los cultivos ni sea detectado virus por Fijación de Complemento o ELISA.

Test de Inocuidad en ratones

Los animales utilizados son ratones lactantes F1 o Balb C de CUATRO (4) a SEIS (6) días de vida. Se colocan SEIS (6) crías con su madre en cajas con cama seca y limpia, alimento balanceado y agua para bebida.

Es recomendable un período de adaptación de VEINTICUATRO (24) horas en la sala dónde serán

inoculados y posteriormente revisados a fin de evitar muertes por falta de cuidado materno.

Se usan CUATRO (4) cajas por cada serie de vacuna, que son rotuladas indicando:

- Serie de Vacuna
- Laboratorio
- Fecha
- Número de caja.

Inoculación de los animales:

Se transporta la vacuna refrigerada hasta el lugar de inoculación, se toman las jeringas estériles de UN (1) mililitro y previa homogeneización de la vacuna se carga la jeringa y se inyecta CERO COMA UN (0,1) mililitro en cada ratón lactante por vía subcutánea en su dorso. Las madres no son inoculadas.

Los ratones son observados durante UNA (1) semana, llevándose un registro de su estado en una planilla.

Interpretación de los resultados:

En caso de ausencia de sintomatología y/o muertes, la prueba se considera negativa.

En caso de haber sintomatología específica de Fiebre Aftosa (parálisis) o muerte se debe procesar la muestra (disecar – morterear - añadir Cloroformo -congelar y descongelar) y luego realizar la Fijación de complemento o ELISA de Tipificación. Si hubiera resultado positivo la vacuna será rechazada.

ANEXO V

CAMPO EXPERIMENTAL

En el campo experimental se realiza el Control de Eficacia de las Vacunas Antiaftosa con bovinos libres de anticuerpos específicos de la Fiebre Aftosa, provenientes de zonas libres y sin vacunación.

Ubicación:

Vivero Forestal "Las Salicáceas" - Localidad: 25 de Mayo (Provincia de LA PAMPA). Superficie aproximada del predio: CIENTO SESENTA Y DOS MIL QUINIENTOS METROS CUADRADOS (162.500 m²).

Instalaciones e infraestructura:

OCHO (8) corrales con capacidad total para MIL (1.000) bovinos, manga, embarcadero, balanza, laboratorio para fraccionamiento de sueros, vivienda para el personal del SENASA y puesto de vigilancia.

Vigilancia y mantenimiento del predio:

Vigilancia:

Es realizada por una empresa acreditada en seguridad, que realiza vigilancia durante las VEINTICUATRO (24) horas y registra ingreso y egreso de personas y vehículos en un cuaderno numerado de la empresa. No está permitido el ingreso de personas sin autorización expresa de la DILAB.

Mantenimiento:

A cargo del personal del SENASA.

Recepción de animales vírgenes:

El paratécnico deberá controlar la integridad y numeración del precinto del camión, el Número de caravana de sangría y el estado de los animales en el momento de la recepción, cotejando dichos datos con la planilla que remite el veterinario actuante del SENASA en el momento del embarque, que deberá acompañar a los animales.

Deberá volcar en el "Acta de Recepción de Bovinos" por duplicado, la fecha, la cantidad de bovinos, sus datos personales, los datos del transportista y en las observaciones asentar la conformidad o no conformidad de lo recibido. Deberán firmar ambos el original y el duplicado del acta. El original del "Acta de Recepción de Bovinos" se archiva en la carpeta con el mismo nombre y el duplicado se entrega al transportista.

Asimismo, los animales recibidos serán registrados en la "Planilla de Existencia de Bovinos" en el sector de animales ingresados vírgenes en el que consta la fecha, remanente, ingresos y total de animales. Archivar en la carpeta del mismo nombre.

Ingreso de forrajes:

El paratécnico deberá controlar la calidad y cantidad del fardo de heno de alfalfa. Se registra en la "Planilla de Existencia de Heno de Alfalfa" completando los datos solicitados en el sector de ingreso de heno de alfalfa.

Alimentación:

Se suministra la ración de CERO COMA SETENTA Y CINCO (0,75) fardo de heno de alfalfa de VEINTE A VEINTICINCO (20 a 25) kilogramos por animal distribuido en DOS (2) raciones diarias, el CINCUENTA POR CIENTO (50 %) por la mañana y el CINCUENTA POR CIENTO (50 %) restante por la tarde, los SIETE (7) días de la semana.

Se registra en la "Planilla de Existencia de Heno de Alfalfa" la cantidad de fardos por corral y por día, el total y el stock. Se archivará en la carpeta del mismo nombre.

Animales vacunados:

Una vez realizada la vacunación oficial el paratécnico deberá registrar en la "Planilla de Existencia de Bovinos" sector de animales vacunados y egresados, el Número de Prueba y la cantidad de animales utilizados, restándolo del stock de animales vírgenes.

Egreso de animales:

Finalizadas las pruebas de control de Vacunas Antiaftosa por Elisa, los animales podrán ser liberados luego de transcurridos SIETE (7) días de la revacunación, que deberá ser realizada por un profesional y se deberá controlar el Número de la Caravana de vacunación con la planilla de la prueba correspondiente, confeccionándose el Acta de Egreso de Bovinos. Luego asentará su salida en la "Planilla de Existencia de Bovinos" sector Animales vacunados y egresados.

Control sanitario de los animales:

El paratécnico deberá observar diariamente el estado general y sanitario de los bovinos y el correcto suministro de agua. De encontrar algún animal cuyo estado no sea óptimo deberá apartarlo, llevarlo al Lazareto y comunicar cualquier novedad inmediatamente a la DILAB.

ANEXO VI

ADQUISICION, VACUNACION Y SANGRIA DE BOVINOS:

Los laboratorios que presenten vacunas a control deberán hacerse cargo de la compra de los animales, de su traslado y alimento.

Características de los animales:

Bovinos: raza Polled Hereford / Hereford -Hasta CINCO POR CIENTO (5 %) de astados descornados-.

Edad: DIECIOCHO (18) a TRINTA Y SEIS (36) meses

Peso: Entre DOSCIENTOS CUARENTA (240) y CUATROCIENTOS (400) kilogramos más menos (+/-) DIEZ POR CIENTO (10 %).

Sexo: Macho castrado

Animales provenientes de zonas libres de Fiebre Aftosa sin vacunación.

Campos de procedencia:

Deben estar ubicados en la zona libre de Fiebre Aftosa sin vacunación.

Debe tener instalaciones acordes para el manejo de los animales (Potreros, mangas con cepo, corrales, balanza individual, etcétera).

Debe tener vías de acceso confiables, que garanticen un movimiento programable de los animales.

Estado sanitario general:

Personal del SENASA supervisará el control del estado sanitario de los animales verificando que sean lotes homogéneos (peso, raza y edad), buen estado sanitario y de nutrición, libres de ecto y endoparásitos.

Se realizará una sangría previa de los animales a adquirir identificados con igual número de caravana oficial en oreja derecha y marcación a fuego, y se remitirán los sueros a la DILAB a fin de realizar las técnicas correspondientes. Serán aceptados los animales para ser incorporados a la prueba de control en cuyo suero sanguíneo no se detecten anticuerpos específicos de la Fiebre Aftosa, detectable por Elisa Estructural y Elisa 3 ABC.

Los animales recibirán tratamiento específico contra endo y ectoparásitos antes de su traslado al campo experimental. Los animales permanecerán en cuarentena en el campo de procedencia, VEINTE (20) días como mínimo.

El embarque de los animales al campo experimental de vacunación será supervisado por personal del SENASA y se realizará en camiones precintados.

El Campo de vacunación debe garantizar un adecuado cuidado de los animales de prueba (alambrado perimetral que permita un seguro aislamiento de los campos vecinos, alimentación con heno de alfalfa de zonas libres de Fiebre Aftosa), agua potable en cantidad suficiente; debe permitir un manejo acorde con las tareas a realizar, contando con manga con cepo, corrales de aislamiento, potreros, galpones para stock de raciones, casilla de vacunación e iluminación; a su vez, debe tener vías de acceso transitables en toda época del año.

La ropa de trabajo será de uso exclusivo para el personal que desarrolla tareas en el establecimiento.

VACUNACION Y SANGRIA DE LOS ANIMALES:

Los animales tendrán un plazo de adaptación después del ingreso al campo de vacunación de CATORCE (14) días como mínimo.

Vacunación y Primera Sangría:

Se vacunarán y sangrarán utilizando tubos con vacío y tapón perforable -CERO (0) días postvacunación- DIECISIETE (17) animales por cada serie de vacuna en control y se incluirán DOS (2) testigos por prueba. En las series de vacunas que se presenten a registro se vacunarán DOS (2) lotes de DIECISIETE (17) animales y se incluirán DOS (2) testigos. Los animales serán debidamente identificados y reunirán las condiciones establecidas previamente.

Antes de la vacunación se realizará la palpación del área de inoculación en la tabla del cuello, a fin de verificar la ausencia de nódulos pre-existentes. De presentarse, se deberá anotar en la columna de observaciones de la planilla de vacunación.

En el momento de la vacunación se coloca la caravana de vacunación con logo del SENASA numerada, en la oreja izquierda del animal, dicho número consta en una Planilla, que permite identificar fehacientemente al animal vacunado. También se registra en dicha Planilla el número de la caravana de sangría.

- Tipo de jeringa: de vidrio calibrada, que asegure la exactitud de la dosis.
- Tipo de aguja: común para aplicación subcutánea e intramuscular.
- Responsables de la aplicación: profesionales de DILAB.
- Vía y lugar de aplicación: según indicación del laboratorio productor, respetando las prácticas de rigor y evitando el reflujo de vacuna.
- Conservación de la vacuna: De acuerdo a las indicaciones del laboratorio productor.
- Manejo del animal: Los animales deben manejarse durante el proceso de encierre y vacunación evitando factores estresantes.
- Sangrías: Se realizará la segunda sangría a los TREINTA (30) días post-vacunación; los sueros obtenidos se fraccionarán en CUATRO (4) juegos de tubos eppendorfs rotulados con el Número de Prueba, Número de Suero, Número de Frasco y DPV.

Cada juego de sueros será guardado en paquetes identificados con los datos de Número de Prueba, Número de Frasco y DPV, lacrados y firmados por los profesionales actuantes de la DILAB y de CAPROVE. A los SESENTA (60) DPV se realizará la tercera sangría y se procederá de la forma antes explicada.

A los NOVENTA (90) DPV, si a la vacuna se le realiza el desafío viral, se procederá a la cuarta sangría, fraccionando los sueros de igual forma que en las sangrías anteriores. Los paquetes con los sueros serán conservados en la DILAB a MENOS VEINTE GRADOS CENTIGRADOS ($- 20^{\circ}$ C) hasta el vencimiento de la serie de vacuna, a excepción del 4° paquete, el que una vez terminadas las pruebas de control será entregado al Laboratorio Elaborador.

ANEXO VII

DESAFIO VIRAL

El costo del alquiler de los boxes de desafío, el transporte y el alimento correrán por cuenta de los laboratorios elaboradores.

Transporte:

Los camiones jaula que efectúen el transporte de los bovinos en prueba desde el campo de vacunación hasta los galpones de descarga deberán estar precintados y acompañados por custodia del SENASA.

Galpones de aislamiento:

Deberá ajustarse en un todo a lo establecido en el Anexo II – Bioseguridad, de la presente resolución.

Los animales de cada prueba deben estar agrupados por serie de vacuna. Deberán mantener un compartimiento para los animales testigos.

Deberá tener condiciones ambientales adecuadas para estabular los animales de prueba.

Deberá contar con instalaciones acordes para el manejo de los animales.

Arribo de animales:

Descanso después de la llegada al galpón y previo a la descarga: mínimo VEINTICUATRO (24) horas y máximo de SETENTA Y DOS (72) horas.

El galpón donde se alojen los animales permanecerá cerrado durante el desarrollo de la prueba bajo responsabilidad del personal del SENASA.

Virus de descarga:

El virus de desafío deberá tener los controles previos de caracterización, tipo y subtipo por Fijación de Complemento o por ELISA Tipificación caracterización por anticuerpos monoclonales y secuenciación.

Titulación del virus:

Se realiza en ratón lactante.

Se utilizan como mínimo SEIS (6) ratones por dilución de virus.

Se realizan diluciones 10-4, 10-5, 10-6 y 10-7 de la suspensión virulenta en medio Eagle.

Se inoculan para cada dilución DOS (2) cajas de ratones lactantes conteniendo cada una SEIS (6) ratones de CUATRO (4) a SEIS (6) días de edad; la inoculación es intraperitoneal y se inoculan CERO PUNTO UN (0.1) mililitros por ratón. La prueba se lee diariamente durante SIETE (7) días y los ratones muertos se morterean y el material obtenido se procesa por Fijación de Complemento al CINCUENTA POR CIENTO (50 %). El título se expresa en dosis letales CINCUENTA POR CIENTO (50 %) en ratón lactante por mililitro (DL50 RL/ml) y se calcula a partir de los resultados del SEPTIMO (7°) día de lectura según el método de Spearman – Kärber.

Adicionalmente la DILAB podrá realizar la titulación en bovinos.

Desafío de los bovinos:

A los NOVENTA (90) DPV cada grupo de DIECISEIS (16) animales serán inoculados por vía intradermolingual con UN (1) mililitro de una dilución de la cepa oficial de virus de descarga que contenga DIEZ MIL (10.000) dosis infectante ratón lactante/mililitro o DIEZ MIL (10.000) dosis infectante bovino/mililitro.

En cada descarga se utilizan DOS (2) bovinos vírgenes en calidad de testigos.

Los animales serán observados a los SIETE (7) días post-inoculación. Para que la prueba sea válida se deberá verificar que los animales testigos presenten lesiones podales debido a la generalización viral.

Se consideran protegidos los bovinos vacunados que no presenten lesiones podales en ninguno de sus miembros.

Metodología de la inoculación:

- Tipo de jeringa: de UN (1) mililitro – calibrada, descartable.
- Tipo de aguja: Medida para inoculación intradérmica 15/5 milímetros.
- Lugar de aplicación: Intradermolingual.
- Modo de aplicación: CUATRO (4) puntos; volumen de inyección por punto CERO PUNTO VEINTICINCO (0.25) mililitros.
- Sangrado de los animales vacunados y testigos previo a la descarga.

Manejo de los animales:

Garantizar la provisión de agua ad libitum y alimento suficiente.

Lectura:

- Sujeción correcta del animal.
- Retirar material podal de bovinos testigos y vacunados para su posterior tipificación.
- Finalizada la prueba la totalidad de los animales son sacrificados y los cadáveres sometidos a proceso de digestión.

ANEXO VIII

CONTROL DE TOLERANCIA

1. MATERIAS PRIMAS

Los laboratorios productores de vacunas antiaftosa deberán adjuntar a cada presentación de serie a control oficial:

1.1. Protocolo de control de calidad de origen con especificaciones físico-químicas y biológicas de las materias primas utilizadas en la elaboración de la vacuna.

1.2. Protocolos de control de calidad interno en los aspectos físico-químicos, biológicos y test de toxicidad de las materias primas utilizadas en la elaboración de las vacunas, con carácter de Declaración Jurada, bajo la responsabilidad del Director Técnico del laboratorio productor.

1.3. Si la DILAB lo solicitara, los laboratorios productores deberán entregar muestras de todos los componentes que integran la vacuna terminada, en el momento que los inspectores del SENASA lo requieran. La toma de muestras se hará constar en el Acta de Inspección respectiva. Las muestras permanecerán en la DILAB para los fines que el SENASA disponga. La DILAB realizará los controles de toxicidad u otro toda vez que lo considere necesario.

2. PRUEBA DE TOLERANCIA CLINICA

2.1. Los bovinos utilizados en la prueba de eficacia serán observados mientras dure la prueba, para valorar la tolerancia post-vacunal del inmunógeno.

2.1.1. La aparición de reacciones indeseables atribuibles a la vacuna será motivo de valoración, según los siguientes criterios:

a) Muerte de UNO (1) o más animales;

b) Torción o rigidez de cuello, síntomas nerviosos o trastornos en la locomoción, shock anafiláctico y toda otra reacción indeseable en UNO (1) o más animales;

c) Aparición de nódulos visibles en el punto de inoculación de un diámetro superior a los DIEZ (10) centímetros en TRES (3) o más animales. En este caso, los animales de la serie en control se remitirán para la prueba de tolerancia en frigorífico.

En caso de presentarse las reacciones indeseables descritas en el punto 2.1.1. a) y b), se realizará una prueba de tolerancia ampliada a la serie en control.

3. PRUEBA DE TOLERANCIA EN FRIGORIFICO

3.1. Se evaluará la presencia de nódulos post-vacunales en la totalidad de los bovinos usados en la prueba de eficacia. Los parámetros de evaluación serán el peso del nódulo disecado post-sacrificio. Las series serán valoradas por el método estadístico de T de Student utilizando un parámetro estimador normal máximo de CINCUENTA (50) gramos. La DILAB queda facultada a utilizar otro método que en el futuro demuestre similar utilidad, valorada estadísticamente. Todas las series rechazadas por esta prueba tendrán opción, a pedido del elaborador, de ser sometidas a la Prueba de Recontrol de Tolerancia en Frigorífico.

3.2. Recontrol de tolerancia en Frigorífico: Será realizado en un Campo Oficial del SENASA y supervisado en toda la ejecución de la prueba por personal oficial, en un número no menor a CINCUENTA (50) bovinos que serán provistos por el laboratorio elaborador. Se evaluará la aparición de reacciones generales o de nódulos post-vacunales según los criterios establecidos en 2.1 y 3.1 del presente Anexo. La valoración de nódulos en frigoríficos será realizada entre los SESENTA (60) y NOVENTA (90) días post-vacunación. Será rechazada y decomisada toda serie de vacuna que no superara este recontrol.

4. PRUEBA DE TOLERANCIA AMPLIADA

4.1 Será realizada en un Campo Oficial del SENASA y supervisada en toda la ejecución de la prueba por personal oficial, en un número no menor a CIEN (100) bovinos que serán provistos por el laboratorio elaborador. Se evaluará la aparición de reacciones generales o de nódulos post-vacunales según los criterios establecidos en los puntos 2.1 y 3.1 del presente Anexo.

4.2 En caso de muertes o reacciones indeseables atribuibles a la vacuna la serie en control será rechazada.

ANEXO IX

PRUEBAS INDIRECTAS

1. Por cada serie en control se vacunarán como mínimo DIECISIETE (17) bovinos libres de anticuerpos que reúnan las condiciones establecidas en el Anexo V de la presente resolución. Los animales serán sangrados a los CERO (0), TREINTA (30) y SESENTA (60) días post-vacunación.

2. Los animales serán sangrados a los SESENTA (60) DPV MAS MENOS CINCO (+/- 5) días, para ser valorados por la técnica de Elisa en fase líquida cuyo protocolo de trabajo se detalla en el presente Anexo.

3. Todos los sueros de las sangrías serán fraccionados en el campo experimental del SENASA en CUATRO (4) alícuotas y serán envueltas, lacradas y firmadas. Una de ellas queda en poder de la DILAB para su procesamiento, DOS (2) permanecerán en dependencias de la DILAB como contramuestras, hasta TREINTA (30) días después de la terminación de la prueba. Una muestra permanecerá lacrada en la DILAB y será entregada a los representantes de CAPROVE una vez concluidos la totalidad de los controles, si son solicitados.

4. La DILAB será la única responsable de las pruebas para valoración de eficacia de vacuna antiaftosa.

5. En los casos en que se produjeran problemas técnicos en la realización de los controles indirectos que impidieran arribar a conclusiones precisas, la DILAB decidirá al respecto.

6. Metodología estándar de trabajo:

Elisa en fase líquida para determinación del nivel de anticuerpos en animales vacunados contra la Fiebre Aftosa.

1. Reactivos y Materiales.

1.1 Antígenos: Se utilizarán las cepas oficiales de control O1 Campos, A24 Cruzeiro, A Argentina 2001 y C3 Indaial, con DOS (2) pasajes en células BHK-21, inactivados, titulados y conservados a MENOS VEINTE GRADOS CENTIGRADOS (-20° C) con glicerol al CINCUENTA POR CIENTO (50 %).

1.2 Sueros de captura: de cobayo o conejo hiperinmunizados con las cepas oficiales de control purificadas (140 S), en su título de uso.

1.3 Sueros detectores: mezcla de CUATRO (4) anticuerpos monoclonales para cada cepa de control, en su título de uso.

1.4 Conjugado anti-ratón, en su título de uso.

1.5 Sustrato: solución de ABTS con CERO COMA CERO CINCO POR CIENTO (0,05 %) de Agua Oxigenada TREINTA (30) volúmenes.

1.6 Solución de Fluoruro de Sodio.

1.7 Sueros problema: de los bovinos vacunados con las series en control, sangrados a los CERO (0), TREINTA (30) y SESENTA (60) días post-vacunación.

1.8 Sueros control: sueros bovinos con títulos dentro del rango de UNO PUNTO CINCO (1.5), UNO PUNTO OCHO (1.8) y DOS PUNTO UNO (2.1).

1.9 Diluyentes: PBS + 0,05 % Tween 20 + 3% Albúmina bovina. Tampón carbonato – Bicarbonato pH 9,6. Solución de lavado: PBS + 0,05 % Tween 20 (PBST).

1.10 Placas para Elisa de NOVENTA Y SEIS (96) pocillos (Nunc-Maxisorp, Greiner o similares).

1.11 Placas auxiliares de NOVENTA Y SEIS (96) pocillos (tipo Hemoaglutinación fondo en u).

1.12 Lector para lectura espectrofotométrica de placas de Elisa con filtro de CUATROCIENTOS QUINCE (415) milímetros.

1.13 Interfase para conectar el lector a un computador.

1.14 Computador y programa para cálculos de títulos en prueba Elisa.

2. Esquema de la Técnica.

Elisa fase líquida monoclonal - Prueba de Eficacia - Dilución Final

Para la cuantificación de anticuerpos contra el virus de la Fiebre Aftosa en suero, kit de CEVAN.

DILUCION FINAL: CUATRO (4) DILUCIONES

PRINCIPIO

Las muestras de suero a titular son diluidas UNO EN DIECISEIS (1:16), UNO EN SESENTA Y CUATRO (1:64), UNO EN DOSCIENTOS CINCUENTA Y SEIS (1:256) y UNO EN MIL VEINTICUATRO (1:1024) e incubadas con una cantidad constante de antígeno en placas de incubación.

En placas de ELISA se adsorbe el suero de captura: antisuero de conejo contra la Fiebre Aftosa, específico de tipo viral.

La mezcla suero-virus es transferida a la placa de ELISA para medir la cantidad de antígeno libre.

Como reactivo detector se utilizan anticuerpos monoclonales específicos de tipo. Se agrega conjugado HRP-anti-ratón- IgG y el sustrato (ABTS-H₂O₂).

La reacción es detenida y leída en un lector automático de Elisa.

Cada placa es validada usando SEIS (6) sueros controles.

Los datos pueden ser procesados con un programa de cálculo en una computadora (PC).

PROCEDIMIENTO

Pasos Preliminares

Llevar los reactivos a temperatura ambiente antes de usarlos.

Antes de comenzar el test, marcar la posición de las muestras problema y controles en la hoja Protocolo" de acuerdo a la siguiente distribución (ver Esquema de Placa):

DIECISIETE (17) muestras de suero: diluciones UNO EN DIECISEIS (1:16) a UNO EN MIL VEINTICUATRO (1:1024) -final UNO EN TREINTA Y DOS (1:32) a UNO EN DOS MIL CUARENTA Y OCHO (1:2048)-.

SEIS (6) Sueros Controles: diluciones UNO EN DIECISEIS (1:16), UNO EN TREINTA Y DOS (1:32) y UNO EN SESENTA Y CUATRO (1:64) -final UNO EN TREINTA Y DOS (1:32) a UNO EN CIENTO VEINTIOCHO (1:128)-.

OCHO (8) Controles de Virus -OD = CIENTO POR CIENTO (100 %) - DOS (2) Blancos.

Nota: en el caso de tener los DOS (2) testigos de la Prueba de Eficacia, ubicarlos en el lugar correspondiente a controles CIENTO POR CIENTO (100 %) en H9 y H10, en dilución UNO EN OCHO (1:8) -final UNO EN DIECISEIS (1:16)-.

PRIMER DIA

1) Sensibilizar la Placa de ELISA.

Rotular la Placa de ELISA con el tipo de virus a testear.

Preparar la dilución de uso de captura: SESENTA (60) ul de captura CIENTO (100x) en SEIS (6) mililitros de buffer carbonato/bicarbonato.

Agregar CINCUENTA (50) ul de suero de captura específico (en dilución de uso) en todos los pocillos.

Mover la placa suavemente para permitir que el líquido se distribuya homogéneamente.

Cubrir la placa de ELISA con un film adhesivo.

Incubar una noche a CUATRO GRADOS CENTIGRADOS (4° C).

2) Dilución de las muestras: UNO EN DIECISEIS (1:16) - UNO EN SESENTA Y CUATRO (1:64) - UNO EN DOSCIENTOS CINCUENTA Y SEIS (1:256) y UNO EN MIL VEINTICUATRO (1:1024) – final UNO EN TREINTA Y DOS (1:32) - UNO EN CIENTO VEINTIOCHO (1:128) - UNO EN QUINIENTOS DIECISEIS (1:516) y UNO EN DOS MIL CUARENTA Y OCHO (1:2048).

Las diluciones pueden hacerse directamente en las placas de incubación siguiendo el procedimiento indicado a continuación:

Usar DOS (2) placas de incubación.

Agregar CINCUENTA (50) ul de buffer dilución en las columnas UNO (1) a DIEZ (10).

Agregar CINCUENTA (50) ul de cada suero a testear en cada pocillo de las columnas 1 (A a H).

Cambiar los tips para cada muestra.

Hacer diluciones en base DOS (2) de cada suero desde UNO EN DOS (1:2) hasta UNO EN MIL VEINTICUATRO (1:1024), usando pipeta multicanal.

Mezclar y transferir CINCUENTA (50) ul, descartar los últimos CINCUENTA (50) ul.

3) Dilución de los sueros controles: UNO EN OCHO (1:8) - UNO EN DIECISEIS (1:16) - UNO EN TREINTA Y DOS (1:32) y UNO EN SESENTA Y CUATRO (1:64) - final UNO EN TREINTA Y DOS (1:32) UNO EN SESENTA Y CUATRO (1:64) - UNO EN CIENTO VEINTICOCHO (1:128).

Las diluciones pueden hacerse directamente en las placas de incubación.

a) Hacer dilución UNO EN OCHO (1:8) de cada control de la siguiente forma:

Agregar SETENTA (70) ul de buffer dilución en la columna 1 y CINCUENTA (50) ul en las columnas 2, 3 y 4.

Dispensar DIEZ (10) ul de cada uno de los sueros controles en la columna 1.

Cambiar los tips para cada suero control.

b) Hacer diluciones en base 2 de cada control desde UNO EN DIECISEIS (1:16) hasta UNO EN SESENTA Y CUATRO (1:64) usando pipeta multicanal, de la siguiente forma:

Mezclar y transferir CINCUENTA (50) ul de la dilución UNO EN OCHO (1:8) ubicada en la columna 1 de la placa de dilución de controles al pocillo de dilución UNO EN DIECISEIS (1:16), mezclar y pasar CINCUENTA (50) ul al pocillo de dilución UNO EN TREINTA Y DOS (1:32) mezclar y transferir CINCUENTA (50) ul al pocillo UNO EN SESENTA Y CUATRO (1:64) y descartar CINCUENTA (50) ul, usar pipeta multicanal.

4) Control de antígeno.

Agregar CINCUENTA (50) ul de solución dilución en la columna 6 de la placa de incubación de los controles.

5) Preparación del antígeno.

Preparar la solución de antígeno en dilución de uso en buffer dilución inmediatamente antes de usar. Ver indicaciones del lote a usar.

6) Adición del antígeno.

Agregar CINCUENTA (50) ul de la dilución de antígeno en las placas de incubación según el siguiente esquema.

Placas con sueros muestra: en columnas 4, 6, 8 y 10.

Placas con sueros controles: en columnas 2, 3 y 4 (sueros controles) y 6 -control CIENTO POR CIENTO (100 %)-.

Cubrir las placas de incubación e incubar una noche a CUATRO GRADOS CENTIGRADOS (4° C).

SEGUNDO DIA

Preparación de la solución de lavado: PBS 1x - tween CERO PUNTO CERO CINCO POR CIENTO (0.05 %):

PBS 10 x: 100 ml.

Tween: 0.5 ml.

H2O: csp 1 litro.

7) Quitar cuidadosamente el film de la placa de ELISA.

Lavar todos los pocillos CINCO (5) veces con DOSCIENTOS (200) ul de solución de lavado.

Golpear firmemente la placa sobre un papel absorbente para remover el contenido.

8) Transferir CINCUENTA (50) ul de la mezcla suero-virus desde la placa de incubación a la de ELISA siguiendo la distribución de muestras y controles indicada en el diagrama (diagrama de la Placa de ELISA).

Agregar CINCUENTA (50) ul de buffer dilución en los pocillos H11 y H12 (blanco).

9) Incubar UNA (1) hora a TREINTA Y SIETE GRADOS CENTIGRADOS (37° C).

10) Lavar CINCO (5) veces como se describe arriba.

11) Preparar la dilución de uso del anticuerpo detector: SESENTA (60) ul de detector CIEN (100) x en SEIS (6) mililitros de buffer dilución.

Agregar CINCUENTA (50) ul. de detector en dilución de uso en todos los pocillos.

12) Incubar UNA (1) hora a TREINTA Y SIETE GRADOS CENTIGRADOS (37° C).

13) Lavar CINCO (5) veces como se describe arriba.

14) Preparar la dilución de uso del conjugado anti-ratón según título del lote:

Preincubar TREINTA (30) minutos a TREINTA Y SIETE GRADOS CENTIGRADOS (37° C), luego completar a SEIS (6) mililitros con buffer dilución.

Agregar CINCUENTA (50) ul de la solución de conjugado en dilución de uso en todos los pocillos de las placas de los serotipos O1 Campos, A24 Cruzeiro, A Argentina 2001 y C3 Indaial.

Los títulos de los conjugados pueden presentar variaciones de acuerdo a los lotes que se envía el proveedor.

15) Incubar UNA (1) hora a TREINTA Y SIETE GRADOS CENTIGRADOS (37° C).

16) Lavar CINCO (5) veces como se describe arriba.

17) Preparar ABTS/H2O2: agregar CERO OCHO (08) ul de H2O2 a SEIS (6) mililitros de ABTS.

Agregar CINCUENTA (50) ul de ABTS/H2O2 a todos los pocillos.

18) Incubar TREINTA (30) minutos a temperatura ambiente, protegido de la luz.

19) Agregar CINCUENTA (50) ul de solución stop a todos los pocillos.

20) Leer con filtro CUATROCIENTOS QUINCE (415) en un Lector de ELISA.

21) Sumergir todo el material usado en una solución de hipoclorito de sodio antes de descartarlo.

VALIDACION DE LOS RESULTADOS:

Los criterios que a continuación se describen se aplicarán individualmente a cada placa.

1- Control de blanco: Cada placa será válida si la densidad óptica (O.D) de los pocillos es inferior a CERO PUNTO TRESCIENTOS (0.300).

El promedio de las O.D de los blancos se resta a los OCHENTA Y SEIS (86) pocillos.

2- Control del CIENTO POR CIENTO (100 %) de las O.D del virus: cada placa será válida si en SIETE (7) de los OCHO (8) pocillos se obtiene un valor de O.D dentro del rango específico en cada lote de reactivos.

La O.D resultará del promedio de los valores válidos.

3- Sueros Control: Para la obtención de los títulos se calculan individualmente sus respectivas curvas de regresión utilizando las O.D de las diluciones procesadas: UNO PUNTO CINCUENTA (1.50), UNO PUNTO OCHENTA (1.80) y DOS PUNTO DIEZ (2.10). Se obtiene para cada suero control el coeficiente de correlación (r) y el título CINCUENTA POR CIENTO (50 %).

El título para cada suero será la inversa de la dilución expresada en logaritmo 10, donde se obtenga el CINCUENTA POR CIENTO (50 %) de O.D. del control del CIENTO POR CIENTO (100 %) del virus correspondiente.

4- Se aceptan aquellos sueros control cuyo coeficiente de correlación (r) no sea inferior a CERO PUNTO NOVENTA (0.90) y cuyos títulos no difieran en más o en menos CERO PUNTO VEINTE (0.20) log del título histórico.

Una vez aplicado el factor de corrección se aceptan aquellos sueros cuyos títulos no difieran en más en menos CERO PUNTO TRECE (0.13) log del título histórico.

La placa quedará aceptada si al menos CUATRO (4) de los SEIS (6) sueros control cumplen con los criterios mencionados.

5- Curva Standard: el título de los sueros controles obtenidos se relaciona con las absorbencias producidas a una única dilución -UNO EN SESENTA Y CUATRO (1:64 final)- de cada suero control.

Para ello se calcula la curva de regresión lineal y el coeficiente de correlación (r).

La Curva Standard será aceptada si el r es superior a CERO PUNTO NOVENTA (0.90).

El título de cada suero muestra será expresado como el log DIEZ (10) de la inversa de la dilución que corresponda al CINCUENTA POR CIENTO (50 %) de densidad óptica del control del CIENTO POR CIENTO (100 %) de virus.

El título se redondeará al segundo decimal.

6- Los títulos obtenidos en cada virus se promedian y ese título final es con DIECISIETE (17) animales, se realiza una sumatoria de cada suero en los CUATRO (4) virus, y el animal cuya suma sea la menor es el descartado, con lo cual se vuelven a promediar los títulos de los DIECISEIS (16) animales restantes, quedando así el título obtenido como resultado final.

ESQUEMA DE PLACA



----- Sueros a analizar - dilución final 1:32 a 1:2048

----- Sueros control dilución final 1:32 - 1:64 - 1:128

----- Control virus 100%

----- Blancos

Controles indirectos - Dilución acotada.

Cuantificación de Anticuerpos de Fiebre Aftosa para la aprobación de Vacunas.

DESARROLLO:

- Test de ELISA para Controles Indirectos para control de Eficacia de Vacunas Antiaftosa.

Preparación del protocolo de trabajo

En el protocolo de ELISA se anota el número de la vacuna a controlar y también en cada pocillo se anota el número de caravana correspondiente a esa vacuna. También se escriben los sueros controles, el CIENTO POR CIENTO (100 %) de antígeno y el blanco.

Preparación de las placas auxiliares

Las placas para cada prueba serán previamente bloqueadas con solución PBST con CINCO POR CIENTO (5 %) de leche descremada, durante DOS (2) horas a TREINTA Y SIETE GRADOS CENTIGRADOS (37° C) seguido por un enjuague con agua destilada y posterior secado.

Por cada placa auxiliar se pueden testear DIECISEIS (16) sueros. Se coloca arriba de la placa el número del primer suero y del noveno y así sucesivamente, también se prepara la placa con los controles y el CIENTO POR CIENTO (100 %) de antígeno.

- Cargar 50 ul de PBST en:

a) Todos los pocillos de las columnas de 1 a 4 y 7 a 10 que corresponden a las diluciones del suero bovino que se quiere analizar.

b) Todos los pocillos de las columnas 1 a 3 y pocillos G4 y H4 que corresponden a los sueros controles y a los controles del CIENTO POR CIENTO (100 %) de antígeno.

- Cargar CINCUENTA (50) ul de solución dilución en:

a) Todos los pocillos de las columnas 5 y 11 que corresponden a las diluciones de los sueros bovinos en estudio.

b) Los pocillos de las filas A hasta F en las columnas 4, 5 y 6 que corresponden a los sueros controles y a los controles del CIENTO POR CIENTO (100 %) de antígeno.

- Agregar CINCUENTA (50) ul de cada uno de los sueros a titular en la columna 1 y 7 y comenzar a hacer las diluciones en base 2 hasta la dilución UNO EN TREINTA Y DOS (1:32), y en las filas de los sueros controles hasta UNO EN SESENTA Y CUATRO (1:64) y descartar los últimos CINCUENTA (50) ul.

- Preparar los virus en sus correspondientes diluciones en solución dilución. Colocar CINCUENTA (50) ul de virus en los pocillos:

*Las diluciones a probar de los sueros en estudio.

*Las diluciones de los controles.

*En los CIENTO POR CIENTO (100 %) de antígeno.

- Incubar durante la noche a CUATRO GRADOS CENTIGRADOS (4° C) tapadas con film plástico.

D- PREPARACION DE LAS PLACAS DE ELISA

Sensibilizar una placa de ELISA por virus con el suero de captura correspondiente (50 ul por pocillo) e incubar las placas toda la noche a CUATRO GRADOS CENTIGRADOS (4° C), envueltas con film plástico asegurándose que el líquido se haya distribuido uniformemente en el pocillo, agitando suavemente.

E- A las VEINTICUATRO (24) horas lavar las placas de ELISA sensibilizadas con PBST CIN-CO (5) veces y secar.

F- Transferir las muestras suero-virus a la placa de ELISA

Pasar CINCUENTA (50) ul de la mezcla suero - virus de la dilución UNO EN SESENTA Y CUATRO (1:64) de los sueros a probar y de las diluciones UNO EN TREINTA Y DOS (1:32) - UNO EN SESENTA Y CUATRO (1:64) y UNO EN CIENTO VEINTIOCHO (1:128) finales de los sueros controles de la placa auxiliar a la placa de ELISA sensibilizada. Transferir los controles del virus - CIENTO POR CIENTO (100 %) - a la placa de ELISA.

Incubar UNA (1) hora a TREINTA Y SIETE GRADOS CENTIGRADOS (37° C) sin apilar las placas.

Lavar CINCO (5) veces con Solución Salina Fosfatada Tween 20 (PBST).

G- Agregar CINCUENTA (50) ul de anticuerpos monoclonales del título correspondiente a las placas de ELISA.

Incubar UNA (1) hora a TREINTA Y SIETE GRADOS CENTIGRADOS (37° C) sin apilar las placas.

Lavar CINCO (5) veces con PBS.

H- Preparar la dilución del suero conjugado a la dilución de uso.

Agregar CINCUENTA (50) ul a todas las placas.

Incubar UNA (1) hora a TREINTA Y SIETE GRADOS CENTIGRADOS (37° C) sin apilar las placas.

Lavar CINCO (5) veces con PBST.

I- Cargado de la solución ABTS en las Placas de ELISA.

Descongelar la solución de ABTS, agregar en el momento de uso, OCHO (8) ul de agua oxigenada TREINTA POR CIENTO (30 %) por cada SEIS (6) mililitros de solución.

Colocar rápidamente CINCUENTA (50) ul en un orden establecido a las placas.

Dejar actuar a temperatura ambiente durante TREINTA (30) minutos en oscuridad.

J- Frenar la reacción.

Con CINCUENTA (50) ul de solución de fluoruro de sodio, siguiendo el mismo orden que en I.

K- Lectura de la placa

Leer inmediatamente las placas en el orden que fueron frenadas.

L- Obtención y validación de los resultados.

Los criterios de validación que a continuación se describen se aplicarán individualmente a cada placa.

- 1- Control del blanco: Cada placa será válida si la O.D promedio de los pocillos es inferior a CERO PUNTO TRESCIENTOS (0.300). Dicho promedio se resta a la O.D de cada pocillo en toda la placa.

- 2- Control del CIENTO POR CIENTO (100 %) de O.D del virus: Cada placa será válida si al menos SIETE (7) de los OCHO (8) pocillos cumplen los siguientes criterios de aceptación:

∅ Los valores deberán estar dentro del rango establecido para el kit.

∅ La O.D media de los pocillos aceptados según punto anterior está dentro del rango O.D +/- 0.3.

- 3- Sueros controles: Para la obtención de los títulos se calculan individualmente sus respectivas curvas de regresión utilizando las O.D de las diluciones realizadas (1.5-1.8 y 2.1) obteniéndose para cada control el coeficiente r y su título. El título para cada suero será la inversa de la dilución, expresada en Log y donde se obtenga el CINCUENTA POR CIENTO (50 %) de O.D del control del CIENTO POR CIENTO (100 %) del virus correspondiente. Se aceptan aquellos sueros controles cuyo coeficiente de correlación no sea inferior a CERO PUNTO NOVENTA (0.90) y sus títulos no difieran en MAS MENOS CERO PUNTO DOS (+/- 0.2) Log del título histórico para el lote.

Se calcularán las diferencias entre título obtenido y título esperado para todos los sueros (se expresan con su signo). Aquéllos que sean <0.06 serán expresados como igual a CERO (0).

Si al menos CUATRO (4) de los SEIS (6) sueros presentan diferencias del mismo signo, se aplicará factor de corrección que se calculará con el siguiente criterio:

3.1- Promediar todas las diferencias -incluso las diferencias iguales a CERO (0)-que sean menores a CERO PUNTO DOS (0.2) —considerando su signo—.

3.2- Aplicar factor de corrección según la siguiente tabla:

DIFERENCIA DEL TITULO	FACTOR DE CORRECCION
$0.00 < x < 0.06$	No se corrige
$0.06 < x < 0.10$	Corregir por 0.05
$0.10 < x < 0.15$	Corregir por 0.10
$0.15 < x < 0.20$	Corregir por 0.15

3.3- Una vez corregidos se aceptarán aquellos sueros controles cuyos títulos corregidos no difieran en MAS MENOS CERO PUNTO TRECE (+- de 0.13) del título histórico.

3.4- Recta de regresión de cada placa:

- Se calculará la recta de regresión de cada placa con aquellos valores aceptados de los sueros controles.

- Se aceptarán las placas que sus curvas de regresión tengan coeficientes de correlación

superiores a CERO PUNTO NOVENTA (0.90).

3.5- Títulos de los sueros problema: Se obtiene por interpolación del valor de la O.D obtenido en la dilución realizada del suero -UNO PUNTO OCHO (1.8)- en la recta de regresión correspondiente a su placa.

Los sueros cuyos títulos sean mayores a DOS PUNTO UNO (2.1) y menores a UNO PUNTO CINCO (1.5) se expresarán como DOS PUNTO ONCE (2.11) y UNO PUNTO CUARENTA Y NUEVE (1.49) respectivamente.

3.6- Resultados: La prueba se hará por duplicado en DOS (2) días diferentes. Para el resultado se promediarán los títulos obtenidos en ambas determinaciones.

Reactivos: Todos los reactivos de este kit son proporcionados por el CEVAN.

ANEXO X

ELISA 3ABC

Diagnóstico por screening de anticuerpos contra proteínas no estructurales del virus de la Fiebre Aftosa. Kit de PANAFITOSA.

Reactivos suministrados.

1. Solución PBS-Tween 20x concentrada
2. Suero Equino
3. Solución Bloqueadora
4. Leche en polvo descremada
5. Microplacas sensibilizadas con Proteína 3 ABC
6. Escherichia coli
7. Suero control negativo
8. Suero control padrón 1
9. Suero control padrón 2
10. Conjugado 100x concentrado
11. Diluyente del sustrato
12. Sustrato 100x concentrada

Test de ELISA 3 ABC

A- Procedimiento

Procedimientos preliminares:

- Aproximadamente UNA (1) hora antes de comenzar la reacción, retirar todos los reactivos de la heladera, con excepción del conjugado, para permitir que se estabilicen a temperatura ambiente. Límites recomendados de VEINTE (20) a VEINTICINCO GRADOS CENTI-GRADOS (25° C).

- Preparar la planilla de la prueba teniendo en cuenta que deben ser reservados DOS (2) pocillos para el suero control negativo (CN), TRES (3) pocillos para el suero control padrón 1 (CP1), DOS (2) pocillos para el suero control padrón 2 (CP2) y UN (1) pocillo para un suero control interno del laboratorio de desempeño conocido en la prueba.

- Observación: El análisis de muestras individuales deberá ser realizado contra el suero padrón CP1 diluido UNO EN VEINTE (1:20).

- Homogeneizar los reactivos antes de su uso.

- Preparar el volumen de las soluciones necesarias para la prueba en función del número de muestras (placas) a procesar siguiendo lo especificado en la Tabla I a seguir.

TABLA I – Volúmenes y soluciones en función del número de muestras.

Número de muestras	Buffer de lavado	Diluyente de muestra/conjugado
1 placa: 88 muestras	500 ml.	30 ml.
2 placas: 176 muestras	1000 ml.	60 ml.
3 placas: 264 muestras	1500 ml.	90 ml.
4 placas: 352 muestras	2000 ml.	120 ml.
5 placas: 440 muestras	2500 ml.	150 ml.

- Buffer de lavado: Diluir VEINTE (20) veces con agua deionizada y/o destilada la solución PBSTween 20x. Antes de diluir observe que no haya precipitados; de presentarse, disolverlos en Baño María a TREINTA Y SIETE GRADOS CENTIGRADOS (37° C). Puede ser conservada durante DOS (2) semanas a CUATRO GRADOS CENTIGRADOS (4° C).

- Diluyente de muestras/conjugado: Para preparar CIENTO (100) mililitros de esta solución, disolver CINCO (5) gramos de leche descremada en aproximadamente CINCUENTA (50) mililitros de agua eionizada y/o destilada. Adicionar CINCO (5) mililitros de solución PBS-Tween 20x concentrada, DIEZ (10) mililitros de suero equino, CIENTO (100) ul de Escherichia coli, homogeneizar y llevar a volumen final on agua deionizada y/o destilada. Usar en el transcurso del día.

- La dilución del conjugado y del sustrato debe ser realizada estrictamente CINCO (5) - DIEZ (10) inutos antes de su uso, de acuerdo a lo especificado en la Tabla II a seguir.

B - Principio del ensayo

El ensayo consta de TRES (3) etapas. 1: Incubación de las muestras; 2: Incubación del Conjugado; : Incubación del Sustrato. Siguen a las DOS (2) primeras etapas ciclos de lavado y a la última la dición de la solución bloqueadora para detener la reacción.

1- Incubación de las Muestras: la proteína 3 ABC. Inmovilizada en la microplaca, al entrar en ontacto con la muestra y en el caso de ésta tener anticuerpos anti-3ABC, reaccionará con los mismos ormando un complejo antígeno-anticuerpo. Los anticuerpos que no hayan reaccionado serán eliminados n la etapa de lavado que sigue a la incubación, quedando solo los anticuerpos 3 ABC adheridos la placa a través de la proteína 3 ABC.

2- Incubación del Conjugado: En esta etapa se agrega el conjugado (anticuerpos anti-IgG de ovino con peroxidasa), que se unirá específicamente al complejo antígeno-anticuerpo (de haberse omado). De no formarse el complejo en la etapa anterior, el conjugado no reaccionará y será eliminado urante el lavado que sigue a este paso.

3- Incubación del Sustrato: En esta tercera etapa se adiciona el sustrato incoloro TMB/H2O2 obre el cual actúa la enzima peroxidasa del conjugado. Como resultado de la acción de la misma se bservará el surgimiento de color azul en aquellos pocillos en que el antígeno haya retenido

anticuerpos anti-3ABC y consecuentemente conjugado. Por último la reacción es interrumpida al agregarse la solución bloqueadora, que provoca el viraje del color azul al amarillo.

C- Ejecución del ensayo.

Incubación de las Muestras:

- Colocar NOVENTA Y CINCO (95) ul de diluyente de muestras/conjugado por pocillo en toda la placa. Adicionar CINCO (5) ul de muestra a analizar o suero control -dilución final UNO EN VEINTE (1:20)- en el pocillo asignado, siguiendo el orden establecido en la planilla de prueba. También se pueden prediluir las muestras problema en una placa auxiliar virgen (sin sensibilizar) colocando CIENTO NOVENTA (190) ul de diluyente de muestras/conjugado en los pocillos de las muestras problema, respetando las posiciones definidas en la planilla de prueba y adicionar DIEZ (10) ul de muestra por pocillo. Homogeneizar las diluciones. Transferir CIEN (100) ul de las muestras prediluidas a la placa sensibilizada. Los sueros controles no son prediluidos.

- Sellar la placa e incubar a TREINTA Y SIETE GRADOS CENTIGRADOS (37° C) MAS MENOS UN GRADO CENTIGRADO (+/- 1° C), durante TREINTA (30) minutos MAS MENOS TRES (+/- 3) minutos.

- Antes de finalizar la etapa de incubación de las muestras prepara el conjugado diluido según Tabla II.

Lavado:

- Lavar la placa SEIS (6) veces, en TRES (3) ciclos dobles; concluido el mismo se elimina el resto de solución golpeando la placa invertida sobre papel secante.

Incubación del Conjugado:

- Adicionar CIEN (100) ul de conjugado diluido por pocillo. Sellar la placa e incubar a TREINTA Y SIETE GRADOS CENTIGRADOS (37° C) MAS MENOS UN GRADO CENTIGRADO (+/- 1° C), durante TREINTA (30) minutos MAS MENOS TRES (+/- 3) minutos.

Antes de finalizar la etapa de incubación del conjugado preparar el sustrato cromógeno según lo indicado en la Tabla II.

Lavado:

- Proceder del modo indicado en la etapa anterior del lavado.

Incubación del Sustrato-cromógeno:

- Adicionar CIEN (100) ul de sustrato-cromógeno diluido a cada pocillo, e incubar a temperatura ambiente durante QUINCE (15) minutos.

- Adicionar CIEN (100) ul de solución bloqueadora a cada pocillo.

Lectura de la placa:

- Debe ser realizada en un plazo máximo de TREINTA (30) minutos después de la adición de la solución bloqueadora. Leer con filtro de CUATROCIENTOS CINCUENTA (450) nm.

TABLA II: Preparación del conjugado y sustrato en función del número de placas.

Número de Placas	Diluyente Muestra-conjug.	Conjugado 100x	Diluyente de Sustrato	Sustrato 100x
1	11 ml.	100 ul.	11 ml.	110 ul.

2	22 ml.	220 ul.	22 ml.	220 ul.
3	32 ml.	320 ul.	32 ml.	320 ul.
4	42 ml.	420 ul.	42 ml.	420 ul.
5	52 ml.	520 ul.	52 ml.	520 ul.

D- Cálculo de los resultados

1. Criterio de aceptación de la prueba.

La prueba será válida solamente si los sueros controles cumplen los requisitos a seguir.

- Control negativo: El valor de absorbancia de cada una de las réplicas de este control debe ser inferior a CERO COMA UNO (0,1). Si cumple calcular la media.

Control Padrón 1 (CP1): El valor de absorbancia de cada una de las réplicas de este control, luego de sustraer el valor de absorbancia de la media del control negativo (CN), debe ser superior a CERO COMA QUINCE (0,15). Si sólo una de las réplicas está fuera de rango, podrá ser desconsiderada, calculando la media con los otros DOS (2) valores. Si los valores son aceptables, calcular la media y luego restarle la media del control negativo. Control Padrón 2 (CP2): Sustraer del valor de absorbancia de cada réplica el valor de la media del control negativo. Calcular la media. La relación CP2/CP1 deberá ser igual a DOS COMA UNO (2,1) con una variación máxima de MAS MENOS VEINTICINCO POR CIENTO (+/- 25 %).

De no cumplir con los requisitos detallados la prueba deberá ser considerada inválida y deberá ser repetida.

2. Cálculo del valor de corte (cut-off): Se recomienda como valor de corte (cut-off) para el análisis de los resultados el valor de la media de la absorbancia obtenida para el suero Control Padrón 1 (CP1).

3. Análisis de resultados: Expresar los resultados en relación al suero Control Padrón 1 (CP1) como:

$$T/C = (\text{Abs. del suero en análisis} - \text{media Abs. CN}) / (\text{media de Abs. de CP1} - \text{media Abs. CN}).$$

La muestra deberá ser considerada:

- No reactiva para valores de $T/C < 0,8$.
- Inconclusiva o sospechosa para valores de $0,8 < T/C < 1$.
- Reactiva para valores de $T/C > 1$.

4. Control de calidad interno: Es aconsejable controlar el desempeño de la ejecución de la prueba a lo largo del tiempo en las condiciones locales usando un panel conocido de sueros controles preparados en el propio laboratorio.



EITB

Prueba de western blot confirmatoria de los resultados positivos y sospechosos por I ELISA 3 ABC. Kit por PANAFTOSA.

Reactivos suministrados en el Kit.

- Buffer lavado 10x concentrado.
- Diluyente Sustrato.
- Tiras sensibilizadas NC.
- Suero Control Negativo (CN).
- Suero Control Padrón 1 (CP1).
- Suero Control Padrón 2 (CP2).
- Escherichia coli.
- Leche en polvo descremada.
- Conjugado 100x concentrado (anti IgG bovino conjugado con Fosfatasa Alcalina).
- NBT (Nitro Blue Tetrazolium).
- BCIP (4) 5-Bromo 4-Chloro 3-Indolyl Phosphate.

Referencia de los sueros controles:

Control Negativo: sin anticuerpos contra el virus de la Fiebre Aftosa.

Control Padrón 1: con bajo título de anticuerpos contra las proteínas 3 ABC, 3D, 2C, 3B, y 3A del VFA. Padrón Validado contra un estándar primario que corresponde al suero de un animal a SETECIENTOS CATORCE (714) dpi. experimental y del cual no se recuperaba virus del LEF desde los TRESCIENTOS VEINTICOCHO (328) dpi., la reactividad de este suero equivale a la máxima reactividad de fondo observada individualmente para cada uno de los CINCO (5) antígenos en animales no vacunados en regiones libres de Fiebre Aftosa.

Suero Control Padrón 2: suero bovino con título medio de anticuerpos contra las proteínas 3ABC, 3D, 2C, 3B y 3A del VFA. Padrón validado contra un standard primario que corresponde al suero de un animal no vacunado a SETECIENTOS CATORCE (714) dpi. Experimental y del cual se recuperaba ocasionalmente virus del LEF. La reactividad de este suero equivale a las mayores reactividades observadas para los CINCO (5) antígenos en regiones de muy bajo riesgo epidemiológico -TRES (3) años después del último brote-.

Test Inmunoenzimática de electrotransferencia en Blot

Ensayo

Saturación de las tiras:

- Colocar el número de tiras necesarias para la reacción en las canaletas de las bandejas usando pinza plástica. Adicionar CERO COMA OCHO (0,8) mililitros de buffer de saturación en cada canaleta, verificar que las tiras queden bien sumergidas y con la numeración visible.
- Colocar las bandejas sobre el agitador y dejar incubando durante TREINTA (30) minutos a temperatura ambiente. La velocidad del agitador debe ser de SEIS (6) movimientos oscilatorios/minuto. Esta misma velocidad debe ser mantenida durante toda la prueba.

Incubación de las Muestras:

- Adicionar a los CERO COMA OCHO (0,8) mililitros de buffer de saturación CUATRO (4) ul de la muestra a analizar o suero control -dilución final UNO EN DOSCIENTOS (1:200)- de acuerdo al orden establecido en el protocolo de prueba.

- Incubar con agitación durante SESENTA (60) minutos a temperatura ambiente. Verificar que el lado numerado de la tira esté visible.

Lavado: Concluida la etapa de incubación de las muestras, eliminar el buffer de saturación inclinando la bandeja, evitando traspase líquido de una canaleta hacia otra. Invertiendo la bandeja secarla muy bien sobre papel toalla. Lavar las canaletas y tiras con abundante buffer de lavado 1x usando una piceta. Secar las bandejas con papel toalla. Adicionar a continuación UN (1) mililitro de buffer de lavado 1x por canaleta y dejar agitando durante CINCO (5) minutos a temperatura ambiente. Repetir DOS (2) veces este último procedimiento de lavado. Luego del último lavado secar muy bien las bandejas golpeándolas invertidas sobre papel toalla.

Incubación del Conjugado:

- DOS (2) minutos antes de finalizar la etapa de lavado diluir el conjugado según lo indicado en la Tabla I y aplicar CERO COMA SEIS (0,6) mililitros por canaleta.

- Incubar con agitación durante SESENTA (60) minutos a temperatura ambiente.

Lavado: proceder del modo indicado en etapa anterior.

Incubación del Sustrato-cromógeno:

- DOS (2) minutos antes de finalizar la etapa de lavado preparar el sustrato –cromógeno (NBT/BCIP) según lo indicado en la Tabla I, adicionando primero el NBT al Buffer sustrato y luego el BCIP.

- Aplicar CERO COMA CINCO (0,5) mililitros por canaleta e incubar con agitación a temperatura ambiente hasta que la tira del CP1 desarrolle CINCO (5) bandas visibles, aproximadamente QUINCE (15) minutos.

Detención de la Prueba:

- Descartar el sustrato-cromógeno y lavar las tiras con abundante agua. Por último secar bien las bandejas invirtiéndolas y golpeándolas sobre papel toalla.

- Dejar secar las tiras y pegarlas en el protocolo de resultados con cinta adhesiva transparente.

Interpretación de los resultados:

1. Criterios de validación de la prueba

La prueba será válida cuando los sueros controles presenten los siguientes resultados:

- Control negativo (CN): no debe presentar banda de reacción para ninguno de los CINCO (5) antígenos o estas deben ser apenas apreciables.

- Control Padrón 1 (CP1): debe presentar bandas muy tenues y de intensidad homogénea para cada UNO (1) de los CINCO (5) antígenos.

- Control Padrón 2 (CP2): debe presentar bandas muy visibles para cada uno de los CINCO (5) antígenos con intensidades superiores a las del CP1.

Cuando los sueros controles satisfagan las condiciones detalladas la prueba podrá ser considerada válida y se podrá proceder al análisis de los resultados. En caso contrario la prueba deberá ser considerada inválida y deberá ser repetida.

2. Análisis de los resultados.

La reactividad de cada suero deberá ser analizada por comparación con la reactividad del suero

control CP1 del mismo gel corrido en la misma prueba, evaluando comparativamente la intensidad de cada UNA (1) de las CINCO (5) bandas.

La muestra deberá ser considerada no reactiva si se observa alguna de estas condiciones:

- Ausencia total de reacción para los CINCO (5) antígenos; o
- reactividad con intensidad menor a la de la banda correspondiente del CP1 para cada UNO (1) de los CINCO (5) antígenos, individualmente o en conjunto; o
- reactividad igual o mayor a la de la banda correspondiente del CP1 para un máximo de DOS (2) antígenos simultáneamente.

La muestra deberá ser considerada reactiva si se observa:

- Reactividad para 3 ABC, 3D,3B, 3A, (+/-2C) con intensidad igual o superior a la de la banda correspondiente al suero control CP1.

El resultado deberá ser considerado indeterminado:

- Cuando el padrón de bandas obtenido no se ajuste a los parámetros definidos para muestras reactivas o no reactivas.

3. Consideraciones Metodológicas:

Esta prueba diagnóstica está basada en la detección de anticuerpos. Debe tenerse en cuenta que la presencia de los mismos no necesariamente indica presencia del virus ya que puede estar reflejando también infección pasada (memoria inmunológica). Asimismo, es importante resaltar que existe un intervalo temporal entre la exposición al virus y la formación de anticuerpos contra el mismo. Pruebas realizadas con el EITB en animales experimentalmente infectados permitieron establecer que el proceso de seroconversión puede detectarse a partir de los SIETE (7) DPI.

TABLA N° 1

Número de Muestras	Buffer De Saturación	Conjugado 100 x	Diluyente de sustrato	NBT	BCIP
1gel: 25 muestras + 4 sueros controles	18,5 ml	185 ul	15,5 ml	110 ul	55 ul
2 geles 50 muestras + 8 sueros controles	36 ml	360 ul	31 ml	220 ul	110 ul
3 geles 75 muestras + 12 sueros controles	54 ml	540 ul	45 ml	320 ul	160 ul

ANEXO IV

SENSORES DE FRIO

1. Toda caja de transporte de vacuna (Unidad de Venta) que contenga frascos de vacunas antiaftosa y que hayan sido autorizadas para su uso y comercialización deberán incorporar

obligatoriamente para su despacho hacia los lugares habilitados, según lo establecido en los planes de control y erradicación de Fiebre Aftosa, un sensor térmico para garantizar que el producto no ha superado los QUINCE GRADOS CENTIGRADOS (15° C), generando una señal visible e irreversible que no desaparezca aunque la temperatura posterior a la misma haya descendido.

2. Los sensores térmicos deberán ser adheridos en la pared interior lateral longitudinal en contacto con las vacunas y en un lugar que permita una rápida visualización de su estado, una vez retirados los refrigerantes por parte del receptor.

3. Todos los despachos deberán consignar el día y la hora en que se incorpora el sensor que se tomarán como las del inicio del despacho.

4. En ningún caso el tiempo de traslado de los despachos de vacunas antiaftosa podrán ser superior a las SETENTA Y DOS (72) horas desde su inicio hasta el momento de la recepción.

5. Todas las cajas que transporten vacunas (unidades de venta) deberán incluir adosado en el exterior de las mismas un instructivo sobre las características de los sensores y su interpretación.