

**TESIS MAESTRÍA EN PREVENCIÓN Y CONTROL DE
ZONOSIS**

UNNOBA

**EXPLORACIÓN DE UNA FORMA ALTERNATIVA DE
REFRIGERACIÓN PARA EL TRANSPORTE DE LA
VACUNA CANDID #1 Y SU IMPACTO EN LA
ESTABILIDAD A UN AÑO**

UNNOBA

Reforma Universitaria

Tesista: Alejandro Javier Bottale

Directora de tesis: Dra. Laura M. Riera

Noviembre 2019

NOROESTE BUENOS AIRES

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas que participaron con su colaboración de forma generosa y entusiasta para la concreción de este proyecto.

Agradezco a:

- Dra. Laura Riera, directora de tesis; Ing. Ernesto Cascardo; Farm. Sebastián Fossa; Farm. Constanza Céccoli; a los técnicos de Control y Aseguramiento de Calidad del INEVH: Gisele Lázzari, Nahuel Martinez, Alicia Escallier, Carina Paz, Florencia Cantore, Pablo Bilós y Lucas Taborda.
- Secretaria de maestría: Denise Jaccoud.
- Sr. Diego Bonanno del sector Audiovisuales del INEVH.
- Personal de los sectores de Cultivos Celulares Normales y Producción del INEVH.
- Personal del sector Epidemiología del INEVH.
- Docentes de la maestría en Prevención y Control de Zoonosis.
- Compañeros de cursada.
- Autoridades de las instituciones UNNOBA e INEVH “Dr. Julio I. Maiztegui” por su apoyo en el marco académico y científico para la realización de este trabajo.
- Agradezco también a mi familia, esposa e hijos: Gabriela, Agustina, Máximo y Tomás porque sin ellos nada es posible.

DEDICATORIA

A la memoria de mi padre Vicente B. Bottale (02-03-1943 – 12-10-2016)

CONTENIDO

CONTENIDO	4
SIGLAS Y ABREVIATURAS	7
TABLA DE ILUSTRACIONES	9
RESUMEN	12
ABSTRACT	13
INTRODUCCIÓN	14
Antecedentes.....	14
Prevención de la Fiebre Hemorrágica Argentina. Vacuna Candid #1.....	14
Justificación	22
Tema de investigación	29
OBJETIVOS	30
Objetivo general.....	30
Objetivos específicos	30
TRABAJO EXPERIMENTAL.....	31
MATERIALES Y MÉTODOS	31
Materiales	31
Diseño experimental	35
Perfil térmico	35

Prueba en terreno.....	38
Métodos.....	38
Potencia	38
pH.....	39
Osmolalidad	39
Humedad Residual	40
LAL. Endotoxinas bacterianas	40
RESULTADOS	41
Perfiles térmicos	41
Conservadora con hielo seco	41
Conservadora con geles refrigerantes	42
Prueba en terreno.....	44
Conservadoras con hielo seco y geles refrigerantes en terreno.....	44
Resumen de temperaturas de ambas pruebas	45
Ensayos de estabilidad	46
Resultados de la comparación estadística de las potencias de vacuna transportada en hielo seco y gel refrigerante	47
Comparación gráfica de los resultados de los ensayos de estabilidad.....	49
DISCUSIÓN	51
CONCLUSIÓN	59

BIBLIOGRAFÍA..... 61

SIGLAS Y ABREVIATURAS

FHA	Fiebre hemorrágica argentina
ARN	Ácido ribonucleico
INEVH	Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas "Dr. Julio I. Maiztegui"
ANMAT	Administración Nacional de medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica
IM	Intramuscular
SC	Subcutánea
°C	Grados centígrados
LAL	Limulus Amebocytes Lisate
EU	Unidades de endotoxinas
mL	Mililitros
Log.	Logaritmo
UFP	Unidades Formadoras de Placas
Inf.	Inferior
Sup.	Superior
%	por ciento
mOsm	miliosmolal
kg	kilogramo
km	kilómetro
µg	microgramo
c.s.p.	cantidad suficiente para

Pág.	página
CFR	Code of Federal Regulations
USP	United States Pharmacopeia
CO ₂	Dióxido de carbono
g	gramo
c/u	cada uno
Hg	Mercurio
ΔT	diferencia de temperatura
H.S.	hielo seco
G.R.	gel refrigerante
Prom.	promedio
<	menor a
gl	grados de libertad
VVM	Vaccine Vial Monitor
OPV	Vacuna anti poliomielítica oral
FA	Farmacopea Argentina
FDA	Food and Drug Administration
WHO	World Health Organization
OMS	Organización Mundial de la Salud
MS	Ministerio de Salud
OPS	Organización Panamericana de Salud

TABLA DE ILUSTRACIONES

Figura 1. Ciclos de transmisión de la Fiebre Hemorrágica Argentina	15
Figura 2. Distribución de los casos de FHA entre los años 1958 y 2018	16
Figura 3. Distribución de <i>Calomys musculus</i> y área endémica de FHA	18
Figura 4. Área endémica actual	19
Figura 5. Vista aérea de las instalaciones del INEVH "Dr. Julio I. Maiztegui"	21
Figura 6. Producción de vacuna Candid # 1	22
Figura 7. Potencia Candid #1 lotes de estabilidad.....	26
Figura 8. Humedad residual Candid #1 lotes de estabilidad.....	26
Figura 9. pH Candid #1 lotes de estabilidad	27
Figura 10. Osmolalidad Candid #1 lotes de estabilidad.....	27
Figura 11. Frascos de vacuna Candid #1 liofilizada	31
Figura 12. Packs de geles refrigerantes	33
Figura 13. Datalogger con 4 sondas	33
Figura 14. Envase secundario de vacuna	34
Figura 15. Conservadora de poliestireno expandido	34
Figura 16. Vehículo de transporte	35
Figura 17. Vacuna con hielo seco	36
Figura 18. Vacuna con geles refrigerante.....	36

Figura 19. Sonda en contacto con el liofilizado	37
Figura 20. Ubicación del Datalogger y sondas	37
Figura 21. Ensayo de Potencia. Recuento de unidades formadoras de placas	39
Figura 22. Monitoreo continuo de temperaturas. Conservadora con hielo seco en estufa a 40° C	42
Figura 23. Monitoreo continuo de temperaturas. Conservadora con gel refrigerante en estufa a 45°C	43
Figura 24. Monitoreo continuo de temperaturas. Conservadoras en terreno (hielo seco y gel refrigerante)	45
Figura 25. Comparación gráfica de los valores logarítmicos de potencia de la vacuna en hielo seco y gel refrigerante	49
Figura 26. Comparación gráfica de los valores de pH de la vacuna en hielo seco y gel refrigerante	50
Figura 27. Comparación gráfica de los valores de osmolalidad de la vacuna en hielo seco y gel refrigerante	50
Tabla 1. Ensayos para la aprobación del lote 28A de vacuna Candid #1 liofilizada.	32
Tabla 2. Temperaturas dentro de la conservadora con hielo seco en estufa a 40°C	41
Tabla 3. Temperaturas dentro de la conservadora con gel refrigerante en estufa a 45°C.....	43

Tabla 4. Temperaturas dentro de las conservadoras con vacuna en terreno (hielo seco y gel refrigerante)	44
Tabla 5. Resumen de resultados de los perfiles térmicos	46
Tabla 6. Resultados de los ensayos de estabilidad a distintos tiempos desde la exposición.....	47

RESUMEN

La vacuna Candid #1 contra la fiebre hemorrágica argentina se transporta hacia los centros provinciales de inmunización en conservadoras con hielo seco. Este circuito presenta dificultades al momento de la adquisición del refrigerante por motivos logísticos y económicos. El reemplazo del hielo seco por geles refrigerantes podría ser una opción adecuada si el producto se mantiene estable. Los geles refrigerantes son, a diferencia del hielo seco, de amplia disponibilidad, reutilizables y de bajo costo.

El objetivo del presente trabajo fue explorar una forma alternativa de refrigeración para el transporte de la vacuna Candid #1 liofilizada, evaluando su estabilidad térmica hasta un año después de haberse simulado el transporte hacia los centros provinciales de inmunización de la zona endémica de fiebre hemorrágica argentina.

Se acondicionaron frascos de vacuna Candid #1 liofilizada, congelados a $-20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, en dos conservadoras. Una con geles refrigerantes y otra con hielo seco. Ambas se colocaron en estufa a una temperatura externa al embalaje de 40 a 45°C con monitoreo continuo durante 24 horas para determinar los perfiles térmicos dentro de los envases con ambos sistemas de refrigeración.

Se realizó luego una prueba en terreno con el mismo diseño de embalaje dentro de un vehículo para hacer un trayecto no menor a 24 horas simulando el transporte. Se registró la temperatura de la misma forma que la prueba anterior. Al regreso, los frascos de cada conservadora fueron almacenados inmediatamente a $-20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ a la espera de la realización de los ensayos de estabilidad. Los ensayos indicadores de estabilidad fueron: potencia, pH, osmolalidad, humedad residual y endotoxinas (LAL).

La temperatura dentro de los frascos con vacuna en hielo seco, resultó en todos los casos, de acuerdo a lo esperado según las características de este refrigerante. En cuanto a lo sucedido con los frascos mantenidos con geles refrigerantes, pudieron observarse temperaturas promedio muy próximas a los 0°C , a pesar de que la máxima alcanzada en el vehículo fue de $57,5^{\circ}\text{C}$.

Se realizaron los ensayos de estabilidad de la vacuna al mes, a los 5 meses y al año de la exposición en el vehículo. En ningún caso se encontraron resultados fuera de especificaciones y se evidenció que la utilización de geles refrigerantes en lugar de hielo seco para el transporte de la vacuna por períodos limitados de tiempo, no afectó de manera negativa a la potencia.

ABSTRACT

The Candid # 1 vaccine against argentine hemorrhagic fever is transported to provincial immunization centres in cold boxes with dry ice. This circuit presents difficulties at the time of the acquisition of the refrigerant for logistical and economic reasons. The replacement of dry ice with cooling gels could be an appropriate option if the product remains stable. Refrigerant gels are, unlike dry ice, widely available, reusable and inexpensive.

The objective of the present work was to explore an alternative form of refrigeration for the transport of the lyophilized Candid # 1 vaccine, evaluating its thermal stability up to one year after the simulated transport to the provincial immunization centres of the endemic area of argentine hemorrhagic fever.

Bottles of lyophilized Candid # 1 vaccine, frozen at -20 ± 2 ° C, were conditioned in two cold boxes. One with cooling gels and one with dry ice. Both were placed in an incubator at a temperature outside the packaging of 40 to 45 ° C with continuous monitoring for 24 hours to determine the thermal profiles inside the packages with both cooling systems.

A field test was then carried out with the same packaging design inside a vehicle to make a journey of not less than 24 hours simulating transport. The temperature was recorded in the same way as the previous test. Upon return, all of the bottles were stored immediately at -20 ± 2 ° C pending the performance of the stability tests. The stability indicator tests were: potency, pH, osmolality, residual moisture and endotoxins (LAL).

The temperature inside the bottles with dry ice, was in all cases, as expected according to the characteristics of this refrigerant. As for what happened with the jars kept with cooling gels, average temperatures very close to 0°C could be observed, although the maximum reached in the vehicle was 57.5°C.

Vaccine stability tests were performed one month, 5 months and one year after exposure in the vehicle. In no case were results outside the specifications found and it was evidenced that the use of refrigerant gels instead of dry ice to transport the vaccine for limited periods of time does not adversely affect the potency.

INTRODUCCIÓN

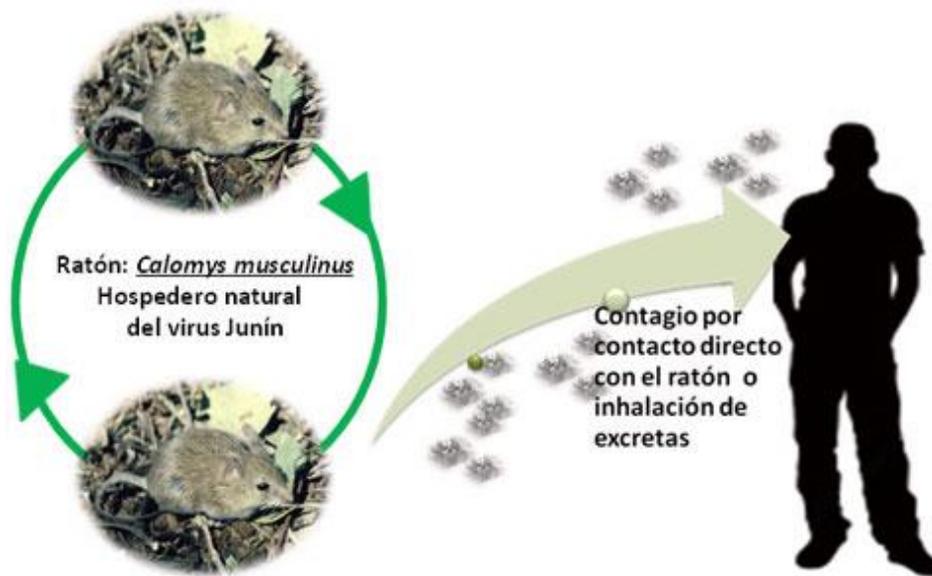
Antecedentes

Prevención de la Fiebre Hemorrágica Argentina. Vacuna Candid #1

La Fiebre Hemorrágica Argentina (FHA) posee una vasta historia en la salud pública de nuestro país. Comenzó con la descripción de esta patología como una nueva enfermedad epidémica y continuó con una serie de acontecimientos que llevaron al control de esta infección zoonótica no erradicable, mediante la aplicación de un tratamiento eficaz, dentro de los ocho días desde la aparición de los síntomas, como también al desarrollo y fabricación de una vacuna capaz de prevenirla (Enria, Franco, Ambrosio, & al, 1986). En la década del cincuenta se describió por primera vez en zonas rurales de la Provincia de Buenos Aires esta extraña enfermedad epidémica de origen desconocido que comenzaba como una afección febril y síntomas generales que se asemejaban a los de una gripe común, pero evolucionaba hacia un cuadro hemorrágico y neurológico con una letalidad superior al 30% de los casos (Arribalzaga, 1955). Estos hallazgos sobre esta nueva patología emergente llamaron la atención de los profesionales del campo de la salud pública haciendo que se intensificaran las investigaciones.

El agente etiológico de la enfermedad se aisló en el año 1958. El Virus Junín, a ARN integrante de la familia *Arenaviridae*, género *Mammarenavirus* constituido hasta hoy por 35 agentes entre los cuales ocho (Coriomeningitis Linfocitaria, Junín, Machupo, Chapare, Guanarito, Lujo, Sabiá y Lassa) son patógenos para el hombre (Maes, y otros, 2018). El virus Junín es un arenavirus cuyo huésped natural es el roedor *Calomys musculus*. El ciclo de transmisión del virus se produce entre roedores de forma tanto horizontal como vertical y llega al humano a través de la liberación de aerosoles de las excretas de roedores crónicamente infectados, ingresando por ingestión, mucosas y también lesiones en piel siendo la transmisión interhumana muy infrecuente (Figura 1) (Parodi, y otros, 1958); (Mills, Ellis, McKee, & al, 1992).

Figura 1. Ciclos de transmisión de la Fiebre Hemorrágica Argentina

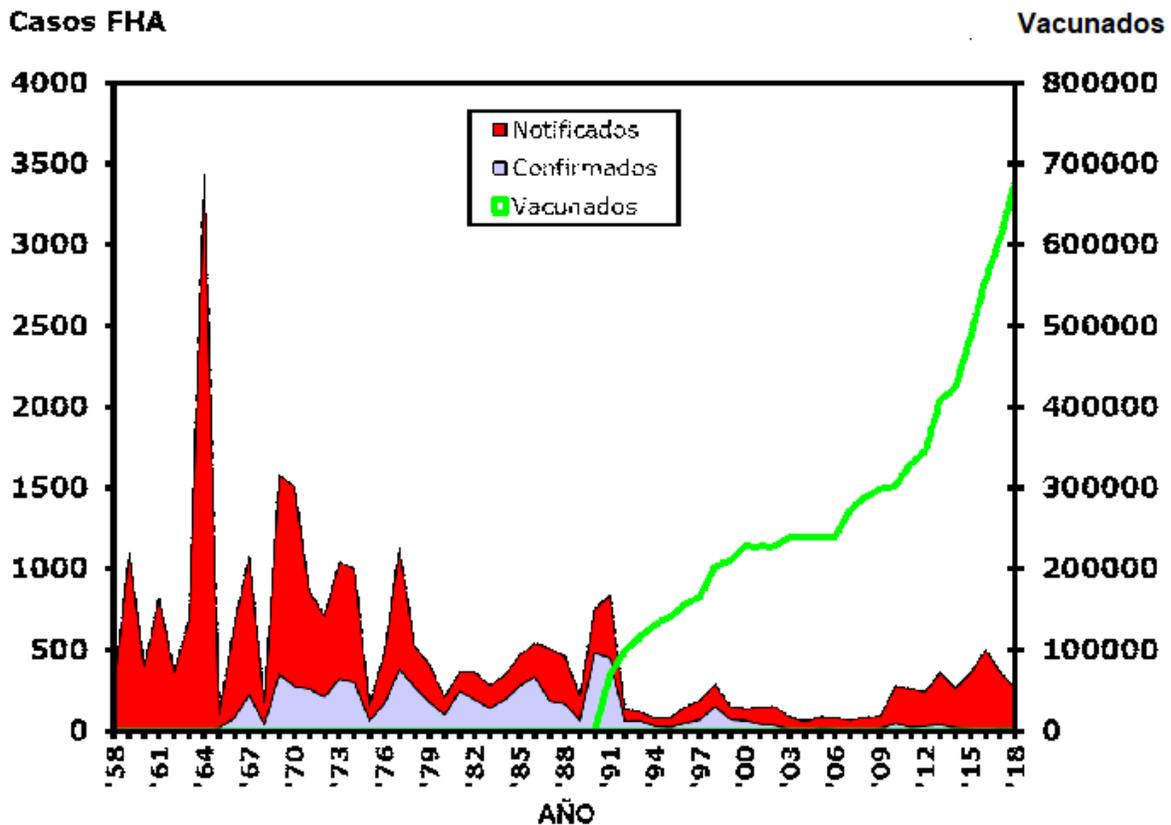


Fuente: OMS/OPS

Ya en los años sesenta se comenzó a hablar de la Fiebre Hemorrágica Argentina o “mal de los rastrojos” como una enfermedad profesional que afectaba a los trabajadores agropecuario (Enria, 2011). La sintomatología de la FHA comienza luego de una incubación de 8 a 12 días, con un período febril de 8 a 10 días, progresiva leucopenia y trombocitopenia y presencia del virus en sangre. A esto se agregan alteraciones renales, neurológicas y cardiovasculares. La convalecencia es prolongada, con debilitamiento y pérdida del cabello, pero usualmente sin secuelas permanentes (Maiztegui J., 1975); (Harrison, y otros, 1999); (Castilla & Enria, 2013). La aparición de anticuerpos específicos puede detectarse desde dos semanas después del comienzo de los síntomas y la persistencia de los mismos es variable (Maiztegui J., 1975); (Harrison, y otros, 1999); (Castilla & Enria, 2013). Desde el descubrimiento del virus Junín se han producido brotes anuales de FHA sin interrupción, que ocurren durante el otoño y el invierno y que afectaban en un principio fundamentalmente a varones que

residian y/o trabajaban en las zonas rurales del área endémica (Mastrangelo, y otros, 2014). Luego del inicio de la vacunación se logró una importante reducción de la incidencia de la FHA (Figura 2) y se modificaron los patrones de riesgo para contraer la enfermedad (Enria, y otros, 1999).

Figura 2. Distribución de los casos de FHA entre los años 1958 y 2018



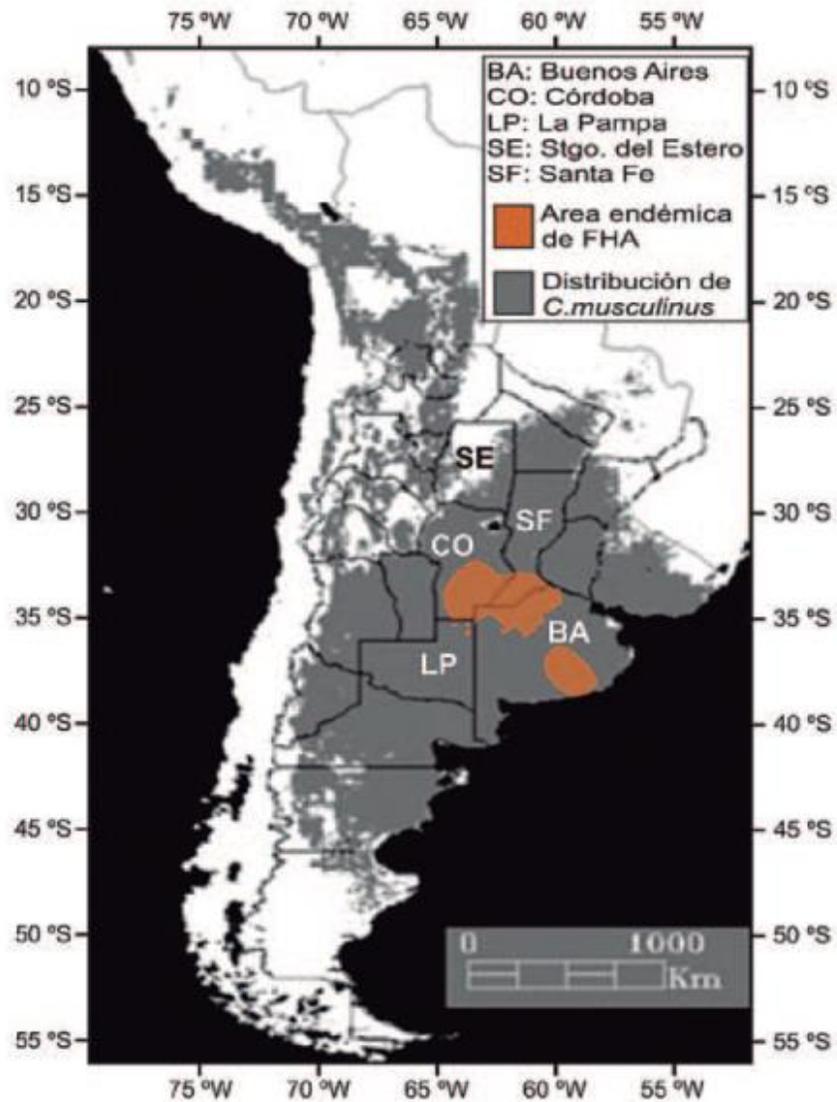
Fuente: Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas "Dr. Julio I. Maiztegui"

Entre los casos confirmados se viene observando un incremento en el porcentaje de mujeres, que se vacunan en menor proporción, y de niños menores de 15 años. También la proporción de enfermos entre personas que realizan trabajo rural disminuyó y han aumentado las cifras de casos confirmados en

personas que desarrollan otras actividades económicas, no asociadas necesariamente con el campo y residentes en áreas urbanas. Estos cambios fueron caracterizados en un estudio realizado entre los años 2011 y 2012 (Mastrangelo, y otros, 2014). Como conclusión de esta investigación se definieron tres escenarios de transmisión de la FHA. Un escenario clásico que abarca el área endémica y coincide geográficamente con el complejo agroindustrial cerealero. El lugar de contagio y de residencia de los casos se ubica en este territorio. Otro escenario es el emergente-reemergente, lugares donde acontecieron cambios en la organización social de la producción que lo hacen compatible con el escenario clásico. Emergente cuando los casos residen y se contagian fuera del área endémica, pero que no viajaron en las tres semanas previas a enfermar, y reemergente cuando los casos residen en áreas históricas de transmisión donde no se habían notificado casos en los diez años previos. Por último un escenario viajero donde los casos transitaron por un escenario clásico o emergente-reemergente, pero no residen en ellos. En este escenario se unen viajeros y trabajadores que migran estacionalmente o transitan eventualmente para emplearse en tareas asociadas al complejo agroindustrial. Un grupo de trabajadores que podría presentar un elevado riesgo de enfermar lo constituyen los trabajadores migrantes estacionales que se desplazan anualmente a la zona endémica para trabajar en el despanojado de maíz (Mastrangelo, y otros, 2014); (Briggiler, y otros, 2015).

Los arenavirus se caracterizan por infectar generalmente a un número limitado de especies de pequeños roedores, quienes actúan como sus reservorios y habitan áreas geográficas bien definidas, que en general coinciden con las áreas de actividad de cada virus (Mills, Ellis, McKee, & al, 1992); (Polop, y otros, 2007). Sin embargo, el área de distribución de la especie de roedor que se conoce como reservorio del virus Junín, *Calomys musculus*, es mucho más amplia que las áreas de actividad de este virus hasta hora conocidas como se observa en la Figura 3 (Mills, Ellis, McKee, & al, 1992); (Polop, y otros, 2007).

Figura 3. Distribución de *Calomys musculinus* y área endémica de FHA

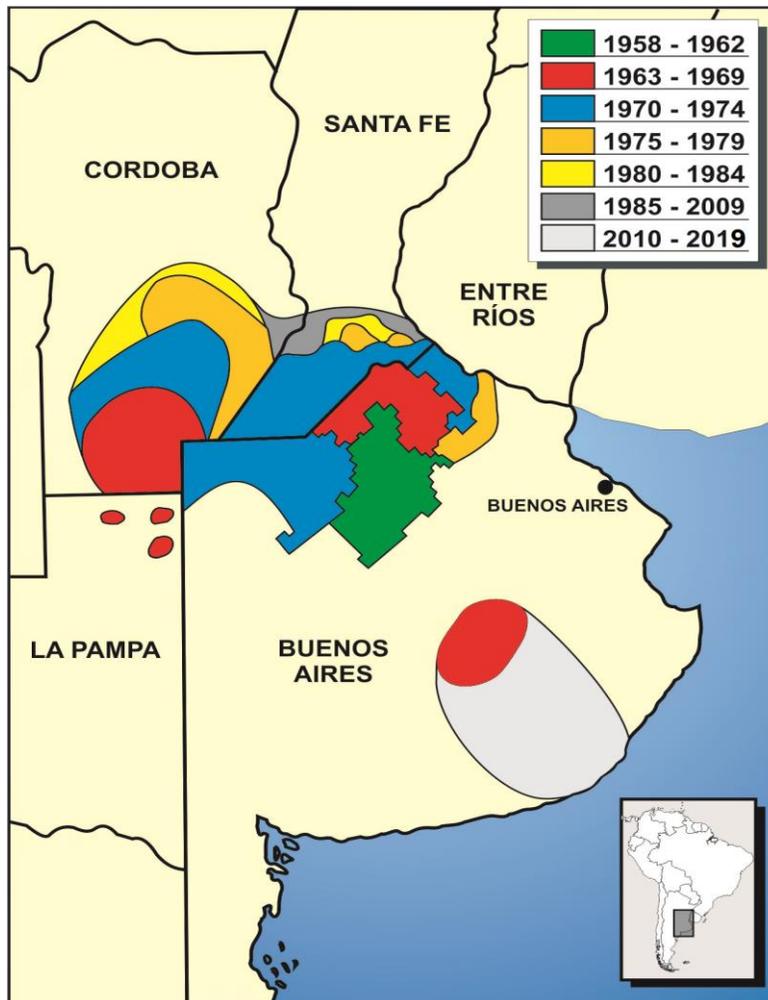


Fuente: Programa Nacional de Control de la FHA

El área endémica de la FHA y su crecimiento paulatino se muestra en la Figura 4. Abarca zonas de cuatro provincias del centro del país, Buenos Aires, Santa Fe, Córdoba y La Pampa extendiéndose a lo largo de los años, con una población en riesgo en la actualidad de más de cinco millones de habitantes

(Maiztegui & Sabbattini, 1977); (Sabbattini & Contigiani, 1982); (Mills, Ellis, McKee, & al, 1992); (Polop, y otros, 2007).

Figura 4. Área endémica actual



Fuente: Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas "Dr. Julio I. Maiztegui"

A mediados de los sesenta se comenzó a desarrollar un Programa Nacional de Control de la FHA que desencadenó una serie de acciones las cuales se centraron en la ciudad de Pergamino y tuvieron como principales resultados la creación del Instituto Nacional de Estudios sobre Virosis Hemorrágicas, actual

Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas (INEVH) “Dr. Julio I. Maiztegui”, el establecimiento de un tratamiento eficaz de la enfermedad con plasma inmune y el desarrollo y la producción de una vacuna capaz de prevenir la infección (Oro & Kee, 1992).

Mientras en los inicios de la década de los 80 se comenzaba la construcción del Edificio de Nivel III de Bioseguridad, el proyecto de colaboración internacional “Desarrollo de una vacuna contra la Fiebre Hemorrágica Argentina” iniciado en 1979 y programado originalmente para extenderse durante tres años, culminaba en 1983 con la obtención de una semilla maestra y semilla de trabajo de la cepa Candid #1 de Virus Junín. Esta cepa fue derivada de la cepa parental XJ 44 mediante clonados por dilución final y single burst en células diploides certificadas FRhL-2 (ATCC-CCL 160). Completados extensos estudios preclínicos en cobayos y monos Rhesus, la mitad de la existencia de la semilla maestra [Junín XJ, Cobayo (2), Cerebro Ratón (44), FRhL-2 (17)] y de la semilla de trabajo [Junín XJ, Cobayo (2), Cerebro Ratón (44), FRhL-2 (18)] de la cepa vacunal Candid #1 fueron cedidas a la República Argentina y a la custodia del INEVH en diciembre de 1983, en cumplimiento de los acuerdos firmados en el proyecto internacional (Oro & Kee, 1992) (Enria & Barrera Oro, 2002).

Hacia 1985 finalizaron los estudios preclínicos y en ese mismo año se inició la fase clínica de la investigación que culminó en 1990 estableciendo a Candid # 1 como una vacuna eficaz para prevenir la FHA (Maiztegui, y otros, 1987); (McDonald, y otros, 1987); (Maiztegui & McKee, 1989). Candid #1 resultó inocua, ya que ninguno de los voluntarios inoculados presentó alteraciones clínicas o bioquímicas de significación. La inmunogenicidad de Candid #1 se demostró en más del 90% de los voluntarios. Además se evaluó la eficacia de Candid #1 en un estudio prospectivo, aleatorio a doble ciego que se realizó en 6.500 varones adultos de 41 localidades del sur de la Provincia de Santa Fe, seleccionadas en base a la incidencia de FHA en su población masculina en los cuatro años previos al estudio (Maiztegui, McKee, Oro, & al, 1998); (McDonald, y otros, 1987). La

eficacia de la vacuna Candid #1 para la protección contra la FHA fue del 95,5% (intervalos de confianza del 95%, 82%-99%, $p < 0.001$). Se abrió entonces la perspectiva del control definitivo de esta zoonosis endémica (Maiztegui & McKe, 1989) (Maiztegui, McKee, Oro, & al, 1998 (Ambrosio, Saavedra, Riera, & Fassio, 2006).

Ya en la década del 90 se habían realizado la planificación de las remodelaciones edilicias y la adquisición del equipamiento de producción, para años más tarde, comenzar las obras (Figura 5). La instalación y puesta en marcha del equipamiento finalizó a mediados del año 2000 y se obtuvo al año siguiente la habilitación de la planta para la producción de vacunas virales de uso en humanos del INEVH por disposición N° 3775/01, Legajo 7308 de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) (Figura 6).

Figura 5. Vista aérea de las instalaciones del INEVH "Dr. Julio I. Maiztegui"



Fuente: Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas "Dr. Julio I. Maiztegui"

En el 2006 se obtuvo el registro ante la misma autoridad regulatoria de la Vacuna Candid #1 liofilizada como especialidad medicinal con certificado N°53205 y en el año 2007 se la incorporó al calendario Nacional de Inmunización para

hombres y mujeres entre 15 y 65 años que habiten o circulen en el área endémica de la FHA (Ambrosio, Saavedra, Riera, & Fassio, 2006) (MS, 2012).

Figura 6. Producción de vacuna Candid # 1



Fuente: Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas “Dr. Julio I. Maiztegui”

Justificación

La complejidad de las vacunas hace que la formulación sea un aspecto crítico del desarrollo y un gran desafío. Estos productos de origen biológico pueden poseer uno o más tipos de componentes antigénicos que incluyen partículas víricas o bacterianas, polisacáridos, proteínas, poli nucleótidos y conjugados de partículas atenuadas o muertas. Además, entre los excipientes pueden estar presentes adyuvantes para reforzar la respuesta inmunitaria. Por lo antes expuesto, para lograr una formulación exitosa, no solo se debe mantener la integridad química y estructural de los diversos componentes, sino que se debe garantizar la inmunogenicidad (Volkin, Burke, Sanyal, & Middaugh, 1996).

Una tendencia general a destacar entre las vacunas existentes en el mundo, es que las vacunas vivas atenuadas como lo es Candid #1, no contienen adyuvantes, debido a que su inmunógeno es una versión de la bacteria o del virus infeccioso con menor grado de patogenicidad. Es por ello que una vez inoculados, estos deben replicarse *in vivo*, simulando la infección natural para generar una respuesta inmunológica de protección que generalmente es muy eficaz. Esto explica que a menudo solo se requieren de una o dos aplicaciones. La administración de las vacunas vivas atenuadas puede ser por vía oral o nasal imitando la ruta natural de la infección, como también por inyección parenteral IM o SC, proporcionando también protección contra infecciones que a menudo son adquiridas naturalmente por otras vías. Sin embargo, como aspecto negativo, este tipo de vacunas presenta una mayor sensibilidad al calor con pérdida de potencia durante el almacenamiento y distribución (Kumru, y otros, 2014); (WHO, 2015).

Desde el punto de vista de la estabilidad, las vacunas vivas atenuadas a menudo son liofilizadas para favorecer su conservación. Este proceso se aplica para la eliminación de agua bajo condiciones controladas, generando una situación inevitable de stress sobre el producto debido a que emplea presiones negativas y temperaturas muy bajas en una serie de pasos como son el congelamiento, el secado primario que consiste en la sublimación del agua a granel y un secado secundario en el cual se produce la desorción del agua ligada (Kumru, y otros, 2014). El proceso de liofilización se realiza en presencia de una mezcla compleja de aditivos y excipientes, no solo como protectores del proceso de liofilización y crio protectores sino también estabilizadores de la formulación, que protejan a la vacuna de efectos perjudiciales ya que en él se pueden generar cambios de pH, cambios en la fuerza iónica y formación de cristales de hielo entre otros. Estos posibles cambios críticos durante el proceso, implica que se debe trabajar simultáneamente en la formulación, composición y proceso de liofilización para proporcionar suficiente estabilidad durante el almacenamiento a largo plazo. Las causas más comunes de inestabilidad de las vacunas que afectan

principalmente a la potencia son el contenido de humedad residual, composición de la atmósfera de sellado y condiciones de almacenamiento como temperatura, humedad y luz (Kumru, y otros, 2014); (Volkin, Burke, Sanyal, & Middaugh, 1996). Las vacunas liofilizadas tienden a ser sensibles al calor durante el almacenamiento a largo plazo en estado sólido y durante el corto plazo después de la reconstitución antes de la administración al paciente. Los diluentes varían en su composición y volumen y están diseñados específicamente para cumplir con los requisitos de pH, volumen y composición química de cada vacuna (Kumru, y otros, 2014). El diluyente de Candid #1 es agua estéril de calidad para inyectables, también fabricada en el INEVH, mientras que otros pueden contener ingredientes que no solo ayudan a disolver el liofilizado sino también estabilizar o bien mantener la esterilidad de la vacuna reconstituida por la inclusión de conservantes. Por lo tanto y debido a las características inherentes a estos productos biológicos es imprescindible un mantenimiento cuidadoso de la cadena de frío (Kumru, y otros, 2014); (Volkin, Burke, Sanyal, & Middaugh, 1996); (WHO, 2015).

La labilidad propia de las vacunas puede limitar críticamente su distribución, administración y eficacia, por esto la estabilidad tiene su mayor impacto en el éxito de los programas de inmunización alrededor de todo el mundo y principalmente en países donde es difícil mantener una cadena de frío debido a motivos económicos, logísticos y de infraestructura (John, 1996); (Deshpande, Rao, Nadkarni, Bhatia, & Rodrigues, 1995). Otros factores que pueden comprometer la estabilidad son la combinación con otras vacunas y la administración por vía oral. La estabilización de una vacuna para que sea exitosa, debe incluir tanto estudios para detectar e identificar los estabilizadores como también las condiciones ambientales apropiadas para la conservación de sus propiedades inmunogénicas.

La vacuna Candid #1 es un producto biológico cuyo principio activo es la cepa atenuada Candid # 1 viva del virus Junín, junto a una mezcla compleja de excipientes que completan la formulación. Se presenta liofilizada en frascos para

diez dosis. Durante el proceso de elaboración, el virus vacunal a granel se formula con una serie de excipientes que cumplen la función de proteger al virus vivo del estrés provocado durante el proceso de liofilización y a su vez proveer al producto final de cierta estabilidad al paso del tiempo en las condiciones de conservación establecidas. Cabe agregar que la formulación de Candid # 1 no posee adyuvantes.

Las indicaciones para las condiciones de almacenamiento y transporte de Candid #1 surgieron de los estudios de estabilidad pre y pos registro según el requerimiento de la autoridad regulatoria ANMAT (ANMAT, 2018). En los últimos años, la vida útil de Candid #1 liofilizada cambió de cinco a nueve años conservada entre - 18 y - 22°C. Los indicadores de estabilidad utilizados para el estudio fueron potencia, humedad residual, pH, osmolalidad y endotoxinas bacterianas (LAL), los cuales se ensayaron sobre tres lotes de vacuna Candid #1, Lotes 7A, 8A y 9A, conservados en dichas condiciones (EMEA, 2006); (ANMAT, 2018). Estos resultados que evidenciaron su estabilidad por nueve años fueron presentados ante el ANMAT y permitieron a esta autoridad regulatoria autorizar la extensión de la vida útil al tiempo propuesto. Los resultados durante los nueve años de los ensayos indicadores, excepto LAL, se muestran en las Figuras 7, 8, 9 y 10. Los resultados para LAL en todos los casos fueron < 75 EU/ml cuando el requerimiento es < 700 EU/ml.

Figura 7. Potencia Candid #1 lotes de estabilidad

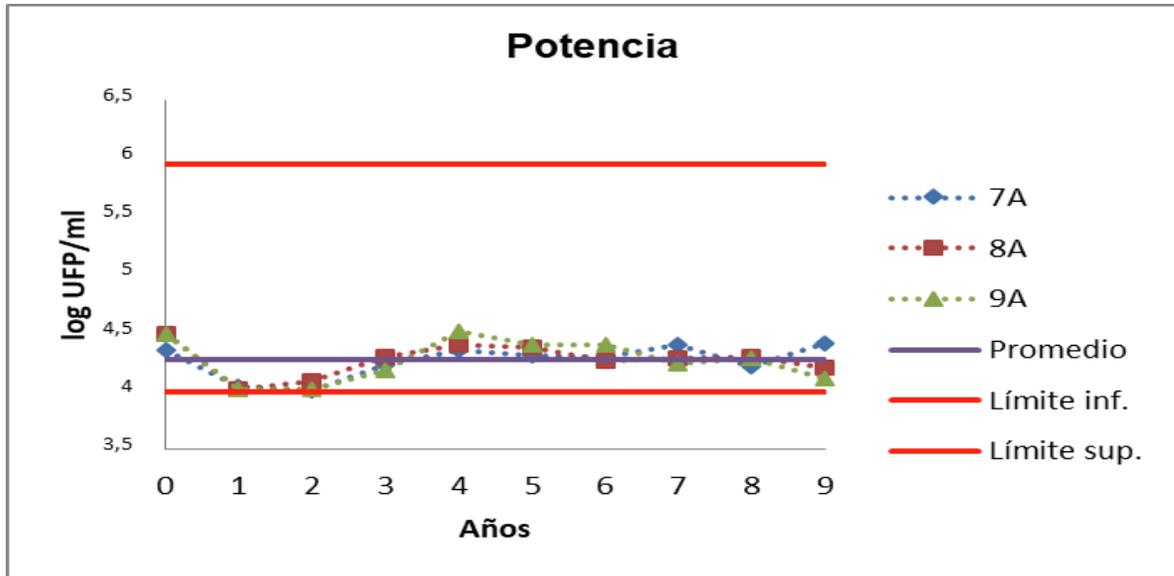


Figura 8. Humedad residual Candid #1 lotes de estabilidad

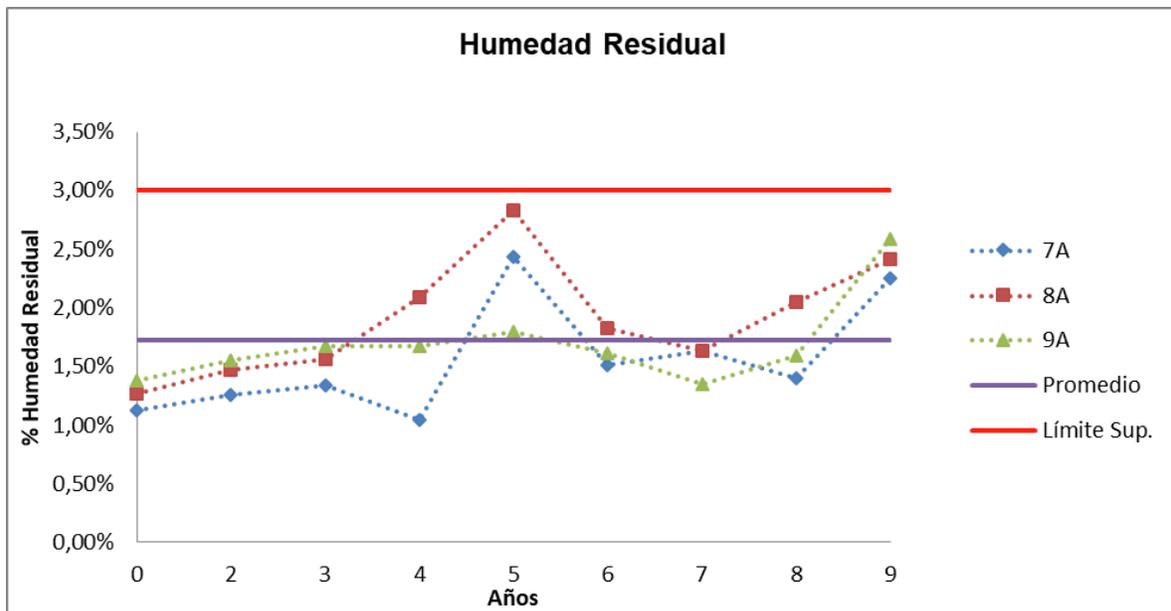


Figura 9. pH Candid #1 lotes de estabilidad

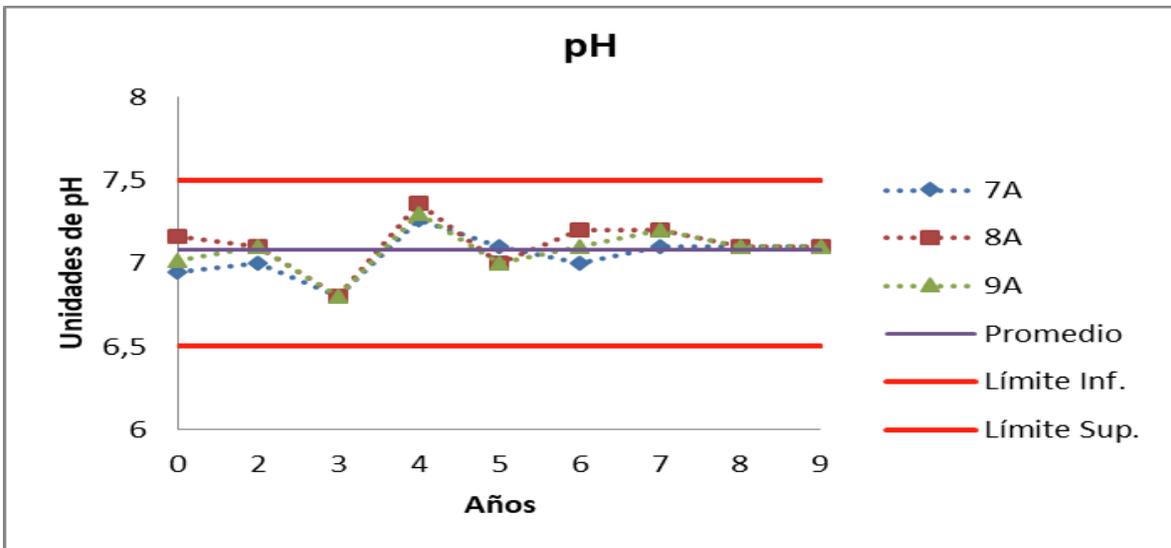
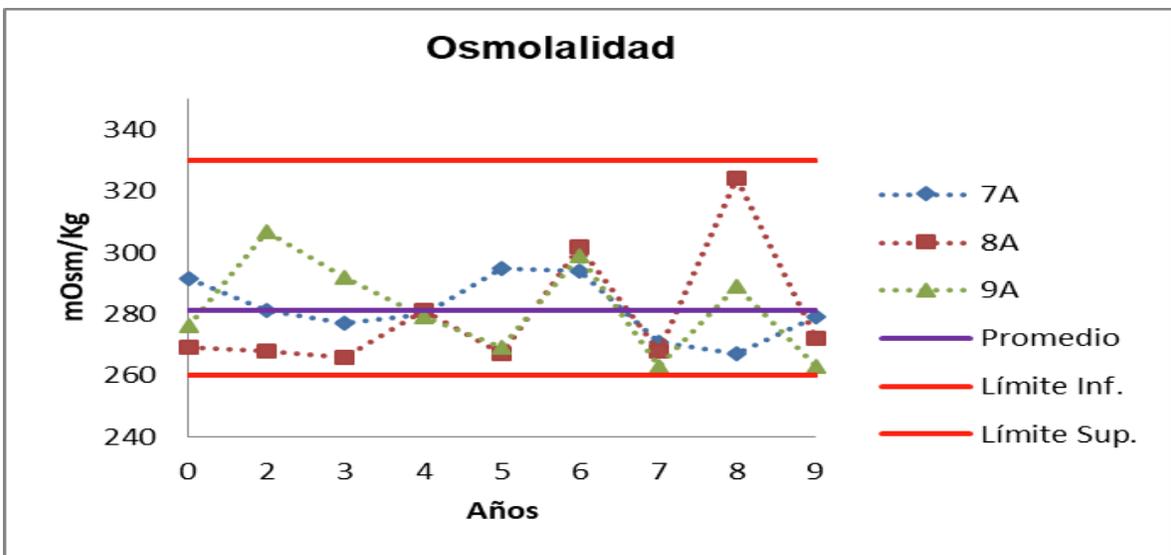


Figura 10. Osmolalidad Candid #1 lotes de estabilidad



La vacuna puede ser usada dentro de las 12 horas siguientes a la reconstitución con agua estéril para inyectables y hasta 30 días sin reconstituir, siempre que durante esos períodos la vacuna se haya conservado en refrigerador entre 2 y 8°C.

La cadena de frío es imprescindible para que durante el transporte, el producto se mantenga estable en terreno y de esta forma sea inmunológicamente efectivo. La Vacuna Candid #1 almacenada a $-20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ en el INEVH, se transporta hacia los centros provinciales de inmunizaciones en conservadoras con hielo seco hasta ser guardadas nuevamente a $-20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ en el lugar de destino. Si bien el hielo seco es un excelente material refrigerante ya que posee una temperatura de sublimación de $-78,5^{\circ}\text{C}$ a una atmósfera de presión, el circuito de distribución presenta dificultades al momento de la adquisición del hielo seco por motivos logísticos y económicos, haciendo a la expedición de la vacuna un procedimiento poco práctico y engorroso. El reemplazo del hielo seco por geles refrigerantes podría ser una opción adecuada si se prueba la estabilidad de la vacuna a través de una serie de ensayos que aseguren el mantenimiento de sus propiedades luego del transporte en las nuevas condiciones. Esto podría ser posible si consideramos que la vacuna Candid # 1 ha demostrado ser muy estable por sus propiedades intrínsecas, manteniendo sus características a lo largo del proceso de fabricación y almacenamiento evidenciando una vida útil muy prolongada en las condiciones adecuadas. Además, la zona de distribución no implica el traslado a muy grandes distancias y por ser un área ubicada, en lo que llamamos pampa húmeda, no presenta condiciones climáticas extremas. El centro provincial de acopio de vacuna en la zona endémica más alejada de la ciudad de Pergamino, se encuentra en la ciudad de Mar del Plata a unos 660 km, distancia que llevaría recorrer en automóvil unas siete horas y media aproximadamente. Según la evidencia antes descrita, la refrigeración alternativa al hielo seco debería mantener los frascos de vacuna fríos dentro del embalaje como mínimo el

tiempo necesario para alcanzar los centros de acopio más alejados sin que la vacuna se vea afectada.

Tema de investigación

El tema central de investigación del presente estudio fue el comportamiento de la estabilidad térmica de la vacuna Candid #1 cuando se reemplazó el hielo seco por otro refrigerante durante la simulación del transporte para su distribución. El estudio se realizó comparando la exposición de la vacuna a un sistema de frío con hielo seco tomado como referencia y otro sistema con geles refrigerantes durante un recorrido en vehículo por un tiempo no menor a 24 horas. Se utilizaron los ensayos de potencia, pH, osmolalidad, humedad residual y endotoxinas bacterianas como indicadores de la estabilidad de la vacuna.

OBJETIVOS

Objetivo general

El objetivo del presente trabajo fue explorar la estabilidad térmica de la vacuna Candid # 1 hasta un año después de haberse simulado el transporte hacia los centros provinciales de inmunización de la zona endémica de Fiebre Hemorrágica Argentina (FHA) utilizando geles refrigerantes, una alternativa al hielo seco como método de refrigeración. El establecimiento de un protocolo de transporte sencillo y que asegure la conservación y disponibilidad de una vacuna estable e inmunológicamente eficaz, se podría considerar como un aporte para colaborar con en el éxito de los programas provinciales de inmunización con Candid #1 en la zona endémica de la FHA.

Objetivos específicos

- Determinar el comportamiento térmico de los viales de vacuna dentro de los embalajes de transporte con ambos métodos de refrigeración, hielo seco y geles refrigerantes, mediante una prueba de laboratorio que desafíe a altas temperaturas ambas condiciones de refrigeración por un tiempo no menor a 24horas. Establecer así los criterios para la simulación de transporte en terreno.
- Evaluar la estabilidad térmica de la vacuna hasta el año de haber sido expuesta a la simulación de transporte con las nuevas condiciones, tomando como parámetros de estabilidad el título viral (potencia), pH, osmolalidad, humedad residual y endotoxinas bacterianas.

TRABAJO EXPERIMENTAL

El trabajo experimental fue realizado en los laboratorios de Control y Aseguramiento de Calidad de la planta de producción del INEVH y la simulación del transporte en la ciudad de Pergamino, en el período 2017 – 2018.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

- Vacuna Candid # 1 Liofilizada para 10 dosis. Lote # 28 A (Figura 11).

Especificaciones:

Vacuna Candid # 1, Cepa Candid # 1 de Virus Junín vivo atenuado, polvo liofilizado para inyectables

Cada dosis de 0,5 ml de vacuna reconstituida contiene:

- Virus Junín vivo atenuado (cepa Candid # 1) 10^4 UFP
- Sulfato de Neomicina base: 9,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- Excipientes (albúmina sérica humana, gelatina hidrolizada, sorbitol, ácido L- glutámico sal mono sódica) c.s.p.: 0,5 ml

Figura 11. Frascos de vacuna Candid #1 liofilizada



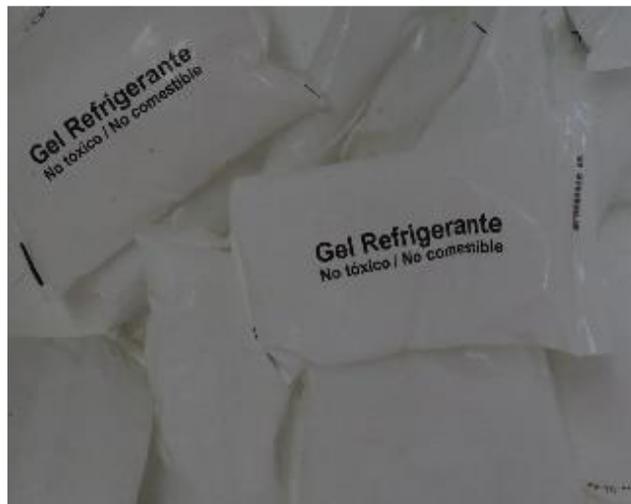
Para la simulación en terreno se utilizó el lote # 28A de vacuna Candid #1 liofilizada aprobado por Control de Calidad del INEVH el 23/12/2014 (Tabla 1).

Tabla 1. Ensayos para la aprobación del lote 28A de vacuna Candid #1 liofilizada.

Control	Método	Test N° / Libro/Pág.	Resultado	Criterio de aceptación
Potencia	Titulación en placas bajo agarosa	7408-17/1T2/24 7432/1T2/25	2,3 x 10 ⁴ UFP/ml	Entre (1x10 ⁴ y 9x10 ⁵) UFP/ml
Identidad	Neutralización con antisuero específico, reducción de placas bajo agarosa	7359/1T2/22	Cumple	El suero anti Virus Junín neutraliza la vacuna probada
Seguridad general	CFR 21 610.11	7369/1T2/23	Cumple	Cumple
Humedad residual	Karl Fisher	7346/1T2/22	2,31 %	< 3%
pH	Potenciométrico	7344/1T2/22	6,9	6,5 a 7,5
Osmolalidad	Descenso crioscópico	7345/1T2/22	286 mOsm/kg	260 a 330 mOsm/kg
Esterilidad	CFR 21 610.12 (a) (b) (c) (d) (e)	7339/1T2/22	Cumple	Cumple
Endotoxinas	LAL USP	7365/1T2/23	< 75 EU/ml	< 700 EU/ml

- Refrigerantes:
 - ✓ Hielo seco o nieve carbónica. Dióxido de carbono (CO₂) en estado sólido. Tiene una temperatura de sublimación de -78.5 °C a una atmósfera de presión.
 - ✓ Geles refrigerantes (783 gr c/u). Congelados a -20°C no menos de 24 horas (Figura 12).

Figura 12. Packs de geles refrigerantes



- Estufa de secado.
- Datalogger de 4 sondas con termocuplas para la medición de temperatura. Rango de medición: -195°C a $+400^{\circ}\text{C}$ (Figura 13).

Figura 13. Datalogger con 4 sondas



- Envases secundarios de la vacuna: recipientes cilíndricos, metálicos, con tapa y capacidad para 66 viales de vacuna (Figura 14).

Figura 14. Envase secundario de vacuna



- Conservadoras de poliestireno expandido iguales a las provistas por el Ministerio de Salud para la distribución de vacunas (Figura 15).

Figura 15. Conservadora de poliestireno expandido



- Vehículo de transporte adecuado para llevar dos conservadoras en su interior (Figura 16).

Figura 16. Vehículo de transporte



Diseño experimental

Perfil térmico

Se realizó una prueba de laboratorio para determinar el perfil térmico del interior del contenedor utilizado habitualmente para el transporte de vacuna. Se sometieron dos conservadoras conteniendo frascos de vacuna con el formulado liofilizado sin virus congelados a $-20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, una con geles refrigerantes congelados (15 packs de 783 g c/u) y otra con hielo seco (10 panes producidos en el INEVH) (Figuras 17 y 18), a una temperatura externa al embalaje proporcionada por una estufa entre 40 y 45°C.

La vacuna posee un envase primario, frasco tubo antibiótico de vidrio boro silicato tipo I de 20 mL para productos inyectables y otro secundario, que consiste en latas cilíndricas metálicas con tapa cuya capacidad es para 66 frascos. La capacidad de las conservadoras de poliestireno expandido fue de diez latas de vacuna las cuales se ubicaron, 6 en posición vertical y 4 horizontales sobre las anteriores. Tanto el hielo seco como los geles refrigerantes se ubicaron rodeando

las latas, relleno los espacios entre ellas. Los geles previamente habían sido congelados a temperatura de freezer (- 20°C) por más de 24 horas.

Figura 17. Vacuna con hielo seco



Figura 18. Vacuna con geles refrigerante



Las temperaturas interior y exterior de las conservadoras fueron monitoreadas de manera continua a través de un Datalogger con 4 sondas que se ubicaron dentro de los frascos y en contacto con el formulado liofilizado (Figuras

19 y 20), por fuera de la conservadora y dentro de la misma. Los embalajes permanecieron en estufa no menos de 24 horas.

Figura 19. Sonda en contacto con el liofilizado

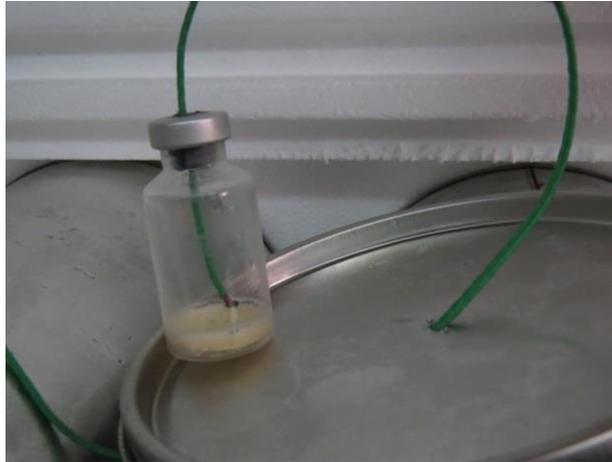


Figura 20. Ubicación del Datalogger y sondas



Se realizó el análisis de los datos arrojados por el monitoreo de las sondas térmicas de ambos contenedores a través del software (Testo) del datalogger.

Prueba en terreno

En una segunda etapa, el estudio se trasladó a terreno. Se utilizaron dos conservadoras que contenían frascos de vacuna en cantidad suficiente para los ensayos posteriores. La carga se completó con frascos conteniendo formulado liofilizado sin virus, todo congelado a $-20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y embalados de forma adecuada como se describió anteriormente. En una se colocaron geles refrigerantes congelados y en otra hielo seco como elementos de refrigeración. Se transportaron en un vehículo para desplazarse un trayecto local de no menos de 24 horas entre ida y vuelta al punto de partida, en este caso el INEVH. Se controló la temperatura del producto liofilizado de la misma forma que en la prueba anterior. Las condiciones en el interior del vehículo siguieron los cambios atmosféricos ambientales del exterior ya que no se usó el climatizador. Al regreso, los viales de vacuna de cada conservadora fueron almacenados inmediatamente a $-20 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Todos los frascos permanecieron a la espera de la realización de los ensayos indicadores de la estabilidad de la vacuna.

Métodos

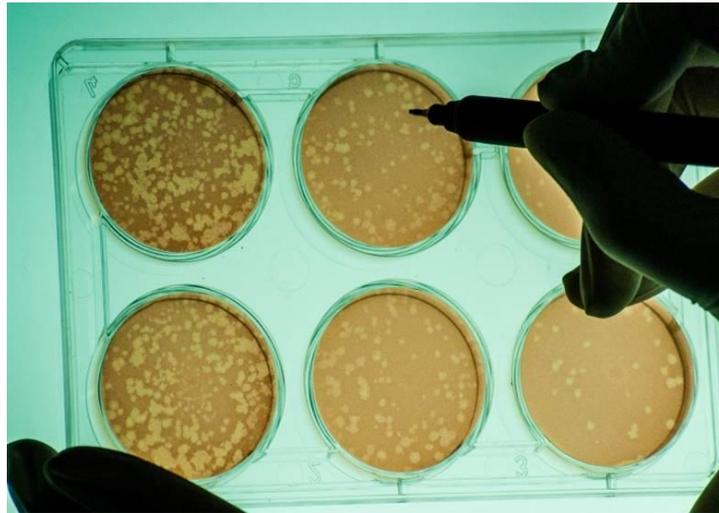
Los resultados de los ensayos indicadores realizados a los frascos expuestos a ambas condiciones de refrigeración en terreno fueron relacionados con los datos arrojados por el monitoreo de las sondas térmicas. Los fundamentos de estos ensayos son los siguientes:

Potencia

Permite estimar el título de virus de la vacuna Candid # 1. Consiste en generar la infección viral de mono capas de células susceptibles que puede inducir cambios celulares conocidos como efecto citopatogénico. Estos cambios morfológicos inducidos por virus incluyen: estructura celular alterada, formación de

células gigantes, vacuolización o lisis. Se adiciona una cubierta de agarosa para restringir los cambios del efecto citopatogénico a áreas discretas de la monocapa limitando la diseminación viral de célula a célula. Estas áreas focales de infección se visualizan macroscópicamente o microscópicamente como áreas discretas o placas. Se agrega rojo neutro como colorante para contrastar el área afectada con las células adyacentes sin afectar. El criterio de aceptación para la potencia de la Vacuna Candid # 1 liofilizada es entre 1×10^4 y 9×10^5 UFP/mL (CFR, 2018).

Figura 21. Ensayo de Potencia. Recuento de unidades formadoras de placas



pH

Método Potenciométrico. El criterio de aceptación para Candid # 1 está en el rango 6,50 – 7,50 unidades de pH. La determinación se realizará empleando un medidor del pH calibrado y capaz de reproducir valores con variaciones menores a 0,02 unidades (FA, 2013).

Osmolalidad

Método de depresión en el punto de congelamiento. El criterio de aceptación para Candid #1 se encuentra en el rango 260 – 330 mOsm/Kg. Cada osmol de soluto agregado a 1 kg de agua disminuye el punto de congelación en

1,858 °C y la presión de vapor baja aproximadamente 0,3 mm Hg a 25 °C. Estos cambios físicos son cuantificables lo que permite estimaciones de las concentraciones osmolales. La relación entre la miliosmolalidad y el descenso crioscópico se expresa en la siguiente fórmula:

$$\text{Osmolalidad (mosmol/kg)} = (\Delta T/1,858) 1.000 \text{ mosmol/kg}$$

Cuando se emplean osmómetros que miden el descenso crioscópico, un volumen medido de solución se coloca en un tubo de vidrio sumergido en un baño de temperatura controlada. Se coloca en la solución un termistor y un sistema de vibración. Después la temperatura del baño se reduce hasta lograr que la solución se sobre enfríe. El sistema de vibración se activa para inducir la cristalización del agua en la solución muestra y el calor de fusión liberado aumenta la temperatura de la mezcla hasta su punto de congelación. A través de un puente de Wheatstone, el punto de congelación registrado se convierte en una medida de la osmolalidad (FA, Osmolaridad y Osmolalidad., 2013).

Humedad Residual

Método Karl Fischer. El criterio de aceptación para vacunas liofilizadas es menor al 3% de humedad residual. La determinación del contenido de agua se realiza mediante una valoración coulombimétrica según Karl Fischer con indicación volumétrica. Dicho método se basa en la reacción cuantitativa entre el agua y un reactivo constituido por dióxido de azufre e iodo en presencia de metanol y una base orgánica como la piridina (FA, Determinación de agua, 2013).

LAL. Endotoxinas bacterianas

Ensayo biológico que permite la cuantificación de endotoxinas provenientes de bacterias gram negativas. Se emplea como reactivo el lisado de amebocitos circulantes del cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*). Cuando se enfrenta el reactivo a soluciones que contienen endotoxinas produce gelificación. El criterio de

aceptación para la vacuna Candid # 1 es ≤ 700 EU/mL (FA, Ensayos de endotoxinas bacterianas, 2013).

RESULTADOS

Perfiles térmicos

Conservadora con hielo seco

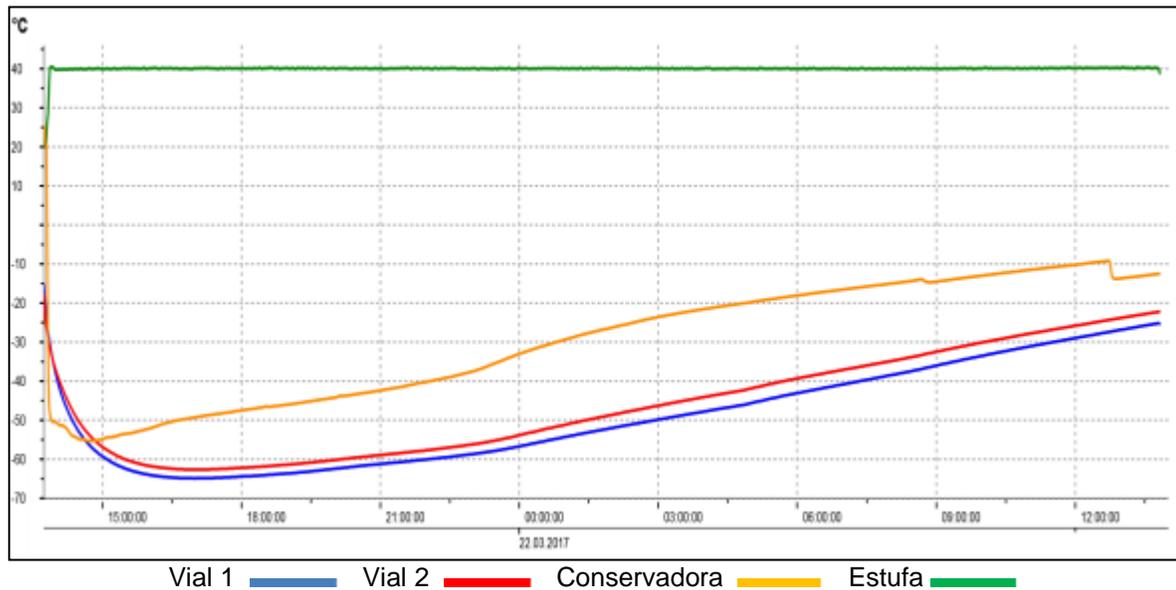
En la primera etapa del estudio se determinó el perfil térmico dentro de la conservadora que contenía viales de formulado liofilizado sin virus en latas con hielo seco. En la Tabla 2 se muestran las temperaturas mínimas, máximas y promedio alcanzados en los distintos puntos donde se colocaron las sondas durante el tiempo de prueba.

Tabla 2. Temperaturas dentro de la conservadora con hielo seco en estufa a 40°C

Ubicación Termocuplas	Temperatura Mínima (°C)	Temperatura Máxima (°C)	Temperatura Promedio (°C)
Interior Vial 1	- 64,90	-15,00	- 49,01
Interior Vial 2	- 62,70	-17,40	- 46,18
Interior Estufa	19,60	40,80	40,00
Interior Conservadora	- 55,40	25,80	- 29,71

En la Figura 22 se representan las fluctuaciones de temperatura registradas por cada una de las cuatro sondas de forma continua. La representación gráfica de los datos se obtuvo a través del software Testo provisto por el equipo de medición.

Figura 22. Monitoreo continuo de temperaturas. Conservadora con hielo seco en estufa a 40°
C



Conservadora con geles refrigerantes

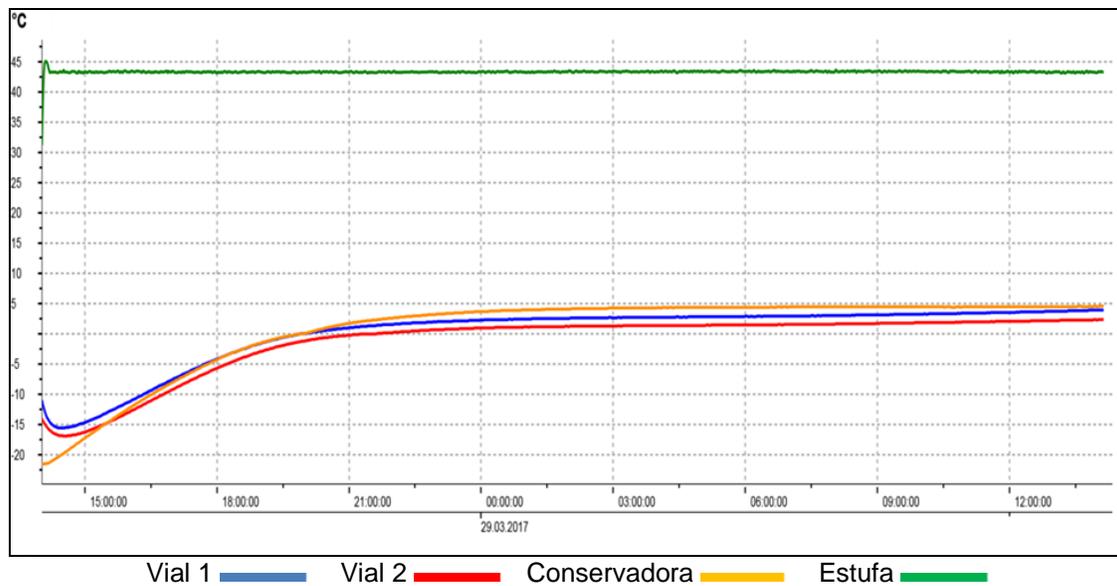
Posteriormente se determinó el perfil térmico dentro de la conservadora que contenía como en la prueba anterior, viales de formulado liofilizado sin virus en latas con geles refrigerantes, utilizando cuatro sondas con termocuplas para registrar la temperatura de forma continua. En la Tabla 3 se muestran las temperaturas mínimas, máximas y promedio alcanzadas en los distintos puntos donde se colocaron las sondas.

Tabla 3. Temperaturas dentro de la conservadora con gel refrigerante en estufa a 45°C

Ubicación Termocuplas	Temperatura Mínima (°C)	Temperatura Máxima (°C)	Temperatura Promedio (°C)
Interior Vial 1	-15,60	3,90	0,07
Interior Vial 2	-16,90	2,40	-1,294
Interior Estufa	31,20	45,30	43,336
Interior Conservadora	-21,50	4,60	0,746

En la Figura 23 se representan las fluctuaciones de temperatura registradas por cada sonda.

Figura 23. Monitoreo continuo de temperaturas. Conservadora con gel refrigerante en estufa a 45°C



Prueba en terreno

Conservadoras con hielo seco y geles refrigerantes en terreno

En la segunda etapa del trabajo se realizó la simulación del transporte utilizando dos conservadoras simultáneamente en el interior del vehículo conteniendo latas con viales de vacuna, una con hielo seco y la otra con geles refrigerantes. La temperatura en ambas conservadoras se monitoreó con el mismo equipo que en la prueba anterior. La Tabla 4 muestra las temperaturas mínimas, máximas y promedio registradas por el equipo durante las 24 horas de la prueba.

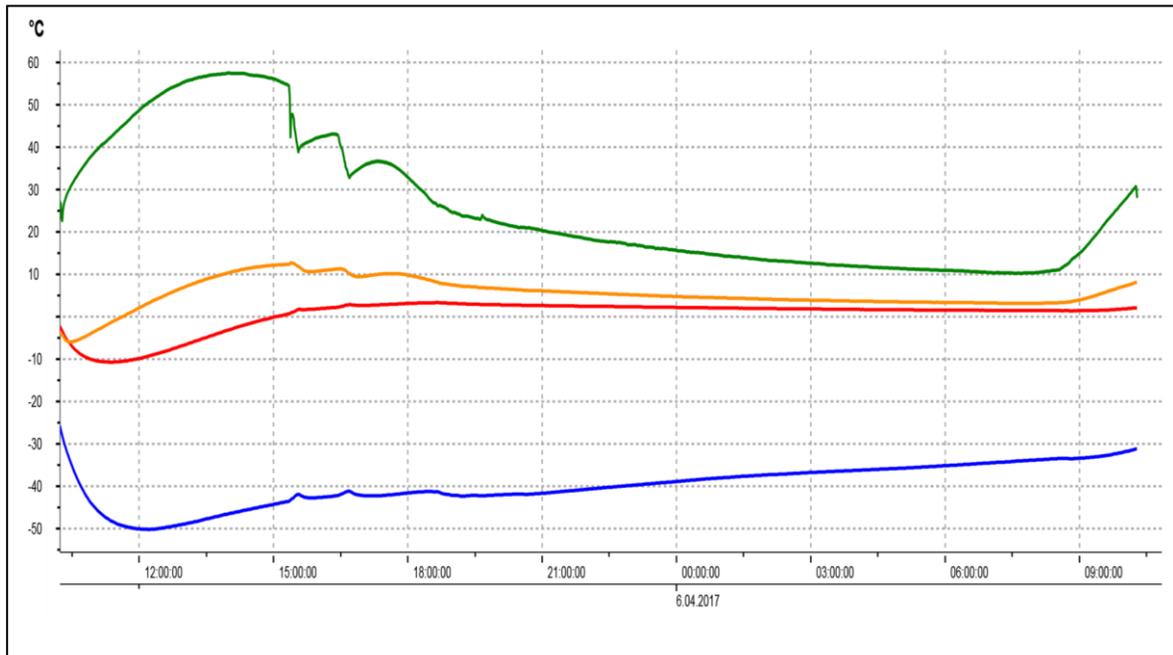
Tabla 4. Temperaturas dentro de las conservadoras con vacuna en terreno (hielo seco y gel refrigerante)

Ubicación Termocuplas	Temperatura Mínima (°C)	Temperatura Máxima (°C)	Temperatura Promedio (°C)
Interior Vial en H.S.	-50,20	-25,70	-39,818
Interior Vial en G. R.	-10,80	3,30	0,32
Interior Vehículo	10,30	57,50	25,903
Interior Conservadora con G. R.	-5,90	12,80	5,534

H.S. Hielo Seco G.R. Gel Refrigerante

En la Figura 24 se muestra las curvas correspondientes al registro continuo de las temperaturas en las distintas ubicaciones durante el tiempo que llevó el ensayo.

Figura 24. Monitoreo continuo de temperaturas. Conservadoras en terreno (hielo seco y gel refrigerante)



Vial Hielo Seco — Vial Gel Refrigerante —
Conservadora Gel Refrigerante — Vehículo —

Resumen de temperaturas de ambas pruebas

En la Tabla 5 se muestra un resumen de los resultados de las pruebas en el laboratorio y en terreno. En ella se pueden comparar los valores mínimos, máximos y promedios de las temperaturas alcanzadas en las distintas ubicaciones dentro y fuera de ambas conservadoras cuando fueron sometidas, tanto la que estaba refrigerada con hielo seco como la que contenía geles refrigerantes, a la temperatura constante de la estufa y las temperaturas fluctuantes de las condiciones en terreno.

Tabla 5. Resumen de resultados de los perfiles térmicos

Ubicación Termocuplas	Temperatura Mínima (°C)		Temperatura Máxima (°C)		Temperatura Promedio (°C)	
	Vehículo	Estufa	Vehículo	Estufa	Vehículo	Estufa
Frasco vacuna con H.S.	-50,20	-63,80	-25,70	-16,20	-39,82	-47,60
Frasco vacuna con G.R.	-10,80	-16,25	3,30	3,15	0,32	-0,61
Temperatura exterior conservadora	10,30	25,40	57,50	43,05	25,903	41,67
Interior conservadora con G.R.	-5,90	-21,50	12,80	4,60	5,534	0,746

H.S. Hielo Seco G.R. Gel Refrigerante

Ensayos de estabilidad

En la Tabla 6 se muestran los resultados de los ensayos elegidos como indicadores de estabilidad de la vacuna. En primer lugar (tiempo 0) se observan los resultados de estos parámetros al momento de ser aprobado el lote por Control de Calidad del INEVH el 23/12/2014, previo a la prueba en terreno y, a continuación los resultados de estos mismos parámetros al mes, a los 5 meses y entre los 12 y 15 meses desde la exposición a las condiciones de transporte.

Tabla 6. Resultados de los ensayos de estabilidad a distintos tiempos desde la exposición

Tiempo en meses	Vacuna Candid #1 liofilizada Lote # 28 A (Fecha de exposición: 05/04/2017)									
	Controles									
	Potencia (UFP/ml)		Humedad Residual (%)		pH		Osmolalidad (mOsm/kg)		Endotoxinas (EU/ml)	
0	2,3x10⁴		2,31		6,90		286		< 75	
	H. S.	G.R.	H. S.	G.R.	H.S.	G.R.	H.S.	G.R.	H.S.	G.R.
1	5,5x10 ⁴	5,8x10 ⁴	2,16	2,07	7,02	7,05	275	274	< 75	< 75
	5,9x10 ⁴	3,5x10 ⁴	2,47	2,30	7,06	7,02	271	272	-	-
	3,9x10 ⁴	3,3x10 ⁴	1,93	2,77	7,07	7,03	273	279	-	-
Prom.	5,1x10⁴	4,2x10⁴	2,19	2,38	7,05	7,03	273	275	< 75	< 75
5	4,1x10 ⁴	3,4x10 ⁴	2,68	2,04	7,0	7,0	273	273	-	-
	2,6x10 ⁴	2,6x10 ⁴	2,13	1,64	7,0	7,0	268	268	-	-
	4,5x10 ⁴	3,0x10 ⁴	1,98	1,81	7,0	7,0	272	272	-	-
Prom.	3,7x10⁴	3,0x10⁴	2,26	1,83	7,0	7,0	272	272	-	-
12 - 15	5,6x10 ⁴	5,8x10 ⁴	2,35	2,90	6,79	7,20	270	263	< 75	< 75
	5,2x10 ⁴	6,6x10 ⁴	-	-	6,83	6,83	269	279	-	-
	7,3x10 ⁴	5,0x10 ⁴	-	-	6,89	6,87	275	274	-	-
Prom.	6,0x10⁴	5,8x10⁴	2,35	2,90	6,84	6,97	271	272	< 75	< 75

H.S. Hielo Seco G.R. Gel Refrigerante Prom. Promedio

Resultados de la comparación estadística de las potencias de vacuna transportada en hielo seco y gel refrigerante

Se realizaron los análisis de comparación entre las medias de dos conjuntos de datos considerados independientes. Uno de los conjuntos estuvo constituido por los resultados de las potencias de los viales de vacuna mantenidos

en hielo seco y el otro por los resultados de las potencias de los viales de vacuna mantenidos en geles refrigerantes durante la simulación del transporte en terreno.

El análisis estadístico fue realizado mediante el software Epidat 4.1 y sus resultados se muestran a continuación:

Inferencia. Comparación de medias independientes

Datos:

Muestra 1: media de las potencias de vacuna conservadas con hielo seco

Muestra 2: media de las potencias de vacuna conservadas con geles refrigerantes

	Muestra 1	Muestra 2
Media	4,676	4,611
Desviación estándar	0,131	0,147
Tamaño de muestra	9	9

Nivel de confianza:	95,0%
Calcular:	Intervalo de confianza y contraste de hipótesis

Prueba de comparación de varianzas (F)

Estadístico F	gl numerador	gl denominador	Valor p
1,259	8	8	0,752

gl: grados de libertad

Intervalo de confianza (95,0%)

Diferencia de medias	Varianzas	Límite inferior	Límite superior
0,065	Iguals	-0,074	0,204
0,065	Desiguales	-0,074	0,204

Prueba de comparación de medias (varianzas iguales)

Contraste	Estadístico t	gl	Valor p
Bilateral	0,990	16	0,337

gl: grados de libertad

Prueba de comparación de medias (varianzas desiguales)

Contraste	Estadístico t	gl	Valor p
Bilateral	0,990	15,792	0,337

gl: grados de libertad

Comparación gráfica de los resultados de los ensayos de estabilidad

En las Figuras 25, 26 y 27 se muestran los resultados de las potencias, pH y osmolalidad realizados sobre ambos grupos de viales de vacuna, mantenidos con hielo seco y con gel refrigerante al año de almacenamiento a -20°C después de la simulación del transporte en terreno.

Figura 25. Comparación gráfica de los valores logarítmicos de potencia de la vacuna en hielo seco y gel refrigerante



Figura 26. Comparación gráfica de los valores de pH de la vacuna en hielo seco y gel refrigerante

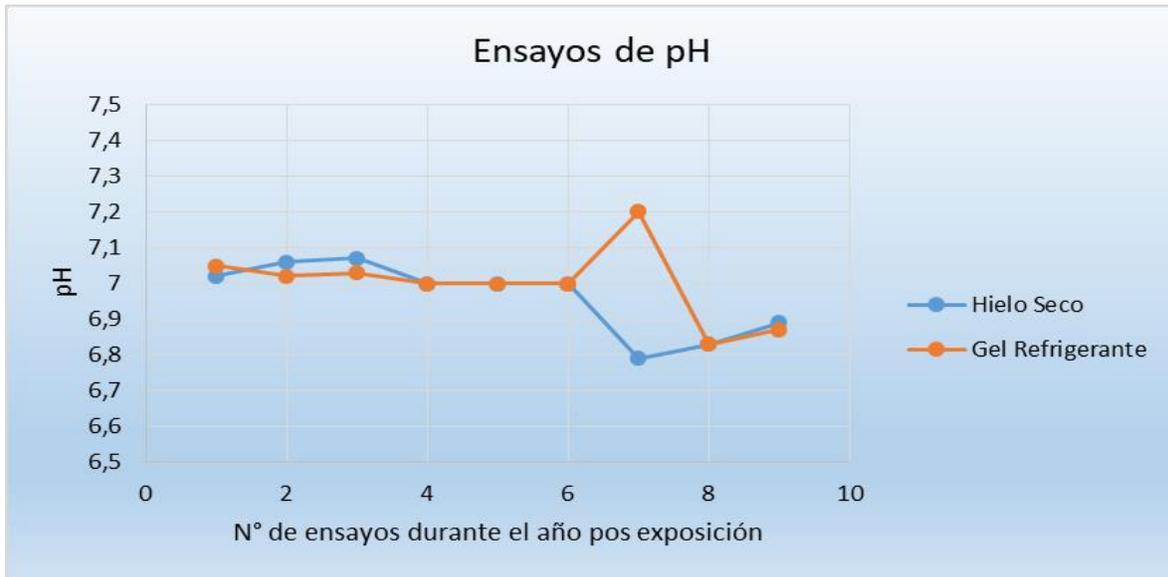
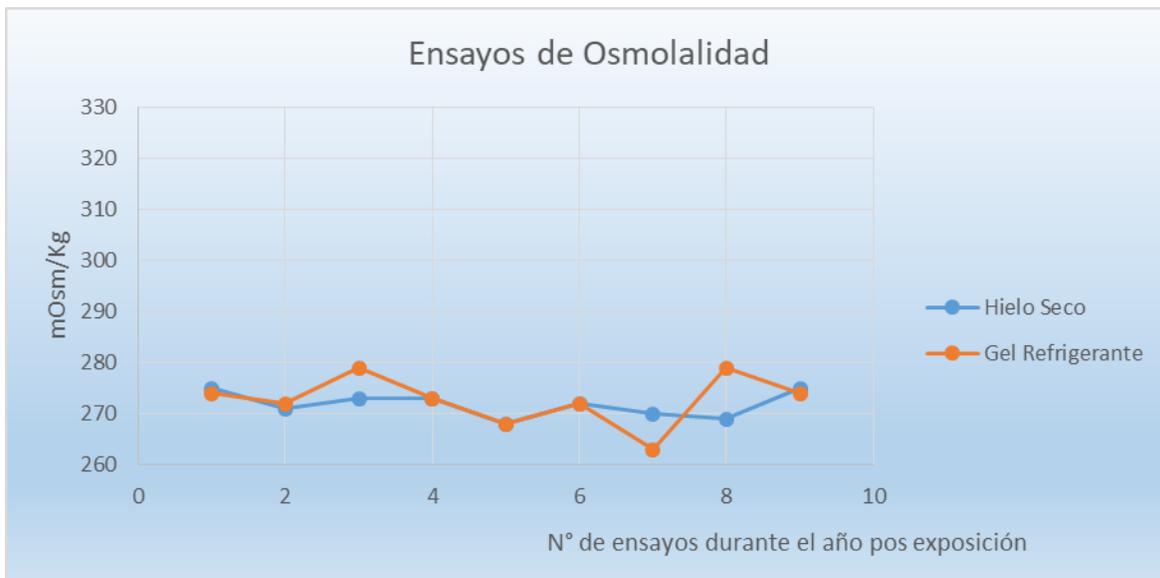


Figura 27. Comparación gráfica de los valores de osmolalidad de la vacuna en hielo seco y gel refrigerante



DISCUSIÓN

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar la respuesta de la vacuna Candid #1 liofilizada al cambio en las condiciones de refrigeración durante el transporte. Para ello se eligió un sistema de frío alternativo al hielo seco provisto por geles refrigerantes, habitualmente utilizados para el transporte de medicamentos. El motivo de su elección fue por su bajo costo, su amplia disponibilidad y además ser reutilizables. El efecto de estas nuevas condiciones sobre la vacuna fue comparado con el actual método de refrigeración provisto por panes de hielo seco, que si bien permite mantener temperaturas muy bajas por largo tiempo, tiene la desventaja de tener un costo económico alto y numerosas dificultades logísticas a la hora de su adquisición, ya que no hay en la zona lugares que lo provean.

Los experimentos realizados fueron diseñados, en primer lugar, para conocer cuál era el comportamiento de la temperatura en el interior de las conservadoras utilizadas para el transporte con los dos sistemas de frío y fundamentalmente dentro de los viales de vacuna. Los frascos se acondicionaron dentro de latas según el procedimiento habitual para su expedición hacia los centros provinciales de acopio solicitantes. Las conservadoras después de ser embaladas y aseguradas sus tapas con cinta engomada para retrasar el mayor tiempo posible el ingreso de calor, fueron desafiadas colocándolas dentro de una estufa de laboratorio a una temperatura externa elevada mantenida constante durante 24 horas. Los perfiles térmicos obtenidos a través de cuatro sondas con termocuplas conectadas a un registrador (Datalogger), midieron las temperaturas de forma continua. En la Tabla N°2 y su respectiva Figura N° 18, se muestran las temperaturas registradas durante el tiempo de la prueba dentro de la conservadora, en cuyo interior había latas en hielo seco con viales de formulado sin virus. Se puede observar que la temperatura externa se mantuvo cercana a los 40°C (línea verde). Por otro lado, las sondas colocadas dentro de dos viales de vacunas (líneas roja y azul), registraron temperaturas muy similares entre ellos,

manteniéndose por debajo de los -20°C . Sin embargo la temperatura en el interior de la conservadora (línea naranja) se mantuvo por encima de las otras dos, aproximadamente 20°C . Esta diferencia, según se pudo comprobar, se debió a que los cables de las sondas impidieron el cierre completo de la conservadora. Se realizó la misma prueba con el único cambio de hielo seco por geles refrigerantes. Los resultados del monitoreo de las temperaturas se muestran en la Tabla N°3 y su respectiva Figura N°19. La temperatura externa proporcionada por la estufa de laboratorio permaneció cercana a los 45°C (línea verde). Las líneas correspondientes a las sondas en el interior de los viales (líneas roja y azul) y la sonda del interior de la conservadora (línea naranja), fueron prácticamente coincidentes. A diferencia de la prueba anterior, los cables ingresaron a la conservadora por un orificio de la tapa, el cuál fue sellado y el cierre en consecuencia fue correcto. Además se observa que la temperatura en los viales se mantuvo por debajo de los 0°C hasta 5 o 6 horas desde el inicio de la exposición para posteriormente mantenerse entre 0 y 5°C hasta finalizar el experimento a las 24 horas.

La obtención de los perfiles térmicos en las condiciones descritas anteriormente, permitió definir las características de los embalajes, la disposición de la carga dentro de estos y la cantidad y distribución de los refrigerantes para optimizar el aprovechamiento del frío en la siguiente etapa del experimento.

Una vez establecida la manera más eficiente de conservar el frío, se realizó una simulación de transporte hacia los centros de acopio. Para ello se colocaron dos conservadoras de forma simultánea conteniendo vacunas en latas con ambos sistemas de frío, en un vehículo durante 24 horas. Se realizó un recorrido local de algunos kilómetros. Se registraron las temperaturas de forma continua en puntos similares a las pruebas anteriores. La Tabla N°4 y su respectiva Figura N° 20 muestran el registro de temperaturas medidas por las distintas sondas durante la prueba en terreno. Aquí la temperatura en el interior del vehículo alcanzó los $57,5^{\circ}\text{C}$ como máximo y los 10°C como mínimo, siguiendo las variaciones día -

noche (línea verde). La sonda ubicada dentro del vial en hielo seco (línea azul) muestra temperaturas que se mantuvieron por debajo de los -30°C durante las 24 horas. Las sondas restantes fueron colocadas en la conservadora que contenía los geles refrigerantes como sistema de enfriamiento. Ambas sondas siguieron un comportamiento similar excepto durante las primeras horas de la exposición cuando la temperatura en el interior del vehículo alcanzó los valores más altos. En este tramo de la exposición, la sonda en el interior de la conservadora (línea naranja) se colocó aproximadamente 10°C por encima de la temperatura registrada por la sonda en el interior del vial (línea roja). En ese mismo tramo de la exposición, con temperaturas cercanas a los 57°C en el exterior, la temperatura dentro del vial subió aproximadamente 10°C en 4 horas hasta 0°C . Después de este período, coincidiendo con la disminución de la temperatura externa, ambas sondas registraron temperaturas similares que se ubicaron entre 0 y 5°C durante el resto de la exposición.

Las vacunas utilizadas durante la prueba en terreno fueron guardadas inmediatamente a -20°C hasta la realización de los ensayos de laboratorio.

La temperatura dentro de los frascos con vacuna en hielo seco, resultó en todos los casos, de acuerdo a lo esperado según las características de este refrigerante cuya temperatura de fusión es de $-78,5^{\circ}\text{C}$. En cuanto a lo sucedido con los frascos mantenidos con geles refrigerantes, pudo observarse temperaturas promedio muy próximas a los 0°C , a pesar de que la máxima alcanzada en el vehículo durante la prueba en terreno fue de $57,5^{\circ}\text{C}$.

Se realizaron los ensayos de estabilidad de la vacuna al mes, a los 5 meses y entre los 12 y 15 meses de la exposición en el vehículo y los resultados se muestran en la Tabla N°6. En ningún caso se encontraron resultados fuera de especificaciones.

Se realizó un análisis estadístico de medias independientes de las potencias para comparar los resultados obtenidos entre ambos grupos, uno expuesto al frío del hielo seco y el otro al frío de los geles refrigerantes. No se

encontró diferencia significativa entre las medias de ambos grupos de resultados de potencia, con un nivel de confianza del 95%.

Se muestra en las Figuras N° 21, 22 y 23, la comparación de los resultados obtenidos para potencia, pH y osmolalidad respectivamente. Se puede observar en todos los casos la similitud entre los valores obtenidos para ambos grupos de vacuna como así también la inexistencia de valores fuera de especificación.

Una cadena de frío adecuada establecida según las características propias de cada vacuna y su mantenimiento durante toda la distribución, desde el sitio de fabricación hasta el centro de acopio como así también desde este a los distintos locales de vacunación periféricos, debe ser cuidadosamente monitoreado para garantizar la capacidad inmunogénica de estos productos (WHO, 2015). Es por ello que las dificultades para asegurar el éxito de las campañas de vacunación, especialmente en lugares de difícil acceso y de escasos recursos económicos y de infraestructura, sigue siendo motivo de preocupación a nivel mundial. La industria farmacéutica invierte mucho dinero en el desarrollo de nuevas vacunas y en nuevas formulaciones que provean de mayores ventajas a la hora de mantener su estabilidad en condiciones ambientales extremas. Además, deja al descubierto la diferencia entre una buena vacuna de laboratorio y una vacuna exitosa en terreno.

Se han realizado estudios similares al presente en las últimas décadas. Aunque utilizando distintas metodologías se llevaron a cabo con el único fin de probar la estabilidad térmica de vacunas en condiciones ambientales no favorables. Los estudios en terreno se desarrollaron en lugares donde el mantenimiento de la cadena de frío se hace muy difícil por la carencia del equipamiento e infraestructura adecuada para cumplir con las recomendaciones de conservación formuladas por los laboratorios fabricantes de estos productos inmunobiológicos. Uno de estos estudios fue realizado en los años 80 con una nueva fórmula de estabilización del virus de la vacuna para la fiebre amarilla, cepa 17D, que al igual que Candid #1 es un virus vivo atenuado y como tal se inactiva fácilmente por calor incluso si se liofiliza. La indicación para su conservación es de

2 a 8°C. Es por esto que el uso de las vacunas atenuadas en países tropicales ha encontrado problemas con la pérdida de potencia después de ser almacenadas a temperaturas inapropiadas. Previamente se estudió el efecto de distintas sustancias químicas para brindarle al virus de la fiebre amarilla mayor resistencia al calor. Se demostró que la lactosa, sorbitol y aminoácidos como histidina y alanina podrían mejorar sensiblemente la estabilidad térmica de las preparaciones liofilizadas de esta vacuna. La nueva fórmula del virus estabilizado fue desarrollada sobre esta base de excipientes, la cual presentó una vida media de 10 días a 37°C y generaba altos títulos de anticuerpos neutralizantes en niños. Se midió la estabilidad de esta nueva fórmula con un estudio en las condiciones de campo siguiendo su título infeccioso en cultivo celular y evaluando su potencia en niños vacunados después de un almacenamiento prolongado a 10°C y repetidos viajes al interior de un estado de África Central. Los equipos para mantener la vacuna en frío disponibles en el hospital centro de acopio, constaba de refrigeradores a kerosene que generaban temperaturas de alrededor de 10°C. Desde este hospital se realizó un viaje en cinco etapas de 12 a 14 horas de trayecto, cada una hacia los vacunatorios que se encontraban en cinco regiones diferentes en el interior del país. La vacuna viajó en conservadoras sin hielo para simular las condiciones que habitualmente se presentaban en el transporte de distribución. Se registró a intervalos la temperatura dentro las conservadoras, observándose un rango de variación entre 18 y 38°C. A la llegada en cada vacunatorio, se vacunaron niños y se guardaron viales de vacuna a -20°C para titular. El remanente se guardó nuevamente a 10°C en refrigerador a kerosene a la espera del próximo viaje. Los resultados obtenidos en la titulación de la vacuna en cultivo celular como también la seroconversión en la mayoría de los niños vacunados mostraron que no hubo pérdida significativa del título ni de la potencia después de seis meses de almacenamiento a $10 \pm 2^\circ\text{C}$ y cinco viajes a campo, confirmando la estabilidad térmica y su resistencia a las pobres condiciones de conservación (Georges, y otros, 1985).

Otro estudio fue presentado en el año 2011, realizado con la vacuna anti poliomielítica oral (OPV) monovalente tipo 3, también una vacuna a virus vivo y la menos estable de las comúnmente utilizadas en los programas ampliados de inmunización. Los estudios de laboratorios habían demostrado la correlación entre la exposición al calor y la pérdida de potencia de la vacuna. Las recomendaciones publicadas para la conservación de la OPV sugieren condiciones adecuadas de la cadena de frío, idealmente -20°C . Esta temperatura que puede ser alcanzada con un simple freezer doméstico no se logra de rutina ya que las campañas de inmunización a veces deben alcanzar lugares aislados donde la tecnología y la corriente eléctrica no llegan. Cuando el almacenamiento a -20°C no es posible, la vacuna puede ser guardada entre 2 y 8°C por un máximo de 6 meses. Las condiciones de la cadena de frío en campo frecuentemente son muy problemáticas y a veces imposible siendo este el principal factor que limita las acciones de los servicios de inmunización para alcanzar al total de la población en riesgo. Esto es clave a la hora de cumplir con el objetivo de vacunar a todos los niños menores de 5 años en el marco de la estrategia global tendiente a la erradicación de la poliomielitis, tanto para países endémicos como para el control de brotes en países donde el virus puede reemerger. Este estudio fue realizado en un país de África central donde las campañas de inmunización contra la polio se encuentran con todas estas limitaciones, como en otros lugares. Esto hace que el mantenimiento de la OPV fuera de los rangos de temperaturas definidas por el fabricante durante las campañas sea un desafío. Los frascos de vacuna utilizados en el estudio se mantuvieron fuera del rango de temperatura definido por el productor por un máximo de 86,9 horas durante las actividades de la campaña de inmunización y expuestos a temperaturas superiores a los $47,1^{\circ}\text{C}$. Después de la campaña, la vacuna fue ensayada en el laboratorio demostrando que todavía se mantenía potente y en conformidad con las especificaciones publicadas (Zipursky, y otros, 2011) (Schoub & Cameron, 1996) (John, 1996) (Deshpande, Rao, Nadkarni, Bhatia, & Rodrigues, 1995) (Kumru, y otros, 2014).

Si bien las vacunas contra la fiebre amarilla y la OPV contra la poliomielitis son a virus vivo atenuado como la vacuna Candid #1, las características propias inherentes a los distintos tipos de virus y sus formulaciones hacen que sus comportamientos frente a la exposición al calor sean diferentes, siendo Candid #1 (vida útil 7 días a 37°C) más resistente que OPV, pero menos que la vacuna para fiebre amarilla (vida útil 10 días a 37°C). Por otro lado, la vacuna Candid #1 fue probada en campo en condiciones ambientales no tan exigentes como las otras dos ya que fue expuesta a un rango de temperaturas entre - 5,9 y 12,8°C por 24 horas. Cabe aclarar que para el caso de Candid #1 solo se pretende evaluar cómo responde la vacuna al cambio del sistema de refrigeración y no a la ausencia de éste.

La medicina preventiva es reconocida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como un pilar fundamental de la Salud Pública. Cuenta con el uso de vacunas como una de las herramientas más efectivas, ya que ha permitido una reducción importante en la mortalidad infantil y preescolar.

En la República Argentina el Programa Nacional de Inmunizaciones tiene como principal objetivo disminuir la morbi-mortalidad de las enfermedades inmunoprevenibles. A fin de lograr este objetivo, el Ministerio de Salud adquiere las vacunas para el Calendario Nacional de Vacunación cuya aplicación es gratuita y obligatoria en todo el país. Con este programa se busca lograr una amplia cobertura de inmunización contra enfermedades con el fin de sostener el nivel inmunitario de la población susceptible y eliminar o erradicar aquellas patológicamente inmunoprevenibles, de reservorio únicamente humano.

El Calendario Nacional de Vacunación cuenta con una amplia cobertura, provista por una variedad de vacunas. Estos productos inmunobiológicos son fabricados a partir de diferentes tipos de antígenos como: agentes vivos atenuados, inactivados, toxoides, subunidades de microorganismos o virus y recombinantes entre otros. Esta variedad de antígenos y sus respectivas formulaciones le dan características propias a cada vacuna en cuanto a su

conservación y comportamiento frente a la temperatura. Las vacunas que integran el Calendario Nacional, a pesar de su diversidad, poseen temperaturas recomendadas por sus respectivos fabricantes para su conservación que van de 2 a 8°C incluyendo vacunas a virus vivos atenuados como la vacuna triple viral con cepas de virus de Sarampión, Rubeóla y Parotiditis, vacuna contra Rotavirus, vacuna contra Varicela y vacuna contra la Fiebre Amarilla, siendo algunas líquidas y otras liofilizadas. Las excepciones corresponden a OPV y Candid #1. Para ambas se recomienda conservar a una temperatura de -20°C hasta su vencimiento. Sin embargo para la OPV existe la posibilidad de mantenerla, en caso de ser necesario, de 2 a 8°C acortando su vida útil de 2 años a 6 meses o 1 año. En el caso de Candid #1 la recomendación para su almacenamiento y transporte es de $-20 \pm 2^\circ\text{C}$ manteniendo en estas condiciones el tiempo de vida útil de 9 años. La falta de flexibilidad en cuanto a la temperatura de conservación podría estar atentando contra la disponibilidad de la vacuna en los vacunatorios, incidiendo negativamente sobre la cobertura de la población en riesgo de contraer la enfermedad. Por otro lado, se podría plantear el interrogante sobre el costo beneficio de tener un período muy prolongado de vida útil a costa de un rango de temperatura de almacenamiento y transporte muy bajo. Si realizamos una comparación con el resto de las vacunas del Calendario Nacional y principalmente las vacunas a virus vivos atenuados, vemos que todas se almacenan entre 2 y 8°C con vidas útiles que en general no superan los 3 o 4 años. Si bien estas condiciones permite mantener un stock de un gran número de dosis de vacuna Candid #1, se podría estar limitando su disponibilidad en los vacunatorios debido a la necesidad de contar con freezers y provisión de hielo seco para su transporte.

El comienzo de un nuevo estudio a fines del año 2018, que toma como base y complementa al presente, tiene como objetivo profundizar en el conocimiento sobre la estabilidad de Candid #1 y aportar más evidencia científica para encontrar el balance más apropiado entre conservación y disponibilidad en terreno. Se utilizó además durante el desarrollo de las pruebas de este nuevo

estudio el uso de VVM (Vaccine Vial Monitor) como una herramienta para el control de la cadena de frío.

CONCLUSIÓN

El acondicionamiento de la vacuna con geles refrigerantes en la cantidad y distribución como así también el tipo de embalaje utilizados para simular el transporte, evidenció la suficiente capacidad para mantener una temperatura en promedio cercana a 0°C durante 24 horas, tiempo más que suficiente para alcanzar los centros más alejados desde la planta productora por vía terrestre.

La vacuna embalada como se describió anteriormente fue desafiada durante la prueba en terreno a temperaturas extremadamente altas, que alcanzaron por varias horas los 57,5°C, mientras que en situaciones reales de transporte las temperaturas dentro del vehículo no serían tan extremas como las probadas.

Los resultados obtenidos en los ensayos de estabilidad y fundamentalmente en la potencia de la vacuna al año de la exposición durante la simulación del transporte, no mostraron evidencia de deterioro alguno del producto, encontrándose todos dentro de las especificaciones.

Por lo antes expuesto, los resultados del presente estudio exploratorio se consideraron satisfactorios y alentaron a profundizar las investigaciones sobre el tema de aplicación. A tal efecto, se diseñó un estudio posterior, iniciado a fines del 2018. En este nuevo trabajo, se programaron tres viajes al centro de acopio de vacuna Candid #1 más alejado de la ciudad de Pergamino. El centro seleccionado fue Santiago del Estero capital a 900 Km de distancia al norte, si bien no pertenece al área endémica de FHA, se vacunan año a año miles de personas que viajan a esta zona por razones laborales. Además se amplió la prueba a tres lotes de vacuna provenientes de distintos lotes de vacuna fluido a granel (bulk), en distintas condiciones de transporte y en cantidad suficiente para realizar los ensayos de estabilidad por el tiempo de su vida útil según normativa nacional e

internacional (EMEA, 2006); (ANMAT, 2018). Por otro lado, se incorporó a las pruebas una nueva tecnología para el control de la cadena de frío a través de VVM, pequeños indicadores que evitarían el uso de vacunas que no hayan mantenido la cadena de frío y el descarte de vacuna sospechosa de no haber mantenido las condiciones de almacenamiento. El estudio ya completó la primera etapa de las pruebas en terreno encontrándose en la segunda etapa que consiste en la realización de los ensayos de laboratorio. El resultado de los ensayos permitirá evaluar la estabilidad post exposición y la eficiencia de los VVM como indicadores visuales de las condiciones en que llegan las vacunas a manos del personal de salud antes de ser usadas en pacientes.

Los avances en el diseño experimental del nuevo trabajo, con las consideraciones normativas correspondientes, se lograron como resultado del presente estudio que buscó establecer las bases para la confección de un protocolo sencillo de transporte, validado a través de evidencias que aseguren la conservación y disponibilidad de una vacuna estable e inmunológicamente eficaz en terreno. De esta forma facilitar la oportunidad de inmunización de personas en lugares alejados del sitio de producción y colaborar con en el éxito de los programas provinciales de inmunización con Candid #1 en la zona endémica de la FHA.

BIBLIOGRAFÍA

- Ambrosio, A. M., Saavedra, M. C., Riera, L. M., & Fassio, R. M. (2006). La producción nacional de vacuna a virus vivo atenuado (Candid #1) anti-fiebre hemorrágica argentina. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 40, 5-17.
- ANMAT. (2018). Lineamientos generales de Buenas prácticas de fabricación para elaboradores, importadores/exportadores de medicamentos. *Disposición 3827*. Disponible en: http://www.anmat.gov.ar/boletin_anmat/BO/Disposicion_3827-2018.pdf
- Arribalzaga, R. A. (1955). Una nueva enfermedad epidémica a germen desconocido: hipertermia nefrotóxica, leucopénica y enántémica. *Día Médico*, 27, 1204.
- Briggiler, A., Sinchi, A., Coronel, F., Sánchez, Z., Levis, S., Taylor, J., & Enria, D. (enero-marzo de 2015). Los nuevos escenarios de transmisión de la fiebre hemorrágica Argentina desde la introducción de la vacuna a virus junín vivo atenuado (Candid#1): una experiencia en trabajadores golondrinas. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 32(1), 165-171.
- Castilla, V., & Enria, D. (2013). Arenaviridae. En J. Basualdo, C. Coto, & R. de Torres, *Microbiología médica*. (3 ra ed.). Buenos Aires, Argentina: Atlante. Cap. 29.
- CFR. (1 de abril de 2018). *FDA*, Digital. Obtenido de CFR - Code of Federal Regulations Title 21: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?CFRPart=610>
- Deshpande, J., Rao, V., Nadkarni, S., Bhatia, J., & Rodrigues, J. (1995). An evaluation of cold chain in Maharashtra & Karnataka states by potency

testing of field samples of oral poliovirus vaccine. *Indian J Med Res*, 102, 60-5.

EMA, E. M. (2006). *ICH Topic Q 1 A (R2) Stability Testing of new Drug Substances and Products*. Obtenido de https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-1-r2-stability-testing-new-drug-substances-products-step-5_en.pdf

Enria, D. (2011). Situación actual de la fiebre hemorrágica argentina (FHA). *Temas de Zoonosis V*, 99-106.

Enria, D. A., & Barrera Oro, J. G. (2002). Junin virus vaccines. *Curr Top Microbiol Immunol*, 263, 239-261.

Enria, D., Feuillade, M., Levis, S., AM, B., Ambrosio, A., Saavedra, M., & al., e. (1999). Impact of the vaccination of high risk population for AHF with a live attenuated Junin virus vaccine. En J. Saluzzo, & B. Dodet, *Factors in the emergence and control of rodent - Borne viral diseases (Hantaviral and Arenaviral diseases)* (págs. 273-80). París: Elsevier.

Enria, D., Franco, S. G., Ambrosio, A., & al, e. (1986). Current status of the treatment of Argentine hemorrhagic fever with immune plasma. *Med. Microbiol. Immunol.*, 175, 169-172.

FA. (2013). Determinación de agua. En M. d. Salud, *Farmacopea Argentina* (séptima edición ed., 1:143 -147). Buenos Aires: Ministerio de Salud. Obtenido de http://www.anmat.gov.ar/webanmat/fna/pfds/Farmacopea_Argentina_2013_Ed.7.pdf

FA. (2013). Determinación de pH. En M. d. Salud, *Farmacopea Argentina* (séptima edición ed., 1:167-168). Buenos Aires: Ministerio de Salud. Obtenido de

http://www.anmat.gov.ar/webanmat/fna/pfds/Farmacopea_Argentina_2013_Ed.7.pdf

FA. (2013). Ensayos de endotoxinas bacterianas. En M. d. Salud, *Farmacopea Argentina* (séptima edición ed., 1:190-196). Buenos Aires: Ministerio de Salud. Obtenido de http://www.anmat.gov.ar/webanmat/fna/pfds/Farmacopea_Argentina_2013_Ed.7.pdf

FA. (2013). Osmolaridad y Osmolalidad. En M. d. Salud, *Farmacopea Argentina* (séptima edición ed., 1:306-307). Buenos Aires: Ministerio de Salud. Obtenido de http://www.anmat.gov.ar/webanmat/fna/pfds/Farmacopea_Argentina_2013_Ed.7.pdf

Georges, A., Tible, F., Meunier, D., Gonzalez, J., Beraud, A., Dybdahl, N. S., . . . Courbot, M. G. (1985). Thermostability and efficacy in the field of a new, stabilized yellow fever virus vaccine. *Vaccine*, 3, 313-315.

Harrison, L., Halsey, N., McKee, K., Peters, C., Barrera Oro, J., Briggiler, A., & al, e. (1999). Clinical case definitions for argentine hemorrhagic fever. *Clin Infect dis*, 28, 1091-4.

John, T. (1996). Vaccine stability in the context of vaccine delivery in a developing country: India. *Dev. Biol. Stand.*, 87, 19-25.

Kumru, O., Joshi, S., Smith, D., Middaugh, C., Prusik, T., & Volkin, D. (2014). Vaccine instability in the cold chain: Mechanisms, analysis and formulation strategies. *Biologicals*, 42, 237-259.

Maes, P., Alkhovsky, S. V., Bào, Y., Beer, M., Birkhead, M., & Briese, T. (21 de Abril de 2018). *Archives of Virology*. Obtenido de VIROLOGY DIVISION

NEWS. Taxonomy of the family Arenaviridae and the order Bunyavirales: update 2018: <https://doi.org/10.1007/s00705-018-3843-5>

Maiztegui, J. (1975). Clinical and epidemiological patterns of Argentine hemorrhagic fever. *Bulletin of the World Health Organization*, 52 (4-6), 567 - 575.

Maiztegui, J. I., & McKee, K. T. (1989). Inoculation of human volunteers with a vaccine against Argentine hemorrhagic fever. *VI International Conference on Comparative and Applied Virology*, (pág. S4).

Maiztegui, J. I., & Sabattini, M. (1977). Extensión progresiva del área endémica de fiebre hemorrágica argentina. *Medicina (Buenos Aires)*, 37, 162 - 166.

Maiztegui, J. I., McKee, K. T., Oro, J. G., & al, e. (1998). Protective efficacy of a live attenuated vaccine against Argentine Hemorrhagic Fever. *J Infect Dis.*, 177, 277-283.

Maiztegui, J., Feinsod, F., Briggiler, A., Peters, C., Enria, D., Lupton, H., & al., e. (1987). Inoculación de los primeros voluntarios argentinos con la cepa atenuada Candid #1 de virus Junin. *Medicina*, 47(6):565.

Mastrangelo, A., Tagliabue, P., Berro, L., De Carolis, D., Sinchi, A., Digilio, C., & D., E. (2014). Estudio cualicuantitativo de las variables sociales que definen escenarios de transmisión de la fiebre hemorrágica argentina en las provincias de Buenos Aires y Santa Fe, 2001 - 2010. *Salud colectiva*, 10(2), 171 -184.

McDonald, C., McKee, K., Peters, C., Feinsod, F., Cosgriff, T., & Barrera Oro, J. (1987). Initial clinical assessment of humans inoculated with a live-attenuated Junin virus vaccine. *VII International Congress of Virology*, (pág. R3 27). Alberta.

- Mills, J. N., Ellis, B. A., McKee, K. T., & al, e. (1992). A longitudinal study of Junin virus activity in the rodent reservoir of Argentine hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg.*, 47, 749-763.
- MS. (28 de Diciembre de 2012). *Ministerio de Salud. Recomendaciones nacionales de vacunación argentina.* Obtenido de http://www.msal.gob.ar/images/stories/bes/graficos/0000000451cnt-2013-06_recomendaciones-vacunacion-argentina-2012.pdf
- Barrera Oro, J. G., & McKee, K. T. (1992). *Hacia una vacuna contra la fiebre hemorrágica argentina.* Organización Panamericana de Salud. Oficina Sanit Panam. Obtenido de <http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/27097>
- Parodi, A., Greenway, D., Rugiero, H., Rivero, E., Frigerio, M., Mettler, N., . . . Nota, L. G. (1958). Sobre la etiología del brote epidémico en Junin. *Día Médico*, 30, 2300.
- Polop, J., Claderón, G., Feuillade, M., García, J., Enria, D., & Sabattini, M. (2007). Spatial variation in abundance of the Junin virus hosts in endemic and non endemic argentine hemorrhagic fever zones. *Austral Ecology*, 32(3), 245-253.
- Sabattini, M. S., & Contigiani, M. S. (1982). Ecological and biological factors influencing the maintenance of arenaviruses in nature, with special reference to the agent of Argentine hemorrhagic fever. *International Symposium on Tropical Arbovirus and Hemorrhagic Fever* (págs. 251- 262). F. D. Pinheiro.
- Schoub, B., & Cameron, N. (1996). Problems encountered in the delivery and storage of OPV in an African country. *Dev. Biol. Stand.*, 87, 27-32.
- Volkin, D., Burke, C., Sanyal, G., & Middaugh, C. (1996). Analysis of vaccine stability. *Dev. Biol. Stand.*, 87, 135-142.

WHO. (3 de October de 2015). *WHO - The vaccine cold chain*. Obtenido de https://www.who.int/immunization/documents/IIP2015_Module2.pdf

Zipursky, S., Boualam, L., Cheikh, D. O., Caruana, J. F., Hamid, D., Janssen, M., . . . Ronveaux, O. (2011). Assessing the potency of oral polio vaccine kept outside of the cold chain during a national immunization campaign in Chad. *Vaccine*, 29, 5652-5656.