

205 68



**Universidad Nacional Autónoma de México**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA  
Y ZOOTECNIA**

**PRUEBAS COMPARATIVAS DEL EFECTO DE LA ADI-  
CION DE AE-DEXTRAN EN EL ESTABILIZADOR DE  
LIOFILIZACION SOBRE LA VIABILIDAD DE LA -  
VACUNA ANTIRRABICA CEPA V-319/ACATLAN.**

**T E S I S**

**Que para obtener el título de**

**MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**P R E S E N T A :**

**ROSARIO GARCIA BENITEZ**

*México, D. F.*

8238

1979



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## I N D I C E

RESUMEN

INTRODUCCION

MATERIAL Y METODOS

RESULTADOS

DICUSIONES

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFIA

**PRUEBAS COMPARATIVAS DEL EFECTO DE  
LA ADICION DE AE-DEXTRAN EN EL ESTABI-  
LIZADOR DE LIOFILIZACION SOBRE  
LA VIABILIDAD DE LA VACUNA ANTIRRA-  
BICA CEPA V-319/ACATLAN**

**EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN EL DEPARTAMENTO DE  
INVESTIGACION EN PRODUCCION DE VACUNAS, DEL INSTI-  
TUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES PECUARIAS, S.A.R.H.**

## -RESUMEN-

Se estudiaron 5 lotes de vacuna antirrábica, cepa V-319/Acañón y tres lotes de diluyentes diferentes, uno de ellos conteniendo DEAE-dextran, con el objeto de comparar el título de virus rábico liofilizado en presencia o ausencia de DEAE-dextran.

El DEAE-dextran funciona como adyuvante en la vacuna viva, de ahí la necesidad de incorporarlo al producto.

Las pruebas efectuadas para este objeto fueron la esterilidad de la vacuna, titulación en ratones lactantes, infección con diluyente + DEAE-dextran, y pruebas de pH en los diluyentes.

Los resultados de este estudio parecen indicar que el diluyente está dentro de la tolerancia del virus rábico, y que el DEAE dextran no tiene efecto negativo sobre el virus durante la liofilización, y que el diluyente con DEAE-dextran se mantiene estable en la esterilización.

Por lo tanto, se concluye que el DEAE-dextran puede incorporarse al diluyente o al liofilizado según sea conveniente al laboratorio productor.

## -INTRODUCCION-

La rabia paralítica bovina está ubicada en el área ecológica de los murciélagos hematófagos, principalmente del "Demodus rotundus" (24), la principal preocupación de este padecimiento son las pérdidas económicas que origina a la ganadería tropical, comprendida ésta, entre el paralelo 28' de latitud norte (sur de Sonora) y el paralelo 33' de latitud sur (norte de Argentina) entre los 40' y 115' meridianos de longitud oeste, en tierras bajas con máximo de 2,000 metros de altura sobre el nivel del mar (24).

La aparición de la rabia en América, fue reportada por primera vez en el siglo - - XVIII. A fines del siglo XIX la rabia en América fue confirmada como una enfermedad transmitida por una mordedura, al aislarse el virus rábico de la saliva de los animales enfermos (3).

Los primeros intentos para prevenir la rabia fueron llevados a cabo por Galtier, en 1880, quien inculcó por vía intravenosa saliva y masa encefálica de animales enfermos de rabia (17). Sin embargo, la primera vacuna efectiva, fue elaborada por Pasteur, quien utilizó tejido nervioso de conejo infectado, atenuando al virus por deshidratación (22). Desde entonces a la fecha, se han elaborado diferentes tipos de vacunas antirrábicas. Estas son de diferentes orígenes, obteniéndose y tratándose al virus con diversos métodos. Se distinguen principalmente dos tipos de vacunas. Las de virus vivo atenuado y las de virus inactivados por distintos procedimientos.

Aproximadamente en 1957, fue introducida a México, la llamada cepa Flury alto pasaje, por Camargo y Velásquez (11). En 1965 Boer Rivera y Mancisidor tuvieron conocimiento de la ineficacia de la cepa Flury para detener un brote de derriengue, encontrando que a los seis meses de haberse aplicado, no se observaban anticuerpos protectores, siendo necesaria la preparación y aplicación de una autovacuna, elaborada por Mancisidor (21).

En la actualidad las investigaciones de los métodos para el cultivo de tejidos han contribuido grandemente al progreso de la virología animal en general, así como, en la preparación de nuevas vacunas antirrábicas (1, 2, 18), ya que son productos antigénicos, inócuos y que generan protección, la que puede durar varios años con una sola aplicación (10). En el Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias en colaboración con la F.A.O., se obtuvo una vacuna a partir de virus rábico (V-319) aislado de un vampiro (6, 8, 9), la cual ha resultado muy eficaz, por que puede obtenerse altos títulos y es de fácil producción en grandes cantidades y confiere una inmunidad de más de tres años (16). La cepa V-319/Acatlán se obtuvo de un vampiro macho capturado en San Vicente, municipio de Acatlán Figueroa, Oaxaca.

La cepa fue adaptada a cultivos celulares, mediante cuatro pases en cultivos celulares de embrión de vampiro, posteriormente se le dieron nueve pases en células BHK-21, la cepa V-319 adquirió la capacidad de formar placas en suspensión de agarosa, por lo que se procedió a purificar el virus por clonación, seleccionando una caja de petri con una sola placa, esta clona V-319 cl 476 alcanzó entonces un título de  $10^9$  ufp (unidades formadoras de placas por ml) en tres pases más, estabilizándose en este título. Con esta cepa se preparó el lote de semilla maestra a partir del cual se -

prepararon los lotes de trabajo que se utilizan en la preparación a gran escala de la vacuna V-319/Acatlán (15).

Por otra parte el DEAE-dextran interactúa con muchos sistemas biológicos a muy bajas concentraciones. Esta acción se ejerce sobre las cargas negativas de la superficie celular, con los consecuentes efectos físicos en la célula.

Larsen (14, 20) demostró que un tratamiento in vitro de una línea de células tumorales con DEAE-dextran, inhiben el subsecuente desarrollo de estas células in vivo. Es sabido que el DEAE-dextran tiene un efecto inhibitorio en cultivos celulares in vitro como otros polícatones, pero para que tenga efecto citotóxico usualmente se requiere de altas concentraciones de DEAE-dextran.

Posiblemente el efecto más interesante del DEAE-dextran en la fisiología de la célula es en la estimulación en la penetración o captura dinámica de moléculas tanto en proteínas como ácido nucleicos. Ryser (23) mostró que la absorción de la albúmina por las células de sarcoma S-180 es estimulada por el DEAE-dextran y otros polícatones y este estímulo en la absorción, es más grande a medida que aumenta el peso molecular de los polícatones.

En estudios virales el DEAE-dextran, así como el dextran sulfato, tienen efecto estimulante y depresor respectivamente del crecimiento viral en cultivos celulares.

Fue observado que con la adición de DEAE-dextran en agar, las placas formadas por el virus de la encefalomielitís aumenta el tamaño de las placas, ya que el dextran contraresta el efecto inhibitorio de los polisacáridos sulfatados del agar. Por otra parte se observó que variantes del virus de pollo difieren en la capacidad de ser inhibidas por el

dextran sulfato. El rápido desarrollo en este cultivo fue examinado por Vaheri (25). Bengtson (5), encontró que el dextran sulfatado atenúa al virus de polio e interfiere en su adsorción inicial a las células susceptibles, pero no con las subsecuentes etapas del ciclo de infección.

Se ha efectuado una prueba en placa usando células formadoras de anticuerpos estimuladas con DEAE-dextran, para incrementar la formación de placas y un ensayo similar fue usado por Friedman (13) en estudios de distribución de anticuerpos en cultivos de cepas celulares de ratón.

Wittman (27), ha descrito el uso de DEAE-dextran como adyuvante de vacuna inactivada contra fiebre aftosa. Asimismo, observó que las reacciones locales eran menos severas que las producidas por el adyuvante de Freund en cuyos.

Para el diagnóstico de la rabia, Mancisidor (21) indica que el virus rábico obtenido de la saliva de bovino fue detectado más rápido en el cultivo de tejido que en ratones inoculados, cuando utilizaba DEAE-dextran al infectar las células.

El método de BHK, DEAE-dextran es económico y rápido para detectar virus rábico en muestras de saliva, que pueden ser usados para estudios ecológicos y patogénicos, así como el diagnóstico de rabia, antes de la muerte del animal sospechoso (diagnóstico intra vitam).

En 1974, Bijlenga y Bogard (7) demostraron las ventajas de agregar DEAE-dextran como adyuvante a la vacuna antirrábica de virus vivo desarrollado por Bijlenga y Hernández en el Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias (6).

La infección de rabia in vitro es marcadamente realizada con la adición de dietil-amino-etil-dextran (DEAE-dextran) y sulfato de protamina (19, 26).

La vacuna antirrábica de virus vivo V-319/Acatlán, fue producida industrialmente en el I.N.I.P. de 1972 a 1976.

Para obtener un alto título en la cosecha, también se emplea el DEAE-dextran en el medio de infección (15).

A partir de las observaciones de Bijlenga (7) sobre el poder adyuvante del DEAE-dextran para la vacuna V-319/Acatlán, se decidió incorporar regularmente este producto en el diluyente.

Al poco tiempo de incorporar este producto a la vacuna, los usuarios (Manríquez, comunicación personal) se quejaron de la inestabilidad del pH del diluyente, así como de su facilidad para contaminarse, por lo que el diluyente fue substituido por otro que se pudiera esterilizar, después de envasado, en autoclave. Debido a esta substitución, se eliminó el DEAE-dextran como adyuvante.

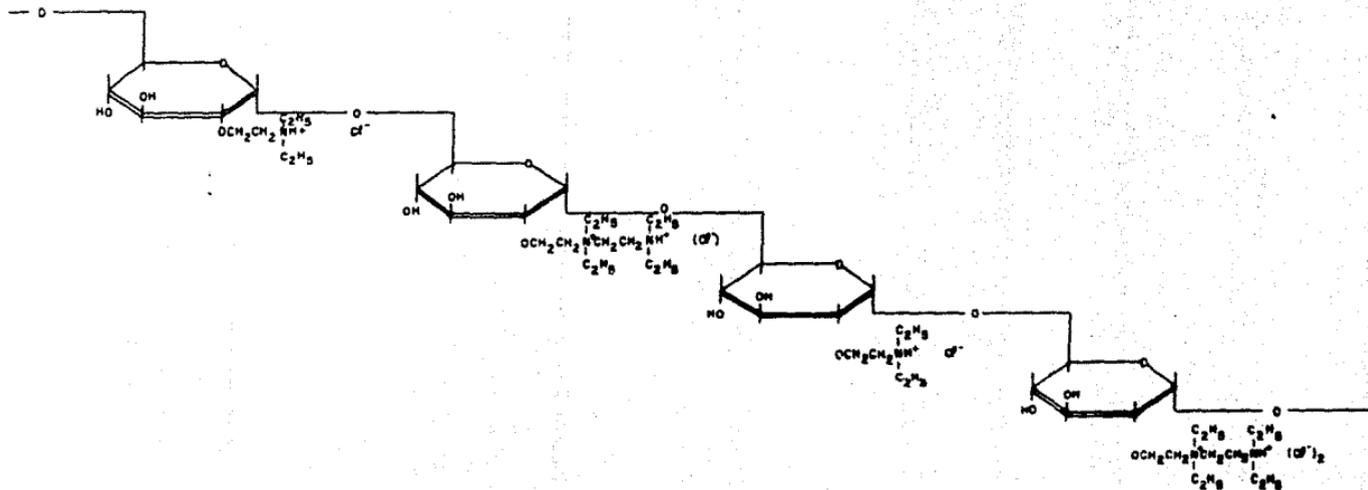
El presente estudio, basado en la comprobada utilidad del DEAE-dextran como adyuvante, tiene como objetivo el encontrar el mejor método de incorporar este producto a la vacuna, sin tener los inconvenientes arriba mencionados. Se intenta probar la estabilidad del DEAE-dextran a la esterilización en autoclave, así como, determinar el efecto del producto sobre la viabilidad del virus rábico cuando se agrega éste en el estabilizador para liofilización de la vacuna.

El DEAE-dextran es un dietilaminoeter policationico de dextran producido a partir de dextran con PM promedio de 500,000, y se surte como la solución de clorhidrato, el

contenido de nitrógeno es aproximadamente 5.2% y se expende como polvo secado - por spray.

Las soluciones acuosas de DEAE-dextran tienen buena estabilidad ante la hidrólisis - alcalina o ácida. Las soluciones pueden esterilizarse en autoclave a un pH bajo. Se deben evitar oxidantes fuertes (12).

# DEAE-DEXTRAN



- MATERIAL Y METODOS -

I.- MEDIOS DE CULTIVO

- a).- BHK-21(Gibco), fabricación especial de "Grand Island Biological Company", ajustándose a un pH de 7.1 utilizando HClO<sub>4</sub>.IN. posteriormente se esteriliza por filtración (filtros millipore 0.22 micras) envasándose en volúmenes de 500 o 1000 ml y conservándose a 4°C.
- b).- CALDO DE TRIPTOSA FOSFATADA (TPB) (Difco) se agrega 29.5 g. en 1,000 ml. de agua bidestilada estéril y deionizada.

La esterilización se efectúa en el autoclave a 15 libras de presión - - (121°C.) durante 15 minutos, envasándose en botellas de 100 ml. y se conserva a 4°C.

- c).- SOLUCION SALINA FOSFATADA (PBS).

Solución "A"

NaCl	8 g.
KCL	0.2 g.
KH <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.9 g.
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2 g.
H <sub>2</sub> O bidestilada	800 ml.

Solución "B"

CaCL	0.1 g.
MgCL <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O	0.1 g.
H <sub>2</sub> O bidestilada	200 ml.

Estas dos soluciones se esterilizan por separado en el autoclave a 10 libras de presión durante 10 minutos, se dejan enfriar a temperatura ambiente y se mezclan las dos soluciones conservándose después a 4°C.

d).- TRIPSINA 1:300 (Mann Research Laboratories Inc. New. York.) Un gramo de tripsina se disuelve en 100 ml. de PBS (c) la esterilización se realiza con filtros millipore a través de una membrana de 0.22 micras con presión positiva y se envasa en volúmenes de 5 ml. y se congela a menos 20°C. Antes de usarse se diluye 1:4.

e).- PENICILINA ESTREPTOMICINA (Squibb)

Penicilina G. Procaínica	1,000,000 U.I.
Sulfato de estreptomicina	1 g.
H <sub>2</sub> O bidestilada estéril	50 ml.

En un mililitro de esta mezcla tenemos 20,000 U.I. de penicilina y 20 mg de estreptomicina. Se envasa en volúmenes de 25 ml. y se congela a menos 20°C.

f).- DEAE-DEXTRAN a 0.5% (Pharmacia, Fine Chemicals) 0.5 g. y PBS libre de Ca y Mg (Sol. "A") (c) 100 ml.

Se agita durante 6 hs. a temperatura ambiente, se esteriliza con filtros millipore con una membrana de 0.22 micras por presión positiva, se envasan en volúmenes de 5 ml. y se conservan en refrigeración a menos 20°C.

g).- DILUYENTE "A" (antiguo)

Solución "A"

NaCl	160 g.
KCl	4 g.
NaHPO <sub>4</sub>	50 g.
H <sub>2</sub> O deionizada	16,000 ml.

Solución "B"

CaCl <sub>2</sub>	2 g.
MgCl <sub>2</sub>	2 g.
H <sub>2</sub> O deionizada	400 ml.

Se esterilizan en el autoclave las soluciones "A" y "B" por separado, se dejan enfriar a temperatura ambiente, se mezclan las dos soluciones asépticamente, posteriormente se le agrega rojo de fenol al 1%, 25 ml., hasta darnos un pH de 7.0.

Se le agrega DEAE-dextran al 1%, 200 ml., 2,000,000 de penicilina, 2 gramos de estreptomina y se agita perfectamente.

Nuevamente se vuelve a ajustar el pH a 7.4, posteriormente se envasa en frascos de color ámbar de 30 ml. aforándolos a 22 ml., se tapa y se retapa, por último se hacen pruebas de esterilidad en caldo nutritivo. (para 20 lts.).

h).- DILUYENTE "B" (ACTUAL)

NaCl	8.5 g.
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.54 g.
NaHPO <sub>4</sub>	12.6 g.
Rojo de fenol al 1%	1.5 ml.
H <sub>2</sub> O deionizada	1000 ml.

Se disuelve al Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, hasta que se encuentre completamente disuelto, posteriormente se disuelve el NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, se agrega el NaCl, también el rojo de fenol y se ajusta el pH a 7.0.

Se envasa en frascos ámbar de vidrio de 30 ml. aforándolos a 22 ml. y posteriormente se meten los frascos al autoclave a esterilizarse a 15 libras durante 15 minutos y por último se les hace prueba de esterilidad en caldo nutritivo.

i).- DILUYENTE "C" (con DEAE-dextran)

NaCl	8.5 g.
NaH <sub>2</sub>	1.54 g.
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	12.6 g.
Rojo de fenol al 1%	1.5 ml.
DEAE-dextran 1%	50 ml.
H <sub>2</sub> O deionizada	1000 ml.

Se van disolviendo todas las sustancias en el orden anotado anteriormente.

Posteriormente se envasan en frascos ambar de vidrio neutro de 30 ml. aforándolos a 22 ml. se meten los frascos al autoclave a esterilizarse a 15 libras de presión durante 15 minutos.

j).- CALDO NUTRITIVO (Bacto Nutrient Dehydrated) (Difco).

Caldo nutritivo	8 g.
H <sub>2</sub> O deionizada	1000 ml.

Se esteriliza en autoclave, 15 libras durante 15 minutos, se envasan en frascos ampollita de 3 ml. y se almacena a 4°C.

k).- ROJO NEUTRO (Merck)

Rojo neutro	1 g.
H <sub>2</sub> O bidestilada deionizada	1000 ml

Se esterilizan en el autoclave a 15 libras durante 15 minutos, se envasan en botellas de 250 ml. y se protege de la luz con papel estaño conservándose a 4°C.

l).- SUERO FETAL BOVINOS (Flow Laboratories).

Es obtenido en forma líquida y congelada; durante su uso es inactivado en baño maría a 50°C. durante 30 minutos, se deja enfriar a temperatura ambiente y después se conserva a 4°C.

m).- MEDIO DE CRECIMIENTO

Medio BHK-21	80%
Suero fetal bovino	10%
Caldo triptosa fosfatada	10%
Antibióticos:	
Penicilina	50 µm/ml
Estreptomicina	50 µm/ml

n).- MEDIO DE MANTENIMIENTO

Medio BHK-21	98%
Suero fetal bovino	2.0%
Antibióticos:	
Penicilina	50 $\mu\text{m}/\text{ml}$
Estreptomina	50 $\mu\text{m}/\text{ml}$

o).- MEDIO DE INFECCION

Medio BHK-21	88%
Suero fetal bovino	2%
DEAE-dextran 5%	2%
Antibióticos:	
Penicilina	50 $\mu\text{m}/\text{ml}$
Estreptomina	50 $\mu\text{m}/\text{ml}$

p).- ESTABILIZADOR PEPTONA SACAROSA (Difco)

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2.7 g.
Peptona	20 g.
Sacarosa	100.0 g.
$\text{H}_2\text{O}$ deionizada	1000 ml.

Se disuelven las sustancias en el orden anotado, se esteriliza por filtración (filtros millipore 0.22 micras) envasándose en volúmenes de 500 ml. y conservándose a 4°C.

q).- ESTABILIZADOR PEPTONA-SACAROSA CON DEAE-DEXTRAN (Pharmacia Fine Chemicals).

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2.7 g.
Peptona	20.0 g.
Sacarosa	100 g.
DEAE-dextran	4.0 g.
$\text{H}_2\text{O}$ deionizada	1000 ml

Se disuelven las substancias en el orden anotado, se esteriliza por filtración (filtros millipore 0.22 micras) envasándose en volúmenes de 500 ml. y conservándose a 4°C.

r).- MATERIAL BIOLÓGICO

Ratones blancos, cepa CD-1 lactantes.

Estos ratones fueron proporcionados por el Departamento del Bioterio del I.N.I.P.

II.- LINEAS CELULARES.

13S.- Esta línea celular es una clona de la línea BHK-21 obtenida en riñón, de hamster lactante y adquirida por el I.N.I.P. del Instituto Wistar de Filadelfia E.U.A.

III.- PREPARACION DE MONOSTRATOS.

Para la preparación de monostratos de células 13S, se saca el medio de crecimiento que contenía la botella, se deposita 5 ml de tripsina, que se pone en contacto con las células y se esperan unos minutos hasta que empiezan a desprenderse.

En seguida se les agregan 5 ml. de medio de mantenimiento, para neutralizar la tripsina y evitar se destruyan las células. Con una pipeta de 10 ml y una perilla de hule, se procede a desprender las células de la pared de la botella tomando líquido con la pipeta y después haciendo presión sobre el monoestrato.

Se cuentan las células con un hemocitómetro para saber la cantidad de células por mililitro que contiene.

Para las botellas de Roux se siembran 13 millones de células con 100 ml de medio de crecimiento, para las botellas de leche se utilizan 3 millones de células con 15 ml. de medio de crecimiento. Después de sembrar las botellas se incuban en una estufa a 37°C durante 72 hs.

#### IV.- PROCEDIMIENTO DE PRODUCCION DE LOS LOTES.

Se hicieron 5 lotes utilizando 8 botellas de roller chicas para cada una de ellas de acuerdo al siguiente procedimiento:

a).- Se sembraron células 13S, las cuales son una clona de la línea BHK-21 (riñón de Hamster lactante), la clona utilizada fue la número 7 preparada en el Departamento de Rabia Paralítica del I.N.I.P. (cabe aclarar que se puede utilizar otras clonas).

Estas células fueron incubadas a 37°C por un período de 5 días, después de las cuales se procedió a la inoculación.

b).- INOCULACION: Cada botella fue inoculada con 15 ml. de medio de infección (descrito anteriormente).

**PROCEDIMIENTO:** Se decanta el medio de crecimiento de las botellas, se le añade 15 ml. del medio infectante conteniendo  $10^{6.5}$  ufp/ml de virus del lote de trabajo, a cada botella y se incuban a 37°C y .12 RPM (revoluciones por minuto) durante 60 minutos.

Posteriormente se decanta el medio de infección y se le agrega el medio de mantenimiento, 200 ml. a cada botella; se vuelven a colocar en la estufa de cell-roll a 32°C y .12RPM. durante 5 días, al término de los cuales se realiza la cosecha.

c).- COSECHA.

Antes de realizar la cosecha se refrigeran a 4°C. las de 10°C. a 12°C. durante 6 horas.

Nota: el proceso de liofilización no se alteró con la adición del DEAE-dextran.

Una vez terminado el proceso de liofilización se engargolan los frascos y se almacenan en cámaras frías a 4°C, cada lote deberá reunir los siguientes datos en sus cajas de envase.

- a) No. de lote
- b) Fecha
- c) No. de charolas liofilizadas
- d) No. de frascos

VI.- PRUEBAS EFECTUADAS.

- a).- ESTERILIDAD DE LA VACUNA: para realizar las pruebas de esterilidad del producto, se reconstituye uno de los frascos con 1.5 ml. de diluyen-

te estéril y se procede a sembrar en 3 frascos de caldo nutritivo manteniéndose estos a 37°C durante 14 días. Con el sobrante de la ampollita se siembran 3 cajas de petri conteniendo sabouraud, agar, manteniéndose a 25°C durante 14 días.

b).- TITULACION EN RATONES: Se inoculan por vía intracerebral 6 lotes de 6 ratones lactantes, cada uno con 0.02 ml. de la vacuna en diluciones decimales de  $10^3$  a  $10^8$  y se obtiene el título del producto mediante el método de Reed and Muench (DL 50 1c RL).

c).- INFECCION CON DILUYENTE "C" (CON DEAE-DEXTRAN):

Por otro lado se preparó un lote dividido en 2, en el cual se utilizó como medio de infección suero y diluyente con DEAE-dextran y suero con diluyente sin DEAE-dextran. Este pequeño lote se hizo con botellas de leche y no se liofilizaron.

d).- PRUEBAS DE Ph EN LOS TRES DIFERENTES DILUYENTES:

Cada semana se hicieron pruebas de pH en 10 botellas (lotes A, B y C) midiéndose estos en un potenciómetro de Perkin-Elmer o Coleman.

## VII.- PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.

a).- Se hicieron 5 lotes de vacuna (78-1, 78-5, 78-6, 78-7, 78-8) los cuales cada lote se dividieron en dos partes:

- 1) Vacuna antirrábica cepa V-319/Acatlán + DEAE-dextrán.
- 2) Vacuna antirrábica cepa V-319/Acatlán sin DEAE-dextrán y éstos a su vez se dividieron en dos partes:

- 1) Liofilizada
- 2) Sin liofilizar

Todos estos lotes pasaron las pruebas ya antes mencionadas (control de calidad) y se titularon en ratones lactantes.

b).- Por otra parte, se hicieron tres lotes diferentes de diluyente para la vacuna.

Diluyente "A" (antiguo)

Diluyente "B" (nuevo)

Diluyente "C" (nuevo + DEAE-dextrán)

A cada lote se le hicieron pruebas de pH.

Cada semana, se tomaron 10 botellas de los tres lotes diferentes y se midió el pH de cada botella durante 10 semanas.

c).- PRUEBA FINAL

Una vez que se hicieron estas pruebas de pH durante 10 semanas, se hizo una prueba final que consistió en meter a incubar 50 frascos de cada lote de diluyente a 37°C.

Estos frascos se revisaron cada 24 hs. después de los 7 días se revisaron también todos los frascos chequeándose que no presentaran contaminación alguna.

Posteriormente de esas mismas botellas de los tres diferentes lotes, se sembraron en agar sangre, Sabouraud, agar suero tripticosa soya agar.

Se puso 1 ml. de diluyente en cada medio de cultivo y se procedió a incubarse a 37°C durante dos días.

- RESULTADOS -

Los resultados de las diversas titulaciones de cada lote se presentan en el cuadro número 1.

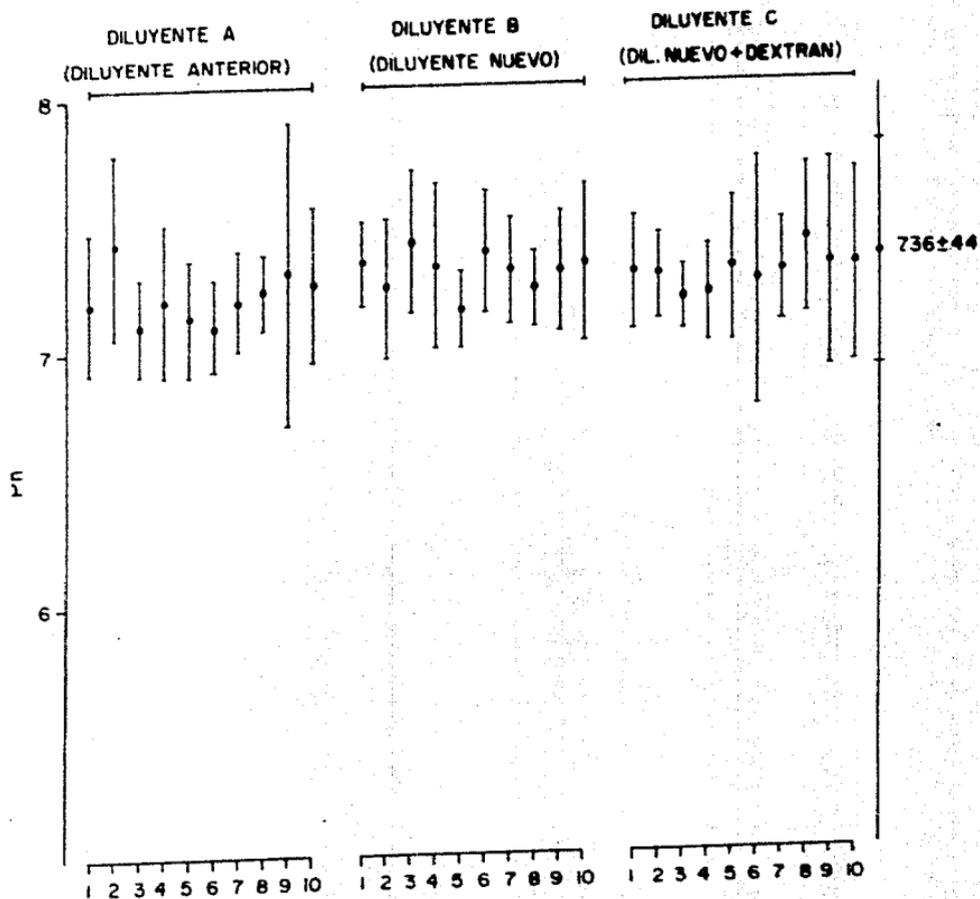
Los resultados de las pruebas efectuadas a cada diluyente se presentan en el cuadro número 2 y en la gráfica número 1.

La prueba de esterilidad con los diversos diluyentes estudiados indicó que no hubo contaminación en ningún diluyente, pero se observó que el 5% de las muestras incubadas mostró precipitación de sales minerales en todos los diluyentes estudiados.

El pequeño lote de vacuna que se produjo en botellas de dilución de leche, fue con la finalidad de determinar la actividad biológica del DEAE-dextran esterilizando en autoclave. El lote infectado con diluyente conteniendo DEAE-dextran arrojó un título de  $10^{7.7}$  y el que se infectó con diluyente sin DEAE-dextran dió un título de  $10^{6.9}$ .

La razón por la que los lotes de vacuna utilizados en este estudio no siguen un número progresivo del 1 al 5, es debido a que los lotes 2 al 4 se contaminaron durante el proceso de producción y se desecharon, incluyendo en el estudio solamente lotes de vacuna libre de contaminación.

GRAFICA 1



CUADRO 1

**RESULTADOS DE LA TITULACION DE CINCO LOTES DE VACUNA EN RATON LACTANTE  
CON Y SIN DEAE-DEXTRAN EN EL ESTABILIZADOR**

No. Lote	SIN DEAE DEXTRAN		CON DEAE-DEXTRAN	
	Antes de Liofilizar	Liofilizado	Antes de Liofilizar	Liofilizado
1	$10^{8.23}$	$10^{8.16}$	$10^{7.00}$	$10^{8.52}$
	$10^{8.8}$ (1)	$10^{7.9}$ (1)	$10^{8.32}$ (1)	$10^{7.50}$ (1)
5	$10^{6.8}$	$10^{7.0}$	$10^{8.1}$	$10^{8.0}$
	$10^{5.5}$	$10^{6.5}$	$10^{8.0}$	$10^{7.5}$
6	$10^{8.52}$	$10^{8.52}$	$10^{7.52}$	$10^{7.0}$
	$10^{7.7}$	$10^{8.0}$	$10^{8.0}$	$10^{7.40}$
7	NH	$10^{7.6}$	$10^{7.8}$	$10^{7.1}$
	NH	$10^{7.40}$	$10^{8.5}$	$10^{8.2}$
8	$10^{4.8}$	$10^{7.2}$	$10^{5.1}$	$10^{7.0}$
	$10^{3.1}$	$10^{8.3}$	$10^{3.0}$	$10^{8.0}$

(1) El dato anotado arriba corresponde al título del Departamento de Producción, el anotado abajo es titulación de constatación en todos los recuadros.

NH No se hizo

**CUADRO 2**

**RESULTADOS DE LA MEDICION DEL PH EN LOS 3 DILUYENTES EMPLEADOS DURANTE 10 SEMANAS DE LA PREPARACION DEL DILUYENTE**

Semanas Después de preparado	Diluyente A (Antiguo) PH	Diluyente B (Actual) PH	Diluyente C (Actual + Destron) PH
1a.	7.18 ± .28 <sup>(1)</sup>	7.34 ± .17 <sup>(1)</sup>	7.28 ± .22 <sup>(1)</sup>
2a.	7.42 ± .35	7.24 ± .27	7.27 ± .17
3a.	7.1 ± .18	7.42 ± .27	7.18 ± .13
4a.	7.2 ± .29	7.32 ± .33	7.2 ± .18
5a.	7.14 ± .23	7.16 ± .13	7.29 ± .29
6a.	7.11 ± .16	7.38 ± .24	7.24 ± .40
7a.	7.2 ± .18	7.3 ± .21	7.29 ± .28
8a.	7.24 ± .15	7.23 ± .15	7.41 ± .28
9a.	7.33 ± .60	7.3 ± .24	7.28 ± .43
10a.	7.28 ± .29	7.32 ± .33	7.38 ± .25

1.- PH Promedio de 10 muestras con desviación estándar.

## - DISCUSION -

Los resultados de la titulación de las diferentes muestras de cada lote, como se puede observar en el cuadro 1, presentan variaciones dentro del mismo lote en las distintas evaluaciones. Con algunas excepciones, la mayoría de los datos no muestran diferencias significativas entre las titulaciones comparativas efectuadas en laboratorios -- y por personas distintas. Puede notarse que el lote 1 antes de liofilizar sin DEAE-dextran, dió un título de  $10^{8.23}$  DL<sub>50</sub>/ml. en producción, en tanto que el título obtenido en el Departamento de Constación, fue de  $10^{6.0}$  DL<sub>50</sub>/ml. Aparte de este caso y -- otros anotados en el cuadro, la mayoría de las titulaciones no muestran diferencias significativas entre laboratorios.

Los títulos de las vacunas antes de liofilizar tienen un título promedio superior al de las vacunas liofilizadas, tanto cuando se agregó DEAE-dextran al estabilizador, como cuando el estabilizador no contenía este producto.

El promedio de baja de título, fue de .49 de logaritmo para los lotes sin DEAE-dex-- tran, y de .35 de logaritmo para los lotes con DEAE-dextran. Esta baja de título no es del todo sorprendente, ya que el proceso de liofilización siempre tiene este efecto. La diferencia en la caída de título en ambos tipos de lote de .49 y .35 no es significativa; es decir, el estabilizador con DEAE-dextran no es necesariamente superior al estabilizador que no lo contiene. La observación importante a este respecto estriba -- en que el DEAE-dextran agregando al estabilizador no causa una baja drástica del títu-- lo de virus viable, lo cual indica que por lo menos no tiene un efecto negativo sobre el virus durante la liofilización.

Existe una ligera tendencia en los lotes con DEAE-dextran a dar títulos más altos de virus que los mismos lotes sin este producto. El promedio de aumento de título por este concepto es de .55 de logaritmo.

Aún sin ser una gran diferencia, ésta es constante en todos los lotes probados. Esto se debe a que el DEAE-dextran, aumenta la capacidad del ratón para detectar al virus por el mismo efecto de captura dinámica, estimulada por el producto y que es notable tanto in vitro como in vivo, lo que quiere decir, que el mayor título observado no es indicación de que el título de virus aumente sino que se considera que aumenta la capacidad de detección del mismo.

Las pruebas efectuadas con los diferentes diluyentes indican que existen pequeñas variaciones en el pH atribuibles al tipo de vidrio de que están fabricadas las botellas. En todos los casos las variaciones de pH son iguales o inferiores a .49 unidades. Si se toma en cuenta que el pH inicial fue de 7.2, el rango de pH de 6.71 a 7.62 se encuentra ubicado dentro del margen de estabilidad del virus rábico que es de 3.5 a 9 (4).

Cabe hacer notar que las variaciones de pH en los estabilizadores, se manifiestan desde los primeros días de preparados y no se hacen mayores a medida que pasa el tiempo. Los tres diluyentes se mantuvieron estériles durante el experimento y sólo se observó precipitación de algunos frascos cuando se efectuó la prueba de esterilidad incubándolas a 37°C. durante una semana. Esto indica, que si bien hay que admitir que la preparación del diluyente A (antiguo) tiene más riesgo de contaminación en su preparación, si se hace con cuidado, puede obtenerse tan estéril como los que se esterilizan en autoclave después de envasados.

En ninguno de los diluyentes empleados se encontró confirmación a las protestas de los usuarios de la vacuna respecto a la inestabilidad del pH del diluyente, no sobre su alto riesgo de contaminación, lo que hace pensar en que la vacuna se ha manejado mal en el campo. El hecho de que el diluyente se precipite como consecuencia tanto por la incubación a 37°C, como, según experiencias previas, varfe su pH y su estabilidad al congelarse, indican que el manejo óptimo del diluyente es en refrigeración entre 2 y 6°C.

La prueba de actividad del DEAE-dextran efectuada en el diluyente después de esterilizado ( $10^{6.9}$  cuando se infectó con diluyente actual y  $10^{7.7}$  cuando se infectó con diluyente con DEAE-dextran) indica que el producto sigue mostrando la actividad biológica de adyuvante, que fue la razón de agregarlo a la vacuna.

La ausencia de efecto negativo del DEAE-dextran durante el proceso de liofilización, así como, la estabilidad de este producto a la esterilización en autoclave plantean la posibilidad de agregarlo a la vacuna, ya sea en el estabilizador de la vacuna o bien en el diluyente de la misma. Independientemente del sitio de adición que se elija, la vacuna puede seguir siendo complementada por este adyuvante que tan buenos resultados ha dado.

**-CONCLUSIONES-**

- 1.- No hubo diferencia significativa de los lotes en los dos laboratorios, solo se encontró .5 log. más alto título antes de liofilizar la vacuna, que se pierde en la liofilización.
- 2.- El DEAE-dextran no tiene efecto negativo sobre el virus durante la liofilización. El título superior con DEAE-dextran mejora la capacidad de detección de virus en ratones.
- 3.- En el diluyente hay variaciones de pH mayores en el antiguo con respecto al nuevo. Aún así, están dentro del rango de tolerancia del virus rábico.
- 4.- No hubo contaminación en ninguno de los diluyentes, pero en el "B" (antiguo) hay riesgo de contaminación en su preparación.
- 5.- En la prueba de incubación se precipitó el diluyente, es conveniente mantener lo refrigerado junto con la vacuna y no se debe congelar tampoco.
- 6.- La prueba de actividad biológica del DEAE-dextran estéril en autoclave indica que el producto es todavía activo.
- 7.- Se puede agregar el DEAE-dextran tanto en el estabilizador para liofilización como en el diluyente nuevo.

-BIBLIOGRAFIA-

- 1.- Ableset, M.K. "An attenuated rabies vaccine for domestic animals produced in tissue culture", Canad. Vet. J. 5: 279-280 (1964).
- 2.- Ableset, M.K. "Propagation of rabies virus in pig kidney cell culture", Can. Vet. J. 5: 4-7 (1964).
- 3.- Acha, Pedro: "Epizootiología de la rabia bovina paralizante transmitida por los quirópteros", Bull. Of. Sanit. Panamericana, p.p. 411-430 (1968).
- 4.- Baer, M. Georges "The natural history of rabies" Vol. II, Academic Press (1975).
- 5.- Bengtsson, S.: "Mechanism of dextran sulphate inhibition of attenuated polio virus", Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 118: 47-53 (1965).
- 6.- Bijlenga, G., Hernández, B., Mar, R.: "Vacunación experimental en ganado con una cepa de rabia origen murciélagos vampiro, elaborada en cultivos celulares", VIII Reunión Anual INIP (S.A.G.), México, p.p. 26-29 (1971).
- 7.- Bijlenga, G. and Van Den Bogard, A.E.J.M.: "In vivo enhancement of rabies infection by diethyl aminoethyl-dextran", Arch. Ges. Virusforsch. 42: 96-101 (1973).
- 8.- Bijlenga, G. y Hernández, E.: "Adaptation, attenuation and plaque purification of a rabies isolate (V-319 from a vampire bat (*Desmodus rotundus*)", Amer. J. Vet. Research in the press. (1979).

- 9.- Billega, G. y Hernández, E.: "Testing of vaccine potential of the plaque purified rabies virus strain V-319, Derived from vampire bat (*Desmodus rotundus*) in México. "Amer. J. Vet. Research in the press (1979).
- 10.- Boletín epizootiológico sobre rabia parálitica (PIRP-INIP) (SAG) Vol. 1, No. 2, segundo trimestre (1975).
- 11.- Camargo, N.F., Velázquez, A.: "Desarrollo y producción en México de la vacuna avianizada para el control del derriengue". Bol. of Sanit. Panam. 43:, 251-259 (1957).
- 12.- "Dextran fractions; dextran sulphate, DEAE-dextran: Defined polymers for biological Research". Pharmacia, Chemicals, Eds. printed in sweden by upplands Grafiska AB. p.p. 13-17 (1973).
- 13.- Friedman, H.: "Distribution of antibody plaque forming cells in various tissues of several strains of mice injected with sheep erythrocytes. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 117: 526-530 (1964).
- 14.- Gubensek, F. Lapanje, S.: "Activity coefficients of counterions in solutions of diethylaminoethyl dextran hydrochloride". Biopolymers, 5: 351-358 (1967).
- 15.- Hernández, B. E.: "Boletín sobre rabia parálitica", (PIRP-INIP) (SAG), (1976).
- 16.- Hernández, E., Campos, J. M., Sagardía, J., Pérez, H., González, D., - Fernández, M., Sánchez, A. y Ramsden, R.: "Resúmenes de la XIII Reunión Anual INIP, México, D.F. (1976).

- 17.- Hutyra, Marek y Manninger: "Patología y terapéutica especial de los animales domésticos. "Tomo I, 2a. Ed. Labor, S.A., México, D.F., (1968).
- 18.- Kisling, R.E.: "Antirabies vaccine of tissue culture origin." J. Immunol. 91: 352-357 (1963).
- 19.- Kaplan, M. M., T.J. Wiktor, R. F. Maes, J. B. Cambell, and H. Koprowsky: "Effect of polyions on the infectivity of rabies virus in tissue culture". Construction of a single-cycle growth curve. J. Virol., 1: 145-151 (1967).
- 20.- Larsen, B., Thorling, E.B.: "Inhibitory effect of DEAE-dextran on tumour growth action of dextran sulphate after" in vitro" incubation", Acta Pathol. Microbiol. Scand., 75: 229-236 (1969).
- 21.- Mancisidor, A. A.: "El uso de una vacuna antígena en el control de un brote de derriengue en México". Téc. Pac. Méx. 5: 27-29 (1965).
- 22.- Quiroga, S., Acosta, J. Rotlgardt, A., Masselm, Scasco, R.: "Observaciones y estudios experimentales del mal de cadera de la vacuna del norte de la provincia de corrientes su identidad con la rabia". Rev. Med. Vet. 13: 5-7 - (1931).
- 23.- Ryser, H. J. P.: "A membrane effect of basic polymers dependent on molecular size. Nature., 215: 934-936 (1967).
- 24.- Saiz, Moreno L.: "Las zoonosis", Biblioteca Vet. Aedos p.p. 109-122 (1976).

- 25.- Vehari, A.: "Heparin and related polyanionic substances as virus inhibitors".  
Acta Pathol Microbiol. S. Cand, Suppl., 171-173 (1964).
- 26.- Wiktor, T. J.: "Kinetics of rabies virus growth in tissue culture (Proc. National Rabies Symposium, Atlanta, Georgia, U.S.A. 1966), 9-14 Washington, D.C.: Government Printing Office, U.S. Department of Health, Education and Welfare, Public Health Service (1966).
- 27.- Wittman, G.: "The use of diethylaminoethyl-dextran (DEAE-D) as adjuvant for immunization of guinea pigs with inactivated food-and-mouth disease (FMD) virus (Article in German). "Z. Bakt. Parasit. In fiktionskr. Hiji Abt. I. Orig. 213: 1-8 (1970).