

Recopilación sobre vacuna Anti-aftosa

ELADIO JARAMILLO MORALES

Médico-Veterinario

INTRODUCCION

El siguiente trabajo tiene por objeto principal el de ilustrar a los colegas sobre la historia, métodos de preparación y control de la vacuna anti-aftosa, producto que juega un papel preponderante en la campaña que en la actualidad adelanta en Colombia el Ministerio de Agricultura y Ganadería por un grupo selecto de Veterinarios, en una larga y costosa campaña que cubre todo el territorio nacional y en la cual van ya invertidos muchos millones de pesos; el Ministerio de Agricultura y Ganadería se empeña en el control y erradicación de la fiebre aftosa siguiendo los métodos de vacunación de la población bovina y otras especies menores además de control de movilización y desinfección de áreas infectadas.

Las anotaciones siguientes, más que una enumeración de técnicas de laboratorio es una recopilación de datos y observaciones obtenidas en varios institutos europeos. También se incluye aquí una serie de traducciones de trabajos esparcidos en la literatura científica sobre vacuna antiaftosa, como también sobre técnicas seguidas en diversos Institutos especializados en la producción de dicha vacuna.

Sea ésta la oportunidad para presentar mis agradecimientos a las Entidades y personas que en una u otra forma colaboraron directa o indirectamente para la realización de la siguiente recopilación.

El trabajo comprende tres partes a saber:

Primera parte

- I Historia.
- II Composición del producto.
 - a) de la vacuna natural.
 - b) de la vacuna cultivada sobre epitelio lingual.
 - c) de la vacuna cultivada sobre célula renal.
- III Dosis de empleo del producto.
 - a) dosis de la vacuna subcutánea.
 - b) dosis vacuna intradérmica.
 - c) vacunas mono bi y trivalentes.
- IV Métodos de preparación de los varios componentes.
 - a) del hidróxido de aluminio.
 - b) de la solución de glicocla y soda.
 - c) del virus de extracción natural.
 - d) del virus de extracción cultivado en epitelio.
 - e) de la solución de formalina.
 - f) de los antibióticos.

PRIMERA PARTE

I

Historia

Antes del preludeo de la Virología, muchas fueron las tentativas de preparar una vacuna anti-afosa. Fue sólo en 1935 que S. Schmidt e Coll prepararon una vacuna formolada, adsorbida en hidróxido de aluminio, con la que alcanzaron a conferir a los animales vacunados, una inmunidad sólida y de aceptable duración. Estos autores, llegaron a producir esta vacuna, basándose en las investigaciones y experiencias de investigadores precedentes, fue así que, al respecto de la inactivación por el formol, se refieren al trabajo de Vellée, Carré y Rinjard (1925-1926) que agregando de 0,2 a 0,5% de formalina al virus aftoso (como Ramón había hecho con su anatoxina diftérica), alistaron una vacuna que daba una sólida inmunidad, pero de breve duración. Los trabajos de Bedson, Maitland y Barbury (1927), Maitland (1928), Gibbs (1931), fijaron la porcentualidad de la formalina al 0,1%. Al respecto del Hidróxido de Aluminio, se basaron en la experiencia que habían aportado Schmidt en (1931-1935) al agregar el gel de aluminio como absorbente y adyuvante en la anatoxina diftérica. Es, gracias a este sistema que se resolvió el problema de la duración de la inmunidad.

La vacuna de Schmidt y Coll, constaba de una solución viral formolada y tamponada, atenuada por medio del calor a 26°C. por 48 horas que se hacía adsorber en hidróxido de aluminio.

Waldman y Kobe, poco tiempo después y con el fin de prolongar la inmunidad conferida de tal vacuna, modificaron la técnica de preparación, haciendo absorber, primeramente el virus del gel de aluminio, tratando después el absorbido con el formol o poniéndolo al efecto de la temperatura (26° por 48 horas). Estos autores llegaron así a obtener una menor atenuación del virus y por consiguiente un mayor poder antigénico.

En 1941 estos autores, comunicaron la composición de su vacuna bivalente constituida así:

Virus	0.4 %
Formol al 40%	0.05%
Gel de hidróxido de aluminio (2% Al_2O_3)	50 %
Diferentes líquidos de lavado y extracción	50 %

El pH se ajustaba a 9, antes de la atenuación por el calor. La dosis de esta vacuna era fijada a 60 c.c. para un animal adulto.

Muchos investigadores, modificaron la técnica descrita, para disminuir la porcentualidad de virus y para reducir el costo de la vacuna; al mismo tiempo se variaron las concentraciones de los demás componentes de la vacuna, con la mira de reducir la dosis y facilitar su empleo en la práctica.

En la Conferencia Internacional para la Fiebre Aftosa, reunida en Berna en 1947 fue tomada la decisión de producir la vacuna bivalente con un porcentaje de virus de al menos 0.66%, y reducir la dosis para un bovino adulto a 30 c.c.

En estos últimos años, con la aparición de nuevas variantes del tipo de escaso poder antigénico, ha obligado

a los Institutos preparadores a aumentar de nuevo la porcentual, en general del 1% para cada tipo de virus contenido en la vacuna.

En la mayoría de los países, se practica la vacunación con vacuna preparada por el método de Schmidt-Waldman-Kobe y se fabrica por los Institutos especializados. **Instituto Experimental Zooprofiláctico de Sicilia. Italo Nobili. La vacuna antiáfosa página 25.**

Definición simplificada de las vacunas utilizadas en la Fiebre Aftosa

Las vacunas utilizadas en Europa, pueden ser agrupadas en 3 grupos característicos, por los orígenes de los virus aftosos que son la base de su preparación.

Para más comodidad, se designan por sus nombres más precisos:

"Vacuna Waldman" o del tipo Waldman aún llamada Schmidt-Waldman y Vallée-Schmidt-Waldman, que es preparada a partir del virus natural, recogido de las aftas linguales de animales vivos.

La Vacuna "Frenkel" utiliza virus de cultivo multiplicado sobre epitelio de lenguas de bovinos sacrificados.

La "Vacuna Belin" preparada a partir de virus cultivados sobre la piel de bovinos en presencia de virus de la vacuna, es llamada también **complejo vacuno-aftas.**

La vacuna tipo "Waldman" es la más repartida y se fabrica en 12 países europeos, ya sea en Institutos del Estado, o en Institutos privados, más o menos subvencionados por los gobiernos respectivos. Los detalles de

preparación de las diferentes vacunas, han estado discutidos en las conferencias organizadas por la Oficina Central de Epizootías para los problemas de la inmunización anti-aftosa.

Las normas de preparación definidas por la O.I.E. no siguen, según los Institutos, algunas modificaciones de detalle. En las vacunas constituidas por una mezcla: virus, hidróxido de Aluminio, formol, las dosis mínimas de virus son siempre respetadas; ellas son a veces sobrepasadas, cuando se utiliza al lado de virus natural, virus de cultivo, sin embargo en Padova, Italia, se substituye el hidróxido de aluminio por bentonita, en Turín, una vacuna concentrada permite una dosis menor que la vacuna ordinaria, en Dinamarca se agrega Glicocola, en Hungría se prepara al lado de la vacuna clásica, una vacuna concentrada para inyección intradérmica. En fin, las proporciones de formol pueden variar ligeramente, así como el tiempo de duración de la inactivación por el calor que se hace en general a 25 grados C.

Las vacunas tipo Waldman a base de virus recogidos en animales vivos, son preparadas en Alemania, en Bélgica, en Dinamarca, en Francia, en Hungría, en Italia, en Suiza, en Checoslovaquia, en Yugoslavia y a título experimental en Polonia. De esos países es exportada a Austria, Finlandia, Grecia, Luxemburgo, Rumania y Suecia. La Gran Bretaña, Irlanda y Noruega prohíben las vacunaciones anti-aftosas en sus territorios.

La vacuna dicha según el método de "Frenkel" utiliza el virus de cultivo multiplicado en epitelio lingual y tratados según los mismos principios

fundamentales que los virus naturales, ella es preparada en los Países Bajos, donde es sólo utilizada, en Yugoslavia, en Francia, en Bélgica, será fabricada en Austria cuando se haya terminado el Instituto Federal para la lucha contra las enfermedades a virus, es experimentada en Italia.

El Portugal importa de los Países Bajos la cantidad de vacuna que le es necesario, Austria, Grecia, Luxemburgo, Finlandia, son también importadores según las necesidades de "vacuna Frenkel".

La vacuna según el método de Berlin, conocido después de 1925, con el nombre de Complejo vacuna-antiaftosa, es el más antiguo. Es hoy preparado como los 2 anteriores y utiliza el hidróxido de aluminio, el formol y el calor. Solo se fabrica en Francia donde los Veterinarios y los servicios oficiales lo emplean en las mismas condiciones que las vacunas "Waldman" y "Frenkel".

Estas tres clases de vacunas son fabricadas a partir de tipos de virus conocidos hasta hoy en Europa: O—A y C, o más exactamente a partir de ciertas variantes de esos tipos tenidas en razón de sus cualidades antigénicas. Las vacunas distribuidas son monovalentes, divalentes o trivalentes, las tres monovalentes son preparadas en Alemania, Francia, Hungría, en Yugoslavia por la vacuna de Waldman; en los Países Bajos y en Yugoslavia para la vacuna Frenkel; Italia, Suiza, preparan una monovalente C (hoy en Italia Bivalente).

La vacuna bivalente O A según Waldman es preparada en Alemania, en Dinamarca, en Francia, en Hungría, en Italia, en Suiza, etc.

Las vacunas trivalentes son frabricadas en Alemania, según Schmidt-Waldman, en Francia, según el método de Belin, y en Bélgica donde entran en el mismo producto, un virus O de cultura, un virus A natural y un virus C natural o de cultura. La vacunación bajo la forma bivalente es la más empleada (O y A). Las vacunas monovalentes solo son utilizadas cuando se quiere completar una vacunación bivalente, cuando algún tiempo después, un tipo de virus es descubierto en el territorio infectado. Sin embargo los 3 tipos de virus, se encuentran además en más frecuentemente lado a lado en el curso de una misma epizootia, las vacunaciones trivalentes, tienden a repartirse, ellas utilizan, sea una vacuna bivalente, OA y una monovalente C o 3 monovalentes como en los Países Bajos. Accidentalmente en Alemania y regularmente en Bélgica una vacuna trivalente es empleada.

Medidas Generales y Profilaxia

En todos los países europeos las medidas generales de profilaxia contra la fiebre aftosa, que se relatan en los textos de ley que datan generalmente desde el fin del siglo pasado, son más o menos idénticos.

Siempre actuales, ellos son tomados por la Convención Sanitaria Internacional elaborada en febrero de 1955 bajo la regencia de la Oficina Internacional de Epizootias y que ha sido seguido por un gran número de países donde se opera en rigor.

Declaración obligatoria e inmediata de todos los casos confirmados o simplemente sospechosos. Secuestro de

la explotación, desinfección, establecimiento de una zona de protección al lado del foco. Prohibición del comercio de los animales vivos, reglamentación de la circulación de los animales, de los subproductos animales, de personas, etc., etc. La demora mínima que debe correr entre la desaparición del último caso de la enfermedad y el levantamiento de la prohibición y de la reglamentación es fijada a 15 días.

Después de la aparición de vacunas, y de su utilización en la práctica, hace unos 15 años, no habiendo que modificar en la policía veterinaria, oficial, ciertos países han orientado la profilaxia hacia las nuevas direcciones con el fin de eliminar de una vez por todas el Afta de sus territorios, a lo cual no habían soñado tentar, contentándose en combatir, tanto bien como mal, los focos o brotes declarados, sin impedir a la epizootia de continuar su evolución a través de las barreras policivas interiores y de las barreras entre los países.

Después de 10 años de experiencia de vacunación contra la fiebre aftosa, en el curso de los cuales Europa ha sufrido 2 epidemias graves y prolongadas por las de antes de la guerra, se ha llegado a saber que la vacunación, por eficaz que ella sea, no trae la solución, y que los países que han logrado preservarse mejor, son aquellos que han tenido la posibilidad, con o sin vacunación, practicar el sistema de matanza de los enfermos y contaminados de un foco de infección presentado.

La Convención Sanitaria Internacional, define las reglas a adoptar en materia para los países adherentes.

En las explotaciones invadidas:

1.—Secuestro de la Explotación.

2.—Sacrificio de todos los animales receptivos, en todos los casos donde esta medida podría conducir a la erradicación de la enfermedad, notoriamente cuando los primeros brotes aparecen en un país indemne o va a terminarse una epizootia.

3.—Desinfección, etc.

En lo tocante a la vacunación.

En los países utilizando la matanza y la vacunación, esto es aplicable en la zona de protección. La vacuna deberá responder a las normas definidas por la Oficina Internacional de Epizootias.

1.—El método de sacrificio es solo admitido en práctica en Gran Bretaña, Irlanda, Noruega, Finlandia.

2.—La vacunación es aplicada junto con las medidas Sanitarias pero sin sacrificio en Bélgica, España, Francia, Grecia, Italia y Luxemburgo.

3.—El sacrificio y la vacunación son conjuntamente adoptados con la policía veterinaria en Dinamarca, Austria, Hungría, Países Bajos, Polonia, Rumania, Suecia, Suiza, Checoslovaquia y Yugoslavia.

La Fiebre Aftosa en América

Se sabe que en América del Norte y en el Canadá, la Fiebre Aftosa no existe, en Estados Unidos, se conoció una enzootia en 1951, este país era indemne desde 1929. La enfermedad no ha estado declarada en los países de la América Central, sin embargo en la frontera sur de los EE.UU., Méxi-

co, a partir de diciembre de 1946 ha sufrido una grave epidemia y diez años después su territorio es siempre considerado infectado.

En suma, casi todos los países de la **América del Sur** son actualmente más o menos atacados, o lo han estado en el curso de los últimos años. Con México ellos practican la vacunación Anti-Aftosa. Los tipos de Virus encontrados son aquellos del continente europeo O A más frecuentes que el C. El diagnóstico diferencial, con la estomatitis vesiculosa debe ser efectuada cada vez que se encuentren casos sospechosos en una región antes indemne de Fiebre Aftosa.

En **Argentina**, la vacunación se efectúa en gran escala, la vacuna es preparada por 15 laboratorios privados, controlados por el Instituto Nacional. Se utiliza generalmente una vacuna trivalente concentrada, en inyección intradérmica al nivel del cuello y en dosis de 2 c.c.

En **Colombia** la vacuna es preparada a partir de virus cultura según el método de Frenkel. Es inoculada subcutáneamente y en dosis de 5 c.c. para los bovinos de menos de 6 meses, 10 c.c. para los bovinos de más edad y de 5 c.c. para los ovinos, caprinos y cerdos. El tiempo necesario para establecer la inmunidad es de 15 días a 20 días, la duración de la inmunidad varía de 4 a 8 meses.

En **Venezuela**, se preparan vacunas monovalentes del tipo O y A y una bivalente OA, utilizadas siguiendo las necesidades, después de determinar los tipos de virus en causa en la zona a vacunar. La vacuna monovalente A solo es empleada en una zona reducida, la monovalente O por todas partes. Sobre la frontera colombiana se

practica una vacunación bivalente O A.

La vacuna es introducida en el espesor de la piel en una dosis de 2 c.c. se repite al cabo de 4 a 6 meses, tiempo de duración de la inmunidad. El Brasil, Chile, México, Paraguay, Perú y Uruguay, practican igualmente la vacunación.

En México cuando se confirmó los primeros casos de Fiebre Aftosa, en enero de 1946, la lucha fue conducida por la aplicación del "Stamping out", con la colaboración técnica y la ayuda financiera de los Estados Unidos, después se organiza la vacunación generalizada de animales receptivos de las zonas prohibidas. Más de 40.000 habían sido efectuadas en 1949. La vacuna producida en México según Waldman, era un monovalente A, correspondiente a un solo tipo aislado en las zonas infectadas. Los animales son inoculados por vía intradérmica con una dosis de 2 c.c. la duración de la inmunidad no parece ser superior a 120 días.

Las medidas sanitarias en la América, son iguales a las que se ponen en rigor en Europa. El Canadá y los Estados Unidos por largo tiempo indemnes, han previsto la aplicación inmediata del "Stamping Out", desde la aparición de la enfermedad.

Los países considerados como habitualmente infectados, México, Venezuela, Antillas Holandesas, asocian la matanza a la vacunación.

La Policía Sanitaria en las fronteras es severa en los países que se consideran indemnes. La importación de animales vivos es prácticamente prohibida por los EE. UU. y el Canadá; los productos animales y el material contaminado con virus aftoso, paja y

empaques, son sometidos a un control riguroso. En Canadá se atribuye a emigrantes agricultores, su última epizootia.

(Tomado del Bulletin de L'Office International des Epizooties) Mayo 1957 Como XLVIII. — Compté rendu de lavingi-cinquieme session du comité de Office. Página 74-94.

LA VACUNA ANTI-AFTOSA DE SCHMIDT

Sobre la preparación de la vacuna Anti-Aftosa-Maaned-sskrnit for Dyrlæger 52, 1941, pp. 601-623) - (Bull. Off. Int. Epiz. XX 1941 p. 283).

En 1938 en la Isla de Lindhon ha estado terminado un laboratorio para la preparación de la vacuna anti-aftosa. Se utilizó la técnica de Waldman e Kocbe para la infección de los bovinos que vienen sacrificados 24 horas después de la infección. Las paredes de las vesículas han dado una media de 44 gramos de epitelio, (en vez de 30 de Waldman).

El material así obtenido es molido y adicionado de 7 a 8 veces su peso en agua destilada. Su homogenización es obtenida bajo presión a 200 atmósferas, que son necesarias para desintegrar la célula.

La parte sólida es eliminada mediante varias centrifugaciones con una supercentrífuga a 50.000 revoluciones. La suspensión virulenta, libre de células es portada a un P H 8,5 y pasada por un filtro Seitz EK.

Cada semana se preparan 4.000 a 5.000 litros de vacuna que son 150.000 dosis, (las dosis de Schmidt eran de 30 c.c. y no de 60 como aquellas de Waldman). La suspensión virulenta es

alcalinizada con una solución Tampón gliceranzada, sódica (glicerina a partes 900, agua a 100 partes). Los recipientes son mantenidos a 25 grados Centígrados (capacidad 300 Lts.) después se añade el hidróxido y después el formol. La vacuna es calentada en esos recipientes por 36 horas solamente (y no 48 horas como hace Waldman) porque el virus es inofensivo después de 24 horas.

La vacuna monovalente contiene 0,7% de virus y la vacuna bivalente 1,4%. El tenor en formol es de 0,05 y del 0,1%. La vacuna es conservada a + 3 grados C.

Para la prueba de inocuidad de la vacuna, se inocula, de cada preparación 3 vacas con 60 c.c. o sea 3 veces la dosis normal (**dosis declarada de 20 c.c.**).

Vacuna Original de Waldman

Willstatter ha empleado por primera vez el hidróxido de aluminio para adsorber los enzimas.

Con este objeto, ha hecho primero que toda una serie de trabajos para fijar el método de la preparación del hidróxido y para fijar la modificación espontánea de muchos tipos de hidróxido que se distinguen no solo por su propiedad química sino por su poder absorbente.

Willstatter ha comenzado su experiencia sobre la enzima en torno al 1920 (estos trabajos son mencionados en el artículo B.S. Schmidt Archiv. F. Virusforschung 1,215, 1939).

Del resumen de las investigaciones, resulta que con la absorción se pueden obtener las siguientes modificaciones de un virus:

Un virus del todo infectante, pierde su infectividad sin perder sus propiedades antigénicas (esto se verifica en cualquier caso -poliomielitis, leucosis del pollo) hasta fines de octubre de 1938 Waldmann ha preparado y distribuido vacuna monovalente, después vacuna bivalente y algunas veces trivalentes. A causa de las variaciones constatadas un mismo tipo de virus (cepa) servía a Waldmann para la producción de vacuna por un período no más de dos meses.

En el afta primaria, el virus posee la más grande virulencia y la infectividad de 20 a 24 horas después de la infección.

Preparación del virus para la producción de la vacuna

Todos los aparatos y el agua destilada son mantenidos a $+1^{\circ}\text{C}$. el material virulento es pesado, despedazado en una máquina de moler carne y puesto en un recipiente mezclador a paletas empleado en las carnicerías. Después de 20 minutos se obtiene una masa cremosa homogénea que viene diluida en 5 veces su peso de agua destilada y después colada en un cedazo. La pasta que queda se pone a agitar de nuevo con igual cantidad de agua, una segunda vez y después una tercera. Se obtiene así 15 veces el peso del virus bajo forma de un líquido turbido que antes es centrifugado y después filtrado a través de Seitz EK. esterilizante.

El número de filtros es tal que para 7 litros de líquido de filtrar se emplean 2 extractos K y EK de 30 cms. de diámetro. El filtrado es recogido en recipientes provistos de un nivel de

agua estéril. (Esto constituye el primer filtrado).

Se ha demostrado que queda en el filtro una cantidad considerable de virus que se puede recuperar con un lavado con solución apropiada, (líquido de Hartley o tampón). Actualmente nosotros empleamos con suceso la solución fosfática tamponizada de concentración M/180 de Sorensen, de un pH 7,6 representando la solución madre (como líquido de lavado).

Mezcla y preparación de la vacuna

Suspensión de Hidróxido de aluminio	50 %
Agua agregada (hidróxido y agua forman la mezcla	30.2 %
Primer filtrado (1)	3.56%
Líquido de lavado (1)	14.2 %
Tampón	1 %
Agua formalada a: 1% de formalina Schering..	1 %

La titulación, efectuadas repetidamente con inoculaciones en la lengua han demostrado que el virus fresco, recogido de bovinos da en una suspensión de 1:25 un título medio de 1:1.000.000 y no inferior a 1:100.000. La preparación de una dosis de vacuna de 60 c.c. exige, como media 7.000.000 de dosis infectantes.

En el mezclador autoclave se pone la noche anterior el hidróxido y el agua añadida, lo que constituye la **mezcla** y se esteriliza por una hora a 120°C .

(1) El material infectante de partida (virus) en las proporciones del 0.24 por ciento para la vacuna monovalente y del 0.40% para las vacunas bivalentes.

Se enfría la mezcla a 20°C. y después se aspira la solución tampón. Se pone en movimiento el agitador que puede ser automáticamente parado cada 20 rotaciones.

Solo en este momento, se comienza a aspirar el virus filtrado (primero filtrado y líquido de lavado), después se agrega el agua de formol. Después de una media hora la vacuna puede ser embotellada. Los frascos se tienen por 48 horas en un ambiente a 25°C. para obtener la inactivación del virus. Después son mantenidos en frigorífico a +3°C.

Exámenes Químicos.

Sean los productos químicos como las soluciones que entran en la composición de la vacuna son naturalmente controladas antes del uso. Aunque, la vacuna terminada, exija un último control antes de ser dado a la venta del público.

Para el hidróxido de Aluminio

- a) Porcentual de óxido de aluminio que debe ser del 2%; esta se hace por medio de pruebas gravimétricas en cápsula de porcelana porosa.
- b) Prueba de sedimentación 5 c.c. de Hidróxido en 20 c.c. de agua destilada son mezclados en un cilindro graduado de 25 c.c. (diámetro 17 mm., altura marcada 100 mm.) El volumen de sedimentación debe de ser de al menos de 5 c.c. después de 24 horas.
- c) El poder adsorbente se averigua con una solución de 70 c.c. de rojo congo (0,77 gr. por litro), se ponen 4 c.c. de hidróxido y se agita por 30 minutos después se centrifuga. La solución debe ser casi incolora. El reci-

piente con hidróxido debe ser cuidadosamente agitado antes de prelevar la muestra.

Tampón

El tampón es una solución de glicocola y soda de la cual su concentración es tal para asegurar un pH = 9,0 después de agregarle la vacuna en la proporción del 1%.

Composición

- Hidrato de sodio purísimo en forma de plaquetas de pasta... 51 g.
- Cloruro de sodio purísimo... 104 g.
- Glicocola de Sorensen... 158 g.

Se disuelven estas substancias portándolas a 1 litro en recipiente de vidrio de jena y esterilizada a 120 g. C. por 30 minutos. Su PH. debe ser de 10. La medida del contenido salino, es constatada por el refratómetro a inmersión de Seiss, después de la dilusión de una parte de solución con una parte de agua destilada. A la lectura, debe indicar la cifra Nro. 75 en la escala graduada y a la temperatura de 17,5 (prisma de medida L-b).

Agua formolada. — Se toma una cantidad de agua destilada estéril correspondiente al 1% de la cantidad total de vacuna a preparar, o se añade 1 a 2.000 1:2000 del mismo volumen de formalina Shering al 40%. De la formalina concentrada se separan, después de un reposo prolongado, productos de polimerización bajo la forma de pequeños floculados blancos que se pueden evitar si se tiene la formalina a 35 grad. C. Para no po-

ner en la vacuna estos floculados blancos se eliminan por filtración. Su tenor en alcoholado fórmico no es modificado por esta operación.

Control de la formalina. — Se hace en la casa productora por yodimetría, la porcentual, debe corresponder a la indicación de la casa.

Tampón fosfático, control electrométrico del P. H.

Examen de la vacuna preparada

1)—P.H. electrométrico debe ser de 9,0.

2)—Medida refratométrica del contenido de sales del líquido de centrifugación del hidróxido. Debe corresponder a la temperatura de 17,5 grados C. a la cifra de 16,5 de la graduación (prisma de medida I-b).

3)—Porcentaje de formol: la dificultad consiste en la medida en un sistema heterogéneo. Se puede admitir que la proporción de formalina libre y de formalina fijada del hidróxido de aluminio, sea constante y para ello bastará medir el formol libre. Se emplea el método colorimétrico según la técnica modificada de Collins e Hanzlick (*J. of Biol Chem.* 25,231 - 1916) con la solución alcalina de floroglucina: 0,2 gms. de floroglucina, son disueltos con 0,2 gms. de hidrato de sodio puro en 20 c.c. de agua destilada, 10 c.c. de vacuna centrifugada y 100 c.c. de agua destilada son adicionados de 2 c.c. de reactivo a la floroglucina. La coloración es completa después de 6 a 7 minutos y solo después de ese momento, se procede en el colorímetro de B. Lange con lámpara a incandescencia y filtro protector, para evitar el calor, la medida debe ser de 40 - 50%

de luz transmitida absorbida. Según el grado de fijación del formol a la albúmina y al tampón, este valor de absorción disminuye con el tiempo.

Examen biológico de la vacuna, desde el punto de vista de inocuidad del formol y del poder inmunizante.

Prueba de virulencia.

Se emplean solo los bovinos que son los animales más receptivos. Se escogen bovinos de 2 a 3 años, sin aftosa y jamás vacunados. Se emplean 4—6 animales por cada partida de vacuna. Los animales reciben 60 c.c. de vacuna. Si al séptimo día muestran señales de afta, la vacuna no es utilizable. Si los animales controlados se encuentran bien, son portados a un establo contaminado y se infectan, si se muestran altamente receptivos y la búsqueda de gérmenes en la vacuna ha sido negativa, la vacuna puede ser considerada como inocuosa. Si en vez, después de cuatro días los testigos no se enferman, se admite que los animales de este grupo eran resistentes y se comenzará la prueba con otros animales.

Investigación de los gérmenes de contaminación

Se toman de cada partida de vacuna, cinco frascos. Se siembra después de una prolongada agitación, 1 c.c. de cada muestra en tantas probetas de caldo glucosado. Medio c.c. de vacuna de cada muestra viene sembrado en placas de Agar-petri, Agar-sangre, en Gassner y en InKonradi Drigalski. Poner al termostado por cuatro días.

La vacuna no debe contener más de diez gérmenes no patógenos (gérmenes del aire) por c.c.

Prueba de la inmunidad

Los animales para esta prueba son aislados siete días mínimo, a partir del fin de la prueba para el examen de inocuidad de la vacuna (la misma). Son examinadas cada día y cada día se les toma la temperatura a mañana y tarde.

Si aparece el afta en este período, se repite la prueba de inocuidad para el mismo lote de vacuna.

Después de quince días de vacunados, los animales son conducidos a un establo infectado con el tipo de afta correspondiente. La infección es realizada mediante frotamiento sobre la lengua de un pedazo de tejido de lana impregnado de virus. Los animales son siempre en contacto con los demás animales del establo infectado e igual el personal que maneja a unos y a otros. Se examinan los animales dos veces al día, se toma la temperatura. Los animales deben resistir siete días al menos. La vacuna se considera eficaz si al día séptimo todos los controles son chequeados sanos y si el 50% son sanos y los otros solo presentan una ligera enfermedad después de cuatro días.

Si la vacuna no responde a esta prueba, no se debe dar a la venta pública. Se admite repetir la prueba antes de dar por descartada una partida de vacuna definitivamente.

(O. Waldmann, G. Pyl, K. O. Hoborn e H. Möhlmann in L'elaboration de l'adsobat de Riems contre la fevre aphteuse-Bull. Off. Epiz. XX. 1, 2, 1941). (Bull, Int. Epiz. t. XLIX Pág. 84). — Dr.

Tadeusz Kobusiewicz. Instituto Veterinario — Laboratorio de la fiebre aftosa Zdunska Wola Pologne.

La vacuna quinoxolada para la fiebre aftosa.

La producción de la vacuna clásica Vallée-Schmidt-Waldaman, como la aplicación de esta vacuna en la práctica requiere muchos gastos. Se pueden disminuir utilizando el método de Frenkel que permite una multiplicación de virus en los epitelios de lenguas de bovinos adultos sacrificados. Este método es utilizado todo día más y más en los laboratorios productores de vacuna. Los gastos pueden ser disminuídos si se utiliza la preparación de una vacuna concentrada.

Las ventajas de la vacuna característica, según Waldaman, son bien conocidos, pero es preciso señalar algunos apartes negativos.

- a) Durante la preparación de la vacuna hay una pérdida de virus, debido a la incompleta extracción y a la filtración por Seitz.
- b) Las dosis necesarias para establecer la inmunidad es alta, de 30 a 45 c.c. lo que trae dificultades técnicas ya sea en la producción de la vacuna como en su aplicación en la práctica.
- c) La vacuna clásica es sensible a la temperatura y debe ser conservada entre 2 y 7 grad. C. causando así dificultades en el transporte y la aplicación misma.

Pyl y Möhlmann deseosos de obtener una vacuna desprovista de los defectos anteriores han preparado una vacuna que contiene 30% de antígeno (es decir, material virulento)

purificado por el cloroformo y la acetona. Estos reactivos, desnaturalizan las albúminas extrañas sin lesionar el virus de la fiebre aftosa, pero destruye la flora bacteriana. Hoy en la República Democrática Alemana se ha introducido en la práctica la vacuna concentrada al 6% en la vacunación generalizada de todo el efectivo bovino.

Ratner y Gribanow, anunciaron en 1954 la obtención de una vacuna anti-aftosa a partir de antígeno no filtrado, inactivado por el quinoxol y estabilizado por la glicerina. La vacuna ha estado probada sobre 1.000.000 de bovinos, con resultados satisfactorios.

En los Laboratorios de Polonia, se ha obtenido una vacuna que contiene 2% de antígeno no filtrado (del material virulento de cepas del país) 0,1% de quinoxol, 0,05% de formol y 15% de glicerina.

El antígeno que se encuentra en la vacuna, no es filtrado, es solo macerado perfectamente. Este método simplifica notablemente la producción de la vacuna, elimina los gastos en la compra de las centrifugas, el uso de costosos discos para la filtración. La adición de quinoxol y del formol son suficientes para inactivar el virus y destruir la flora bacteriana. La adición de la glicerina, refuerza la resistencia del virus al calor y al frío.

Los ensayos efectuados, hasta hoy demuestran que la vacuna preserva los bovinos contra la infección artificial por 100.000 LD₅₀ durante cinco meses después de la vacunación. Se han hecho experiencias para demostrar que el formol y el quinoxol son suficientes para destruir los gérmenes de la tuberculosis, de la brucelosis y otros que ocasionalmente pueden en-

contrarse en las sustancias empleadas para preparar la vacuna.

Sobre la estabilidad del virus del Afta, dependiente del P. H.

(Axel Randrup-Acta path. et Microbiol. Scand. XXXV, 389).

Estabilidad del agente infeccioso a P. H. comprendido entre 5,5 y 8,5.

En la literatura se menciona un gran número de experimentos sobre la estabilidad de la infectividad del virus de la aftosa, según los diversos valores del P. H.

Muchos resultados obtenidos son de estrecha relación y confirman la curva trazada por Pyl en 1933.

Algunos de estos experimentos han estado continuados con material virulento proveniente de curies. Otros obtienen el material de cerdos y otros no especifican de qué proveniencia era el virus aunque puede pensarse que en todos estos experimentos hayan sido hechos con virus obtenido de curies.

Solo Kofoed y Pyl en 1944 relatan haber trabajado con virus de bovino.

Se relata en seguida un experimento sobre la estabilidad de la infectividad del material virulento proveniente de lenguas de bovino con la adición o sin la adición de hidróxido de Aluminio.

Material y Métodos

Para los experimentos ha estado usada la linfa, más epitelio vesicular de lenguas de bovinos infectados con afta. Este material ha estado macerado con polvo de vidrio y extraído con agua destilada, hasta obtener una sus-

pensión al 10% que ha estado filtrada a través de filtros **Filtrox**. El P.H. medido era de 7,9.

Como tampón ha estado usada la solución de veronal-acetato que cubre un largo campo de P. H.

La estabilidad de la infectividad del virus en una solución tamponada similar ha estado probada a un P. H. 7,6 y a 9,1 y comparado con la estabilidad en solución fosfática molar 1/50 a P. H. 7,6 y con una fuerte solución a la glicocola (tampón) a P. H. 9,1. Estas dos últimas soluciones tampones son usadas en los estudios sobre el virus aftoso.

La infectividad en estos experimentos se demuestra algunas veces más exactitud usando la solución tampón de fosfato que usando la de veronal-acetato y más exacta aún en veronal-acetato que en la detampón a la glicocola.

De otra parte, el tampón al veronal-acetato no ha demostrado especial efecto. inactivador de la infectividad.

Por otra parte, un cierto número de muestras viene preparado con:

Solución tampone al veronal-acetato	36 c.c.
Suspensión de hidróxido de aluminio (o agua destilada)	50 c.c.
Suspensión de virus al 10%.	14 c.c.

La solución tampón al veronal-acetato era combinada en modo de obtener las muestras a P. H. 5-5, 5-6, 5-7, 0-7, 5,8-0- y 8,5. Para cada P. H. una muestra era preparada con hidróxido de aluminio y otra con agua destilada. Todas las muestras eran conservadas al frigorífico 0 grad. C. o máximo a 5 grad. C.

La infectividad de cada muestra era después probada quince minutos después de la preparación en 3 curies.

Las muestras a P. H. 5-5, 5-6, 5-y 8,5 han estado probadas aún después de 1 hora, 2, 5½ y 12½ de la preparación. Después de 24 horas todas las muestras han sido probadas para su infectividad.

Una prueba de infectividad viene hecha más tarde y a un intervalo de cerca del 10% del tiempo transcurrido entre el inicio del experimento y el momento en el cual la prueba de infectividad era hecha. La prueba de infectividad era hecha en una muestra hasta que dos pruebas sucesivas daban resultados completamente negativo (todos los tres curies negativos).

El P. H. de la muestra era controlado a intervalos y ajustado con solución 0,1/N de Na-OH o 0,1/N de HCl si se encontraba el P. H. desviado más de 0,2 del establecido para la muestra.

Las muestras a P. H. 8,5 cambiaron en el curso de los primeros 27 días de P. H. 9,2 a P. H. 8,2. La diferencia entre las dos muestras ha estado en un máximo de 0,4 unidades y una sola medida; a todas las otras medidas, las diferencias fueron inferiores a 0,2 (muestras sin hidróxido). Después de 27 días estas muestras variaron entre 8,45 y 8,70 su P. H. Una muestra sin hidróxido a P. H. 7,6, después de 136 días se alzó de improviso rápidamente y de modo anormal y por esto se eliminó. Las muestras a P. H. 8,0 y 7,5 (con hidróxido) 7,0 y 6,5, mostraron en el curso del experimento solo ligeras desviaciones recíprocas que no superaron jamás 0,25 unidades P. H.

Resultados

En la tabla I han transcrito los resultados de la prueba de infectividad. Se pueden ver los períodos de tiempo en los cuales la prueba ha dado resultados positivos o negativos. Antes y después del inicio de este período de tiempo, al menos uno de los tres curies dieron una reacción primaria a cada prueba de infectividad. Después y a partir del término de este período de tiempo, todos los curies inoculados para la prueba de la infectividad dieron éxito negativo.

Una fila corresponde a la duración de la actividad (habilidad de generalización) estaba narrada pero no se transcribe, esta tabla mostraba la correlación recíproca entre los varios componentes, pero la capacidad de producir generalización, quedaba en cada caso, por un período de tiempo ligeramente más breve que no aquel de producir reacciones primarias.

De otra parte, la titulación de la infectividad era hecha a intervalos. De la muestra hacían diluciones esca-

nadas con base a diez y cada una de estas diluciones se probaba en tres curies.

La dosis letal 50 LD₅₀, era calculada según Reed & Muench y descrita en la tabla II LD₅₀, a varios períodos del inicio del experimento. Las muestras contienen ¼ % de material virulento. L0g. 1,4% = 1,6.

En los resultados de las muestras sin hidróxido de Al. son en estrecha relación con aquellos de Pyl. Pyl no ha definido una estabilidad a P. H. 7,6 pero tal estabilidad está claramente puesta en evidencia en nuestro experimento. El hidróxido de aluminio ha ejercido un efecto estabilizador sobre el lado ácido del P. H. pero no sobre el lado alcalino.

H. GIRARD et C. MACKOWIAK—
La culture du virus aphteux au stade industriel. (Rev. 'Immunol', 1953 t. 17. Pág. 224-235.

Después de haber producido seis millones de dosis de vacuna (virus de cultivo) los autores piensan que de todos los métodos de obtención en grandes cantidades de virus aftoso.

TABLA N° 1

Duración de la infección

P H	DURACION DE LA IFECCION	
	con hidrox de Al.	sin hidrox de Al.
5.0		15 minutos
5.5	15 minutos	
6.5	1 a 8 días	1-2 días
7.0	203-225 días	8-10 días
7.6	259-282 días	136 días
8.0	126-259 días	126-163 días
8.5	17- 28 días	17-37 días

PH.	CON HIDROXIDO DE AL.					SIN HIDROXIDO DE AL.				
	6,5	7,0	7,6	8,0	8,5	6,5	7,0	7,6	8,0	8,5
15 minutos. . .	2.7	4.7	4.7	5.3	4.3	2.6	4.3	4.7	4.3	4.3
6 días							2.3			
14 días			5.0					4.5		
23 días			4.5					4.5		
32 días		4.5	4.5	3.7				3.3	2.7	
39 días		4.0	3.7	3.5				3.7	2.6	
46 días		2.7	3.7	3.3				3.3	2.6	
56 días		3.3	4.5	3.3				3.5	3.0	
65 días		2.6	4.3	3.3				3.5	2.6	
78 días		3.3	4.5	2.7				2.7	2.4	
95 días		3.3	4.5	2.8				3.3	2.5	
126 días		3.0	3.0	2.4				4.0	1.8	
180 días			3.5							

para producir vacunas específicas, los métodos de Frenkel (cultura sobre epitelio lingual de bovinos en supravivencia), representa el mejor procedimiento industrial, a la hora actual y por las tres razones siguientes:

1º—El método de Frenkel es practicado, por la facilidad de recolección el epitelio, su cultivo en grandes cubos, y la adaptación de cepas de virus a ese modo de producción y la obtención de suero ultrafiltrado indispensable para la supravivencia de las células epiteliales.

2º—Es económico porque suprime la necesidad de inocular bovinos al nivel de la lengua, transformando así los laboratorios en mataderos vigilados estrechamente.

3º—No ofrece peligros de contaminación porque la vigilancia de las operaciones es rigurosa y la posibilidad de difusión por las carnes de re-

cuperación (bueyes inoculados) se evita.

Fotografía del Virus Aftoso

El Departamento de Agricultura de Estados Unidos, por un comunicado del 5 de Septiembre de 1957 informa que los investigadores del Laboratorio de Enfermedades Animales de Plum Island, han llegado a aislar y a fotografiar el virus de la fiebre aftosa.

Al microscopio electrónico, el virus aparece bajo la forma de una esfera con un diámetro de una millonésima de pulgada. Es el más pequeño de los virus conocidos de las enfermedades animales, y más pequeño que el virus de la poliomielititis.

Se supone que este conocimiento de la constitución fisiológica del virus debe permitir avanzar las investigaciones y descubrir los nuevos medios de lucha contra la aftosa.

La Fiebre Aftosa Humana

J. M. Lyon, 1952. Nº 784. Pág. 803-806.

El hombre puede contaminarse, sea por contacto del animal, sea por la ingestión de productos contaminados. Los niños son más frecuentemente atacados porque observan menos cuidados de higiene. No se puede descuidar el peligro de los portadores de gérmenes, humanos o animales. La forma compleja de la enfermedad humana comprende cuatro períodos evolutivos:

1.) Evolución de diez a doce días, astenia, cefálea. 2.) Invasión de cuatro a cinco días con insomnio, fiebre, diarrea, epistaxis. 3.) Erupción, diez días, fiebre, diarrea, abatimiento, cefálea, estomatitis, hay adenopatía, edema de las mucosas, eritema de las manos con serosidad amarilla alrededor de las uñas. 4.) Reparación de cuatro a cinco días. La fiebre aftosa humana evoluciona en la mayoría de los casos hacia una curación completa. El tratamiento comporta sobre todo, cuidados higiénicos y precauciones concerniendo a los productos alimenticios sobre todo el agua y la leche. En algunos casos, es útil recurrir a la penicilina 400.000 U. a 500.000 U. por día durante tres o cuatro días o la aureomicina a razón de 1 gramo por día.

II

COMPOSICION DEL PRODUCTO

Definición - (Simplificada)

Se da el nombre de VACUNA ANTI-AFTOSA a una mezcla en la cual, una cierta cantidad de virus aftoso,

oportunamente atenuado e inactivado, sea puesto en condiciones, reputadamente las mejores, para estimular, una vez inyectada a un organismo animal, una resistencia activa, más o menos duradera, a la infección aftosa correspondiente.

La vacuna antiaftosa, puede ser preparada para uso intradérmico, o subcutáneo, para lo cual la cantidad de vacuna correspondiente a una dosis para un animal adulto, puede variar de 60 c.c. de vacuna original Waldmann a 10 c.c. de ciertas vacunas trivalentes actuales y a 2 c.c. y aún 1 c.c. de vacuna trivalente americana (argentina).

Cualquiera que sea el tipo de vacuna y cualquiera que sea su composición, los componentes esenciales, están representados por el **Virus de Extracción**, atenuado e inactivado.

a) — Composición de la Vacuna de Virus Natural.

La composición porcentual de una tal vacuna antiaftosa, ya sea mono-bi o trivalente y preparada con virus natural, es la siguiente:

1—Hidróxido de Aluminio.....	60%
2—Solución Tampón a la Glicocola o soda.	4%
3—Virus de Extracción.....	35%
4—Formalina al 40% y al 0.07 en agua destilada.....	1%
5—Sulfato de Neomicina en razón de 0,75 gms. por cada 100 lts. de vacuna.	

El Hidróxido de Aluminio, puede variar entre los límites de 50-60% y ser compensado por una variación correspondiente del virus de Extracción. Como se verá más adelante, esto deja

la posibilidad de acomodarse en la práctica, según la cantidad de epitelio a tratar para la extracción del virus.

La solución tampón a la Glicocola, corresponde en la vacuna terminado a la cantidad de sales por litro, prescrita por Waldmann en su vacuna original, solo que para poder disponer de una mayor cantidad de agua para la extracción del virus, consecuentemente a la reducción de la dosis original, se ha pensado concentrarla notablemente. La práctica ha demostrado que tal modificación, no altera en modo alguno la calidad del producto.

El virus de Extracción, en este caso, es extraído de virus **Natural**, ya sea de epitelio lingual de bovinos artificialmente infectados, con la cepa correspondiente de virus de la cual se quiere hacer la vacuna.

Para cada dosis de vacuna se usa establecer, cuantos centigramos de epitelio se ponen a disposición para la preparación del virus de Extracción.

Así se sabe que se pueden preparar vacunas con 10, 20, 30, 35, 40, 45 y 50 cgms. de virus, en este caso representado por epitelio, para dosis monovalentes y que de esto, depende en gran parte la eficacia del producto terminado. Esta eficacia depende, en gran parte, de la propiedad antogénica intrínseca de cada tipo y de cada cepa del virus de la cual ha estado preparado, recolección y preparación del epitelio, su conservación y de muchos otros factores que veremos en detalle más adelante.

El aldehído fórmico, que se usa desde hace tiempo, es la formalina para análisis de E. Merck Nº 4003 solución al 35%, de la cual se usa el 0,08% como también 0,07%, se nota

además, que según la prescripción de Waldmann, la formalina se debe usar al 0,05% de una solución al 40%, pero del 1958 para evitar y prevenir eventuales contaminaciones, y después de acertar que un tal aumento de formalina no tenía efecto letal sobre el virus, sea definitivamente empleado la porcentualidad al 0,08% de una solución al 35%, sin efectos nocivos en la vacuna.

El sulfato de Neomicina es sistemáticamente añadida a cada partida de vacuna en la cantidad de 0,75 gms. por cada 100 litros de vacuna. Este antibiótico es particularmente activo hacia un pequeño germen gram-negativo, frecuente en el epitelio lingual y sobre todo en el epitelio de cultivo, que tiene la propiedad de desarrollarse notablemente en el congelador (o sea a la temperatura de 4 gr. C.) Si tal germen es inocuo para los animales, no produciéndoles abscesos ni tumefacciones particulares ni aún reacciones generales, la contaminación de la vacuna se debe evitar en el mayor límite posible.

b) Composición de la vacuna de virus de cultivo.

La composición de la vacuna preparada con virus de cultivo es igual a aquella preparada con el virus **Natural**, teniendo en cuenta que el epitelio de cultivo se considera poseyendo el igual valor antigénico del virus de epitelio Natural. Como este virus se extrae con el propio sobrenadante, no se puede emplear otros 3,5 c. c., 4,5 c.c. virus de extracción, ya que el sobrenadante es 10 veces mayor al peso del epitelio, para cada dosis de vacuna monovalente, no se puede superar

Universidad Nacional
Bibliotecario de Bibliotecas
BIBLIOTECA CENTRAL
Sección de Publicaciones
C. E.

los 35 o 45 cgms. de epitelio. El enriquecimiento eventual se puede hacer añadiendo otro epitelio de cultivo o natural, en el caso de que se quiera portar el contenido por dosis en los 50 cgms.

Para el resto de procedimiento, la composición de vacuna, dicha de cultivo, no difiere de aquella del virus Natural.

c) — Composición de la vacuna del virus cultivado sobre las células renales.

En la actualidad se experimenta sobre este nuevo método del cultivo del virus sobre células renales. Obteniendo la cantidad suficiente de virus, se comenzará a la producción de la vacuna industrial o semi-industrial. Las pruebas experimentales con vacunas producidas con esta clase de virus han dado resultados satisfactorios.

III

DOSIS DE EMPLEO DEL PRODUCTO

Las dosis para un animal adulto, no es siempre la misma, y aún varía de productor a productor, y aún por la naturaleza de la vacuna (subcutánea o intradérmica).

Sin entrar en discusión, las dosis que se han fijado después de muchos años, son las siguientes:

No se indican las dosis para la vacuna trivalente que en un caso puede ser deducida de las ya relatadas. No se preparan vacunas trivalentes por motivos de economía y aún porque es raro, la presentación de tres cepas invadiendo una misma región en el mismo tiempo.

Desde el punto de vista práctico, está muy bien, no modificar la dosis sino por razones extremadamente importantes que puedan ser bien comprendidas de los utilizadores de la vacuna.

La composición de la vacuna determinará, al momento de la preparación, la dosis fija para usar en la práctica y que debe ser la justa cantidad de antígeno que dé una suficiente protección.

Para la suficiente protección, es bueno ser preciso y saber que cosa se entiende por ejemplo, una protección que llegue al 99% y que parezca una protección óptima, no fácilmente de alcanzar, de los mejores productos inmunizantes humanos y muy apartada de la porcentual de la protección dada de la vacuna de la poliomielitis, que por muchos aspectos pueden ser parangonadas a la vacuna Anti-Aftosa. Un ejemplo práctico sería la vacunación de 1.000.000 de cabezas de ganado, de las cuales 10.000 deberían contraer la aftosa.

Naturalmente, lo deseado sería llegar a una porcentual de protección de

	Monov.	Bival.
Bovino (hasta 100 kgms.).....	7 c. c.	14 c. c.
Bovino (de 101 a 300 kgms.).....	8 c. c.	16 c. c.
Bovino (más de 300 kgms.).....	10 c. c.	20 c. c.
Oveja y Cabra	2 c. c.	3-5 c. c.

100%, lo que es difícil de conseguir, se ha tratado de aumentar la cantidad de antígeno, contenida en cada dosis, pero esto no es suficiente, ya que se encuentran cepas que tienen un poder antigénico escaso y que no se aumenta en grado uniforme ni aún con el aumento de la cantidad.

En tal caso, hay necesidad de recurrir a vacunaciones repetidas, a distancia de días, como se hace para la hipermunización de animales suero-productores, pero naturalmente, esto no es práctico ni aplicable en gran escala.

Las dosis escogidas, son suficientes para permitir durante la preparación de la vacuna, teniendo en cuenta la concentración a la cual viene usada la solución de glicocola o soda, de tratarse para la extracción del virus correspondiente a 60 cgms. de epitelio natural. Esto corresponde a un máximo de concentración que es difícilmente superable en la práctica, siempre se entiende por dosis 10 c.c. Así, en tal caso se debe recurrir a preparar una cantidad de vacuna considerable, para obtener el líquido suficiente y hacer las extracciones eficaces sucesivas.

La dosis de 10 c.c. y de 20 c.c. de vacuna bivalente, es aún una cantidad relativamente pequeña, que el Veterinario, está acostumbrado a inocular a animales de tal tamaño.

Otra consideración, de notable importancia, que puede influir en la determinación de la cantidad de epitelio a usar para cada dosis y por tipo, es la porcentualidad de poder inmunizante que se quiere obtener.

Es evidente, que usando el antígeno inmunizante, al nivel más elevado, se

obtendrá una pequeñísima cantidad de sujetos, que por causas individuales o particulares, condiciones de ambiente, o del momento, no adquirirán más que una débil inmunidad, insuficiente para proteger de una infección normal o severa. Por otra parte, un número considerable de sujetos, habrá adquirido una resistencia a la infección, una inmunidad aunque más elevada, de lo necesario, y al menos teóricamente, será dado para estos animales, una cantidad de vacuna superior a aquella que normalmente habría dado una suficiente inmunidad.

Desde el punto de vista general, se puede asegurar, que para una determinada cepa de virus, la cantidad de epitelio de iniciar para una determinada dosis de vacuna, es proporcional a la cantidad de animales que se quieren proteger.

Una determinada cantidad de antígeno, de una determinada cepa, convertida en vacuna, de una determinada porcentualidad de animales resistentes y que no se puedan obtener grandes cambios de tal porcentual, si no se cambia la porcentual del virus contenido en cada dosis.

Esto es muy importante, porque permite de valorar aproximadamente la eficacia de una vacuna, cuando no se conoce la cantidad de epitelio del cual ha estado extraído el virus. En esta valoración, todos los otros elementos que pueden influir en el resultado deben ser constantes y conocidos, ya que habitualmente se prepara vacuna antiaftosa, según un determinado método, no sirve, aún menos para quien quiera juzgar de la eficacia de una vacuna de la cual es desconocida la preparación.

Habiendo dicho que la eficacia de una vacuna es proporcional a la cantidad de epitelio puesto en una dosis, debemos añadir que muchas otras condiciones pueden alterar y tornar menos clara esta afirmación.

Así, la especial condición de vida en la cual se encuentran los animales en el momento de la vacunación (alimentación, estabulación, altura, variaciones de clima, etc.), son condiciones que actúan sobre la reacción activa del animal a la vacunación.

No es por demás hablar de la cautela con la cual viene efectuada la vacunación, aquí entra en juego, la exactitud de la dosis, la salud del animal, estado de gestación, la manipulación de la vacuna, en particular la conservación de ésta hasta el momento de usarla.

La práctica demuestra, que una vacuna buena, mal usada o mal conservada, no es mejor que una vacuna expirada o casi ineficaz.

(Informe rendido por el Dr. Domenico Bastoni en el Instituto Zooprofiláctico Experimental de Brescia, Italia).

IV

MÉTODOS DE PREPARACION DE LOS VARIOS COMPONENTES

Para cada uno de los componentes que entra en la composición de la vacuna, procederemos a una sucinta descripción de los siguientes puntos:

- a) Instalaciones y materiales empleados.
 - b) Materia prima y métodos usados para su análisis y control.
 - c) Preparación verdadera y propia de los componentes, en la proporción adecuada para la composición de la vacuna.
 - d) Métodos de análisis y control para el componente terminado.
- A.—PREPARACION DEL HIDROXIDO DE ALUMINIO
- 1) **Instalación y maquinaria.**
- Se describirá sucintamente la instalación de los diversos aparatos, sin entrar a discutir, otros que pueden servir para el mismo objeto. Los que se describen, son los usados en la Instalación del Instituto Zooprofiláctico para la producción del Hidróxido de aluminio.
- a.) Recipiente cilíndrico en acero inoxidable, con una saliente externa en la boca para facilitar el vaciamiento del líquido, posee tres manijas para poderlo manipular mejor. Su diámetro es de 40 cms. la altura de 45 cms. y su capacidad es de 56 litros.
 - b.) Recipiente en forma de tronco de cono, en acero inoxidable, diámetro inferior 60 cms., diámetro superior 75 cms., altura 57 cms. y de 200 litros de capacidad. Este recipiente está montado sobre ruedas que giran en diversas direcciones.
 - c.) Dos recipientes en forma de tronco de cono, de acero inoxidable de diámetro inferior de 70 cms. diámetro superior 80 cms. altura 57 cms. y de una capacidad de 250 litros. Provisto como el anterior, de ruedas para facilitar su translación.
 - d.) Agitador de madera con un mango de 80 cms. y su cabeza discoidal de un diámetro de 20 cms.

e.) Instalación para la esterilización de los diversos recipientes, que vienen esterilizados al vapor fluente que es recogido en un recipiente donde se depura el vapor, y provisto de un sistema de tubos de goma para repartir el vapor y de trípodes para colocar boca abajo los recipientes a esterilizar.

f.) Balanza Romana para pesar el Hidróxido producido.

g.) Mezcladora para lavar el Hidróxido que es un recipiente cilíndrico en acero inoxidable, de diámetro de 70 cms. y una altura de 1,25 mts., con tapa que posee un mirador y fijada con tornillos potentes, vertedero en el fondo, un manómetro para medir el vacío, escape, entrada del agua por la parte de encima, vecino a la tapa; mezclador central a tróclea provisto de 4 o 5 espiras de 50 cms. c/u. que gira a 500 revoluciones por minuto por medio de un motor trifásico de 775 rev./minuto, con una polea a 5 cms. en el motor y 57 cms. en el árbol del agitador. La capacidad de este mezclador es de 200 lts. y puede alcanzar a 440 litros.

h.) Un autoclave para esterilizar el hidróxido, en posición vertical y a vapor fluente, de hierro, con una serpentina de 10 espiras, tubo para el vapor que va a la doble cámara donde se encuentra el agua caliente, vertedero en fondo para la salida del vapor, en caso de un calentamiento rápido, termómetro. Recipiente interno cilíndrico en acero inoxidable de 42 cms. de diámetro, altura de 120 cms., sumergido en el baño maría y de una capacidad de 130 lts. está provisto de un agitador helicoidal con 5 espiras de 70 a 80 cms. de desarrollo y de un diámetro de 28 a 30 cms., accionado con una

polea de 37 cms. de diámetro unida a un motor trifásico 775 rev./minuto y de polea de 5 de diámetro, el agitador gira a 100 o 105 rev./minuto, escape, termómetro de 80 cms. en forma de custodia, en acero inoxidable.

i.) Una centrífuga o separador, separada, en acero inoxidable, de diámetro de 85 cms., la corona es de 12,5 cms., altura de 36 cms. Volumen total 200 lts. Volumen de la corona 100 lts. Motor lateral de 1.100 rev./minuto. Hidrostractor en acero inoxidable, todo el resto es revestido en goma o ebanita.

j.) Bomba para aspirar el aire, del recipiente indicado en punto g.

l.) Vapor, agua común, agua destilada, aire comprimido de la instalación central.

Con esta instalación se puede alcanzar a producir 300 lts. de Hidróxido de aluminio por día, la producción normal es de 200 lts. con un obrero que se cambia al medio día.

Cada partida corresponde a 16 veces más de la cantidad sugerida por Waldmann en 1938.

(Informe suministrado por el Dr. Domenico Bastoni - Instituto Zocoprofiláctico Experimental de Brescia, Italia).

PREPARACION DEL HIDROXIDO DE ALUMINIO

2.)—Materia prima empleada y métodos seguidos para su análisis y su control.

- a.) Sulfato de Amonio;
- b.) Sulfato aluminico Amónico;
- c.) Amoniaco del Comercio.

Para las dos primeras sales, deben ser controladas ulteriormente para ver su grado de pureza.

Para el amoníaco,, si se usa del comercio, éste puede ser amoníaco líquido a 28 Be. o raramente a 32 Be. Como el título no es constante, se debe usar un amoníaco a concentración constante.

Para obrar con más seguridad, se hace necesario, proceder cada vez a la titulación del amoníaco a emplear, lo que se hace con la técnica siguiente:

A 5 c.c. de amoníaco comprado en el comercio, se agrega:

de 5 a 8 c.c. de agua destilada.
algunas gotas de una solución de Amarillo de metilo al 0,5 por mil en solución de agua destilada.

La solución toma un color amarillo limón.

Con una bureta graduada, se deja caer en la mezcla tanta solución como sea necesaria de Acido Clorhídrico (solución Normal) N/HCl., hasta obtener un viraje del amarillo a un color rojo púrpura.

Dividiendo el número fijo de 29,4 (mitad de 58,8, porque en la prueba se ha usado 5 c.c. de amoníaco) por el número de c.c. de solución normal de ácido clorhídrico, que son necesarios para obtener el viraje del color, se obtiene así la cantidad de amoníaco de agregar a cuanto hace falta de agua destilada para obtener un litro de amoníaco al título requerido (igual a 5,88 normal). Tal amoníaco corresponde a una solución con un peso específico de 0,955 y a la concentración apropiada para permitir la reacción.

No es por demás, hacer notar las dificultades para obtención y conservación del amoníaco que debe hacerse

en congelador. Así, el amoníaco disuelto en el agua, a temperaturas débiles, la tabla siguiente nos ilustrará al respecto.

Agua a 0 grados C. se disuelve el 47% de amoníaco.

Agua a 15 grados C. se disuelve el 38% de amoníaco

Agua a 20 grados C. se disuelve el 34% de amoníaco.

Agua a 25 grados C. se disuelve el 31% de amoníaco.

Agua a 30 grados C. se disuelve el 28% de amoníaco.

Agua a 50 grados C. se disuelve el 18% de amoníaco.

Solubilidad del Amoníaco en el agua a temperatura y presión diversa.
(Diccionario de Química Guía)

0 grados C.	760 m/m.	0.8833 gms.
0 grados C.	1.5 atm.	1.5260 gms.
0 grados C.	2 atm.	2.1950 gms.
4 grados C.	760 m/m.	0.7920 gms.
10 grados C.	760 m/m.	0.6790 gms.
16 grados C.	760 m/m.	0.5820 gms.
20 grados C.	760 m/m.	0.5260 gms.
30 grados C.	760 m/m.	0.4030 gms.
38 grados C.	760 m/m.	0.3240 gms.
48 grados C.	760 m/m.	0.2440 gms.
56 grados C.	760 m/m.	0.1860 gms.

Habiendo visto el procedimiento clásico para la titulación del amoníaco, para añadir a la mezcla de las dos sales de sulfato para obtener así la reacción deseada del Hidróxido de Aluminio en fase alfa coloidal.

En la práctica, se prefiere preparar notables cantidades de solución de amoníaco a un título exacto y tenerlo listo para el uso en botellas de vidrio graduadas.

Para preparar el amoníaco en gran cantidad, se detalla un procedimiento que aún puede servir para el control de la operación clásica.

Se pesa el amoníaco puesto en damajuanas y que después van al mezclador del hidróxido, por aspiración. De esta mezcla de amoníaco comercial que (debe ser concentrada) se toma una muestra de un litro, se determina su **peso específico** con un densímetro de precisión, después se procede a la titulación de la muestra por el método ya explicado, (Solución N. de HCl).

La cantidad de amoníaco a un título fijo que se puede hacer con el amoníaco titulado corresponde al desarrollo de la siguiente fórmula:

Peso del Amoníaco en Kgms.

29,4 (Constante).

Peso específico:

C. C. de—Sol. N/HCl.

Teniendo presente que el amoníaco a usar debe tener un peso específico igual a 0,955, para lo cual se ha preparado una tabla con los coeficientes al lado del peso específico, la cantidad total de amoníaco a título fijo que se desea obtener, es dada del **producto del coeficiente, correspondiente al peso específico, por el número de litros del amoníaco concentrado.** (Tabla en hoja aparte).

Con esta tabla, se dispone de diversos métodos para saber la cantidad

total de amoníaco a un título fijo que sirven para control ulterior.

Ejemplo:

Si tenemos un amoníaco en cantidad de 78.500 Kgms. y de un peso específico de 0,892.

Para saber la cantidad de litros, se divide el peso en kgms. por la densidad así:

$$\text{Kgms. } 78.500: 0,892 = 88 \text{ lts. (Columna 1).}$$

$$\text{Kgms. } 78.500 \times 1,122 = 88 \text{ lts. (Columna 4).}$$

Para encontrar la cantidad de amoníaco a (total) y a título fijo.

a.) **Peso del amoníaco concentrado**

29,4.

Peso específico inverso.

C. C. Sol N/HCl.

b.) **Peso del amoníaco concentrado X Coeficiente de la columna 5.**

c.) **Litros del amoníaco concentrado X Coeficiente de la columna 3.**

d.) **Peso X peso específico inverso (columna 4 X columna 3).**

Para encontrar la cantidad de agua a añadir para obtener el amoníaco a la dilusión fija. De los litros totales basta deducir los litros del amoníaco concentrado.

$$\text{a.) } 78,500 \text{ kgms.: } 0,892 \text{ (o también } \times 1,122): (29,4: 80,3) = 88 \text{ lts.: } 3,661 = \mathbf{240.371.}$$

$$\text{b.) } 78,500 \text{ kgms. } \times 1,122 \times 2,740 = \mathbf{241.830.}$$

$$\text{c.) } 78,500 \text{ kgms. } \times 3,078 = \mathbf{241.623.}$$

$$\text{d.) } 88 \text{ lts. } \times 2,740 = \mathbf{241.120 \text{ lts.}}$$

En la tabla siguiente, para encontrar la cantidad de litros de 'agua' a agregar, basta multiplicar la cantidad de amoníaco concentrado de que se dispone por el coeficiente de la columna N° 3.

A la cantidad de litros totales, se le resta la cantidad de litros de amoníaco, el resultado es la cantidad de agua a agregar.

3.) — Preparación verdadera y propia del Hidróxido de Aluminio.

La preparación del Hidróxido de Aluminio necesario para la Vacuna de la aftosa, viene descrita por Waldman en 1938, el cual relacionó el método de preparación descrito por Willstatter, que describe el método del Hidróxido de Aluminio **Coloidal en fase alpha.**

Woldman, da para el mismo Hidróxido un método para controlar el poder absorbente, esta razón ha fijado la continuación de la técnica y se sigue escrupulosamente ya que en todas las investigaciones sucesivas, no se ha encontrado aún, un sistema más eficaz, que reemplace el método descrito.

Se ha discutido bastante sobre la prueba del rojo congo como indicador del poder absorbente del Hidróxido en examen con base en el virus. Según el punto de vista (Dr. Bastoni) se ha empleado un rojo congo diverso en cada experiencia, proveniente reacciones diversas y del hidróxido, químicamente igual, se ha querido comprobar la propiedad absorbente que varía notablemente del uno al otro, cuando se habla de fase (Alpha—Beta,

AMONIACO: peso específico - % de amonio - Coeficiente por lts. - Peso específico inverso - Coeficiente x kilogramos.

Peso específico	Amoniaco en 100 c.c.	Coeficiente x lts.	1 / Peso esp.	Coefic. x kilogramo
0.955	11.33	1.000	1.047	1.043
0.954	11.60	1.022	1.048	1.071
0.950	12.74	1.125	1.053	1.184
0.948	13.31	1.178	1.055	1.233
0.946	13.38	1.225	1.057	1.238
0.944	14.46	1.276	1.061	1.333
0.942	15.04	1.328	1.062	1.410
0.940	15.63	1.380	1.063	1.488
0.938	16.22	1.431	1.065	1.558
0.936	16.82	1.485	1.068	1.535
0.934	17.42	1.539	1.070	1.617
0.932	18.03	1.591	1.073	1.710
0.930	18.64	1.645	1.077	1.770
0.936	19.87	1.752	1.080	1.895
0.922	21.12	1.860	1.085	2.020
0.920	21.75	1.918	1.088	2.032
0.914	23.68	2.090	1.095	2.290
0.910	25.00	2.215	1.100	2.438
0.908	25.65	2.265	1.102	2.518
0.906	26.31	2.320	1.104	2.562
0.904	26.98	2.380	1.106	2.638
0.902	27.63	2.440	1.109	2.708
0.900	28.33	2.500	1.111	2.780
0.898	29.01	2.562	1.113	2.858
0.894	30.37	2.678	1.120	2.995
0.892	31.05	2.740	1.122	3.078
0.890	31.75	2.800	1.124	3.150
0.888	32.50	2.865	1.127	3.230
0.886	33.25	2.940	1.129	3.320
0.884	34.10	3.010	1.131	3.410
0.882	35.00	3.090	1.134	3.500
0.880	36.07	3.170	1.138	3.604

etc.), para justificar las variaciones, que hasta hoy se presentan y no se sabe a qué cosa se deben. Para el Dr. Bastoni, la prueba del rojo congo es válida, con el Hidróxido preparado, ya que los resultados obtenidos son buenos, aunque al rojo congo da los resultados variados.

a.) **La reacción** — En el presente, la reacción usada para la obtención 100 kgms. de Hidróxido pronto para el uso, es la siguiente:

Solución I.

Sulfato de Amonio. . . . 3,500 Kgms.
 Agua destilada 96. litros.
 Calentar a 65 grados C.

Solución II.

Sulfato aluminico Amónico 12,250 kgms.
 Agua destilada. 24, litros.
 Calentar a 75 grados C.

Solución III.

Amoníaco del comercio, diluido en agua destilada para obtener un peso específico de 0,955; 16 litros.
 Nota: — 5 c.c de la solución de amoníaco, deben hacer virar la solución de amarillo de Metilo, con 29,4 c.c. de una solución de ácido clorhídrico normal.

La **Solución III**, se vacía en el recipiente que contiene la solución **I** y añadir inmediatamente la solución **II**. La temperatura de la reacción debe ser 65 grados C.

La formación del Hidróxido es instantánea con formación de abundantes vapores de amoníaco, por eso es

aconsejable hacer esta preparación con las puertas abiertas o al abierto.

En el primer tiempo, parece que el hidróxido no tenga el aspecto coloidal, pero al cabo de algunos minutos de lenta agitación, se ve que el hidróxido aparece blanco, parecido a una suspensión de yeso en agua, el color se azulea ligeramente. Este tinte y aspecto particular, se acentúa con los sucesivos lavados.

El lavado, según la teoría de Waldman, serían siete, todos con agua destilada en la siguiente cantidad,

Primero.	160	lts.
Amoníaco.	1	
Segundo.	240	lts.
Amoníaco.	0,100	

Tercero, cuarto, quinto, sexto y séptimo, 240 lts. de agua destilada.

Todos estos lavados, y las operaciones sucesivas, hasta la estabilización del Hidróxido, mediante el calor, (esterilización), deben de ser hechos en un límite máximo de dos horas, por lo cual se ha reducido, el tiempo de cada lavado y la cantidad de lavados. Así, si se usa el agua común para el lavado, no hay ningún peligro, reemplazando así el agua destilada que solo se utiliza en el último lavado.

En el esterilizador, el Hidróxido permanece 30 minutos a una temperatura de 95 grados C., después se recoge en cantinas, se deja enfriar y se pesa. El hidróxido así obtenido está listo para el uso, o se puede usar después de cierto tiempo. Se aconseja usarlo recientemente después de su preparación, prácticamente, es mejor preparar el hidróxido para la vacuna que se quiera producir.

Hay necesidad de examinar una a una las posibilidades de pérdida del Hidróxido durante la preparación, ya que no hay la posibilidad de medir matemáticamente, la cantidad de hidróxido verdadero que se encuentra en los 100 litros de preparado final que se encuentra en el mezclador para ser pasado a la esterilización.

El factor de la impureza, tiene mucha importancia porque ésta disminuye en proporción la cantidad efectiva de hidróxido que en la reacción se formará, por ejemplo, al usar sales insolubles, que no se eliminan con el lavado, al mantenerse en suspensión, podrían actuar como partículas que se dejan absorber por el hidróxido y así disminuir el grado del poder absorbente, que se trata de obtener en gran nivel para las necesidades de la vacuna.

En cuanto a la **alteración de las sales**, se sabe que éstas pueden alterar-se dando cambios de color o de sequedad, las primeras que probablemente se deben a las impurezas, deben ser vigiladas por medio del empaque. Las segundas, pueden ser debidas a la conservación y tienen gran importancia, ya que modifican el valor real del producto que entra en la reacción.

Para profundizar los conocimientos sobre el Hidróxido de Aluminio, se aconseja leer detenidamente el trabajo de Gergescu.

"Dix années de préparation et utilisation de l'Hydroxide d'Aluminium en immunologie vétérinaire Roumaine.

Revue de Patologie Générale et de Physiologie clinique - anno 1958 -mag- gio, págs. 703, 760 con la bibliografía completa (cerca de 150 trabajos mencionados).

Control de absorción del Hidróxido de Aluminio con la prueba del rojo congo.

Solución de Rojo Congo:

A 70 c.c. de solución de Rojo Congo.
 Agua destilada. 1 litro.
 Conservar en botella oscura.

Prueba:

A 70 c.c. de solución de Rojo Congo, se agregan 4 c.c. del hidróxido de aluminio que se quiere analizar. Agitar por 30 minutos, al cabo de éstos centrifugar 15 minutos a 2.000 revoluciones por minuto.

Tomar el sobrenadante y extrava-sarlo en otra probeta.

Interpretación:

El líquido sobrenadante, ligeramente rosado, debe ser igual, o en su defecto, más clara de una dilución del rojo congo al 1:100 (rojo congo empleado).

Valorar la absorción del Hidróxido de Aluminio.

Residuo seco del Hidróxido de Aluminio.

Un hidróxido de aluminio para ser aceptable, debe tener un residuo seco que fluctúe entre **1.4 - 1.6%**.

Experiencia personal. — A 100 c.c. de hidróxido preparado con la técnica anterior, se llevó a una estufa a seco donde perdió totalmente el agua quedando residuo de peso, 1,7172 gramos.

Después de ponerlo bajo el efecto de la llama por espacio de 2 horas, el peso del residuo era 1,5781 gms. Con

un segundo efecto de la llama por espacio de 6 horas, quedó su peso reducido a 1,4547 grms.

Con una tercera exposición a la llama, su peso final no varió.

Peso del residuo seco final del hidróxido de aluminio en examen = 1,4547 gramos.

DIVERSOS METODOS DE PREPARACION DEL HIDROXIDO DE ALUMINIO

Método del tipo Willstatter.

Ya sea el método original o la variante indicada por Hansen, S. Schmidt (C. R. Soc. Biol. 120, 1935-1150). Haddow, Idnani Off Int. Epiz. 29, 1948, 407), la precipitación de una sal de aluminio (aluminio de amonio) es precipitado con una solución de hidróxido de amonio, en presencia de sales de amonio para evitar la formación de gel, en una pseudo-solución bajo forma de sol.

La técnica original de Willstatter es complicada y demanda una instalación apropiada, la duración de preparación varía entre 2 a 3 horas, hay necesidad de utilizar sustancias químicas y reactivos al estado puro absoluto.

El gel así obtenido es extremadamente puro y obtiene una gran capacidad de adsorbimento.

La variación del método de Willstatter consiste sobre todo en el modo de precipitar la solución de sales de aluminio (solución concentrada o diluida, temperaturas de reacción diversa, duración de la precipitación variable) en la manera de lavar y recoger el precipitado, (por centrifugación, por sedi-

mentación, por filtración) o por la presencia o ausencia de sales de amonio en el agua de lavado.

Método del tipo Goret.

..Goret—(C. R. Soc. Franc. Microb, Nro. 5-7 Juin, 1947), emplea un método mucho más simple del punto de vista de la preparación, en la cual la precipitación viene por medio del hidróxido de sodio. Tanto la solución del aluminio, como la del hidrato de sodio son usadas a concentración elevada.

El hidróxido obtenido con este sistema es impuro, contiene muchos electrolitos y parece constituido de una mezcla de hidróxido y de óxido hidrato de aluminio. La capacidad de adsorbimento es relativamente reducida con cierta constante analítica desigual y variable.

Aún este hidróxido representa un cierto valor práctico para la preparación de ciertas vacunas, especialmente si se introducen ciertas modificaciones a la técnica original.

El valor adsorbente del hidróxido de aluminio, a excepción de aquel preparado por la técnica de Willstatter, disminuye en modo rápido, al menos que no venga calentado lo más ligero posible a 120 grados centígrados y enseguida, mantenido conservado a 3 grados C. En tales condiciones conserva su poder adsorbente por seis a nueve meses.

Una variante importante del método Goret ha estado propuesta de Georgesou e Taga, y consiste especialmente en la precipitación de la solución de alumbre de monio ($d = 1050-1045$ a 18 grad. C.) con una solución de hi-

dróxido de sodio al 33%, verificada y estable a $\text{PH} = 8,1$ con lavadas sucesivas por 18-24 H. del hidróxido obtenido para extraer al máximo los electrolitos. En seguida el gel es calentado en autoclave a 120 grados C., ajustado a determinadas constantes analíticas y adicionado de una solución tampón o alcalinizado a un pH determinado según la naturaleza del virus a adsorber.

Aunque este método es lento, se prestaría para uso industrial, demandando una instalación muy simple. La constante analítica y la capacidad de adsorbimento son muy superiores a aquellas obtenidas con el método Goret inicial y son bastante buenas en comparación a aquellas del método de Willstatter y puede ser obtenido con sustancias químicas de origen técnicas.

Los autores han propuesto un método de precipitación del gel con el hidróxido de amonio a diversa concentración, dejando invariable el resto de la operación.

Cualquiera que sea el método de preparación del hidróxido de aluminio, el producto final es ajustado a cierta constante analítica o calentado a 120 Grad. C. por 60 minutos. El hidróxido así preparado es conservado en fresco a la temperatura de menos 3 a menos 5 grad. C.

Para ser utilizado en el adsorbimento del virus, el hidróxido debe corresponder a ciertas características analíticas constantes. Algunas de éstas condiciones son requeridas por unos autores, en cambio otros las siguen completamente, un trabajo sistemático ha estado hecho por Georgescu e Bogdan, estos autores han constatado experimentalmente que no todas estas

constantes físico-químicas tienen la importancia en la apreciación del poder adsorbente del gel de hidróxido de aluminio, por otra parte las cifras que muchos autores indican para esta constante no son siempre las mejores. (Contributo experimental al estudio de la Constante del Hidróxido de Aluminio como adsorbente de virus. Anuarul Institutului de Patologie și Igiena Animală V 5-1954-191).

Por ejemplo, el contenido en óxido de aluminio (Al_2O_3) determinado con la calcinación del gel tiene un valor óptimo comprendido entre 1,4 y 1,5%. Para la adsorción del virus de la peste aviar, y para el de la peste porcina, debe ser de 1,6%.

El estado de turgescencia, que es el volumen del sedimento depositado en 48 horas se expresa en c.c. y debe ser por lo menos de 5 c.c. para una mezcla de 5 c.c. de gel y 20 c.c. de agua destilada, homogenizada al comienzo. Las condiciones que influyen sobre este estado de turgescencia son: el pH, el modo de preparación del hidróxido de Al. en menor medida, la esterilización y la alteración del hidróxido.

El contenido en electrolitos, sobre todo el del anión sulfúrico, no debe superar al 5-7%.

La propiedad del gel varía en función del pH, que debe ser el más vecino posible al neutro. Una variación del pH hacia la alcalinidad, implica una carga negativa del gel y la adsorción se vuelve más acentuada porque la sustancia es de carácter electropositivo. En un medio ácido se verifica un fenómeno inverso. La adsorción de colorantes básicos y ácidos depende de su carga eléctrica, de la re-

lación entre las dimensiones de la partícula del colorante y la del hidróxido pero sobre todo de la carga eléctrica del hidróxido en sí.

Este factor es muy importante, porque explica ciertas anomalías en la adsorción del rojo congo, utilizado para apreciar la capacidad adsorbente del hidróxido de aluminio.

El hecho de juzgar la capacidad de un hidróxido para adsorber el rojo congo, no parece constituir un criterio decisivo, para valorar su potencial de adsorbimento.

No parece que haya relación directa entre el adsorbimento del virus a aquella del rojo congo. Hay en vez, un paralelismo entre la adsorción de la toxina diftérica y aquel del virus de la peste aviar.

Parece posible que cada adsorbimento, venga dominado de un factor específico.

Para la toxina diftérica se debe tener al menos el 8% de adsorción en una mezcla de 10 c.c. de Hidróxido con 50 c.c. de toxina de 40-50 U. F.

La acidificación del gel, debido a la esterilización y la variación de pH, influyen en modo apreciable la capacidad de adsorción del hidróxido de aluminio.

En la adsorción del virus se debe tener en cuenta en primer lugar el pH del virus en cuestión, y después el pH de la masa viral, las cuales pueden influir igualmente en la capacidad de adsorción.

La capacidad de retener el agua, con la prueba de secamento con la acetona, debe ser al menos de $\frac{2}{5}$ del valor de la turgescencia.

En la adsorción, la preponderancia general es debida al estado físico del

gel, el método de preparación, la naturaleza química del precipitado y los lavados del hidróxido de aluminio, son los determinantes del poder de adsorción.

Hay necesidad de estudiar individualmente cada virus en relación con la adsorción, porque los datos obtenidos con ciertos virus no pueden transferirse o generalizarse para los otros.

Geirgescu y Taga — Proponen el siguiente complejo de investigaciones sistemáticas para juzgar la calidad de un hidróxido.

- 1.)—Determinación del pH.
- 2.)—Determinación del contenido en aluminio mediante el método colorimétrico del ácido aurintricarbónico.
- 3.)—En la vacuna, determinar el contenido en formol, mediante el método colorimétrico a la floroglucina (según Collins e Henzlich) y aquel contenido en el líquido supranadante con el método iodimétrico o con la dimedona.
- 4.)—Determinar el N orgánico de la masa viral (en la vacuna) con el método microkjeldahl.
- 5.)—Determinar el contenido total de substancia mineral.
- 6.)—Determinar el contenido total en aniones sulfúricos (SO_4).
- 7.)—Determinar la capacidad de adsorción con relación a la toxina diftérica con la técnica de Ramón.

Por analogía de la adsorción sobre hidróxido de aluminio de algunas enzimas, toxinas, virus y gérmenes bacterianos, Geirgescu, L e M Taga han estudiado el fenómeno de la adsorción de la proteína sérica sobre el hidróxido de aluminio (Anuarul Institutului

de Patologie si Igienea Animalá V. 6, 1956).

Han demostrado que el valor óptimo de la adsorción total de la proteína sérica sobre el hidróxido de aluminio del tipo Willstatter, es de una concentración de 29 por ciento de suero (sobre el tipo Goret-Georgescu) que es del 26-28%). Sobre estos valores, se observa primero que toda la adsorción de la albúmina sérica lo que denota una selección del fenómeno de adsorción respecto de la otra fracción protéica. En el mismo tiempo se observa que la adsorción de la proteína total no es hecho proporcional a la cantidad de suero añadido.

La naturaleza de la adsorción de la proteína sérica ha estado estudiada con la experiencia de dilución del depósito adsorbido del hidróxido de aluminio, en ciertas condiciones de trabajo, según ciertos criterios para la escogencia del diluyente y del pH.

Se ha notado que la dilución es asintótica (sic: asymptótiqne), decreciente, según una curva regular. La elución no es total: de la pequeña cantidad de proteínas quedan finalmente adsorbidas.

El fenómeno de elución es progresivo, en fases sucesivas, hasta un cierto límite.

El suero sanguíneo no es adsorbido en presencia de uno de sus elementos, la adsorción del suero no es hecho progresivamente y no es hecho proporcional al exceso de suero añadido sobre el valor óptimo de suero adsorbido.

Es característica la adsorción selectiva de la albúmina con relación a la globulina: las albúminas vienen adsorbidas casi enteramente aunque las

cantidades de suero sean de mucha superioridad a la concentración óptima del suero. Así que la eliminación de la globulina es más fácil aunque a la concentración óptima del suero adsorbido y tiene un modo proporcional a la cantidad de suero inicialmente adsorbido.

Popovichi, Georgescu, Gogoase e Taga, han estudiado la adsorción del suero anti-septicémico sobre el hidróxido de aluminio. Han demostrado sea biológicamente como únicamente que el sobrenadante de una mezcla de suero anti-septicémico con hidróxido de aluminio en la proporción de 28% no contiene proteínas séricas y no protege contra una infección de Pasteurellas. En vez, el adsorbido, contiene los anticuerpos respectivos capaces de proteger un ratón contra la infección respectiva. En vez, la globulina diluída por vía química, posee un valor protector sobre el ratón, mientras las primeras eluciones protegen el 100% de ratones, las eluciones sucesivas tienen un poder decreciente hasta la 12ª delución que no protege ningún ratón.

La globulina respectiva del depósito aluminico protegen aún al inicio el 100% de ratones y después del 13 pasaje, lo que queda no protege más que el 14% de ratones inoculados.

Los resultados del análisis químico de la cantidad de globulina, extraída por elución, muestran una concordancia perfecta con los resultados obtenidos por vía biológica.

La inmunidad pasiva de un suero antisepticémico se establece inmediatamente después de la inoculación y alcanza el máximo después de 4 a 6 horas de la inoculación.

Si en vez el suero, viene adsorbido del hidróxido de aluminio, la inmunidad pasiva se establece progresivamente hasta alcanzar el máximo solo a las 24 horas.

Procediendo a las experiencias de selección con proteína sérica adsorbida al hidróxido de aluminio, en la proporción del 28, 50 y 75% del suero e inoculando lotes de ratones con las dosis correspondientes del suero anti-septicémico, se constata que los animales resisten en el mismo modo a todas las variantes.

En la investigación de hemaglutinación (HA) y de la inhibición de la hemaglutinación (H.A.I.) en la peste aviar, Taga, Suhaci, Surdan e Mihaita. Etude sur la application de la reaction de hemagglutination et de l'inhibition de l'hemagglutination, dans la peste aviaire. Bul. St. Acad. R.P.R. 2. Nro. 5, 1950, han demostrado que mediante la reacción de la H. A. se puede hacer una titulación precisa de la capacidad adsorbente del hidróxido de aluminio, con relación al producto virulento utilizado para preparar la vacuna.

Se puede igualmente determinar, la capacidad adsorbente del hidróxido de aluminio mediante la variación de la cantidad del producto virulento hasta la saturación.

Mediante el empleo del hidróxido de aluminio en cantidad determinada se puede desproteinizar el suero del bovino o algún otro suero, dejando el resto del componente del suero normal a pequeñas moléculas como los aminoácidos, las vitaminas y otras substancias.

La adsorción sobre hidróxido de aluminio debe ser hecho en una proporción capaz de asegurar estas condiciones utilizando un adsorbente muy puro (como aquel procedente de la reacción según Willstatter) para alcanzar una adsorción total de la proteína. De la investigación seguida, resulta que los factores del suero homólogo bovino, necesario a la supervivencia y a la multiplicación de la célula, son presentes en el mismo modo ya sea en el suero desproteinizado como en el ultrafiltrado preparado según la técnica de Simme e Sanders, original o modificada.

En una serie de experiencias seguidas para explicar los fenómenos que tienen lugar luego en el organismo después de la inoculación del hidróxido de aluminio, y la modificación hematológica e histológica producida por la inoculación de este material, se ha comprobado que en el punto de la inoculación, aparece un nódulo que es un granuloma de cuerpo extraño, que perdura por largo tiempo en el tejido conjuntivo subcutáneo. Histológicamente se comprueba una reacción histocitaria que se ve evidente después de las 24 horas y alcanza el máximo al 8º a 9º a 10º, día, disminuyendo en seguida, dejando en su punto un proceso de encapsulamiento del granuloma.

El hidróxido de aluminio es tóxico en la proporción 6 c.c. por kgmo. de peso vivo.

Haddow ed Idnani (Vaccination contre la peste aviaire. The Tropical Agriculturist juillet, septembre, 1957 ó Bull. Off. Int. Epiz. XXIX, 1948. Pág. 407)— describen esta técnica de preparación de un gel de Hidróxido de Aluminio:

Solución de amoníaco, al 10% - 100 c.c. son vaciados en 600 c.c. de agua a 63 grados C. en la cual se han disuelto 22 gramos de sulfato de amonio, la temperatura es rápidamente portada a 58 grados C. La solución es agitada vigorosamente y después se agregan 150 c.c. de agua en la cual se disuelven 76,7 gms. de alumbre amoniacal puro a 58 grados C. Se agita la mezcla por quince minutos en un frasco cerrado y manteniendo la temperatura a 60 grados C. Se transporta la mezcla a un recipiente cilíndrico, alto, donde se lava el precipitado con cinco litros de agua destilada y se deja decantar (no centrifugar). Al cuarto lavado, agregar al agua 80 c.c. de amoníaco al 20%. Los lavados son repetidos 20 veces al menos, hasta que el líquido sobrenadante aparezca completamente claro. Los últimos dos o tres lavados requieren igual número de días. La suspensión final del volumen de un litro, se deja a temperatura ambiente por espacio de dos o tres meses, antes de usar el hidróxido.

PREPARACION DE LA SOLUCION DE GLICOCOLA Y SODA

1) — Instalación.

La instalación es muy simple; consta de recipientes que se encuentran fácilmente en todos los laboratorios.

Por ejemplo, un recipiente cilíndrico en acero inoxidable de las siguientes dimensiones:

Diámetro.....	53 c. c.
Altura.....	60 c. c.
Capacidad.....	130 litros

Está provisto de un agitador Marelli a hélice para facilitar la solución. Este recipiente está montado en ruedas para facilitar sus movimientos.

Es necesario, disponer de botellones de vidrio, y de un autoclave para la esterilización.

Material empleado

a.) Glicocola, que es aquella del comercio Q. P. debe ser cuidadosamente examinada. Mejor hacerle el análisis en algún laboratorio químico.

b.) **Cloruro de sodio.** — De un laboratorio que suministra el cloruro de sodio sintético, que es preparado por síntesis de los dos elementos o proveniente de la depurificación de la sal marina. Así se evitan las impurezas que pueden encontrarse en este último.

c.) **Hidrato de sodio.** — Se emplea el de la fábrica "Merck" que lo suministra en pastillas, se debe tener en cuenta la avidéz de agua que tiene este producto para su conservación. Los recipientes de empaque deben ser cerrados herméticamente, tan pronto lleguen al laboratorio, deben ser repartidos en pequeñas cantidades en frascos oscuros y pequeños, que se emplean en su totalidad al preparar la solución requerida, así se evita la humedad que en el tiempo de conservación el hidrato de sodio puede absorber.

d.) **Agua destilada.** — Debe ser preparada con toda la técnica requerida y ojalá examinada para impurezas.

Preparación de la Solución

La composición de la solución isotónica de glicocola y soda dada por

Waldman para preparar su vacuna se ha variado. La diferencia no está en la relación entre las diversas sales, pero sí en su concentración en la solución a añadir al hidróxido para la preparación de la vacuna.

Se ha variado su composición por el siguiente motivo:

Cuando se ha tratado de reducir al mínimo el volumen de la dosis de vacuna, se ha visto la necesidad de poder disponer de la máxima cantidad de agua posible para poder tratar el virus para su extracción. Razonando en este modo se ha concentrado notablemente la solución tampón de glicocola y soda y se ha puesto a disposición el agua para extraer el virus.

En ningún modo esta modificación ha portado daños en la práctica. Hoy

no se habla de dosis de vacunas de 50-60 c.c.

Preparación de la solución de formalina

La solución de formalina para la vacuna anti-aflosa viene usada en la cantidad de 0,08% ó 0,07% si se trata de una formalina al 35% ó al 40% respectivamente.

La solución de formalina "Merck" viene a una concentración del 40%. Por sus pérdidas eventuales (evaporación, etc.), se usa regularmente tomada al 35%.

Ejemplo: — Si se usa la formalina "Merck" al 35%, cuanta cantidad será necesaria para 360 litros de vacuna a preparar.

SOLUCION TAMPON ISOTONICA A LA GLICOCOLA

Para obtener la cantidad de litros	4.000	12.000	24.000	48.000	72.000	96.000
Agua destilada	3.790	11.375	22.750	45.500	68.000	91.000
Cloruro de sodio	0.176	0.527	1.053	2.106	3.159	4.212
Glicocola . . .	0.228	0.685	1.370	2.741	4.113	5.482
Hidrato de sodio	0.017	0.052	0.104	0.208	0.312	0.416

Hidrato de sodio, puro en pastillas "Merck" 6472.

Glicocola, químicamente pura "Merck" (H₂N CH₂ COOH).

Cloruro de sodio Q. P. para análisis.

Técnica—Depositar el agua destilada en un recipiente de acero inoxidable, provisto de un agitador eléctrico, agregarle la glicocola y el cloruro de sodio, el hidrato de sodio, se disuelve antes en una pequeña porción de agua y después de estar bien disuelto se agrega al total, agitar el contenido por espacio de 5 minutos, pasarlo a través de una tela limpia a pirex y en cantidad de 4 litros cada uno, esterilizar los pirex 1½ hora a 120 grados C. (1 atmósfera).

Se procede así: — Si para 100 c.c. de vacuna, corresponden 0,08 de formalina al 35%, para 360.000 c.c. ¿cuánto corresponderán?

$$\frac{100}{0,08} = \frac{360.000}{X} = \frac{288.00}{100} = 288 \text{ c. c.}$$

Los 288 c.c. pueden ser disueltos en cierta cantidad de agua, que generalmente no se tiene en cuenta.

Cálculo para reducir una formalina del 40% al 35%

$$35:40 = 0,07: X = 0,08$$

De dónde: Si se tiene una solución al 40% de formalina, se usará ésta en proporción del 0,07% que equivale a decir 0,7 por mil.

En cambio si se tiene una formalina al 35% se usará en proporción del 0,08% que equivale a decir: 0,8 por mil c.c.

PREPARACION DEL VIRUS DE EXTRACCION

VIRUS NATURAL

a). — Centros de producción del virus natural.

Son mataderos públicos o privados, donde por el número de cabezas que vienen diariamente sacrificadas, se puede con un gasto mínimo, proveer una instalación conveniente para la contención de animales a inocular y otra para los animales inoculados. La contención de los animales. La prepa-

ración del virus a inocular y finalmente la conservación del epitelio lingual recogido.

Es siempre un Veterinario que es el responsable de la buena marcha del centro.

Se ha seguido la práctica de vacunar los bovinos que se encuentran en tres kilómetros de radio. La vacunación es hecha gratuitamente y se repite en el caso de aparición de nuevas cepas, aún antes de la expiración de la última vacuna.

Los centros productores se sirven con matrices extraídas en solución tampón y conservadas, congeladas después de la filtración, al llegar al centro, el virus se disuelve en una solución al 4% y se inyecta en la cantidad de 20 c.c. en diversos puntos de la lengua a cada uno de los bovinos a infectar. La extracción del virus concentrado y filtrado se hace a 1:10 para que la dilución final corresponda al 4 por mil o mejor al 1:250.

Se puede decir que los resultados de este sistema son bastante buenos, pero no es posible evitar la contaminación que es debida a que los animales se encuentran en período de incubación con otra clase de tipo de aftosa.

Cuando la posibilidad de contagio disminuye, la producción regresa a ser pura. Desde el punto de vista de la preparación de la vacuna, esta contagiosidad, no tiene importancia, ya que al examinarlo para investigar el virus, se ve que pertenece a otro tipo y viene descartado para ser utilizado cuando ocurra vacuna de ese tipo.

En los centros de producción más importantes, en vez de proceder con jeringas de 2 c.c. (de dentistería) con

aguja corta y a punta roma, se procede a la preparación de algunos litros de suspensión que se ponen en una bomba, donde se puede por medio de un compresor conectado a una pistola, por medio de aire comprimido, a la cual se inserta la aguja de la jeringa, así se procede a inocular más rápidamente y sin fatiga particular.

CULTIVO DEL VIRUS AFTOSO

METODO DE FRENKEL

Aparatos e instrumentos.

El método de Frenkel para cultivar el virus aftoso, consiste en cultivar dicho virus en un líquido adaptado, en presencia de pedazos de epitelio lingual de bovino sano, en la cantidad suficiente para la preparación industrial de la vacuna anti-aftosa.

Se hace necesario disponer de una especial instalación para los métodos siguientes:

- a.) Inmovilizar la lengua del animal apenas viene de ser sacrificado.
- b.) Para cortar el epitelio a utilizar.
- c.) Para cortarlo en pedazos pequeños sin mucha manipulación.
- d.) Para cultivar el virus en un ambiente oxigenado y en continua y lenta agitación.
- e.) Para volverlo apto a las ulteriores operaciones que permiten extraer del epitelio lingual cultivado la mayor parte de virus.
- f.) Para volverlo apto a ser adsorbido del hidróxido de aluminio que entra en la preparación de la vacuna.

a.)—Aparato para fijar la lengua.

Originalmente ha estado utilizada la cubierta de una caneca de leche, que es un disco de una robusta lámina de hierro estañada del diámetro de 21 cms. con el borde cilíndrico de la anchura de 8-9 cms.

El borde de la cara cilíndrica, tiene un hueco de 6,5 cms. de diámetro que se prolonga a la izquierda en una hendidura triangular de 20 cms. de largo. En el lado opuesto de ésta ha estado abierta una abertura rectangular de 16 cms. de larga por 4,5 cms.

Sobre el disco de cubierta, volteado, que viene a ser el fondo del aparato, se hacen dos huecos en posición diametralmente opuesta que sirven para fijarse sobre dos salientes de la mesa de trabajo. Así fijada, la cubierta no gira para poder extender la lengua con facilidad y hacer el esfuerzo que se desee.

La lengua cortada, en su parte posterior, viene introducida en el cabo de la cubierta. Se toma de la punta y se saca por el hueco redondo, se fija ventralmente la punta con un doble gancho aplicado en una placa de 15 x 6,5 cms. como se muestra en la figura, se tira con fuerza de modo de estirar lo mayor posible la lengua sobre la cara de la cubierta con el epitelio sobre el lado externo de ésta, luego se fija la lengua al extremo opuesto que es con el que se ha hecho la tracción al apósito fijado en justa posición en esta cara. Con el otro gancho que se aplica en el punto correspondiente al promontorio, se practica una tracción notable en sentido opuesto con el fin de estirar aún más la len-

gua y tenerla así presionada sobre la superficie y de consistencia más dura para la operación subsiguiente; aún el mango de este gancho, se fija al apósito correspondiente.

Razamiento del epitelio lingual.

Se usa una Berkel (máquina italiana) modelo P-14 (114) con un motor monofásico de 1/6 de H.P. a 1.450 revoluciones, como la que se usa para cortar filete de pescado o jamón. Para su empleo es necesario descartar el aditamento que las fábricas le ponen para su empleo comercial, o en caso contrario, regular el corte a fin de obtener fácilmente el grosor de 50 micrones.

Aparato para cortar el epitelio

Está constituido de un soporte oblicuo accionado de un movimiento rotatorio lento, sobre el cual se fija un recipiente a boca larga de la capacidad de un litro en los cuales van además de líquido cultural, los epitelios de cuatro lenguas y de un par de tijeras especiales en acero inoxidable, accionadas de un movimiento de va y viene para cortar bien el epitelio.

Las tijeras son constituídas de una lámina de acero inoxidable templado, del espesor de 3 mms. y de la forma que aparece en la figura. La lámina fija es de 22,5 cms. de larga y de 4,6 de ancha, la superior es de 3,8 de larga y el doble cortante de 5,3 cms. (oblicuo, 5,8) el pedazo móvil es de 14 cms. de largo y con 7 cms. de punta afilada de ambos lados y de una adaptación para el movimiento de va y viene a 5 cms. de la otra extremidad

con un hueco central para el movimiento. Los golpes de tijera son en número de 300 al minuto.

Recipiente para el cultivo.

Está constituido de una caneca de 60 litros, para usar de 30 a 40 de terreno cultural. Es en acero inoxidable y debe ser construida a capacidad de vacío.

La cubierta lleva:

1) Dos miradores en posición opuesta uno para la iluminación y otro para la observación.

2) Una apertura con tapa de goma con dos usos, uno para la entrada del material y el otro para el vacío. Terminada la llenada, se cambia esta tapa de dos entradas por una cerrada para el respiradero.

3) Un árbol central rodante constituido de un tubo sutil en acero inoxidable, terminado en forma de T para la inserción de dos bujías Chamberland 5 £ 3. El árbol es tenido con dos empaques y una comunicación con un tubito de goma fijado a la cubierta, a través del cual se introduce el carbógeno.

4) Un motorcito con rotator que hace girar el árbol el cual da una revolución de 16 al minuto.

5) Un rompeolas con lámina de acero inoxidable.

Otros aparatos.

Centrífugas para extraer el virus, Refinadoras para deshacer el remanente epitelio, son empleados en la normal fabricación de la vacuna.

Técnica de ejecución.

La lengua se desprende del animal tan pronto el animal viene de ser sacrificado, el que la recolecta le pondrá un número de control, así se puede restituir fácilmente al propietario. Las lenguas vienen enviadas al laboratorio dos horas después de sacrificar el animal.

La lengua viene sometida a los siguientes procesos:

1.) **Lavada en agua fría.** Se utiliza el agua corriente continua y frotándola con un cepillo fuerte para desprenderle las partículas de alimento y otras suciedades.

2.) **Examen de la lengua.** Antes de proceder a la operación sucesiva, se examina bien la lengua para cerciorarse que sea perfectamente sana. Las lenguas con lesiones tuberculosas, actinomicosas, etc., se descartan.

3.) **Fijación de la lengua.** Se efectúa siguiendo las instrucciones que se dieron al describir el aparato utilizado para tal fin. Cerciorarse antes de comenzar la operación de que la superficie epitelial esté bien extendida y no se forme una concavidad en la parte central.

4.) **Lavado con agua tibia a 45 grad. C.** Con la lengua fijada, se hace una nueva lavada con agua tibia a 45 grad. C. frotándola con un cepillo de cerda fina, estéril, se ponen encarradas para la operación siguiente:

5.) **Desinfección.** Se hace con alcohol a 70 grad. que corre en abundancia de un recipiente adaptado y al tiempo se frota la lengua con un cepillo empapado en alcohol. Se ponen

las lenguas en una fuente para dejar evaporar el alcohol.

6.) **Razamiento de la mucosa epitelial.** Se hace con la máquina descrita en B, sobre la lámina cortante, cae gota a gota una solución Tyrode que viene de un frasco con un sifón, esto para facilitar el desprendimiento de la lámina. Todas las partes de la máquina que se ponen en contacto del epitelio, son desinfectadas con alcohol a débil llama. Antes de iniciar esta operación, el empleado desprende con una pasada ligera, el extracto de papilas córneas salientes, especialmente desarrolladas en el tercio inferior de la lengua, éstas se desperdician. Después de esta operación, se hace una nueva desinfección de la cuchilla cortante con alcohol a débil llama.

Se procede a desprender el epitelio en láminas de 50 micrones que vienen recogidas por un empleado con una pinza estéril y puestas en un vaso a boca ancha (de mermelada) y de la capacidad de un litro. En este vaso, ha estado puesto el líquido de Baker modificado por Frenkel en la proporción de 250 c.c. para cada vaso y con capacidad para el epitelio de cuatro lenguas, 30 gramos por lengua. El epitelio del promontorio no viene recogido. Tener cuidado de no cortar la capa muscular. El epitelio puede conservarse en estos vasos por 24 a 48 horas en nevera y a la temperatura de + 1 + 4 grad. C., o en su defecto se procede a la picada con el aparato especial descrito en el C.

7.) **Picada del epitelio.** Se hace, poniendo el vaso anterior en el plato rotante de la tijera automática, en 8 a 10 minutos son bien picados el epitelio de cuatro lenguas. La mezcla de

terreno de Frenkel y de epitelio, constituye el terreno básico en el cual se siembra, se cultiva y desarrolla el virus del afta. Es este el cultivo que sirve como virus para la preparación de la vacuna anti-aftosa.

Cultivo del virus.

En el recipiente de cultivo, previamente esterilizado, se aspira en forma estéril, el líquido y los pedacitos de epitelio desmenuzados. Se aspira aún en el recipiente de cultivo, tanto líquido como sea necesario para alcanzar el volumen total de 250 c.c. por cada lengua utilizada (hacer el cálculo). En este líquido se disuelve antes, las cápsulas de cloromicetina Parke Davis en la proporción de 0,25 gms. por cada 10 lenguas o de 10 gms. por cada 10 litros de terreno de cultivo final.

Hoy se ha variado el antibiótico y sus proporciones, se emplea la Neomicina con muy buen éxito, se emplea asimismo mezcla de varios antibióticos que se disuelven en un poco de agua y se agregan después al recipiente de cultivo.

Después de la completa introducción del líquido de cultivo en el recipiente, se procede a introducir por aspiración y agitando el virus a sembrar (Q-A-C) que está representado por 15 c.c. de líquido de un cultivo precedente y filtrado a través de Seitz, para cada lengua sembrada. Calcular la cantidad multiplicando el número de lenguas por 15 c.c.

Resumiendo diremos: para diez litros de medio de cultivo es necesario:

40 epitelios linguales distribuidos y desmenuzados en 2.500 c.c. de líquido de Frenkel repartido en diez vasos.

4 cápsulas de cloromicetina de 0,25 c/u. que representa un gramo de cloromicetina Parke Davis diluida en 7.500 c.c. de líquido de Frenkel tibio.

600 c.c. de líquido de sembrar que es el líquido de un cultivo precedente esterilizado por filtración a través de Seitz EK.

Al terminar la operación, el recipiente es llevado al termostato a 37 grad. C. y conectado a un cilindro de carbógeno (97% de oxígeno + 3% de anhídrido carbónico), el paso del gas es controlado. La presión a usar es de 0,8 a 1 atmósfera.

Durante 24 horas que dura la incubación el recipiente se mantiene en continua agitación lenta, que debe ser vigilada.

Con una nueva innovación, la incubación en el termostato se prescinde y es reemplazada por una doble cámara que reviste el recipiente y donde circula agua a 37 grad. C., esta viene controlada con un termómetro y accionada con un interruptor eléctrico.

Es inidicio de un buen cultivo, la formación de poca espuma, y al abrir el recipiente un ligero olor a perfume de azahar, o flores de naranjo.

En los primeros pases de un virus procedente de un bovino, es necesario aumentar la cantidad de líquido a sembrar, llegando hasta 60 c.c. para cada lengua.

Los virus que vienen enviados al laboratorio y recogidos en el campo, algunas veces, no todas, son fácilmente cultivables, hay necesidad de insistir y no desconsolarse.

El virus de cultivo es menos viscoso del proveniente del animal y filtra más fácilmente.

FORMULA DEL MEDIO DE FRENKEL

(1) L	Histidina (monoclorhidrato)	0.038	Grms.
(1) DL	Triptófano	0.100	Grms.
(1) DL	Fenilalanina.	0.050	Grms.
L	Leucina	0.1309	Grms.
(1) DL	Metionina	0.200	Grms.
L	Arginina (monoclorhidrato)	0.050	Grms.
L	Lisina Clorhidrato	0.200	Grms.
DL	Treonina (sin alo-treolina)	0.085	Grms.
L	Cisteína (clorhidrato)	0.125	Grms.
	Niacina (ácido nicotínico)	0.001	Grms.
	Pantotenato de calcio (destrógeno).	0.250	Grms.
	Hemina Cristalizada	0.036	Grms.
	Tiroxina	0.009	Grms.
	Insulina	0.9	Unid.
	Peptona	3	Grms.
	Glucosa	1	Grms.
	Cloruro de Sodio	7.2	Grms.
	Cloruro de Potasio	0.180	Grms.
	Cloruro de Calcio anhidro	0.180	Grms.
	Cloruro de Magnesio 6H ₂ O	0.090	Grms.
	Fosfato monosódico	0.045	Grms.
	Bicarbonato de Sodio	1	Grms.
(x)	Solución Tampón	32	c. c.
	Agua destilada	1.000	c. c.
(1)	Disolver en agua caliente.		
(x)	Solución Tampón:		
	NaH ₂ PO ₄ 2H ₂ O p. q.	2.6	Grms.
	Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O p. q.	36	Grms.
	Agua destilada	1092	c. c.
D	Dextrógiro.		
DL	Destrógiro Levógiro.		
L	Levógiro.		

De "Méthodes d'identification et de culture des virus de la fièvre aphteuse. OECE Organ Européenne de cooperation économique. Paris 1957.

Ensayo de pureza del agua destilada.

10 c.c. no dejan ningún depósito a la evaporación. Con ácido sulfúrico o con sulfuro de amonio no se ennegrece, (presencia de hierro, plomo, cobre). Con el cloruro de bario no se enturbia (sulfatos). Con nitrato de plata no se enturbia (cloruros). Con oxalato de amonio no se enturbia (sales de calcio). 100 c.c. no deben dar color amarillo con el reactivo de Nessler (presencia de sales amoniacaes).

100 c.c. más 1 c.c. de ácido sulfúrico más 0,1 c.c. de una solución al 10/00 de permanganato de potasio, deben mantener la coloración rosásea durante tres minutos de ebullición.

Antibióticos para el líquido de Frenkel

(Instituto Zooprofiláctico Brescia doctor Cessi).

- Estreptomicina . . . 0,8 mgms. por c.c.
- Penicilina . . . 0,06 mgms. por c.c.
- Neomicina. . . 0,06 mgms. por c.c.
- Cloromicetina... 0,06 mgms. por c.c.
- Micostatín . . . 80 unidades c.c.
- Colemicina . . . 0,06 mgms. por c.c.

En resumen, cada c.c. de medio, demanda la cantidad de antibióticos anotada.

pH del medio Frenkel

El pH del medio de Frenkel varía entre 7,47, 5-7,6. Hay necesidad de ajustar el pH antes y después de sembrar el virus, pues con esta operación, el medio se acidifica un poco. Para corregir el pH se usa una solución de bicarbonato de sodio.

Fórmula final del medio Frenkel FC/1

50 c.c. de epitelio matriz, tipificado, extraído según la técnica descrita en 500 c.c. de solución M/180, su pH = 7,6-7,8. Usar el turmix, centrifugar y filtrar a través de K-5, K-7 y EKS. Seitz.

- Epitelio Normal, lavado con solución Tyrode y escurrido 1 kgm.
 - Líquido de Frenkel FC/1. 10 litros
 - Estreptomicina. 8 gms.
 - Penicilina. 0,6 gms.
 - Neomicina. 0,6 gms.
 - Cloromicetina 0,6 gms.
 - Colimicina 10 miligr.
 - Micostatín 800.000
- Unidades I.

pH = 7,6-7,8. Ajustar con solución de Bicarbonato de Sodio.

Para propaganda en esta Revista diríjase al Administrador

JUAN N. BAQUERO

Calle 17 N° 15-30 - Apartamento 202

Apartado Nacional 276 - Bogotá

MEDIO DE FRENKEL—(Instituto Zooprofiláctico) Brescia-Italia**Cantidades determinadas para 10 litros de terreno.**

I—Caseína (Lisado enzimático) Costantino	10	Grms.
Triptófano	0.90	Grms.
Treonina	0.40	Grms.
Leucina	0.30	Grms.
Metionina	1.20	Grms.
Ácido pantoténico	2	Grms.

(Disolver en 5 lts. de H₂O dest. y caliente).

II—Peptona (costantino)	30	Grms.
Cisteína	1.20	Grms.
Hemina y Tiroxina	0.35	Grms.
Insulina	0.225	Grms.
Glucosa	10	Grms.
Cloruro de Sodio	72	Grms.
Cloruro de Potasio	1.80	Grms.
Cloruro de Calcio	1.80	Grms.
Cloruro de Magnesio	0.90	Grms.
Fosfato de Sodio (Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O)	0.45	Grms.
Bicarbonato de sodio	16	Grms.
Arginina	0.20	Grms.
Lisina	1.20	Grms.

(Disolver en agua destilada fría) (5 lts.)

III—Iso-buffer	320	c. c.
--------------------------	-----	-------

(Disolver I y II y éstos en III).**Preparación del Iso-Buffer**

NaH ₂ PO ₄ 2H ₂ O	3.48	Grms.
Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O	47.46	Grms.
H ₂ O	1.440	Lts.

pH=7, 5—7, 6.

SOLUCION TYRODE CONCENTRADA**Cantidades para 3 litros (3.000 C. C.)**

Triturar en un mortero 1.5 grms. de Rojo fenol, disolverlo en 423 c. c. de NaOH N/100.

En un pirex de 5 litros, medir 3 litros (3.000 c. c.) de agua destilada y agregarle:

Cloruro de Potasio	60 gramos
Cloruro de Calcio	60 gramos
Cloruro de Magnesio	30 gramos
Fosfato de Sodio	15 gramos

Distribuir en 12 botellas de $\frac{1}{2}$ litro, en cada una 250 c. c. y añadirle a ca-

Preparar aparte:

12 cajas de cartón parafinado, conteniendo cada una:

Cloruro de Sodio	200 gramos
Bicarbonato de Sodio	25 gramos
Glucosa	25 gramos

Mezclar en el momento del uso.

Hemina y Tiroxina

Tiroxina	5 miligramos
Alcohol absoluto	6 c. c.
NaOH al 1%	2 c. c.
Agua bi-destilada	2 c. c.

Concentrar la mezcla al baño maria, hasta alcanzar 3 c. c., enfriar y agregar agua destilada hasta 10 c. c. Agrregar 20 miligramos de hemina, y al total agregar 190 c. c. de agua bi-destilada.

Extracción del virus para sembrar los cultivos.

Para sembrar los cultivos se usan generalmente 20 gramos de virus-epitelio tipificado, por cada 1 kilo de epitelio normal bovino. La extracción del virus de la matriz, viene hecha con líquido M/180 y en cantidad de 15 c. c. por cada gramo de epitelio lingual.

Calcular la cantidad necesaria de matriz para una determinada siembra, calcular la cantidad de M/180 necesaria para la extracción del virus de la matriz (según sea la capacidad del Turmix) con 1 parte de M/180.

Después de 5 minutos al baño maría, filtrar en cedazo de cobre, el material recogido en la red, viene de nuevo resuspecto y se continúa así hasta tomar todo el M/180.

El filtrado que es primero de color gris, se vuelve más claro según el número de extracciones. El material obtenido puede usarse como tal para la siembra (contaminación fácil) o puede venir centrifugado y filtrado (filtro clarificante y esterilizante).

Conservación del epitelio lingual

El epitelio lingual que al momento de su recolección viene recibido en líquido Tyrode a la cloromicetina 250 gramos por litro, antes de ser utilizado sigue un lavado riguroso a través de un cedazo de cobre y con líquido Tyrode en abundancia. Cada lengua da una media de 40 gramos de epitelio, 1 kg. corresponde a 25 lenguas de un tamaño normal. El epitelio lingual así conservado puede durar 1 semana o más, a condición de que el líquido

Tyrode venga cambiado al menos cada 48 horas.

Preparación del extracto de virus para sembrar en el Medio de Frenkel epitelio bovino.

Después de hacer el cálculo para ver la cantidad de líquido necesario que debe ser sembrado (15 c.c. por cada lengua utilizada). Para obtener un título de $10^{-7,5}$ que es el que debe tener el extracto de virus, es necesario disponer de la cantidad de epitelio tipificado, puesto en cajas de cartón parafinado y conservado en congelador. Por cada 5 litros de M/180 usar 500 gramos de epitelio triturado.

Este epitelio, triturado, que recibe el nombre de matriz, es tomado de un cultivo anterior, que ha sido tipificado y triturado en máquina de moler, después conservado en congelador hasta el momento de usarlo.

Dejar descongelar el epitelio matriz, pequeñas porciones son mezcladas con una porción de M/180 y luego agitadas en Turmix, coladas a través de tejido limpio y el líquido obtenido, es centrifugado, el líquido sobrenadante, es filtrado a través de Seitz EK y EKS y K7. El depósito colector es mantenido bajo la influencia del frío. El extracto así obtenido es llevado al frigorífico hasta su utilización.

El residuo de la colada y de la centrifugación es utilizado como material de extracción de virus, junto con el epitelio producto del cultivo.

Este extracto es sembrado según la técnica del cultivo en Frenkel, por aspiración y previa agitación.

pH del extracto de virus. = 7,6-7,8.

Matriz

Las cepas de virus que se quieren conservar como matrices, vienen primero adaptadas al cultivo, cuando se deduce que están completamente adaptadas (DI₅₀ en ratones 10⁷) se alistan cultivos de proporción superior a la precedente. Después de 24 horas el epitelio se recoge en cajas de cartón, apergamizadas y parafinadas y se conservan en un congelador (DI₅₀ en ratones 10⁻⁷).

Los cultivos sucesivos se hacen partiendo de estas cajas. El número de pases de estos cultivos no deben ser muchos, de otra manera, se pierden sus características antigénicas.

Solución Tampón Fosfática.**Molar 180 (M/180)**

La concentración de la solución puede expresarse en varios modos:

- a.) Gramos de soluto en 100 gramos de solución.
- b.) Gramos de soluto en 100 c.c. de solución.
- c.) Número de moléculas de soluto en 1.000 gramos de solvente.
- d.) Número de moléculas de soluto en 1.000 c.c. de solución.

Para calcular la molaridad de una solución basta dividir el número de gramos de soluto contenidos en 1.000 c.c. de solución, por el peso molecular del soluto.

La fracción molar de un componente, es la relación entre el número de moléculas de aquel compuesto y el número total de moléculas.

Peso molecular del Fosfato bisódico seco.

(Na₂ HPO₄) — 2 H₂O es: 178 - 074.

Peso molecular del Fosfato monopotásico.

(KH₂ PO₄) igual: 136 - 156.

Peso M/180 del Fosfato bisódico seco, igual: 0.7564.

El pH = 7.60 se obtiene con la mezcla de:

8,9 (c.c. 380) de la solución bisódica, 1,7 (170 c.c.) de la solución monopotásica. Para hacer 100 litros de solución, se procede así:

1.)—Disolver:

82.02 grms. de Na₂ HPO₄ · 2H₂O en 20,000 litros de H₂O.

2.)—12.86 de KH₂ PO₄ en 20,000 litros de H₂O.

3.)—Llevar el volumen total a 100 litros después de mezclar las dos soluciones.

CULTIVO DEL VIRUS AFTOSO

(H. S. Frenkel — Institut de recherches vétérinaires de l'Etat. Amsterdam, Pays Bas.).

A — Cultivos en vivo.

1) **Sobre bovinos.** Quien desee reproducir un virus aftoso, sobre un animal receptivo, puede hacerlo usando en este caso un bovino, por diferentes vías. La vía más fácil y segura es la vía intradermo-lingual. El virus puede ser recolectado de 20 a 24 horas después de la infección, cuando el animal es sacrificado. Se obtiene así, 45 gramos de epitelio y líquido virulento. Las ventajas de este método son:

- a.) Una pequeña cantidad de virus a una alta concentración por animal.
 b.) Facilidad para emplear la inyección intradermo-lingual.

Las desventajas son:

- a.) Necesidad de grandes establos aislados, uno para cada tipo de virus.
 b.) Necesidad de un establo de cuarentena.
 c.) Necesidad de un matadero aislado donde el personal sea mantenido en control higiénico para evitar la diseminación del virus.
 d.) Necesidad de una instalación frigorífica aislada.
 e.) El inconveniente de la infección de un gran número de canales y pieles, a destruir o cuya recuperación exige un tratamiento especial.
 f.) Dificultad en los países donde la enfermedad es endémica de recoger una cantidad suficiente de virus a un título elevado. (muchos países han probado el hecho de que la producción de virus es nula o pobre en los animales vivos a causa de una inmunidad anterior.
 g.) Peligro de diseminar la fiebre aftosa, creando focos de infección, aunque se tomen medidas severas.
 h.) El precio elevado del conjunto de este método.
 i.) Los sufrimientos de los dadores de virus.

2.) — Sobre ratones.

Los ratones se han demostrado útiles para la presencia del virus aftoso, como para la demostración de anticuerpos neutralizantes, etc. No se ha fijado bien, sobre su utilización como productores de virus y la preparación

de una escala práctica. Según una opinión del Profesor Ubertini, las vacunas de ratones, no son aún utilizadas en el dominio práctico.

Según Skinner, Henderson y Brookby: "Los cadáveres de ratones infectados a excepción de la cabeza y la piel y vísceras, han estado utilizadas como fuentes de virus para preparar vacunas antiaftosas formuladas al hidróxido de aluminio. Una vacuna preparada a partir de tejidos de ratón al 13 pasaje de la cepa 119 Vallée, ha estado controlada sobre bovinos a las dosis de 100, 30 y 10 cms. c. Dos semanas después de la vacunación tres grupos de ocho vacas vacunadas y un grupo de ocho animales testigos no vacunadas, han estado inoculados por vía intradermo-lingual a razón de 10⁶ ID. 50% de la cepa 119 pasada a bovinos con diez puntos de inoculación c/u. En el grupo de 100 c.c. ocho vacas sobre ocho han estado protegidas contra el desarrollo de lesiones secundarias, lo que corresponde a una protección completa del animal contra la infección por contacto. Tres vacas no mostraron ninguna reacción. En el grupo de 30 c.c. 5 sobre 8. En el grupo de 10 c.c. cuatro sobre 8 han beneficiado de la misma protección. Los 8 animales testigos han reaccionado contra lesiones primarias extensivas y lesiones secundarias en las cuatro patas".

Estos autores declaran que son capaces de producir, a partir de tejidos de ratón una vacuna de un poder inmunizante más elevado que aquella preparada con virus bovino. Parece que los ratones de menos de 36 horas dan también un rendimiento elevado en virus.

Peso molecular del Fosfato bisódico (Seco) $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{—}2\text{H}_2\text{O}$

$\text{Na}_2=22.997 \times 2$ =	45.994
H = 1.008 =	1.008
P = 31.040 =	31.040
$\text{O}_4=16.000 \times 4$ =	64.000
$2\text{H}_2=1.008 \times 4$ =	4.032
$200=16.000 \times 2$ =	32.000
		178.074
Peso molecular		178.074

Peso molecular del fosfato monopotásico KH_2PO_4

K=39.100 =	39.100
$\text{H}_2=1.008 \times 2$ =	2.016
P = 31.040 =	31.040
$\text{O}_4=16.000 \times 4$ =	64.000
		136.156
Peso molecular		136.156

———— = 0.989; $M/180 \text{ Na}_2\text{HPO}_4 = 0.9893 \text{ gms.}^\circ/_{100}$.
180

2) —136.156
———— = 0.7564 $M/180 \text{ KH}_2\text{PO}_4 = 0.7564 \text{ gms.}^\circ/_{100}$.
180

Para un pH de 7.60 es necesario 8.3 partes del N° 1 y 1.7 partes del N° 2.

$0.9892 \times 8.3 = 8.202$ en 8.300 litros y

$0.7564 \times 1.7 = 1.286$ en 1.700 litros

Total 10.000 litros

10 litros de una solución fosfática M/180.

Para propaganda en esta Revista diríjase al Administrador

JUAN N. BAQUERO

Calle 17 N° 15-30 - Apartamento 202

Apartado Nacional 276 - Bogotá

3.)—Sobre Hamsters.

Los hamsters jóvenes, son reputados como receptivos al virus aftoso. Para obtener buenos resultados, esos animales deben tener menos de tres semanas.

4.)—Sobre pollos de un día.

En el Instituto de Pirbright el Profesor Gillespie, ha establecido la receptividad del virus aftoso en pollos de un día. El ha inyectado en estos animales 0,1 c.c. de virus en la vena tarsiana. A los tres días se ven lesiones evidentes, bajo forma de una infiltración leucocitaria y de la capa muscular. Las lesiones visibles a simple vista son la decoloración del músculo y su infiltración más o menos difusa. Estos animales pueden también mostrar lesiones en el miocardio y en la lengua, sin embargo, el gésier = es el más rico en virus. Este trabajo va en vía de experimentación y se persigue adaptar el virus al huevo fecundado.

5.)—Sobre huevos de gallina y de pato.

Las tentativas para realizar este trabajo remontan a 1930. Ningún resultado permite afirmar conclusiones formales para saber si el huevo puede ser una fuente de producción de virus.

6.)—Sobre terneros recién nacidos.

Recientemente Waldman, ha publicado sus trabajos del cultivo en vivo, que él efectúa en terneros de un día, estos animales han sido inoculados

antes de que hayan adsorbido el calostro. Waldman, piensa que estos terneros pueden ser una fuente de producción de virus -vacuna.

7.)—Sobre bovinos.

Combinando con el virus variólico para crear un punto de menor resistencia (Belin). Belin ha cultivado el virus aftoso, infectando bovinos sobre una superficie de la piel con el virus variólico. Las lesiones cutáneas, ofrecen una (parminoris resistance) al virus aftoso, que puede ser recolectada en gran cantidad en las lesiones variólicas. Una vacuna puede ser preparada del virus-tejido que se obtiene de esta manera.

Esta idea de forzar otras regiones cutáneas, a contribuir a la producción de virus, puede ser considerada como muy inteligente.

8.)—Sobre embriomas. — (Método de Thomas).

Thomas ha ensayado a cultivar el virus aftoso sobre fetos bovinos enteros y más tarde sobre la piel de fetos, queriendo demostrar el cultivo de grandes cantidades de virus usando el líquido amniótico ultrafiltrado. Las experiencias se han continuado.

9.)—Sobre laperaux (corderos). No se tienen informaciones completas sobre este método.**B.)—Cultivo in Vitro.**

- 1.)—Sobre tejido fetal de cobayo.
- 2.—Sobre tejido fetal de bovinos, ovinos y porcinos.

La cantidad de virus a cultivar, está de acuerdo al número de células epiteliales disponibles y no parece posibles basar la producción de virus a una escala práctica sobre trasplantes de membrana fetal. Se podrá emplear este método de cultivo en países donde la población bovina es baja y las vacunaciones escasas.

3.) — **Sobre mucosa lingual de bovinos y porcinos adultos.**

Después de la segunda guerra mundial, el cultivo del virus aftoso, en epitelios linguales de bovinos y porcinos, se ha desarrollado rápidamente.

El método y la técnica son ya descritos, la modificación más importante es la de no desmenuzar el tejido antes de cultivarlo. Se utilizan láminas de mucosa, sin reducir las a pequeños fragmentos, lo que da una ventaja de disminuir la contaminación bacteriana, ya que ésta puede reproducirse a pesar de un empleo regular de los antibióticos. Se evita así mucho trabajo y tiempo. El rendimiento en virus es tan bueno como con el epitelio desmenuzado.

Hasta ahora este cultivo in vitro del virus aftoso, es el sólo que se ha mostrado práctico para la producción de vacunas en serie. Los laboratorios que

han empleado este método han alcanzado grandes ventajas.

A menudo se hace un paralelo entre la vacuna Waldman con el de Frenkel, porque Waldman emplea para su vacuna el virus natural. El mérito de la vacuna Waldman no reside en el uso del virus natural.

Frenkel, recomienda a todos los laboratorios, estudiar su cultivo y tratar de mejorarlo.

PREPARACION DE LA SOLUCION DE ANTIBIOTICOS

La especificidad y cantidad de antibióticos, necesarios para la vacuna, son variables y están de acuerdo a la especificidad microbiana de la zona. En el Instituto Zoonofílico de Brescia, se usa la Neomicina pura, o el Sulfato de Neomicina. La cantidad a utilizar está en razón de la cantidad de vacuna a producir.

Generalmente se usa 0,75 gramos por cada 100.000 c.c. (100 litros) de vacuna preparada.

Para disolver el antibiótico, se usan de uno a dos litros de agua destilada que no se tienen en cuenta para el volumen total de la vacuna.

Ejemplo:—Si se prepara una cantidad de 360.000 c.c. de vacuna, cuánta Neomicina será necesaria?

$$\begin{array}{r}
 100.000 \quad 0,75 \\
 360.000 \quad x \\
 \hline
 0,75 \times 360.000 = 2,70 \text{ gramos} \\
 100.000
 \end{array}$$