

# La producción nacional de vacuna a virus Junin vivo atenuado (Candid #1) anti-fiebre hemorrágica argentina\*

► Ana María Ambrosio<sup>1</sup>, María del Carmen Saavedra<sup>2</sup>, Laura Marisa Riera<sup>3</sup>, Rubén Miguel Fassio<sup>4</sup>

1. Doctora en Ciencias Biológicas. Directora de Producción.
2. Doctora en Ciencias Biológicas. Jefe del Departamento de Producción.
3. Doctora en Ciencias Biológicas. Jefe del Departamento de Control/Aseguramiento de Calidad.
4. Ingeniero. Jefe área ingeniería de planta, a cargo de Aseguramiento de Calidad.

\* Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas "Dr JI Maiztegui". ANLIS. Monteagudo 2510. (B2700KIV) Pergamino, Argentina.

## Resumen

La emergencia de la fiebre hemorrágica argentina (FHA) a comienzos de la década del '50 representó para los científicos argentinos un desafío excepcional: una patología humana de alta letalidad, nueva para el mundo, se presentaba solamente en una región (de gran importancia económica) del territorio argentino. El afrontar ese desafío con dedicación y, sin duda, con más recursos intelectuales que financieros, permitió que a los tres años de la descripción clínica de la enfermedad se demostrara que el virus Junin era el agente etiológico de la FHA, siendo éste el segundo arnavirus descrito luego del virus de la Coriomeningitis Linfocitaria, prototipo del grupo, aislado en 1933. En las décadas de los '60 y los '70 se realizaron avances fundamentales con la detección del reservorio natural del virus Junin y el conocimiento de múltiples aspectos de la fisiopatología y la epidemiología de la enfermedad. Esto permitió conocer que se trataba de una enfermedad controlable pero no erradicable. Fue en este mismo período en que se encontró un tratamiento para la FHA que disminuyó drásticamente su mortalidad y se iniciaron diversas líneas de investigación para desarrollar una vacuna eficaz que permitiera controlar la enfermedad. Este trabajo es un relato no exhaustivo de los acontecimientos que condujeron a la elaboración en Argentina de una vacuna (Candid #1) para prevenir la FHA, y fue realizado para rendir homenaje al gran inmunólogo argentino Dr. Ricardo Margni mostrando cómo los principios de la inmunología, difundidos por el Dr. Margni durante su extensa trayectoria como científico y docente contribuyeron, por este camino, a mejorar la calidad de vida de la sociedad.

**Palabras clave:** fiebre hemorrágica argentina \* Arenaviridae \* vacuna Candid #1 \* vacunas virales fabricadas en Argentina

## Summary

### **ARGENTINE PRODUCTION OF LIVE ATTENUATED VACCINE CANDID #1 TO PREVENT ARGENTINE HEMORRHAGIC FEVER**

*The emergence of Argentine hemorrhagic fever (AHF) at the beginning of the '50s represented an exceptional challenge to Argentine scientists: a new human pathology with a high lethality rate was affecting a conspicuous region –of high economical importance– of the Argentine territory. Facing this challenge with dedication and, undoubtedly, more intellectual than financial resources, made it possible that three years after the clinical description of the disease, Junin virus was shown to be its etiological agent,*

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

*being this the second arenavirus reported, following the prototype of the arenavirus group Lymphocytic Choriomeningitis virus, isolated in 1933. During the '60s and '70s fundamental progress was made with the demonstration of Junin virus natural reservoir and many findings on the physiopathology and epidemiology of AHF, being already envisioned that this was a controllable but not an eradicable disease. During this same period the therapeutical use of convalescent's plasma (neutralizing antibodies transference) was shown to dramatically decrease the mortality rate of the disease, and several important research projects were started to develop an efficacious vaccine to control AHF. This paper is a non exhaustive chronicle of events that led to the manufacture of a vaccine (Candid #1) against AHF in Argentina, and was written to honor Dr. Ricardo Margni, a great immunologist. It is also intended to show one of the many ways in which immunology principles, diffused by Dr. Margni along his rich research and teaching background, can improve society's life quality.*

**Key words:** Argentine hemorrhagic fever \* Arenaviridae \* Candid #1 vaccine\* Argentine manufacture of viral vaccines

## Introducción

La fiebre hemorrágica argentina (FHA) fue descrita como una nueva patología a comienzos de los '50 (1) y hacia 1958 se reportó como su agente etiológico al virus Junin (VJ) (2), integrante de la familia *Arenaviridae*, constituida hasta hoy por 23 agentes entre los cuales seis (Coriomeningitis Linfocitaria, Junin, Machupo, Guanarito, Sabiá y Lassa) son patógenos para el hombre (3). La historia natural de los arenavirus está caracterizada 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. El ratón de campo *Calomys musculinus* ha sido identificado como el reservorio principal del VJ (4) (5).

La FHA afecta fundamentalmente a varones que residen y/o trabajan en las zonas rurales del área endémica. El hombre adquiere la enfermedad por contacto con roedores infectados. La inhalación de aerosoles de las excretas de los reservorios infectados es considerada la vía más importante de infección. La transmisión interhumana es muy infrecuente (6).

La sintomatología de la FHA, detalladamente descrita en otros trabajos (6) (7) 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 (8) (9). A esto se agregan alteraciones renales, neurológicas y cardiovasculares. La convalecencia es prolongada, con debilitamiento y pérdida del cabello, pero usualmente sin secuelas permanentes. La aparición de anticuerpos específicos puede detectarse desde dos semanas después del comienzo de los síntomas y la persistencia de los mismos es variable. La mortalidad, cuando fue descubierta la

enfermedad ascendía al 50%, disminuyéndose al 30% con el tratamiento sintomático.

Desde el descubrimiento del VJ se han producido brotes anuales de FHA sin interrupción, que ocurren durante el otoño y el invierno. La enfermedad tiene una distribución focal y las incidencias por áreas varían entre 1 y 140/100.000 habitantes y hasta 355/100.000 varones adultos. Esta incidencia es también variable en el tiempo, registrándose áreas consideradas históricas en las cuales la enfermedad puede reemerger sin causas aparentes. Los niños menores de 14 años constituyen aproximadamente el 10% de los casos anuales.

Uno de los aspectos epidemiológicos más relevantes de la enfermedad es la extensión progresiva de su área endémica. En 1958, la zona afectada estaba circunscripta a cuatro partidos de la provincia de Buenos Aires, con una superficie de 16.000 km<sup>2</sup> y con una población a riesgo estimada en 270.000 habitantes (10). En la Figura 1 están representadas las sucesivas extensiones del área endémica, que actualmente cubre unos 150.000 km<sup>2</sup>, con una población a riesgo estimada en 5.000.000 de habitantes (11).

## El Programa Nacional para el Control de la Fiebre Hemorrágica Argentina

La gravedad de la situación sanitaria planteada por la emergencia de la FHA generó rápidas respuestas de las autoridades de salud pública. Poco después del reconocimiento de la "virosis hemorrágica" o "mal de los rastrojos" como enfermedad profesional de los trabajadores agropecuarios (Decreto 4894; 21 de junio de 1961), se creó la "Comisión Nacional Coordinadora pa-

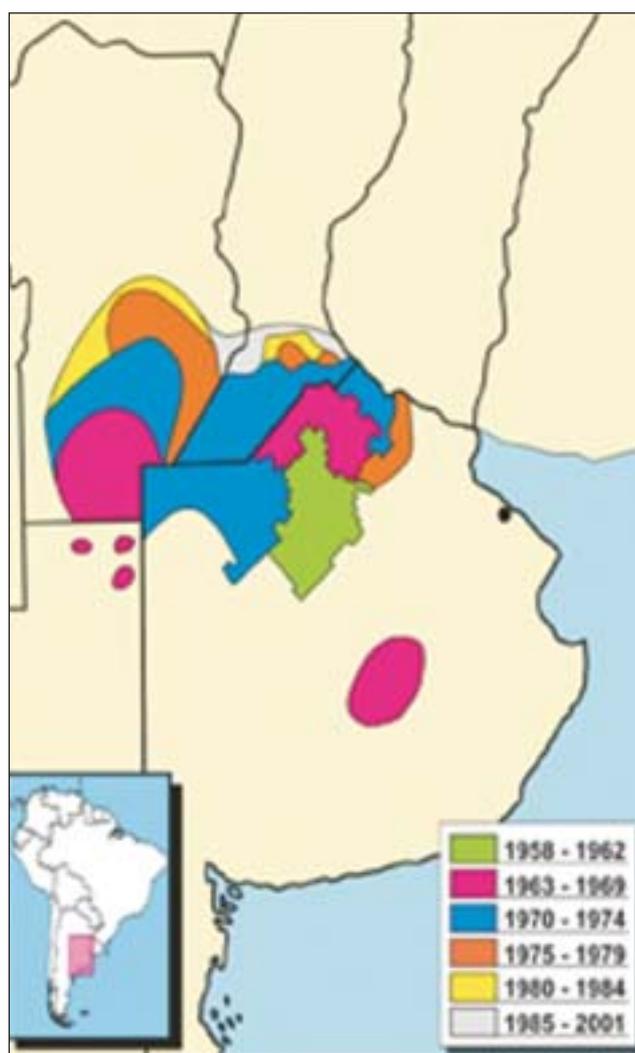


Figura 1. Extensión progresiva del área endémica de la fiebre hemorrágica argentina.

ra el estudio y la lucha contra la fiebre hemorrágica argentina” (Decreto N° 4299 ; 10 de junio de 1964), constituida por representantes del entonces Ministerio de Asistencia Social y Salud Pública, de los Ministerios de Salud Pública de las provincias afectadas por la enfermedad, de las universidades y de otros servicios e institutos, con los fines de coordinar y promover la investigación epidemiológica, los estudios fisiopatológicos, la terapéutica y la lucha contra la fiebre hemorrágica, incluida su prevención en todo el territorio nacional

Desde 1965, se estableció en Pergamino, provincia de Buenos Aires, un Centro de Estudios sobre FHA cuyo propósito fundamental fue diagnosticar y asistir clínicamente a quienes padecían la enfermedad, estando el diagnóstico etiológico confirmatorio a cargo del Instituto Malbrán (Ministerio de Salud Pública de la Nación). Estas actividades constituyeron los prolegómenos de lo que sería el Programa Nacional, comenzando con la Zo-

na Sanitaria IV de la provincia de Buenos Aires y extendiéndose más tarde a la totalidad del área endémica. Durante esta etapa inicial se demostró la eficacia del plasma inmune para el tratamiento de la enfermedad (12).

En 1978, sobre la base de las estructuras existentes, el Poder Ejecutivo Nacional decidió la creación del Instituto Nacional de Estudios sobre Virosis Hemorrágicas (actual Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas “Dr. Julio I. Maiztegui” - INEVH), con sede en Pergamino, como organismo dependiente del Ministerio de Salud y Acción Social de la Nación, con la misión de “luchar contra la FHA mediante la investigación y aplicación de medidas terapéuticas y/o preventivas” (Decreto 663/78). La primera misión del INEVH fue la organización del “Programa Nacional de Lucha contra la fiebre hemorrágica argentina”. Las provincias de Buenos Aires, Santa Fe y La Pampa fueron las que iniciaron el Programa Nacional firmando convenio con el Ministerio de Salud de la Nación en 1978, incorporándose, en 1982, la provincia de Córdoba.

El programa se organizó como un programa de control y no de erradicación, dadas las características zoonóticas de la enfermedad con reservorio natural no humano. El programa tuvo como objetivo contribuir a la reducción de la morbi-mortalidad de la FHA, a través de las siguientes actividades:

1. Implementar un sistema confiable de notificación de los casos con diagnóstico clínico.
2. Generar datos epidemiológicos confiables basados en la confirmación etiológica de los casos notificados.
3. Promover un sistema de diagnóstico clínico precoz para acceder al tratamiento temprano de los enfermos.
4. Implementar actividades continuas de educación para la salud a fin de disminuir conductas de riesgo en la población y sostener un nivel de alerta médico que propicie el diagnóstico precoz.
5. Instalar Bancos de plasma inmune distribuidos en las cuatro provincias afectadas para la provisión del tratamiento específico.

Las actividades enumeradas se desarrollaron como parte de planes de investigación clínica, epidemiológica, ecológica y virológica.

Los estudios realizados, entre otros resultados, permitieron:

1. Desarrollar y mejorar los métodos para el diagnóstico etiológico de las infecciones por VJ (9) (13-16).
2. Mantener información epidemiológica actualizada (6) (10) (11) (17) (18).
3. Agregar nuevos datos a los ya existentes sobre la fisiopatología de la enfermedad (19-28).
4. Sistematizar el tratamiento de los enfermos de FHA con plasma de convalecientes (29-32).

## El objetivo de prevenir la fiebre hemorrágica argentina

En 1976, se desarrolló en Buenos Aires el primer Seminario Internacional en Fiebres Hemorrágicas Virales. Entre las conclusiones y recomendaciones de este seminario, se consideró de alta prioridad el desarrollo de una vacuna contra la FHA. En septiembre de 1978 una misión preparatoria de asistencia para este proyecto, a cargo de representantes de la Oficina Sanitaria Panamericana (OPS) y el Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo (PNUD), visitó diferentes instituciones relacionadas científicamente con la problemática de la FHA, estipulándose en el informe final respectivo que el proyecto de desarrollo de una vacuna contra la FHA debía ejecutarse en el INEVH, reforzándose el proyecto en la correcta utilización de recursos de otras instituciones para apoyo y capacitación. En el mismo año fue firmado el proyecto "Desarrollo de una vacuna contra la Fiebre Hemorrágica Argentina", involucrando al gobierno de Argentina, al PNUD, a la OPS y al *United States Army Medical Research Institute of Infectious Diseases (USAMRIID)*, cuya ejecución se inició en enero de 1979, con el objetivo de obtener una vacuna a virus vivo atenuado en un plazo estimado de tres años. Respecto de la estrategia a seguir para el logro de los objetivos, el Convenio estipulaba que "La caracterización del virus será llevada a cabo por un científico argentino que trabajará en los laboratorios del USAMRIID, Frederick, Md, EE.UU."... Una vez obtenida la semilla y realizados los controles, pruebas de potencia e inocuidad correspondientes, en la Argentina se producirá vacuna utilizando esta semilla en el INEVH, que será ensayada progresivamente en voluntarios humanos..." Para el cumplimiento de esta segunda etapa el gobierno argentino se comprometía a proporcionar un espacio de laboratorio adecuado a los requerimientos internacionales para la producción de sustancias biológicas.

## Las líneas de investigación

Desde que el VJ fue demostrado como agente etiológico de la FHA y la especie de roedor *Calomys musculinus* como el principal reservorio natural del virus, la enfermedad se perfiló como controlable pero no erradicable y la estrategia propuesta por los investigadores para el control ha sido la vacunación de la población expuesta al riesgo de contraer la FHA (33).

Los intentos para obtener una vacuna contra la FHA se iniciaron en 1959 y siguieron dos líneas principales de investigación: a) vacunas inactivadas b) vacunas a virus vivos atenuados. Los diferentes tipos de iniciativas se resumen en la Tabla I.

Las vacunas a VJ muerto, obtenidas mediante variados métodos de inactivación, resultaron en algunos productos inadecuados y otros incompletamente estudiados. Los principales inconvenientes encontrados radicaron en la insuficiente masa antigénica obtenida, una débil respuesta inmune primaria y la consiguiente necesidad de repetidas inoculaciones y la corta duración de la protección conferida por estas preparaciones (66) (67).

Las investigaciones que resultaron más exitosas fueron las que utilizaron virus homólogos vivos atenuados. En este sentido, un importante antecedente lo constituyó la vacuna XJ Clon 3, ensayada en más de 600 voluntarios humanos, cuyo desarrollo y aplicación aportó amplia experiencia para el posterior desarrollo de la vacuna a virus vivo atenuado Candid #1 a la que se refiere este trabajo.

## La vacuna Candid #1 a virus vivo atenuado

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, culminó en 1983 con la obtención de una Semilla Maestra y Semilla de Trabajo de la cepa Candid #1 de VJ. Esta cepa fue derivada de la cepa parental XJ 44 mediante clonados por dilución final y *single burst* (68) en células diploides certificadas FRhL-2 (ATCC-CCL 160). Completados extensos estudios preclínicos en cobayos y monos Rhesus (61) (62), la mitad de la existencia de la Semilla Maestra [ Junin XJ, Cobayo <sup>(2)</sup>, Cer,Ratón <sup>(44)</sup>, FRhL-2 <sup>(17)</sup> ] y de la Semilla de Trabajo [Junin XJ, Cobayo <sup>(2)</sup>, Cer,Ratón <sup>(44)</sup>, FRhL-2 <sup>(18)</sup> ] 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.

Tabla I. Experiencias en el desarrollo de vacunas para prevenir la fiebre hemorrágica argentina.

Tipo de antígeno utilizado	Publicación
<i>Inactivados</i>	
Virus Junin completo tratado con formol	34 - 36
Virus Junin completo tratado con luz y colorantes	37 - 40
Virus Junin incompleto	41 - 42
<i>Atenuados heterólogos</i>	
Virus Tacaribe	43 - 50
<i>Atenuados homólogos</i>	
Virus Junin cepa XJ <sub>0</sub>	51 - 54
Virus Junin cepa XJCl <sub>3</sub>	55 - 60
Virus Junin cepa Candid #1	61 - 65

## La construcción de una planta para la producción nacional de vacuna Candid #1

El compromiso de Argentina en el convenio internacional referido a la prevención de la FHA que incluía, como uno de sus principales objetivos, la producción de Candid #1 en el INEVH, requería contar con instalaciones de laboratorio no disponibles en el país. En marzo de 1980, la entonces Secretaría de Estado de Salud Pública financió la construcción de instalaciones adecuadas para la producción de vacunas destinadas al uso en humanos. Estas nuevas instalaciones comprendían cuatro módulos independientes: uno destinado a bioterio para ratones SPF (libres de patógenos específicos), y los restantes tres módulos, con sistemas de manejo del aire y circulación controlada de insumos, personas y residuos correspondientes al nivel III de bioseguridad, se destinaron a Cultivos Celulares Certificados (Banco de Células), Control de Calidad y Producción de Vacunas.

La infraestructura mínima de este nuevo edificio se construyó entre 1980 y 1983. En las Figuras 2 y 3 se muestran diferentes momentos de la construcción. El agrega-



Figura 2. Diferentes momentos durante la construcción de la planta de producción de vacuna del INEVH entre 1980-81.



Figura 3. Vista actual de la Planta de Producción de Vacunas Virales para uso humano del INEVH "Dr JI Maiztegui".

do y puesta en marcha de múltiples instalaciones, indispensables para el correcto uso de cada módulo del nuevo edificio, se fue completando paulatinamente. Así, en 1992, se trasladó la colonia de ratones albinos exocriados convencionales a las nuevas instalaciones del bioterio y, en 1994, con la estandarización de todos los parámetros de la nueva instalación y toda la documentación interna referida a la buena práctica de bioterios aprobada, previa decontaminación, fue sustituida esta colonia por un núcleo de ratones albinos, exocriados, certificados SPF, importados desde un criador en EE.UU. Este bioterio se ha mantenido monitoreado regularmente, manteniendo hasta el presente su condición de SPF (Figs. 4 y 5).

En 1995 fue trasladado a sus nuevas instalaciones el Laboratorio de Cultivos Celulares y, tres años más tarde, comenzó a funcionar el Laboratorio de Control de Calidad en el módulo del nuevo edificio destinado a tal fin. Hacia mediados del año 2000 se completó la



Figura 4. Área de servicio del bioterio de ratones SPF. Personal realizando limpieza de jaulas.



Figura 5. Área limpia (de cría) del bioterio de ratones SPF. Personal realizando tareas de selección de animales.

instalación y puesta en marcha de la planta de tratamiento de agua para inyectables (Figs. 6 y 7) y del área de liofilización (Fig. 8). En el 2001, la planta total de producción de vacunas fue habilitada por la ANMAT (Disposición N° 3.775/01; Leg. 7.308) como planta elaboradora de vacuna virales para uso humano.

## Los ensayos clínicos de la cepa Candid #1 de virus Junin

Durante los años de construcción, equipamiento y adecuación de la planta para elaboración de vacunas del INEVH se realizaron los ensayos clínicos con la cepa Candid #1, utilizándose algunos lotes piloto elaborados en el Instituto Salk (GSD), Swiftwater, Pa, EE.UU., por contrato con el gobierno de EE.UU. Entre 1984 y



Figura 6. Vista del equipo de doble ósmosis reversa para el tratamiento del agua a utilizar en reactivos y procesos.



Figura 7. Vista de los cuatro efectos del destilador de agua para la obtención de agua para inyectables y vapor limpio.



Figura 8. Operador fijando parámetros de un ciclo de liofilización en la interfase PLC del liofilizador.

1986 los estudios en fases I y II fueron realizados simultáneamente en Argentina y en los Estados Unidos (69) (70). Candid #1 resultó inocua, ya que ninguno de los voluntarios inoculados presentó alteraciones clínicas o bioquímicas de significación. La inmunogenidad de Candid #1 se demostró en más de 90% de los voluntarios (71).

Entre 1988 y 1990 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.

La eficacia de la vacuna Candid #1 para la protección contra la FHA fue del 95,5% (intervalos de confianza del 95%, 82%-99%,  $p < 0.001$ ) (72).

Antes y después de estos ensayos clínicos fueron realizándose diferentes estudios referidos al virus vacunal (73) (64) (65), los métodos para su recuperación (74) y diferentes características de la respuesta inmune a Candid #1 en voluntarios humanos (75-80).

La elaboración de estos lotes piloto de Candid #1 permitió completar el entrenamiento del personal técnico (ya iniciado en 1980) y finalizar la transferencia de la tecnología de producción y control de esta vacuna.

### La aplicación en Argentina de la tecnología transferida para la producción y control de la vacuna Candid #1

#### 1. EL BANCO DE CÉLULAS

La primera etapa hacia la producción en el INEVH de la vacuna Candid #1 fue la expansión de la línea ce-

lular diploide FRhL-2, sustrato para la replicación del virus vacunal, a los fines de preservar en nitrógeno líquido un número suficiente de viales que constituyeran la Semilla Maestra y Semilla de Trabajo de esta línea celular y proceder seguidamente a la certificación de la calidad de ambas semillas. Ambos objetivos fueron alcanzados a fines de 1998. Las Figuras 9 y 10 muestran momentos de la obtención del Lote 2 de Semilla de Trabajo de células FRhL-2, realizada en el Laboratorio de Cultivos Celulares inaugurado en 1995. De esta misma manera se procedió con las cinco líneas celulares requeridas en las diferentes etapas del control de calidad de las mismas células FRhL-2 y de los lotes de vacuna Candid #1 (granel y producto terminado), completándose el banco de células destinado a la producción de vacuna a mediados del año 2000. En las Figuras 11 a 13 se presenta la realización de tres de los diferentes ensayos requeridos para la certificación de calidad de las referidas líneas celulares.



Figura 9. Procedimiento de cosecha de Semilla de Trabajo de células FRhL-2 en el laboratorio de cultivos celulares.



Figura 10. Banco de células criopreservadas. Extracción desde el nitrógeno líquido de ampollas con células para su descongelamiento.

## 2. LOS LOTES EXPERIMENTALES DE VACUNA CANDID #1

La implementación de la tecnología transferida para el cumplimiento de las diferentes etapas en la producción y control de calidad de vacuna Candid #1 como granel demandó un gran número de ensayos que se realizaron en laboratorios anexos a la planta en construcción, entre 1999 y 2000. Simultáneamente, desde 1993 hasta el presente, se generó y se revisa toda la documentación requerida para lograr la trazabilidad de



Figura 11. Inoculación de ratones recién nacidos en la prueba de seguridad en animales para la certificación de cultivos celulares.



Figura 12. Vista microscópica de las metafases utilizadas para el cálculo de número modal de cromosomas en las pruebas de certificación de líneas celulares.



Figura 13. Lectura al microscopio del desarrollo de colonias de micoplasmas sobre agar en el control de esterilidad de líneas celulares.



Figura 14. Inoculación de la cepa Candid #1 en cultivos celulares para la obtención del Lote Experimental N° 3 de esta vacuna.

los procesos exigida por las Normas de Buenas Prácticas de Fabricación y Control (BPFyC). Cuando se pudo disponer del área de liofilización, se produjeron tres lotes experimentales de vacuna Candid #1 como granel y producto terminado de los cuales, el lote N° 3, (producido como se muestra en las Figuras 14 y 15) fue sometido a ensayos de protección en cobayos, como se describirá más adelante.

### 3. LOS PRIMEROS LOTES AMPLIADOS DESTINADOS A LA POBLACIÓN

Una vez demostrada la capacidad de la planta de producción de lotes consistentes, de mediana escala, de vacuna Candid #1 liofilizada, cumpliendo con todos los requerimientos de las BPFyC, se consideró el abordaje de la producción de los primeros lotes ampliados de esta vacuna para su utilización en humanos. Este objetivo fue logrado con el financiamiento de un subsidio de la Secretaría de Ciencia, Técnica e Innovación Productiva (SecTyP) otorgado en septiembre de 2002. De esta manera, un año más tarde se contaba con los dos primeros lotes ampliados de vacuna Candid #1 de producción nacional, liberados en planta e inspeccionados por la ANMAT. La Figura 16 muestra el proceso de envasado y liofilización. El primero de estos lotes, llamado 7A, se ha destinado a un ensayo clínico en el que la vacuna localmente elaborada debe compararse con uno de los lotes de vacuna Candid #1 elaborada en EE.UU. y ya utilizado en gran número de voluntarios humanos. En un ensayo preclínico se ha realizado esta comparación en cobayos, incorporando los dos primeros lotes de Candid #1 elaborados en Argentina, el Lote Experimental N° 3 al que ya nos hemos referido y un lote de Candid #1 de origen EE.UU., resultando todos los lotes de vacuna Candid #1 estudiados, independientemente de su origen, con idéntica capacidad protectora contra el desafío con una cepa letal de virus Junin (81).



Figura 15. Realimentación con medio de cultivo de las células inoculadas con semilla viral para la obtención de vacuna a granel.

### 4. EL SISTEMA DE CALIDAD

La estandarización de cada procedimiento en las etapas de producción de la vacuna Candid #1 ya descritas se implementó simultáneamente con sus pruebas de control de calidad y la correspondiente documentación. De esta manera, se generó un sistema para el control de calidad de materias primas, productos intermedios y terminados, materiales de envase y empaque.

Previo a la obtención de vacuna, ya sea en lotes experimentales o destinados a humanos, se ejecutó la calificación de instalación, operación y desempeño de la planta para tratamiento de agua, iniciándose de inme-



Figura 16. Procedimiento de envasado estéril (pre-ingreso al liofilizador) del Lote 7A de vacuna Cándid #1.

diato un programa de monitoreo continuo. También se desarrolló e implementó un programa de monitoreo continuo del entorno de producción, involucrando aire, agua y métodos de limpieza, decontaminación y esterilización, variables todas sujetas a auditorías internas.

Se pusieron en marcha programas de certificación de equipos involucrando sus respectivas calibraciones, así como programas de validaciones de equipos y procesos. Las Figuras 17 a 20 muestran algunas de las actividades del área Control/Aseguramiento de Calidad.

#### 5. REGISTRO DE LA VACUNA CANDID #1 COMO NUEVA ESPECIALIDAD MEDICINAL EN ARGENTINA

El registro como nueva especialidad medicinal de la vacuna Cándid #1 en Argentina, encuadrado en el Artículo 5º de la Ley 16.463 (referido a la elaboración en Argentina de productos novedosos para el país), ha sido iniciado en noviembre de 2002. Parte de este trámite es el ensayo clínico del producto que, en este caso particular, deberá demostrar ser no inferior a los lotes



Figura 17. Inspección de viales de vacuna Cándid #1 liofilizada, pre-etiquetado.

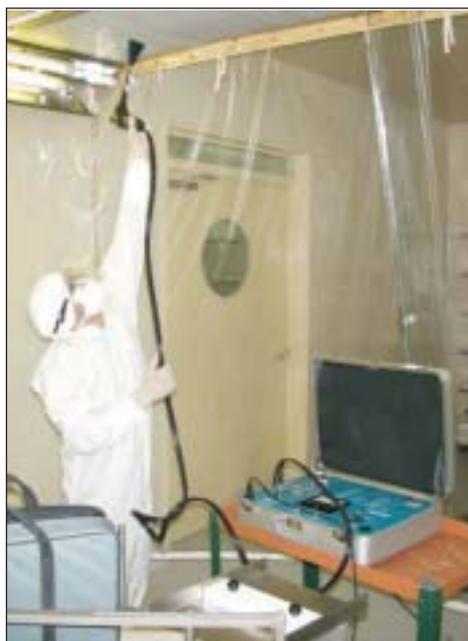


Figura 18. Procedimiento de certificación de filtros HEPA en área clase 100.



Figura 19. Monitoreo de presurización del aire en los diferentes locales de la planta de producción.



Figura 20. Monitoreo de aplicación estéril de indumentaria mediante utilización de placas RODAC.

piloto de Candid #1 (origen EE.UU.) utilizados en los ensayos clínicos de fases I, II y III. La Figura 21 muestra el inicio, el 26 de octubre de 2005, de la ejecución del protocolo titulado "Estudio clínico puente, en fase III, en voluntarios humanos sanos, de entre 15 y 65 años de edad, de ambos sexos, a riesgo de adquirir FHA, aleatorio, a doble ciego, para evaluar la comparabilidad entre la vacuna Candid #1 producida en la Argentina y la producida en los Estados Unidos", aprobado por ANMAT (Disposición N° 5812, del 23 de septiembre de 2004).



Figura 21. Inoculación de voluntarios durante la realización del Ensayo Clínico Puente para comparar la vacuna Candid #1 de origen Argentina y de origen EE.UU.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento a Albani Cristina, Albani Maria, Aubel Carmen, Barrera Oro Julio, Biglieri Marcelo, Bottale Alejandro, Bramante Alejandro, Briggiler Ana Maria, Brun Héctor, Brunelli Martín, Caporalini Claudia, Corrado Mirta, Chiarito Laura, Churín Pablo, Del Valle Adrián, Díaz Carlos, Enría Delia, Eraso Mara, Fazzi Claudio, Fernández Maria Florencia, Fernández Susana, Feuillade Maria Rosa, Fuster Stella, Gazza Pablo, Giuli Viviana, Goncalvez Elena, Gonino Griselda, Goyeneche Maria José, Grosso Fabián, Kucner Liliana, Leites Javier, Levis Silvana, Maiza Andrea, Maiztegui Julio†, Marzano María, Ninni Sandra, Olivera Diego, Pastore Patricia, Paura José, Paz Carina, Pedretti Hugo, Pellegrino Iván, Pini Noemí, Raggio Alejandro, Sabbattini Marta, Salas Adriana, Salud Norma, Sanchez Siles Zaida, Soria Ester, Sottosanti Josefa†, Umanti Maria Elena, Unno Omar, Vidal Javier, Vigorito Mabel.

† Fallecidos.

#### CORRESPONDENCIA

DRA. ANA M. AMBROSIO  
Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas  
"Dr JI Maiztegui"  
Monteagudo 2510  
(B2700 KIV) Pergamino, Argentina  
Fax: (02477) 433045/ 422020  
E-mail: anaambrosio@yahoo.com.ar

#### Referencias bibliográficas

1. Arribalzaga RA. Una nueva enfermedad epidémica a germen desconocido: hipertermia nefrotóxica, leucopénica y enantemática. *Día Médico* 1955; 27: 1204-1210.
2. Parodi AS, Greenway DJ, Rugiero HR, Rivero E, Frigerio MJ, De la Barrera JM, *et al.* Sobre la etiología del brote epidémico de Junin. *Día Médico* 1958; 30: 2300-2.
3. Charrel RN, Lamballerie X. Arenaviruses other than Lassa Virus. *Antiviral Res* 2003; 57: 89-100.
4. Sabbattini MS, Gonzalez LE, Díaz G, Vega VR. Infección natural y experimental de roedores con virus Junin. *Medicina (Buenos Aires)* 1977; 37 (Supl. 3): 149- 61.
5. Mills JN, Calderón GE, Ellis BA, McKee KT, Ksiazek TG, Barrera Oro JG, *et al.* Nuevas observaciones de la infección de roedores por el virus Junin dentro y fuera de la zona endémica de la Fiebre Hemorrágica Argentina. *Medicina (Buenos Aires)* 1991;51: 519-23.
6. Maiztegui JI. Clinical and epidemiological patterns of Argentine hemorrhagic fever. *International Symposium on Arenaviral Infections of Public Health Importance. Bull WHO* 1975; 52: 567-75.
7. Harrison L, Halsey NA, McKee KT, Peters CJ, Barrera Oro JG, Briggiler AM, *et al.* Clinical case definitions for Argentine Hemorrhagic Fever. *Clin Infect Dis* 1999; 28: 1091-4.
8. Boxaca MC, de Guerrero LB, Parodi AS, Rugiero HR, Gonzalez Cappa S. Viremia en enfermos de Fiebre Hemorrágica Argentina. *Rev Asoc Med Argent* 1965; 79: 230-8.
9. Ambrosio AM, Enría DA, Maiztegui JI. Junin virus isolation from lympho-mononuclear cells of patients with Argentine hemorrhagic fever. *Intervirology* 1986; 25: 97-102.
10. Maiztegui J, Feuillade M, Briggiler A. Progressive extension of the endemic area and changing incidence of Argentine hemorrhagic fever. *Med Microbiol Immunol* 1986;175: 149-52.
11. Feuillade MR. Rol de la vacuna Candid #1 en la prevención de la fiebre hemorrágica argentina en los niños. Tesis de Grado Maestría en Salud Pública. Universidad Nacional de Rosario. 2003. pp: 5-7.
12. Maiztegui JI, Fernandez N, Damilano A. Efficacy of immune plasma in treatment of Argentine haemorrhagic fever and association between treatment and late neurological syndrome. *Lancet* 1979; ii: 1216-7.
13. Damilano AJ, Fernández NJ, Ambrosio AM, Maiztegui JI. Persistencia de anticuerpos inmunofluorescentes en 80 casos de fiebre hemorrágica argentina. Reunión Conjunta de la Sociedad Argentina de Microbiología y de la Sociedad Argentina de Virología. 1980. Valle Hermoso, Córdoba, Argentina.
14. Damilano AJ, Levis SC, Ambrosio AM, Maiztegui JI. Comparison of three methods for the serologic diagnosis

- of Junin virus infections. IV International Conference on Comparative Virology, 1982, Banff, Alberta, Canada.
15. García Franco S, Ambrosio AM, Feuillade MR, Maiztegui JI. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of antibodies to Junin virus in human sera. *J Virol Methods* 1988; 19: 299-306.
  16. Riera LM, Feuillade MR, Saavedra MC, Ambrosio AM. Evaluation of an enzyme immunosorbent assay for the diagnosis of Argentine haemorrhagic fever. *Acta Virol* 1997; 41: 305-10.
  17. Argentine Hemorrhagic Fever Surveillance. WER World Health Organization 1982; 57 (29): 219-20.
  18. Weissenbacher MC, Sabattini MS, Avila MM, Sangiorgio PM, de De Sensi M, Contigiani, MS, *et al.* Junin virus activity in two rural populations of the Argentine hemorrhagic fever endemic area. *J Med Virol* 1983; 12 (4): 273-80.
  19. González PH, Cossio PM, Arana RM, Maiztegui JI, Laguens RP. Lymphatic tissue in Argentine hemorrhagic fever. *Arch Pathol Lab Med* 1980; 104: 250-4.
  20. Molinas FC, de Bracco MME, Maiztegui JI. Coagulation studies in Argentine hemorrhagic fever. *J Infect Dis* 1981; 143: 1-6.
  21. Molinas FC, Maiztegui JI. Factor VIII: C and factor VIII R: Ag in Argentine hemorrhagic fever. *Thromb Haemost* 1981; 46 (2): 525-7.
  22. Levis S, Saavedra MC, Ceccoli C, Falcoff E, Enria DA, de De Sensi MRF, *et al.* Endogenous interferon in Argentine hemorrhagic fever. *J Infect Dis* 1984; 149 (3): 428-33.
  23. Levis S, Saavedra MC, Ceccoli C, Feuillade MR, Enria DA, Maiztegui JI, Falcoff R. Correlation between endogenous interferon and the clinical evolution of patients with Argentine hemorrhagic fever. *J Interferon Res* 1985; 5: 383-9.
  24. Ferbus D, Saavedra MC, Levis S, Maiztegui J, Falcoff R. Relation of endogenous interferon and high levels of 2'-5' oligoadenylate synthetase in leukocytes from patients with Argentine hemorrhagic fever. *J Infect Dis* 1988; 157 (5): 1061-4.
  25. Vallejos DA, Ambrosio AM, Feuillade MR, Maiztegui JI. Lymphocyte subsets alteration in patients with Argentine hemorrhagic fever. *J Med Virol* 1989; 27 (89) 2: 160-3.
  26. Ambrosio M, Vallejos D, Saavedra C, Maiztegui JI. Junin virus replication in peripheral blood mononuclear cells of patients with Argentine hemorrhagic fever. *Acta Virol* 1990; 34: 58-63.
  27. Ambrosio AM, Gamboa GS, Feuillade MR, Briggiler AM, Rimoldi MT. Peripheral blood leukocytes of patients with Argentine hemorrhagic fever as effectors of antibody-dependent cell cytotoxicity. *J Med Virol* 1992; 37: 232-6.
  28. Heller MV, Saavedra MC, Falcoff R, Maiztegui JI, Molinas FC. Increased tumor necrosis factor levels in Argentine hemorrhagic fever. *J Infect Dis* 1992; 166 (5): 1203-4.
  29. Enria D, Briggiler A, Fernandez N, Levis S, Maiztegui J. Importance of dose of neutralising antibodies in treatment of Argentine haemorrhagic fever with immune plasma. *Lancet* 1984; ii: 255-6.
  30. Enria D, de Damilano AJ, Briggiler AM, Ambrosio AM, Fernández NJ, Feuillade MR, *et al.* Síndrome neurológico tardío en enfermos de Fiebre Hemorrágica Argentina tratados con plasma inmune. *Medicina (Buenos Aires)* 1985; 45 (6): 615-20.
  31. Enria D, García Franco S, Ambrosio A, Vallejos D, Levis S, Maiztegui J. Current status of the treatment of Argentine hemorrhagic fever. Symposium on Arenaviruses. Hamburgo, Alemania. *Med Microbiol Immunol* 1986; 175: 173-6.
  32. Saavedra MC, Briggiler AM, Enria DA, Riera LM, Ambrosio AM. Prevalencia de anticuerpos para el virus de la Hepatitis C en donantes de plasma para el tratamiento de la fiebre hemorrágica argentina. *Medicina (Buenos Aires)* 1997; 57: 287-93.
  33. Seminario Internacional sobre Fiebres Hemorrágicas Producidas por Arenavirus. Discusión General. *Medicina (Buenos Aires)* 1977; 32 (Supl. 3): 257-9.
  34. Pirotsky I, Martini P, Zuccarini J. Virosis hemorrágica del noroeste bonaerense (endemo-epidémica, febril, exantemática y leucopénica): V, la vacuna específica y la vacunación. *Orientación Médica* 1959; 8: 743-4.
  35. Barrera Oro JG, Girola RA, Frugone G. Estudios inmunológicos con virus Junin: II, inmunidad adquirida por cobayos inoculados con virus inactivado por formol. *Medicina (Buenos Aires)* 1967; 27: 279-82.
  36. Videla C, Carballal G, Remorini P, La Torre J. Formalin inactivated Junin virus: immunogenicity and protection assays. *J Med Virol* 1989; 29: 215-20.
  37. Parodi AS, de Guerrero LB, Weissenbacher M. Fiebre hemorrágica argentina: vacunación con virus Junin inactivado. *Ciencia e Investigación* 1965; 21: 132-3.
  38. D'Aiutolo AC, Lampuri JS, Coto CE. Reactivación del virus Junin inactivado por la luz ultravioleta. *Medicina (Buenos Aires)* 1979; 39: 801.
  39. Martínez Segovia ZM de, Arguelles G, Tokman A. Capacidad antigénica del virus Junin inactivado mediante oxidación fotodinámica. *Medicina (Buenos Aires)* 1980; 40: 156-60.
  40. Carballal G, Videla C, Oubiña JR, Frigerio MJ. Antígenos inactivados de virus Junin. *Medicina (Buenos Aires)* 1985; 45: 153-8.
  41. Cresta B, Padula P, de Martínez Segovia ZM. Biological properties of Junin virus proteins: I, identification of the immunogenic glycoprotein. *Intervirology* 1980; 13: 284-8.
  42. Lopez N, Scolaro L, Rossi C, Jacamo R, Candurra N, Pujol C, *et al.* Homologous and heterologous glycoproteins induce protection against Junin virus challenge in guinea pigs. *J Gen Virol* 2000; 81: 1273-81.
  43. Parodi AS, Coto CE. Inmunización de cobayos contra el virus Junin por inoculación del virus Tacaribe. *Medicina (Buenos Aires)* 1964; 24: 151-3.
  44. Tauraso N, Shelokov A. Protection against Junin virus

- by immunization with live Tacaribe virus. *Proc Soc Exp Biol Med* 1965; 119: 608-11.
45. Weissenbacher MC, Coto CE, Calello MA. Cross-protection between Tacaribe complex viruses: presence of neutralizing antibodies against Junin virus (Argentine hemorrhagic fever) in guinea pigs infected with Tacaribe virus. *Intervirology* 1975; 6: 42-9.
  46. Coto CE, Damonte EB, Calello MA, Weissenbacher MC. Protection of guinea pigs inoculated with Tacaribe virus against lethal doses of Junin virus. *J Infect Dis* 1980; 141: 389-93.
  47. Damonte EB, Calello MA, Coto CE, Weissenbacher MC. Inmunización de cobayos contra la fiebre hemorrágica argentina con virus Tacaribe replicado en células diploides humanas. *Medicina (Buenos Aires)* 1981; 41: 467-70.
  48. Weissenbacher MC, Coto CE, Calello MA, Rondinone SN, Damonte EB, Frigerio MJ. Cross-protection in non-human primates against Argentine hemorrhagic fever. *Infect Immunol* 1982; 35: 425-30.
  49. Damonte EB, Mersich SE, Candurra NA, Coto CE. Cross reactivity between Junin and Tacaribe viruses as determined by neutralization test and immunoprecipitation. *Med Microbiol Immunol* 1986; 175: 85-8.
  50. Samoilovich SR, Calello MA, Laguens RP, Weissenbacher MC. Long-term protection against Argentine hemorrhagic fever in Tacaribe virus infected marmosets: virologic and histologic findings. *J Med Virol* 1988; 24: 229-36.
  51. Guerrero LB de, Boxaca MC. Estudio preliminar de una variante atenuada del virus Junin derivada de la cepa prototipo XJ. *Medicina (Buenos Aires)* 1980; 40: 267-74.
  52. Boxaca MC, Guerrero LB de, Weber L, Malumbres E. Protección inducida en cobayo por la variante XJO del virus Junin. *Medicina (Buenos Aires)* 1981; 41: 25-34.
  53. Guerrero LB de, Boxaca MC, Rabinovich RD, Malumbres E. Evolución de la infección en cobayos infectados con la variante atenuada XJO del virus Junin. *Rev Argent Microbiol* 1983; 15: 205-12.
  54. Guerrero LB de, Boxaca MC, Malumbres E, Gomez MM. Pathogenesis of attenuated Junin virus in the guinea pig model. *J Med Virol* 1985; 15: 197-202.
  55. Guerrero LB de, Weissenbacher MC, Parodi AS. Inmunización contra la fiebre hemorrágica argentina con una cepa atenuada del virus Junin; I: estudio de una cepa modificada del virus Junin, inmunización de cobayos. *Medicina (Buenos Aires)* 1969; 29: 1-5.
  56. Rugiero HA, Astarloa L, Gonzalez Cambaceres C, Maglio F, Squassi G. Inmunización contra la fiebre hemorrágica argentina con una cepa atenuada de virus Junin: II, inmunización de voluntarios, análisis clínico y de laboratorio. *Medicina (Buenos Aires)* 1969; 29: 81-7.
  57. Weissenbacher M, Guerrero LB de, Help G, Parodi AS. Inmunización contra la fiebre hemorrágica argentina con una cepa atenuada de virus Junin. III. Reacciones serológicas en voluntarios. *Medicina (Buenos Aires)* 1969; 29: 88-92.
  58. Rugiero HA, Magnoni C, Cintora FA. Inmunización contra la fiebre hemorrágica argentina con una cepa atenuada de virus Junin: análisis de 636 vacunados. *Pren Med Argent* 1974; 61: 231-40.
  59. Rugiero HA, Magnoni C, Guerrero LB de, Milani HA, Izquierdo FP, Milani HL, *et al.* Persistence of antibodies and clinical evaluation in volunteers 7 to 9 years following the vaccination against Argentine hemorrhagic fever. *J Med Virol* 1981; 7: 227-32.
  60. Weissenbacher MC, Laguens RP, Coto CE. Argentine hemorrhagic fever. *Curr Top Microbiol Immunol* 1987; 134: 79-116.
  61. Barrera Oro JG, Eddy GA. Characteristics of candidate live attenuated Junin virus vaccine. International Conference on Comparative Virology. Banff, Alberta, Canada. 1982. Abstracts Book N° S 4-10.
  62. McKee KT Jr, Barrera Oro JG, Kuehne AI, Spisso JA, Mahlandt BG. Candid N° 1 Argentine hemorrhagic fever vaccine protects against lethal Junin virus challenge in Rhesus macaques. *Intervirology* 1992; 34: 154-63.
  63. Barrera Oro JG, McKee KT Jr. Hacia una vacuna contra la fiebre hemorrágica argentina. *Bol Of Sanit Panam* 1992; 112: 296-305.
  64. Albariño CG, Ghiringelli PD, Posik DM, Lozano ME, Ambrosio AM, Sanchez A, *et al.* Molecular characterization of attenuated Junin virus strains. *J Gen Virol* 1997; 78: 1605-10.
  65. Ghiringelli PD, Albariño CG, Piboul I, Romanowski V. The glycoprotein precursor gene of the attenuated Junin virus vaccine strain (Candid #1). *Am J Trop Med Hyg* 1997; 56 (2): 216-25.
  66. Guerrero LB. Vacunas experimentales contra la fiebre hemorrágica argentina. *Medicina (Buenos Aires)* 1977; 37: 252-9.
  67. Carballal G, Videla C, Oubiña JR, Frigerio MJ. Antígenos inactivados de virus Junin. *Medicina (Buenos Aires)* 1985; 45: 153-8.
  68. Wallen, KH. Demonstration of inapparent heterogeneity in a population of an animal virus by single-burst analysis. *Virology* 1963; 20: 230-4.
  69. McDonald C, McKee K, Peters C, Feinsod F, Cosgriff T, Barrera Oro J. Initial clinical assessment of humans inoculated with a live-attenuated Junin virus vaccine. VII International Congress of Virology, 1987, Banff, Alberta, Canada. Abstracts Book: R3.27.
  70. Maiztegui J, Feinsod F, Briggiler A, Peters C, Enria D, Lupton H, *et al.* Inoculación de los primeros voluntarios argentinos con la cepa atenuada Candid 1 de virus Junin. *Medicina (Buenos Aires)* 1987; 47(6):565.
  71. Maiztegui J, Levis S, Enria D, Feuillade M, Cavanagh P, Briggiler A, *et al.* Inocuidad e inmunogenicidad en seres humanos de la cepa Candid 1 de virus Junin. *Medicina (Buenos Aires)* 1988; 48 (6): 660.
  72. Maiztegui JI, McKee KT, Enria DA, Harrison LH, Gibbs PH, Feuillade MR, *et al.* and the AHF Study Group. Protective efficacy of a live attenuated vaccine against

- Argentine Hemorrhagic Fever. *J Infect Dis* 1998; 177 (2): 277-83.
73. Ambrosio AM, Neffen EL, Maiztegui JI. Ausencia de neurovirulencia y persistencia de Junin Candid 1 en cobayos lactantes. I Congreso Argentino de Virología. 1983. Buenos Aires. Argentina.
74. Ambrosio AM, Levis S, Maiztegui JI. Aislamiento de la cepa Candid 1 de virus Junin (vJ) de cobayos lactantes por cocultivo sobre células Vero. I Congreso Argentino de Virología. 1983. Buenos Aires. Argentina.
75. Enría D, Ambrosio A, Maiztegui JI. Inmunidad celular específica en convalescientes de Fiebre Hemorrágica Argentina (FHA) y en voluntarios inoculados con la cepa atenuada Candid 1 del virus Junin (vJ). *Medicina (Buenos Aires)* 1988; 48 (6): 659.
76. Levis S, Feuillade MR, Enría D, Ambrosio AM, Brigglier AM, McKee K, *et al.* Persistencia de la inmunidad humoral específica en receptores de la vacuna Candid #1 contra la Fiebre Hemorrágica Argentina. *Medicina (Buenos Aires)* 1993; 53 (supl 2): 131.
77. Saavedra M, Sottosanti J, Riera L, Ambrosio A. Estudio comparativo entre los niveles de interferón alfa endógeno en individuos vacunados con Candid #1 y en enfermos de Fiebre Hemorrágica Argentina. *Medicina (Buenos Aires)* 1996; 56, 5/2: 624.
78. Ambrosio A, Saavedra C, Sottosanti M, Riera L. Comparación de neutralización y ELISA en el estudio de la respuesta inmune de vacunados contra la Fiebre Hemorrágica Argentina (FHA). *Medicina (Buenos Aires)* 1998; 58 (5/2): 674.
79. Ambrosio A, Riera L, Saavedra M, Sottosanti M. Vacunados con Candid #1 contra la Fiebre Hemorrágica Argentina con niveles indetectables de anticuerpos neutralizantes específicos. VIII Congreso Argentino de Microbiología, 1998, Buenos Aires, Argentina.
80. Saavedra MC, Sottosanti JM, Riera L, Ambrosio AM. IgG subclasses in human immune response to wild and attenuated (vaccine) Junin virus infection. *J Med Virol* 2003; 69 (3): 447-50.
81. Ambrosio AM, Riera LM, Saavedra MC, Sottosanti MJ. Ensayo preclínico de la vacuna Candid #1 (fiebre hemorrágica argentina) producida en Argentina. *Medicina (Buenos Aires)* 2005; 65: 329-32.

Aceptado para su publicación el 24 de febrero de 2006