

Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



EVALUACION DE LA PRODUCCION DE VACUNA
ANTIRRABICA V-319/ACATLAN PRODUCIDA EN
CULTIVO CELULAR DE PASE BAJO Y CULTIVO
CELULAR EN PASE ALTO, EMPLEANDO LA
LINEA 13ScI-7

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

BIBLIOTECA - UNAM

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A:

JUAN RENTERIA FLORES

Asesor: M.V.Z.; M.S.; Ph.D. Eliseo Hernández Baumgarten





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.

JUN
1983
R435
ej.a
P-t-83-37a

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero reconocimiento de gratitud, a las personas que hicieron posible la realización de este trabajo: Al Dr. Esteban Labrandero Iñigo, por sus valiosas ideas; al Dr. Eliseo Hernández por su asesoramiento. A los Directores de mi actividad dentro del Departamento de Investigación en Producción: Los Doctores María Roldán C. de Gorrón y Justo Martínez Caballero, y a todos mis compañeros de trabajo.

A MI ESPOSA:

Gloria, quien con su amor
y comprensión, me impulsa
siempre a seguir adelante.

A MI HIJO:

Adrián, cuya sonrisa
llena de alegría mis
días.

A MI MADRE:

Que me ha apoyado y
me ha brindado siem
pre su cariño since
ro.

A MIS HERMANOS:

Bertha
Félix
Bernardo
Enrique

A MI JURADO:

M.V.Z. Javier García de la Peña

M.V.Z. Reyna Sánchez San Martín

M.V.Z. Santiago Aja Guardiola

M.V.Z. Ernesto Mendoza Gómez

M.V.Z. Jesús Valdéz Miranda

A MIS AMIGOS

"EVALUACION DE LA PRODUCCION DE VACUNA ANTIRRABICA
V-319/ACATLAN PRODUCIDA EN CULTIVO CELULAR DE PASE
BAJO Y CULTIVO CELULAR EN PASE ALTO, EMPLEANDO LA
LINEA 13Sc1-7"

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN EL DEPARTAMENTO
DE INVESTIGACION EN PRODUCCION DE BIOLOGICOS VETE-
RINARIOS DEL INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES
PECUARIAS, S.A.R.H.

C O N T E N I D O

RESUMEN - - - - -	
INTRODUCCION - - - - -	1
OBJETIVO - - - - -	6
MATERIAL - - - - -	7
METODOS - - - - -	17
RESULTADOS - - - - -	23
DISCUSION - - - - -	33
CONCLUSION - - - - -	35
BIBLIOGRAFIA - - - - -	36



RESUMEN

Se produjeron diez lotes de ~~vacuna~~ ^{VETERINARIA} antirrábica cepa V-319/Acatlán; empleando en cinco de ellos, cultivos celulares de la línea 13Sc1-7 en pases bajos, 8, 9, 10, 11 y 12. Y en los otros cinco, cultivos de la misma línea celular en pases altos 85, 86, 87, 88 y 89. Se titularon los 10 lotes de vacuna, comparando los títulos obtenidos en los lotes producidos en pases bajos con los títulos de la vacuna producida en pases altos. Se hicieron determinaciones de cariotipo, al igual que frotis teñidos con Giemsa de los cultivos celulares de pase alto y bajo. Se observó también el comportamiento de crecimiento de las células de pase alto en botellas de roller mediante el microscopio invertido a 30 aumentos.

Se obtuvo como resultado que en ninguno de los parámetros establecidos se encontraron variaciones que nos condujeran a eliminar los cultivos celulares destinados a la producción de vacuna -- después del pase 30. (La producción normal de vacuna antirrábica empleando la línea celular 13SC1-7, se realiza en cultivos celulares de pases bajos, considerando como tales a los que van desde el pase 6 al 30).

Se considera que la vacuna cepa V-319/Acatlán antirrábica, -- puede elaborarse hasta el pase 89 de la línea celular 13Sc1-7.

INTRODUCCION

La rabia es una enfermedad ampliamente distribuida en el mundo; son muy pocos los países que se encuentran libres de ella. Se presenta en cualquier clima. En 1971, se mencionó que no existía la rabia en Inglaterra, Australia, Nueva Zelanda, así como en muchas áreas delimitadas e islas (4).

La rabia es una enfermedad infecciosa, aguda del sistema nervioso central, cuyo agente causal es un virus que afecta en mayor o menos grado a los animales de sangre caliente incluyendo al hombre (11, 13), ésta es casi siempre mortal, pues se han reportado casos de rabia abortiva o latente, así como formas crónicas (13). Y cuya vía de transmisión en la mayoría de los casos se debe a la mordedura de un animal rabioso (13, 16). Experimentalmente se ha demostrado la transmisión por aerosoles, vía oral y se reportó un caso de transmisión en forma accidental, de humano a humano al efectuar un transplante de córnea de una persona que había muerto de una enfermedad de tipo nervioso (posteriormente se diagnosticó como rabia) a una persona susceptible (4).

El agente etiológico de la rabia es un virus del género lyssa virus, de la familia Rhabdoviridae (7), mide aproximadamente 80 X 180 nm (nanómetros), tiene forma de bala y está constituido por un ácido nucléico (RNA) de filamento único encerrado en una nucleocápside interna, que muestra simetría helicoidal. La superficie está cubierta por peplómeros que miden de 6-8 nm (nanómetros) de largo (12, 18).

En América la rabia paralítica de los bovinos transmitida por murciélagos hematófagos se inició como un serio problema a partir de la conquista de las culturas aborígenes del continente y con la introducción subsecuente al nuevo mundo de las especies ganaderas, en especial la bovina y la equina; el hombre de este modo proporcionó al murciélago hematófago una fuente alimenticia mucho más abundante y de fácil obtención, alterando de este modo su ecología e incrementando el número de vampiros, mismo que antes de la conquista se hallaba limitado, debido a que su alimento (sangre) lo obtenía en forma más difícil de la fauna silvestre (9, 20).

Actualmente el derriengue o rabia paralítica bovina causa en México pérdidas por varios millones de pesos anualmente (24); extendiéndose esta situación a toda latinoamérica (17), debido a la presencia del vector, el murciélago hematófago Desmodus rotundus - en esta zona (25). En México el vampiro habita la zona tropical y subtropical (3, 8).

La rabia en las zonas urbanas es principalmente la rabia transmitida por perros, aún cuando otras especies domésticas, como el gato, pueden estar involucradas. Este tipo de rabia representa un serio problema de salud pública (11).

Como medidas tendientes a combatir la enfermedad después de demostrar la ineficacia de las vacunas comerciales (5) y de la vacuna cepa Flury (1) por Arellano et al; en 1968 se desarrolló el programa denominado "Proyecto de investigaciones sobre la rabia paralítica" (FAO-INIP) y es presentada a principios de 1972 por Bij-

lenga y Hernández, la vacuna antirrábica de origen de murciélago - vampiro, cepa V-319/Acatlán, la cual se obtuvo de un vampiro macho capturado en San Vicente, Municipio de Acatlán Figueroa, Oaxaca. De este vampiro se preparó una suspensión al 20% de cerebro infectado y se procedió a infectar monoestratos de cultivos celulares - de vampiro. Después de cuatro pases en estas células embrionarias se obtuvo un título máximo de $10^{2.6}$ D.L. 50 para ratón lactante.

Dado que estos títulos eran muy bajos y debido al hecho de -- que el virus de la rabia producía títulos más altos en la línea -- BHK-21, se cultivó la cepa V-319/Acatlán en esta línea celular. Después de nueve pases, la cepa adquirió la capacidad de formar -- placas en suspensión de agarosa. Por lo que se procedió a purifi- car el virus por clonación, seleccionando una caja de petri que -- contenía una sola placa.

Esta clona V-319/c1-476, alcanzó entonces un título de $10^{9.0}$ UFP/ml en tres pases más, estabilizándose en este título.

Con esta cepa se preparó el lote de semilla maestra a partir del cual se prepara anualmente un lote de semilla de trabajo, para la preparación comercial de la vacuna antirrábica V-319/Acatlán. Se condujeron las pruebas de control de calidad requeridas para es- te tipo de biológico (2, 3, 16); demostrando en todas ellas ser un producto adecuado para la protección de los bovinos contra el de-- rriengue.

En otros estudios fue demostrada la eficacia de esta vacuna - contra la rabia canina y en 1976 se determinó su inocuidad en ca--

chorros, así como la edad mínima de vacunación, que es de dos meses de edad, sin que influya en la respuesta a la vacunación que la madre del cachorro haya sido o no vacunada (10). En otro estudio -- (9) es comprobada la antigenicidad e inocuidad de la misma vacuna; y es en este mismo año (1977) cuando se concluye que la vacuna V-319/Acatlán es adecuada para conferir protección antirrábica a los perros durante un año (21).

Actualmente, este biológico es producido en gran escala por la Productora Nacional de Biológicos Veterinarios (Pronabive), siguiendo el protocolo de producción de la vacuna V-319/Acatlán, registrada y aceptada ante el Departamento de Control de Productos Biológicos, Farmacéuticos y Alimenticios para animales de la Dirección General de Sanidad Animal.

Se ha recomendado que para mantener un buen título de virus en la producción de vacuna, no se empleen cultivos celulares superiores al pase 20 a partir de una ampollita stock de células maestras (MCS*), lo que significa que hay que eliminar los cultivos celulares, destinados a replicar virus rábico para producción de vacuna después de veinte pases (23). Ante esta situación surgen las siguientes interrogantes:

- a).- ¿La línea celular 13Sc1-7, ya no es apta para continuar replicando virus rábico para producir vacuna después -- del pase veinte?
- b).- ¿Hasta qué número de pases la línea 13Sc1-7 destinada a producir vacuna puede mantener estable su número cromosómico o cambiar sus propiedades oncogénicas?

c).- ¿Qué tanto variará el título de la vacuna con respecto al título que se obtiene en cultivos celulares en pases bajos?

Se ha decidido investigar si es posible continuar con la producción de vacuna antirrábica cepa V-319/Acatlán, después del pase veinte y posiblemente extender el número de pases celulares útiles para continuar la producción de la vacuna.

HIPOTESIS

La línea celular 13S es estable a lo largo de por lo menos 50 pases tanto en su cariotipo como en su capacidad de producción de virus rábico.

OBJETIVO

Determinar si es posible extender el número de pases celulares para continuar utilizando la línea 13Sc1-7, después del pase veinte, en la producción de la vacuna antirrábica cepa V-319/Acatlán.

MATERIAL

MATERIAL BIOLÓGICO (Empleado en la producción de vacunas).

- 1.- Línea celular 13Sc1-7 en pase bajo, 6 y en pase alto, 87. Esta línea es derivada (clona) de la línea celular BHK-21, la cual a su vez procede de riñón de hamster lactante (Mc Pherson and Stoker, 1962).
- 2.- Virus rábico liofilizado cepa V-319/Acatlán, perteneciente al lote de trabajo 75-16 con un título de $10^{8.398}$ UFP/ml.* (14).
- 3.- Suero de ternera, obtenido del rastro de Tlalnepantla. Procesado y envasado en el Departamento de Investigación en Producción de Biológicos del INIP. Este suero se almacena a -20 C y al momento de emplearlo se inactiva en baño maría a 57 C durante 30 minutos.
- 4.- Ratones blancos cepa CD-1, lactantes de 0 a 2 días de edad, éstos fueron proporcionados por el Bioterio del INIP-SARH. Empleados para calcular el título de los lotes de vacuna, por el método de Reed y Muench.

MATERIAL QUÍMICO (Empleado en la producción de vacuna).

- 1.- Medio BHK-21 (Gibco).

medio BHK-21	12.57 g
NaHCO ₃ (bicarbonato de sodio) ...	2.75 g
H ₂ O deionizada.....	1000 ml

* Unidades formadoras de placas.

Se disuelve por separado el NaHCO_3 en 100 ml de agua cuando el BHK-21 está ya disuelto se le agregan los 100 ml. Se ajusta el pH a 6.9-7.1. Esterilizar con filtro Millipore con una membrana de 0.22 micras. Envasar en volúmenes de 500 ml. Hacer prueba de esterilidad a 37C durante 24 horas y guardar a 4 C.

2.- Caldo de Triptosa Fosfatada (TPB) (Difco).

Caldo de triptosa fosfatada..... 29.5 g
 H_2O deionizada..... 1000 ml

Envasar en volúmenes de 500 ml esterilizar en autoclave a 15 libras de presión de vapor durante 15 minutos. Hacer prueba de esterilidad a 37 C durante 24 horas. Se almacena a 4 C.

3.- Estabilizador Peptona-Sacarosa (Difco).

KH_2PO_4 (fosfato de potasio)..... 2.7 g
Peptona..... 20.0 g
Sacarosa.....100.0 g
 H_2O deionizada.....1000 ml

Esterilizar por filtración en sistema Millipore con una membrana de 0.22 micras. Hacer pruebas de esterilidad sembrando en caldo nutritivo e incubando a 37 C durante 24 horas almacenar a 4°C.

4.- Tripsina 1:250 (Difco) al 0.25%.

Tripsina..... 0.25 g
 PBS (libre de calcio y magnesio)..... 100 ml

Se disuelve con un agitador magnético durante 1-2 horas en la cámara frfa. Se esteriliza por filtro Millipore - con membrana de 0.22 micras. Se envasa en volúmenes de 3 ml y se almacena a -20 C (caduca al año, pues se inactiva).

5.- Solución de Antibióticos Penicilina-Estreptomocina - - - (SQUIBB).

Penicilina G Potásica..... 20 000 000 UI
 Estreptomocina base 20 g
 H₂O deionizada..... 1000 ml

Se agita durante 30 minutos. Se filtra por sistema Millipore (0.22 micras) se envasa en frasco de 5 ml hacer prueba de esterilidad sembrando en caldo nutritivo incubando a 37C durante 24 horas. Se almacena a -20 C. Concentración final:

Penicilina 20 000 UI/ml. Estreptomocina base 20 mg/ml.

6.- Solución Buffer Fosfatada (PBS) Ph 7.1 libre de Ca⁺⁺ y - Mg⁺⁺.

NaCl (cloruro de sodio)..... 8 g
 KCl (cloruro de potasio).....0.2 g
 K₂HPO₄ (fosfato de potasio).....0.2 g

Na_2HOP_4 12 H_2O (fosfato disódico dodecahidratado). 2.89 g
 H_2O deionizada..... 1000 ml

Se envasa en volúmenes de 500 ml y se esteriliza en auto
clave a 15 libras durante 15 minutos. Se almacena en re
frigeración.

7.- Hidróxido de sodio 1/normal.

NaOH (Hidróxido de sodio)..... 40 g
 H_2O deionizada c.b.p.1000 ml

Se envasa en volúmenes de 5 ml empleando en los frascos
tapones de silicón. Se esteriliza en autoclave a 15 li-
bras durante 15 minutos. Se almacena a 4 C previamente
etiquetado.

8.- Acido Clorhídrico al 1/normal.

HCL (Acido clorhídrico al 40%)..... 36.46 ml
 H_2O deionizada c.b.p..... 1000 ml

Se envasa en volúmenes de 5 ml se esteriliza en autocla-
ve a 15 libras durante 15 minutos. Se etiqueta y se al-
macena a 4 C.

9.- Solución Salina Fisiológica.

NaCl (cloruro de sodio)..... 0.85 g
 H_2O deionizada..... 100 ml

Se esteriliza en autoclave a 15 libras durante 15 minutos se
envasa según necesidades.



10.- Caldo nutritivo Bacto Nutrient Dehydrated (Difco)

Caldo nutritivo 8 g

H₂O destilada c.b.p.1000 ml

Se envasa en volúmenes de 3 ml se esteriliza en autoclave a 15 libras durante 15 minutos pH Óptimo 6.8 se almacena a 4 C.

11.- Diluyente de la Vacuna

NaCl (cloruro de sodio)..... 8.5 g

Na H₂PO₄ (fosfato de sodio monobásico). 1.54 g

Na₂HPO₄ (fosfato de sodio dibásico)....12.6 g

Rojo de fenol al 1%..... 1.5 ml

H₂O deionizada..... 1000 ml

Se disuelven las sustancias en el orden indicado. Se ajusta el pH a 7.0. Se envasa en frascos ambar de 30 ml aforando a 20 ml. Se esterilizan en autoclave a 15 libras de presión de vapor durante 15 minutos. Se hace prueba de esterilidad en caldo nutritivo incubando a 37 C durante 24 horas. Se almacena a temperatura ambiente.

12.- Medios para cultivo bacteriológico: (bacterinas Aeróbicas).

Agar Papa

Agar Sangre

Tripticasa Soya Agar (TSA)

Estafilococos 110

Medio para cultivo bacteriológico (bacterias anaeróbicas)

Caldo Tioglicolato

Medio para cultivo de hongos

Medio Sabouraud

Después de la preparación de todos estos medios (siguiendo las instrucciones del laboratorio productor) se esterilizan en autoclave a 15 libras de presión de vapor durante 15 minutos. Se conservan en la cámara fría a 4 C.

Este método de conservación evita la desecación de los medios.

13.- Medios de cultivo celular empleados en la preparación de los lotes de vacuna antirrábica.

a).- Medio de Crecimiento:

Medio BHK-21 (Preparado en solución)... 80%

Medio TPB (Preparado en solución)..... 10%

Suero de Ternera (Inactivado)..... 10%

Antibióticos; Penicilina-Estreptomicina 2.5 ml --
por cada 100 ml de medio de crecimiento.

b).- Medio de Infección:

Medio BHK-21 (preparado en solución).. 96.5%

Suero de Ternera (Inactivado)..... 2.0%

DEAE-Dextrán al 0.5% (en solución).... 1.5%

Virus rábico (liofilizado del lote de Trabajo 1 -
fco. con 1.5 ml de volumen, una vez reconstituido.

Todo lo anterior debe dar un volumen final de - -
300 ml, además este medio deberá manejarse en re-
frigeración a 4 C. Esto puede logarse metiendo -
al matraz con el medio en una charola con hielo.

c).- Medio de Mantenimiento:

Medio BHK-21 (preparado en solución)... 98%
Suero de Ternera (Inactivado)..... 2%
Antibióticos, Penicilina Estreptomicina 2.5 ml --
por cada 100 ml de medio de mantenimiento (opcio-
nal).

El pH óptimo en todos estos medios empleados en -
los cultivos celulares tiene un rango entre 6.8 y
7.1.

MATERIAL QUIMICO (Empleado en la preparación de laminillas con
cromosomas).

1.- Giemsa, solución madre

Giemsa..... 8 g
Glicerina.....500 ml
Metanol.....500 ml

Se calienta la glicerina a 60 C y se va agregando el co-
lorante lentamente. Después se agrega el metanol. Se
conserva en la obscuridad.

2.- Giemsa, colorante para cromosomas

Solución Buffer de k_2HPO_4 al 0.14 M. 2 ml

Giemsa solución madre 2 ml
 H₂O destilada.....96 ml

3.- Fijador, Metanol-Acido acético 3:1
 Metanol.....750 ml
 Ácido acético.....250 ml

4.- Solución hipotónica de KCl al 0.075 M
 KCl..... 5,55 g
 H₂O destilada..... 994.45 ml

5.- Solución de K₂HPO₄ al 0,14 M
 K₂HPO₄..... 24,36 g
 H₂O destilada.....975,64 ml

6.- Colchicina al 0.004%
 Colchicina..... 0,004 g
 H₂O destilada..... 100 ml

Se filtra por sistema Millipore con membranas de 13 mm de diámetro por 0,22 micras de diámetro del poro. Se envasa en volúmenes de 2.5 ml, se conserva a 4 C. Cada ca en 60 días.

MATERIAL FÍSICO (Empleado durante todo el trabajo).

Es importante señalar que para la producción de vacuna anti--rática, se debe contar con un laboratorio debidamente equipado. En el material físico empleado destacan:

- Máquina Liofilizadora
- Campana de flujo laminar
- Aparato de Cell-Roll
- Estufa de CO₂
- Estufa de Anaerobios
- Centrífuga refrigerada
- Congelador -70 C
- Congelador -20 C
- Cámara fría (4 C)
- Sistema de filtración Millipore
- Microscopio Invertido 30 aumentos
- Máquina para fabricar hielo
- Agitador Vortex
- Platina
- Agitadores magnéticos
- Baño María
- Máquina destiladora de agua
- Deionizador
- Balanza eléctrica
- Matraces (Erlenmeyer y Kitasato)
- Probetas
- Vasos de precipitados
- Pipetas terminales
- Pipetas pasteur
- Frascos para decantar
- Frascos de 5 ml
- Cajas de Petri de 62 mm

- Tubos de ensaye
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Botellas de Dilución de leche
- Botellas de Roux
- Botellas de Blake (chicas y grandes)
- Botellas de Roller (chicas, medidanas y grandes)
- Perillas
- Jeringas desechables
- Guantes de latex
- Tubos para centrifuga
- Vasos para centrifuga
- Engargoladora
- Retapa
- Rapón gris
- Tapón blanco
- Charolas metálicas (para liofilizar la vacuna)
- Algodón
- Gasa
- Hematocitómetro

METODOS

I PREPARACION DE LA VACUNA.

Lotes de vacuna en pase bajo.- La línea celular empleada fue la 13Sc1-7 pase 6. Se descongeló una ampollita con 9 millones de células/ml. Estas fueron sembradas primero, en una botella de dilución de leche, adicionando 20% de suero de ternera al medio de crecimiento. Se subcultivaron las células cuatro veces más, hasta llegar a seis botellas de roller (pase 10); de éstas, cinco pasaron a formar parte del primer lote de vacuna de este trabajo (lote 79-1-A pase bajo), utilizando la sexta botella como testigo no inoculado y para los lotes posteriores: 79-1-B, 79-1-C, 79-1-D, y - - 79-1-E.

Lotes de vacuna en pase alto.- Se descongeló una ampollita con células de la línea 13Sc1-7 pase 8 con 9 millones aproximadamente. Se procedió a subcultivar en forma seriada estas células hasta el pase 84, en un tiempo de 7 meses. De una botella de roller en pase 84 se sembraron 6 botellas de roller, de estas cinco pasaron a formar parte del primer lote de vacuna en pase alto de este trabajo (lote 79-2-A), la botella restante fue subcultivada para preparar los siguientes lotes de vacuna: 79-2-B, 79-2-C, 79-2-D, y 79-2-E.

Para la preparación de la vacuna se procedió a estandarizar las condiciones de trabajo empleando en forma similar para ambos lotes, tanto los elaborados en cultivo celular de pase bajo como los elaborados en cultivo celular de pase alto, los mismos medios,



tiempo y temperatura de incubación e infección así como velocidad de rotación de los cultivos. La preparación de los lotes de vacuna, en cultivo celular de pase bajo y alto fue realizada simultáneamente. En breve, el procedimiento que se siguió para elaborar los lotes de vacuna fue el siguiente:

10. Incubación de las células en botella de roller chicas con 200 ml de medio de crecimiento a 37 C, pH 6.9-7.1 durante 48 horas o hasta que se formara un monoestrato confluyente. En el aparato cell-roll a 0.12 RPM. Decantación del medio de crecimiento.
20. Infección del monoestrato celular durante una hora a 37 C empleando en el medio de infección virus rábico liofilizado procedente del lote de trabajo. RPM 0.12. Decantación del medio de infección con virus no adsorbido.
30. Incubación a 32 C con medio de mantenimiento pH 6.9-7.1 durante 120 horas en el aparato cell-roll, para crecimiento del virus.
40. Refrigerar a 4 C durante 1 hora, para mejorar la recuperación del virus.
50. Retirar el medio de mantenimiento (vacuna) de las botellas de roller y centrifugarlo a 4000 RPM durante 20 minutos. (La centrifuga debe ser refrigerada a 4 C).
60. Filtrar el sobrenadante (vacuna) por filtros Millipore -- con una membrana de 0.22 micras.

- 7o. Estabilización, mezclar la vacuna a partes iguales con estabilizador (PS) pH final 6.3 a 7.1. En este paso de la producción y durante el envasado de la vacuna ésta se maneja en refrigeración, para lograrlo se meten los matra--ces que contienen a la vacuna en charolas con hielo.
- 8o. Envasar la vacuna en volúmenes de 1.5 ml (durante el enva--sado obtener muestras para titulación y control bacterio--lógico). Conservar las muestras a -70 C debidamente eti--quetadas.
- 9o. Liofilizar durante 24 horas.
- 10o. Retapar y etiquetar.
- 11o. Conservar a 4 C.
- 12o. Titular la vacuna liofilizada y de acuerdo al título obte--nido, establecer el número de dosis por frasco de vacuna liofilizada. El título de la vacuna se calcula por el mé--todo de Reed y Muench.
- 12o. Probar la esterilidad de la vacuna, sembrando muestras de ésta en los medios para crecimiento bacteriológico convencionales empleados en el Departamento de Investigación en Producción.

II TITULACION DE LA VACUNA

Se titularon los 10 lotes de vacuna, antes y después de liofi--lizar; por inoculación intracerebral en ratón lactante y se calcu--

16 el título por el método de Reed y Muech (16).

III PREPARACION DE LAMINILLAS PARA OBSERVAR LA MORFOLOGIA CELULAR.

De cada uno de los lotes de vacuna elaborados se sembró por separado células en cajas de petri de 62 mm, previamente preparadas con dos cubreobjetos dentro de éstas. Se etiquetaron las cajas de petri con el número de lote y pase correspondiente. Se incubaron las cajas a 37 C durante 48 horas. La preparación de laminillas se llevó a cabo con la siguiente técnica:

- 1o. Eliminar el medio de crecimiento de las cajas de petri.
- 2o. Lavar las cajas con PBS sin Ca y Mg.
- 3o. Fijar con alcohol (Etanol puro) durante 5 minutos.
- 4o. Eliminar el alcohol (decantación y evaporación).
- 5o. Aplicar el colorante en la caja de petri (Giemsa al 10%) durante 30 minutos.
- 6o. Sacar el cubreobjetos de la caja de petri y fijar a un portaobjetos con bálsamo de Canadá y etiquetar cada una de las diferentes laminillas.

Una vez listas las preparaciones (laminillas) se procedió a examinar 100 campos bajo el microscopio tratando de encontrar principalmente:

- a) Células solas que una vez fotografiadas y aumentadas de -

tamaño se pudieran tomar medidas del núcleo y citoplasma. Estas -
mediciones se realizaron con un vernier y sobre papel milimétrico,
donde fueron colocadas las fotografías de las células ampliadas y
recortadas de los diferentes pases celulares.

b) Agrupaciones celulares en las que se pudieran establecer
diferencias notables en cuanto a espacios intercelulares, forma ce-
lular y tamaño en los pases celulares bajos y altos.

IV PREPARACION DE LAMINILLAS CON CROMOSOMAS Y CARIOTIPO

Se empleó la técnica desarrollada por Teresita Vallerino, Bió-
logo del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares. (Comuni-
cación personal).

- 1o. Agregar colchicina (0.004%) 0.25 ml por cada 5 ml de me-
dio contenido en una caja de petri con el monoestrato ce-
lular con 90% de confluencia y se incubaba a 37 C durante -
2-3 horas.
- 2o. Centrifugar y decantar el sobrenadante, resuspender el bo-
tón celular agregando solución hipotónica de KCl al 0.075
molar 5 ml.
- 3o. Incubar a 37 C durante 15 minutos.
- 4o. Centrifugar a 800-1000 RPM durante 5 minutos.
- 5o. Decantar el sobrenadante y resuspender.
- 6o. Agregar fijador Metanol-Acido acético 3:1, resuspender y
dejar 15 minutos a 4 C.

- 7o. Se centrifuga a 800 RPM y se decanta el sobrenadante.
- 8o. Repetir el paso 6, aquí se pueden conservar las células - hasta 24 horas.
- 9o. Centrifugar y decantar el sobrenadante.
- 10o. Se agrega fijador 5 ml.
- 11o. Se resuspende y se vierte el fijador sobre los portaobjetos, éstos son secados al fuego y teñidos con Giemsa durante 10 minutos.

Se observaron las laminillas al microscopio 100X, y se tomaron fotografías para la elaboración del cariotipo. Se amplió una de las 40 fotografías que se tomaron de los campos cromosómicos de las laminillas (F16 1). Se recortaron los cromosomas y se arreglaron por pares sobre un fondo blanco, de acuerdo a como lo establece Hsu, en su Atlas Cromosómico de los Mamíferos (15).

Se llevó un registro del número de cromosomas contados por -- campo y de acuerdo al número de pase celular correspondiente.

RESULTADOS

I TITULO DE LA VACUNA

No se encontró diferencia significativa entre los lotes de vacuna elaborados en cultivo celular de pase bajo, comparados con los lotes producidos en cultivo celular de pase alto (Cuadro 1).

La media aritmética para los lotes de pase bajo, así como la media aritmética para los lotes de pase alto (después de liofilizar fue de 6.64, con una diferencia logarítmica no significativa de $+ 1.2$ que resulta de comparar la suma de los títulos en pase bajo con la suma de los títulos en pase alto (gráficas 1, 2).

II MORFOLOGIA CELULAR

Se compararon células de pase alto y pase bajo por medio de una serie de 40 fotografías y no se encontraron diferencias en las células de pase alto que hicieran pensar en la posibilidad de alteraciones morfológicas, pues la relación núcleo citoplasma se mantiene constante, así como el tamaño de las células, características tintoriales y además su crecimiento en capa (monoestrato) no mostró cambios. No se encontraron núcleos piknóticos, ni células gigantes multinucleadas (19). (fotografías 1, 2).

III DETERMINACION DE NUMERO CROMOSOMICO Y CARIOTIPO

Se contaron 100 campos cromosómicos bajo el microscopio a 100 aumentos, de los diferentes pases (bajo y alto) de cultivos celulares

res. (Cuadro 2) se obtuvo un número moda de 42 cromosomas para ambos pases. Posteriormente se tomó una serie de 40 fotografías bajo el microscopio, a diferentes aumentos (40X, 100X); para comprobar los datos anteriores.

El número cromosómico de la especie Mesocricetus auratus - -- (hamster dorado) de la cual proviene la línea celular 13S, clona - de la BHK-21 es de $2N= 44XY$ (15, 22).

Se encontró que en los conteos realizados en células de pase bajo, como en pase alto, el número de cromosomas determinado fue - de 42 (fotografías 3, 4).

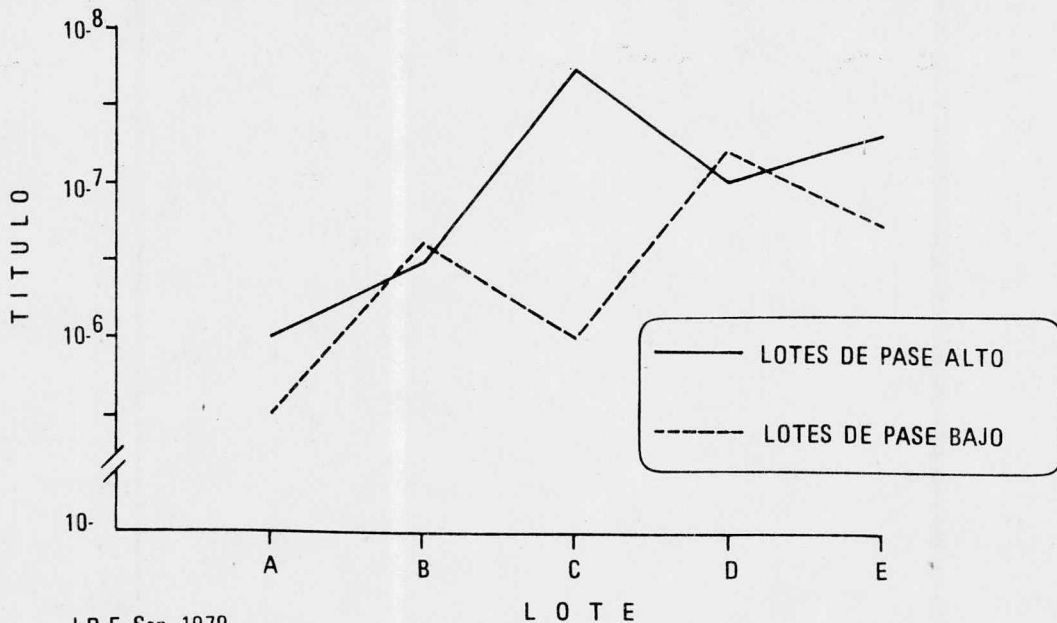
Se notó en el cariotipo realizado en pase alto, 85 la ausencia de 2 cromosomas acrocéntricos, par número 20 (figura 1), lo -- cual no muestra variación del número cromosómico de las células al rededor del 15% y se cumplen hasta el pase 87 de la línea celular 13Sc1-7, los requisitos establecidos por el Código Federal de Regu lación, USA. (23).

CUADRO 1
RESULTADO DEL TITULO DE LOS 10 LOTES DE VACUNA
ANTES Y DESPUES DE LIOFILIZAR.

TITULO ANTES DE LIOFILIZAR		TITULO DESPUES DE LIOFILIZAR	
Lote 79 - 1 - A	10 - 5.5/ml	79 - 1 - A	10 - 5.7/ml
79 - 2 - A	10 - 6.0/ml	79 - 2 - A	10 - 5.7/ml
79 - 1 - B	10 - 6.6/ml	79 - 1 - B	10 - 5.5/ml
79 - 2 - B	10 - 6.5/ml	79 - 2 - B	10 - 6.6/ml
79 - 1 - C	10 - 6.0/ml	79 - 1 - C	10 - 7.5/ml
79 - 2 - C	10 - 7.7/ml	79 - 2 - C	10 - 7.0/ml
79 - 1 - D	10 - 7.2/ml	79 - 1 - D	10 - 7.3/ml
79 - 2 - D	10 - 7.0/ml	79 - 2 - D	10 - 6.6.4/ml
79 - 1 - E	10 - 6.736/ml	79 - 1 - E	10 - 7.2/ml
79 - 2 - E	10 - 7.3976/ml	79 - 2 - E	10 - 7.3/ml

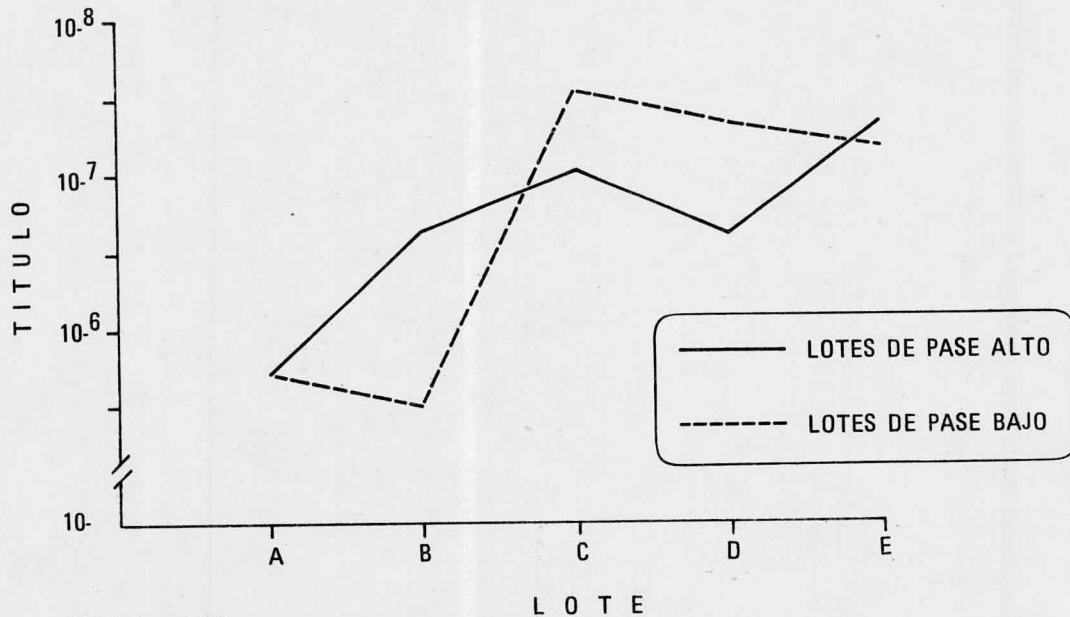
J.R.F. Sep. 1979.

COMPARACION DE LOS TITULOS OBTENIDOS EN VACUNA PRODUCIDA EN CULTIVO CELULAR DE PASE ALTO Y CULTIVO CELULAR DE PASE BAJO ANTES DE LIOFILIZAR.



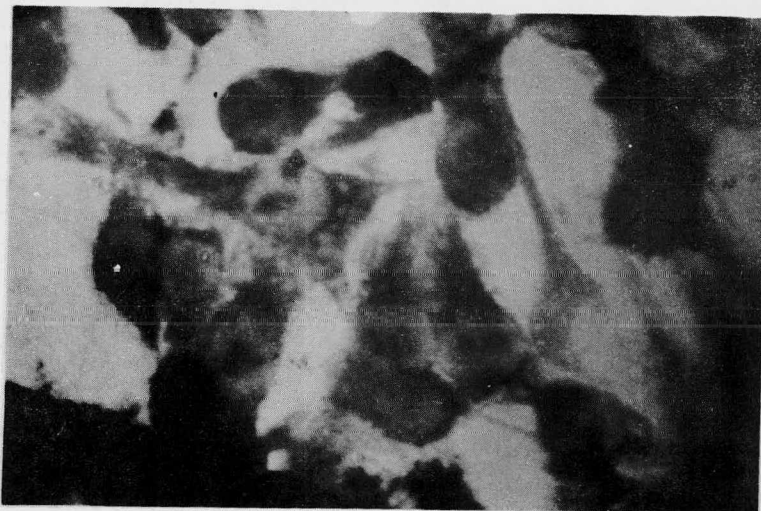
J.R.F. Sep. 1979.

COMPARACION DE LOS TITULOS OBTENIDOS EN VACUNA
 PRODUCIDA EN CULTIVO CELULAR DE PASE ALTO Y
 CULTIVO CELULAR DE PASE BAJO DESPUES DE LIOFILIZAR.





CELULAS 13Sc1-7 (PAGE 12) X 100



CELULAS 13Sc1-7 (PAGE 85) X 100

CUADRO 2

COMPARACION DE LA FRECUENCIA DE DISTRIBUCION DE LOS CROMOSOMAS

SEGUN AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION

Línea celular 13Sc1-7 origen, clona de la línea celular BHK-21

Patrón cromosómico $2n = 44$ frecuencia de distribución de los cromosomas en 50 células.

Células	1	1	1	3	2	2	7	32	1
Cromosomas	36	38	39	40	41	42	43	44	45

RESULTADO DE LA LINEA ESTUDIADA EN EL DEPTO. DE PRODUCCION

Línea celular 13Sc1-7 (pase bajo,8) origen, clona de la línea celular BHK-21.

Patrón cromosómico $2n = 44$ frecuencia de distribución de los cromosomas en 100 células

Células	2	2	3	10	50	30	2	1
Cromosomas	30	33	38	40	42	44	45	66

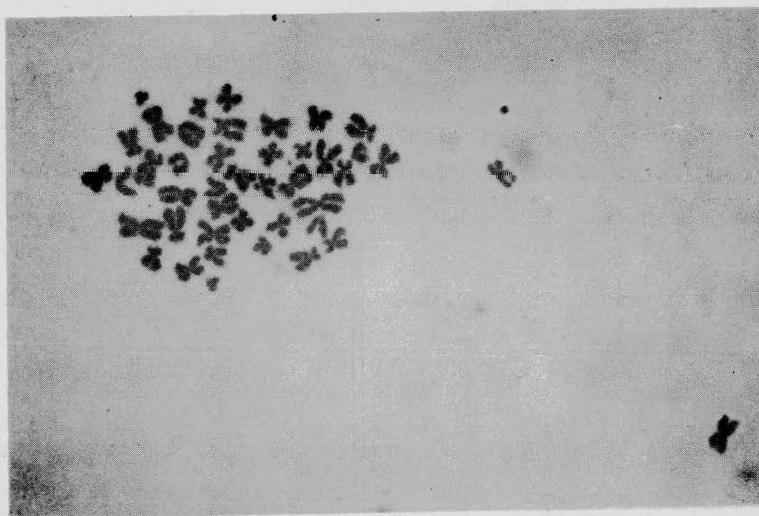
.... continuacion

RESULTADO DE LA LINEA ESTUDIADA EN EL DEPTO. DE PRODUCCION

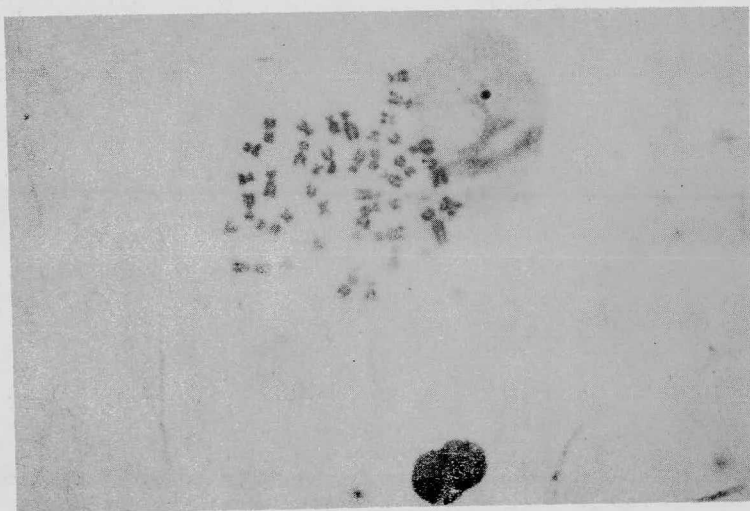
Línea celular 13Sc1-7 (pase alto, 85) origen, clona de la línea celular BHK-21.

Patrón cromosómico $2n = 44$ frecuencia de distribución de los cromosomas en 100 células.

Células	4	1	4	60	28	2	1
Cromosomas	30	38	40	42	44	45	62



CROMOSOMAS DE CELULAS 13Sc1-7 (PASE 12) X 100



CROMOSOMAS DE CELULAS 13Sc1-7 (PASE 85) X 100



FIGURA 1

ARRIBA CARIOTIPO NORMAL DE HAMSTER SYRIAN "GOLDEN"
 (SEGUN HSU) ABAJO CARIOTIPO DE CELULAS 13Sc1-7 DONDE
 SE NOTA LA AUSENCIA DE 2 CROMOSOMAS.

DISCUSION

En la conducción de este trabajo, se notó que vigilar estrictamente nuestros cultivos celulares destinados a producir vacunas es muy importante en algunos puntos como:

- a) Edad del cultivo al momento de efectuar el pase celular (Que sea siempre la misma, cada 48 horas).
- b) pH de los diferentes medios (crecimiento, infección y mantenimiento) que no varíe de 6.9-7.1.
- c) Velocidad de rotación en el Cell-Roll 0.12 RPM.
- d) Temperatura constante de 37 C para los cultivos.
- e) Calidad constante de los medios empleados (mismo laboratorio, mismas cantidades, misma conservación).
- f) Que el proceso de lavado de material no varíe.
- g) Que la concentración celular sembrada sea constante - -- (300 000 células/ml aproximadamente).
- h) Temperatura similar entre el medio de crecimiento nuevo y el decantado al momento de sembrar las células.
- i) Y por último, no variar la técnica desarrollada al efectuar los pases celulares.

Atendiendo estas indicaciones obtendremos la mejor forma para poder continuar realizando vacuna en cultivos celulares superiores al pase 20, ya que como observamos en el presente trabajo,

al no variar las condiciones de elaboración de la vacuna no hubo diferencia significativa en el título de la misma, ni tampoco se encontró diferencia en la morfología y número cromosómico de las células de los cultivos de pases altos.

Bajo las condiciones de trabajo empleadas, la línea celular 13Sc1-7 se comportó de manera estable, por lo que se considera adecuada para la elaboración de vacuna antirrábica hasta el pase 87, el más alto ensayado. Se considera conveniente determinar el cariotipo celular cada 6 meses o cada año a fin de confirmar que -- las condiciones de manejo celular siguen siendo adecuadas.

CONCLUSION

Los resultados de este estudio nos indican que es posible -- continuar con la producción de la vacuna antirrábica cepa V-319/ Acatlán, hasta el pase 87 de la línea celular 13Sc1-7 a partir de una ampolleta stock de células maestras.

BIBLIOGRAFIA

1. Arellano, C., Sureau, P., Batalla, D. y Morales, J.: Evaluación de la eficacia de la vacuna cepa Flury, contra la rabia paralítica bovina. *Téc. Pec. Méx.* 19: 9-14 (1971).
2. Bijlenga, G., and Hernández, B.E.: Adaptation, attenuation and plaque purification of a rabiesvirus isolate (V319) from a vampire bat (Desmodus rotundus). *Cornell Veterinarian*, Vol. 70 No. 3 (1980).
3. Boletín epizootiológico sobre rabia paralítica: Vacuna anti-rábica de origen murciélago-vampiro, cepa V-319/Acatlán para proteger al ganado bovino contra la rabia pasesiante, en México. P.I.R.P. - I.N.I.P. S.A.G. (1976).
4. Correa, Girón. P.: La rabia, manifestaciones clínicas, transmisión, prevención y tratamiento. *Ciencia Veterinaria*, Vol. 3: 103-146 U.N.A.M. (1981).
5. Correa, G.P. y Solana, M.P.: Potencia de vacunas contra derrinque adquiridas en farmacias veterinarias y en sus laboratorios de producción. *Téc. Pec. Méx.* 18: 22-26 (1966).
6. Difco manual of dehydrated cultura media and reagents. For microbiological and clinical laboratory. Procedures with edition Difco laboratories. Incorporated Detroit 1, Michigan (1953).
7. Fenner, F. and White, D.: *Virología Médica*. Ediciones Científicas. La Prensa Médica Mexicana, S.A. (1981).
8. Flores Crespo, R., Said, F.S., Burns, R.J. and Mitchell, G. C.: Observaciones sobre el comportamiento del vampiro común Desmodus rotundus al alimentarse en condiciones naturales. *Téc. Pec. Méx.* 27: 39-45 (1974).

9. Gómez Hernández, H.J.: Inocuidad y respuesta antigénica de la vacuna antirrábica V-319/Acatlán en perros. Tesis U.N.A.M. México (1977).
10. González Salazar, V.D.: Respuesta serológica a la vacunación antirrábica en cachorros Beagle de diferentes edades procedentes de madres vacunadas y no vacunadas. Tesis U.N.A.M. México (1976).
11. Hernández Baumgarten, E.M.: La rabia pareasante bovina: definición del problema y metodología de control. Ciencia Veterinaria, Vol. 1: 104-126. U.N.A.M. (1976).
12. Hernández Baumgarten, E.M.: El virus rábico: morfología, morfogénesis y crecimiento en cultivos celulares. Ciencia Veterinaria, Vol. 2: 1-34. U.N.A.M. (1978).
13. Hernández Baumgarten, E.M.: Patogenia de la rabia. Ciencia Veterinaria, Vol. 2: 72-100 U.N.A.M. (1978).
14. Hernández Baumgarten, E. y Barrenechea Ortuño, E.: Modificaciones del esquema de producción de la vacuna contra el derrriengue cepa V-319/Acatlán. Resúmenes Reunión Anual XIII. I.N.I.P. - S.A.G. México (1976).
- 15.- Hsu, T.C.: an Atlas of Mamalian Chromosomes. Vol. 1, Folio 14. Springer-verlag. New York, Heidelberg, Berlín (1967).
16. Kaplan, M.M. and Koprowsky, H.: Ed. Laboratory techniques in rabies. World health organization. Monograph Series No. 23, Third ed.: 329-332 (1973).
17. Malaga Alba, A.: La rabia de los murciélagos como problema veterinario y de salud pública tropical. Ciencias Veterinarias 4: 520-531 (1959).

18. Matthews, R.E.F.: Classification and nomenclature of viruses. 4th. report of the Sutl. Comitee on taxonomy of viruses. Intervirology, Vol. 17 No. 1-3: 109-114 (1982).
19. Parker, R.C.: Métodos de cultivo de los tejidos y las células. Ed. Atika, S.A., Madrid (1967).
20. Rexford D. Lord.: Guía sobre estrategia ecológica para controlar la rabia bovina. Ciencia Veterinaria, No. 3: 78-101. U.N.A.M. (1981).
21. Sagardía Ruíz A.J.: Duración de la inmunidad conferida por la vacuna V-319/Acatlán contra la rabia en perros, con desafío a un año de la vacunación. Tesis U.N.A.M. México (1977).
22. Sajiro Makino.: An Atlas of the chromosome numbers in animals. The Iowa State College Press. Ames, Iowa (1957).
23. Shannon, J.E.: The American Tupte Culture Collection: Registry of Animal cell Lines. Second Edition; CCL-10, Rockville, Maryland. U.S.A. (1972).
24. The National Archives of the United States.: Code of federal regulations. U.S. Government Printing, Office Washington: 295-301 (1977).
25. Valdéz Ornelas, O. and Atristan, G.: Rabies in México. Southern Veterinarian 1: 13-16 (1964).

26. Villa Ramírez, B.: Biología de los murciélagos hematófagos.
Ciencia Veterinaria, Vol. 1: 85-100. U.N.A.M. (1976).

