



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

**ESTABLECER EL TIEMPO DE CADUCIDAD DE LA
VACUNA ANTIRRABICA V-319 ACATLAN,
INACTIVADA CON BETA-PROPIOLACTONA,
MANTENIENDOLA A 37 °C SIN
IRRADIACION SOLAR.**

TESIS PROFESIONAL

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

P R E S E N T A

ENRIQUE MELGAREJO BAÑOS



México, D. F.

1986



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

A G R A D E C I M I E N T O S :

Al Departamento de Producción del I.N.I.F.A.P.

Dra. María Roldan de Gordón

Dr. José E. Weimersheimer R.

Srita. Ma. Esther Bazán O.

**Por la gran ayuda que tan desinteresadamente
me brindaron.**

**Al Grupo VETEQUI de la clínica #2 del
Hipodromo de las Américas. En especial
al Dr. Carlos Guzmán Clark por su ayuda
brindada.**

Al Sr. Federico Roa

**con profundo agradecimiento y por su
ayuda durante toda la carrera.**

A mis Amigos: Enrique Guerra Falcón

Jesús Ramírez Picazo

Arturo Mondragón

José Luis Estrada Rodríguez

Miguel Angel Paredes Lamadrid

Luis Mariano Romero del Valle

**Por su ayuda que de alguna manera o de otra
está reflejada en esta tesis.**

A mis queridos Padres:
Norberto Melgarejo Ruiz
Celia Baños de Melgarejo

Por que con su ejemplo me han enseñado
el camino del éxito, conservando la sencillez,
honradez y responsabilidad.

A la M.V.Z. Ana Vel Melgarejo Baños
Por su ayuda tan valiosa y desinteresada
por la elaboración de esta tesis.

A mis hermanas: Almaguicela
Ana Vel
Sofía

A mis sobrinos: Miguel Angel
Luis Mariano

A Noemi Arias Cabral
Mí compañera de la vida que
con amor y dedicación supo ayudarme.

A mi asesor:

M.V.Z., M.S., Ph. D. Eliseo Hernández Baumgarten
Por su gran ayuda, tanto en la dirección como en la
elaboración de este trabajo.

A mi jurado:

M.V.Z. CARLOS GUZMAN CLARK
M.V.Z. SANTIAGO AJA GUARDIOLA
M.V.Z. ALEJANDRO RODRIGUEZ MONTERDE
M.V.Z. ROSAURA FRANCO GUTIERREZ
M.V.Z. ALFREDO KURT SPROSS SUAREZ

C O N T E N I D O

	Página
Resumen	1
Introducción	2
Objetivo	6
Material	7
Métodos	9
Resultados	15
Discusión	18
Conclusiones	20
Bibliografía	21

RESUMEN

MELGAREJO BAÑOS, ENRIQUE. Establecer el tiempo de caducidad de la vacuna Antirrábica V-319/Acatlán Inactivada con Beta Propiolactona manteniéndola a 37°C sin irradiación solar, para establecer las condiciones de manejo de este biológico.

Bajo la dirección de: M.V.Z., M.S., Ph.D. Eliseo Hernández Baumgarten.

Se estudió el lote experimental piloto #1, de la vacuna antirrábica Cepa V-319/Acatlán Inactivada con Beta propiolactona, elaborada en el Depto. de Biotecnología en Salud Animal del I.N.I.F.A.P., con el objeto de establecer el tiempo de caducidad manteniéndola a 37°C. sin irradiación solar.

Del lote experimental piloto #1, se procedió a hacer en forma estéril alícuotas de 40 ml, mantenidas en cámara fría a 4°C. Estas se sacarán para ponerlas en la estufa a 37°C a diferentes tiempos según lo indicarán los cuadros de inoculación.

La titulación de la vacuna se hizo mediante la técnica de Habel, dando como resultado que la vacuna antirrábica Cepa V-319/Acatlán Inactivada con Beta propiolactona mantenida a 37°C sin irradiación solar por 90 días, todavía confiere una buena inmunidad.

INTRODUCCION

La rabia se conoce desde hace muchos años, tanto en Europa como en Asia, en donde los animales salvajes han sido el reservorio principal de la enfermedad (II). Aristóteles describe la enfermedad en el siglo III. A. C. y Demócrito en el siglo V. A.C., en el año 100 de nuestra era Celso dá una descripción detallada de la rabia (2). Fleming en el año 900 de nuestra era narra la invasión de Lyon por un oso, el cual mordió a unas 20 personas. De éstas 6 desarrollaron rabia y murieron en los siguientes 27-días (2). En 1271 se describe el primer gran brote cuando unos lobos rabiosos invadieron pueblos y villas, y no menos de 30 personas murieron después de ser mordidas (2). En América en 1502 se conoce esta enfermedad durante la época de la conquista, al observar que los perros traídos por los españoles presentaban rabia (II). En 1881 Pasteur publicó su primer informe sobre la rabia en el que dice que el sistema nervioso central y especialmente el bulbo raquídeo se encuentran involucrados y desempeñan un papel activo en el desarrollo de la enfermedad. Pasteur también reprodujo la rabia mediante inyecciones intracerebrales directas de material del sistema nervioso central, proveniente de animales rabiosos (2). Pasteur es también quien desarrolla la primera vacuna contra esta enfermedad.

Carini en 1911 diagnosticó por primera vez la rabia paralítica bovina en Brasil, cuando encontró corpúsculos de Negri en el tejido cerebral proveniente de bovinos muertos de una enfermedad pareasiante. Estos bovinos estaban en una zona donde existían perros callejeros y vacunación antirrábica con estas bases, Carini sospechó que los animales salvajes eran la causa del brote (2).

Hasta 1921 gracias a las investigaciones de Haupt y Rehaag se establece claramente la relación de las mordidas de murciélagos con la rabia paralítica en el ganado vacuno (2), Esta enfermedad causa la muerte de gran cantidad de animales, afectando así la ganadería de México y de muchos otros países (3,4,5,8,13,14)

Según el país y la zona, a la rabia se le conoce con diferentes nombres por ejemplo: "Tollwut" o "Wut" en Alemania, "Le rage" en Francia, " Peste dais cadeiras" en Brasil, "Tumbi-baba" en Paraguay, " Mal de caderas bovino" y "Rabia pareasiante", "Huequera y Renquera" en Colombia y Costa -

Rica, "Rabia paralítica" y "Rabia Paresiante" en Venezuela "Hidrofobia" " Derriengue", "Tronchado" y "Huila" en México. En algunos países también la conocen como "Lyssa" (7). Así la rabia ha representado y representa un problema para la salud pública. Muchos investigadores de diversos países han dedicado su tiempo al estudio de este padecimiento. Se sabe ahora que la rabia es una enfermedad causada por un virus que pertenece a la familia Rhabdoviridae, al género de los Lyssavirus. Tiene forma de bala y mide aproximadamente 60-80 nanómetros (nm) de ancho por 170-180 nm. de largo y su ácido nucleico está formado por RNA. Es un virus filtrable destruido por ácido, alcalis, fenol, formalina, cloroformo, luz ultravioleta y pasteurización entre otros (4,8,12,18).

La rabia paresiante es transmitida por la mordedura de un murciélago hematófago, siendo el más común el Desmodus rotundus, que actúa como reservorio y vector de esta enfermedad. Este es el más abundante en México tanto en número como por su amplia distribución geográfica, que va desde el norte hasta el sur de México encontrándose en otros países de Hispanoamérica. El Diphylla ecaudata es raro y el Diaemus younqui no existe en nuestro país (6,10,16).

Debido al problema que la rabia paresiante representa para la ganadería de México, ha sido necesaria la producción de vacunas que confieran una inmunidad específica y duradera (14). En el mercado existen varias vacunas antirrábicas de virus vivo modificado. Las vacunas que se producen en cultivos celulares (14) han demostrado tener mayor pureza y antigenicidad que las obtenidas con las mismas cepas de virus, pero propagadas en embriones de pollo o en animales de laboratorio (9,15)

La primera vacuna atenuada utilizada para la prevención de la enfermedad fue la vacuna de Pasteur como ya se mencionó antes. El virus de rabia fue adaptado al conejo por pase intracerebral hasta que el período de incubación se estableció en 5 a 6 días, a esto se le llamó virus fijo. Se sacrificaban los conejos en los últimos signos de la enfermedad y se recuperaba la médula espinal y el encéfalo poniéndolo a secar en jarras de desecación especiales, a temperatura ambiente y de tal modo que se obtenían médulas de 14 días de desecadas, de 13 días, de 12 días etc. hasta tener de 1 día. La virulencia del virus disminuye con más tiempo de desecación, en es

ta forma cuando una persona era mordida por un animal sospechoso, se vacunaba primero con la vacuna de 14 días, al siguiente día con la de 13 días y así sucesivamente hasta llegar hasta la de dos días (8).

Existen tres tipos de vacunas antirrábicas según el método de elaboración: a) Tejido nervioso, b) vacunas avianizadas, preparadas en embrión de pollo y c) vacunas preparadas en cultivos celulares (12,17). Las vacunas de tejido nervioso sólo existen como vacunas inactivadas, los otros tipos de vacunas existen en variedades de virus vivo modificado y de virus inactivado (12,17).

Dentro de las vacunas de virus vivo modificado tenemos la vacuna avianizada Flury, LEP (de bajo pasaje 136). Se cultiva en huevos embrionados o en células de riñón de hamster (8). Actualmente se ha prohibido su uso por reportes de casos de rabia en varios Estados de la Unión Americana (8). La vacuna avianizada Flury HEP, (de alto pasaje, 178 pases) recibe el nombre de vacuna Flury de alto pasaje por haberse dado un número adicional de pases en embrión de pollo con lo cual la atenuación del virus es tal, que sólo mata ratones lactantes por vía intracerebral y se recomienda para especies altamente susceptibles como bovinos y gatos. Estas vacunas fueron desarrolladas por Koprowski y Cox (1948) (2,8). La cepa Kelev (con más de 100 pases). Cultivada en huevos embrionados y utilizada en perros y bovinos. La cepa Kissling de alto pasaje, cultivada en células de hamster para vacunar perros. La cepa KWA (90 a 100 pases a 32°C) producida en cultivos celulares de riñón de hamster y utilizada para todas las especies domésticas (8,2). La vacuna cepa ERA es de virus vivo atenuado producida en cultivos celulares y fué desarrollada en Canadá (Abelseth, 1964). Esta fué la primera vacuna antirrábica que se autorizó en los Estados Unidos de América para ser usada en todas las especies de animales domésticos, proporcionando una inmunidad de cuando menos tres años en perros y ganado vacuno (2). Las vacunas de cultivos celulares han venido a substituir a las vacunas de tejido cerebral, principalmente por gran capacidad antigénica e inocuidad.

Entre las vacunas inactivadas, mencionaremos las siguientes: La vacuna tipo Fermi (1908) que se inactiva con fenol durante 24 horas a 22°C.: La vacuna Umeno (1916) inactivada también con fenol: y la vacuna Kelser (1925) inactivada con cloroformo (8). La vacuna tipo Semple se prepara inactivan-

do al virus con 1.15% de fenol, y ha sido utilizada en personas previamente expuestas con aplicación de dosis múltiples (8). Otro ejemplo es la vacuna Alurabiffa que fué desarrollada por el Instituto Mérieux en Francia, la --- cuál es elaborada en una línea celular de embrión de hamster, (NIL-II) y se presenta en forma liofilizada sin adyuvante, ó en forma líquida con varios tipos de adyuvantes como de tipo oleoso, hidróxido de aluminio o bien saponinas, demostrando estabilidad antigénica en presencia de estos compuestos(14). Otra de estas vacunas es la vacuna antirrábica cepa V-319/Acatlán que ya es usada en todo México como vacuna de virus modificado preparada en cul tivos celulares, en línea 13S CL7, (ésta es una clona de la línea BHK-21).(16), ahora se está desarrollando una vacuna inactivada a partir de esta mis ma cepa, utilizando la Beta propiolactona como inactivante.

Acerca de este biológico se tienen datos valiosos, resultado de traba jos anteriores. El virus fué aislado a partir de un vampiro macho con una - infección generalizada de rabia capturado en San Vicente Oaxaca (6). Se pro cedió a infectar monoestratos de cultivos celulares de vampiro, como el tí tulo del virus obtenido en éstas células era muy bajo ($10^{2.6}$); se empezó a trabajar con la línea BHK-21, obteniéndose títulos más altos hasta lograr - un título máximo de 10^9 UFP (6). Se sabe que la vacuna de virus vivo confie re una protección de 3 años (6); que la duración de la viabilidad de éste - biológico después de reconstituido es de 15.5 horas en condiciones óptimas(4°C) y de 4.5 horas si es expuesta a una temperatura de 28°C. (17). La inac tivación con Beta propiolactona hace cambiar las propiedades de la vacuna - de tal manera que es necesario repetir las pruebas que se han hecho antes.- El presente trabajo servirá como una contribución al estudio de este nuevo producto, y en él se tratará de establecer la caducidad del mismo para faci litar las condiciones de manejo y las precauciones que con él deban tener,- dado que es necesario conocer la duración de la antigenicidad de la vacuna- cuando se interrumpe la cadena fría necesaria para su conservación adecuada.

OBJETIVO

Establecer el tiempo de caducidad de la vacuna antirrábica V-319/Acaatlán, inactivada con Beta-propiolactona, manteniéndola a 37°C sin irradiación solar, para establecer las condiciones de manejo de este biológico.- El propósito de hacer un producto inactivado es que podría ser transportado a lugares poco accesibles, basándose en que las vacunas inactivadas -- mantienen su capacidad antigénica por un período más prolongado que las vacunas de virus vivo, a temperaturas variables.

M A T E R I A L

1. Material biológico.

- 1.1. Ratones blancos cepa CD-1 de 5 semanas de edad, estos animales fueron proporcionados por el departamento del Bioterio del INIFAP.
- 1.2. Vacuna antirrábica V-319/Acatlán inactivada con Beta propiolactona, elaborada por el Depto.de Biotecnología en Salud Animal del INIFAP. Y perteneciente al lote piloto #1 con un título antes de inactivar de $10^{-7.74}$.
- 1.3. CVS (Challenge virus standard) elaborado en el Depto. de Epizootiología del INIFAP.
- 1.4. Suero de ternera.- El suero se separó del coágulo, fué centrifugado 2 veces a 3,000 rpm. durante 20 minutos en cada centrifugación, y se esterilizó por filtración con filtros millipore con presión positiva, fué envasado en volúmenes de 400 ml y congelado a una temperatura de -20°C. Al descongelarse fué inactivado en baño maría a 56°C. durante 30 minutos y se conservó en refrigeración a -4°C.

2. M A T E R I A L F I S I C O

- 2.1.- Jaulas para ratones con bebederos.
- 2.2.- Jeringas de 1 ml y de 5 ml desechables
- 2.3.- Agujas del #27 de 1.25 cm de largo
- 2.4.- Cámara fría a 4°C.
- 2.5.- Estufa bacteriológico ajustada a 37°C.(incubadora convertida a estufa bacteriológica).
- 2.6.- Pipetas de 1,5 y 10 ml.
- 2.7.- Frascos de 27 ml.
- 2.8.- Guantes latex
- 2.9.- Tubo de ensaye
- 2.10. Gradillas
- 2.11. Algodón
- 2.12. Gasas
- 2.13. Baño de hielo
- 2.14. Centrífuga
- 2.15. Campana de flujo laminar con flujo horizontal
- 2.16. Engargoladora para retapas de 25 mm de diámetro
- 2.17. Pinzas de disección
- 2.18. Congelador a -20°C.
- 2.19. Congelador a -70°C.

MÉTODOS

La titulación de la vacuna se hizo mediante la técnica de Habel (20), la que brevemente consiste en lo siguiente:

Se { Se deben emplear ratones blancos cepa CD-1 de 4 a 6 semanas de edad y de un peso uniforme, que se pueden escoger sin tener en cuenta el sexo, en caso de que sea conveniente, se pueden elegir de un mismo sexo.

Para la inmunización de los ratones, se administra a sesenta ratones-0.25 ml de una vacuna diluída que contenga 0.5% del peso del cerebro fresco. Las inoculaciones se hacen por vía intraperitoneal los lunes, mié--cos y viernes durante dos semanas consecutivas (un total de seis dós--is). - Antes de comenzar se separan treinta ratones para emplearlos como testigos en el momento de aplicar el reinfec--tante (desafío).

Catorce días después de la primera dós--is de vacuna se hace una prueba de confrontación. En éste momento se deshuelan dos ampollitas del virus fijo estándar usado como reinfec--tante, y se hace una suspensión de 10^{-1} . - Luego se preparan diluciones decimales, desde 10^{-1} hasta 10^{-7} , empleando co--mo diluyente suero de caballo o conejo, al 2%, en agua destilada. Durante la ejecución de la prueba conviene mantener las diluciones del virus usado para la confrontación en un baño de agua helada, a fin de evitar reduc--ciones en el título del virus.

El reinfec--tante se aplica a grupos de 10 ratones vacunados, inyectán--dole intracerebralmente 0.03 ml de las diluciones 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} y 10^{-1} del virus, en el orden citado. Se puede emplear la misma jeringa y - aguja para todas las inoculaciones, siempre que antes de llenarla de nuevo se lave varias veces para usarla en la dilución siguiente.

Con una nueva jeringa se inoculan los ratones testigos con las dilu--ciones 10^{-7} , 10^{-6} , y 10^{-5} del virus para determinar cuál de las diluciones representa una DL50. Si el virus de control está completamente activo, es--tas tres diluciones dejarán generalmente un número de sobrevivientes que - oscilará del 100% a menos del 50%. La irregularidad en la distribución de las muertes, durante el empleo de las tres diluciones, debe considerarse - sospechosa. Para que la prueba de potencia sea válida, el 50% del límite -

de las muertes por rabia, en los ratones testigos, debe ser superior a la dilución 10^{-5} .

Todos los ratones se observan 14 días: sólo las muertes que ocurran después del quinto día se deben atribuir a la rabia. La observación ha de ser diaria y se deben anotar los síntomas observados. Los ratones que sobreviven después de 14 días, pero que presentan síntomas de rabia, se deben considerar como muertos por rabia para los efectos del cálculo de la potencia de la vacuna.

Para la determinación del grado de protección, el límite del 50% de la mortalidad por rabia se determina por el método de Reed y Muench. Consiste éste límite en la dilución que, aplicada a los ratones vacunados y a los testigos, debe de causar la muerte por rabia del 50%, según los resultados obtenidos en las pruebas efectuadas con las diluciones. Restando el logaritmo del límite de los testigos, del correspondiente a los vacunados, se obtiene fácilmente el logaritmo del número DL50 de protección. Para satisfacer los requisitos mínimos, éste debe ser log. 3 ó 1.000 DL50.

Se utilizaron ratones blancos de 21 días de edad de la cepa CD-1, proporcionados por el Depto. del Bioterio del I.N.I.F.A.P., cada lote de 100 ratones fué dividido en 10 cajas con 10 ratones cada una, y permanecieron dos semanas en el cuarto de ratones como período de adaptación (y fueron vacunados a las 5 semanas de edad como menciona la técnica de Habel), éste cuarto se mantuvo a una temperatura de 18 a 25°C. durante todo el experimento.

Del lote experimental piloto #1, de la vacuna antirrábica cepa V-319/Acatlán inactivada con Beta propiolactona, se procedió a hacer en forma estéril alícuotas de 40 ml mantenidas en cámara fría a 4°C. Posteriormente se sacaron de ésta para ponerlos en la estufa a 37°C., a diferentes tiempos según lo indica el calendario de inoculación, anotado en los cuadros 1, 2, 3, 4, 5 y 6.

El calendario anotado en los cuadros 1 al 6 es un tanto complicado pero tuvo la función de retirar la alícuota de vacuna en la fecha en que se aplicaría, con la finalidad de evitar conservarla en el laboratorio a 4°C. hasta la fecha de su aplicación. También se tuvo el cuidado de que en un determinado grupo de ratones coincidiera la fecha del desafío a fin de ha-

cer éste simultáneamente y así-manejar el CVS el menor número de veces posible.

TIEMPO CERO HORAS

Cuadro 1 de inoculación.

Tiempo	Día de inoculación	Inoculación	Desafío
0 horas	25-III-85	1a.	7-IV-85
0 horas	27-III-85	2a.	7-IV-85
0 horas	29-III-85	3a.	7-IV-85
0 horas	1-IV-85	4a.	7-IV-85
0 horas	3-IV-85	5a.	7-IV-85
0 horas	5-IV-85	6a.	7-IV-85

TIEMPO CERO HORAS

Cuadro 2 de inoculación.

Tiempo	Día de inoculación	Inoculación	Desafío
0 horas	14-X-85	1a.	28-X-85
0 horas	16-X-85	2a.	28-X-85
0 horas	18-X-85	3a.	28-X-85
0 horas	21-X-85	4a.	28-X-85
0 horas	23-X-85	5a.	28-X-85
0 horas	25-X-85	6a.	28-X-85

TIEMPO 10 DIAS

Cuadro 3 de inoculación.

Tiempo	Poner vial 37°C.	Día de inoculación	Inoculación	Desafío
10 días	31-V-85	10-VI-85	1a.	24-VI-85
10 días	2-VI-85	12-VI-85	2a.	24-VI-85
10 días	4-VI-85	14-VI-85	3a.	24-VI-85
10 días	7-VI-85	17-VI-85	4a.	24-VI-85
10 días	9-VI-85	19-VI-85	5a.	24-VI-85
10 días	11-VI-85	21-VI-85	6a.	24-VI-85

TIEMPO 20 HORAS

Cuadro 4 de inoculación.

Tiempo	Poner vial 37°C.	Día de inoculación	Inoculación	Desafío
20 días	8-X-85	28-X-85	1a.	11-XI-85
20 días	10-X-85	30-X-85	2a.	11-XI-85
20 días	12-X-85	1-XI-85	3a.	11-XI-85
20 días	15-X-85	4-XI-85	4a.	11-XI-85
20 días	17-XI-85	6-XI-85	5a.	11-XI-85
20 días	19-X-85	8-XI-85	6a.	11-XI-85

Cuadro 5 de inoculación.

Tiempo	Poner vial 37°C.	Día de inoculación	Inoculación	Desafío
30 días	27-VII-85	26-VIII-85	1a.	9-IX-85
30 días	29-VII-85	28-VIII-85	2a.	9-IX-85
30 días	31-VII-85	30-VIII-85	3a.	9-IX-85
30 días	3-VIII-85	2-IX-85	4a.	9-IX-85
30 días	5-VIII-85	4-IX-85	5a.	9-IX-85
30 días	7-VIII-85	6-IX-85	6a.	9-IX-85

Tiempo	Poner vial 37°C.	Día de inoculación	Inoculación	Desafío
40 días	17-VII-85	26-VIII-85	1a.	9-IX-85
40 días	19-VII-85	28-VIII-85	2a.	9-IX-85
40 días	21-VII-85	30-VIII-85	3a.	9-IX-85
40 días	24-VII-85	2-IX-85	4a.	9-IX-85
40 días	26-VII-85	4-IX-85	5a.	9-IX-85
40 días	28-VII-85	6-IX-85	6a.	9-IX-85

Cuadro 6 de inoculación.

Tiempo	Poner vial 37°C.	Día de inoculación	Inoculación	Desafío
20 días	3-XII-85	23-XII-85	1a.	6-I-86
20 días	5-XII-85	25-XII-85	2a.	6-I-86
20 días	7-XII-85	27-XII-85	3a.	6-I-86
20 días	10-XII-85	30-XII-85	4a.	6-I-86
20 días	12-XII-85	1-I-86	5a.	6-I-86
20 días	14-XII-85	3-I-86	6a.	6-I-86
30 días	23-XI-85	23-XII-85	1a.	6-I-86
30 días	25-XI-85	25-XII-85	2a.	6-I-86
30 días	27-XI-85	27-XII-85	3a.	6-I-86
30 días	30-XI-85	30-XII-85	4a.	6-I-86
30 días	2-XII-85	1-I-86	5a.	6-I-86
30 días	4-XII-85	3-I-86	6a.	6-I-86
40 días	13-XI-85	23-XII-85	1a.	6-I-86
40 días	15-XI-85	25-XII-85	2a.	6-I-86
40 días	17-XI-85	27-XII-85	3a.	6-I-86
40 días	20-XI-85	30-XII-85	4a.	6-I-86
40 días	22-XI-85	1-I-86	5a.	6-I-86
40 días	24-XI-85	3-I-86	6a.	6-I-86
60 días	24-X-85	23-XII-85	1a.	6-I-86
60 días	26-X-85	25-XII-85	2a.	6-I-86
60 días	28-X-85	27-XII-85	3a.	6-I-86
60 días	1-XI-85	30-XII-85	4a.	6-I-86
60 días	3-XI-85	1-I-86	5a.	6-I-86
60 días	5-XI-85	3-I-86	6a.	6-I-86

Cuadro 6 de inoculación.

tiempo	Poner vial 37°C.	Día de inoculación	Inoculación	Desafío
90 días	24-IX-85	23-XII-85	1a.	6-I-86
90 días	26-IX-86	25-XII-85	2a.	6-I-86
90 días	28-IX-85	27-XII-85	3a.	6-I-86
90 días	1-X-85	30-XII-85	4a.	6-I-86
90 días	3-X-85	1-I-86	5a.	6-I-86
90 días	5-X-85	3-I-86	6a.	6-I-86
110 días	4-IX-85	23-XII-85	1a.	6-I-86
110 días	6-IX-85	25-XII-85	2a.	6-I-86
110 días	8-IX-85	27-XII-85	3a.	6-I-86
110 días	11-IX-85	30-XII-85	4a.	6-I-86
110 días	13-IX-85	1-I-86	5a.	6-I-86
110 días	15-IX-85	3-I-86	6a.	6-I-86

En el cuadro 6 podemos observar varios tiempos, que tienen la misma fecha de desafío.

R E S U L T A D O S

En los cuadros 1 y 2 que corresponden al tiempo de cero horas, se nota que no hay fecha de poner vial a 37°C, porque en éste tiempo el vial se saca directamente de la cámara fría, para la inoculación de los ratones.

Este tiempo se repitió ya que los resultados en la primera ocasión, no revelaban datos confiables porque los ratones presentaron una enfermedad diferente a rabia. Esto se comprobó por la técnica de Inmuno fluorescencia. Se notó que algunos ratones mostraban parálisis o torpeza en sus movimientos desde el segundo día post-inoculación, siguiendo en éste estado por varios días. Los animales con estos signos presentaban el pelo liso y brillante, emaciación marcada, los miembros anteriores perdían su posición normal asemejando a las aletas de los pingüinos. El tren posterior presentaba parálisis total y no perdían el apetito ya que cuando el alimento y el agua se ponían a su alcance, éstos comían y bebían. Los animales que murieron dentro de días críticos (6,7,8 y 9), se dieron como muertos por rabia y los que salían de éste rango crítico se les extrajo el cerebro para ser analizados por inmuno fluorescencia, siendo en el 100% negativos a rabia. Otros animales, con los mismos signos fueron enviados al Depto. de Fisiopatología del, I.N.I.F.A.P. para su estudio y su posible diagnóstico. En la necropsia se buscó Hymenolepis nana, que no se encontró. El Depto. de Bioterio estaba por cambiar la cepa de los ratones NIH, (con la cual se tuvieron estos problemas) a la cepa CD-I. Los tiempos restantes se trabajaron en la misma forma pero con la cepa nueva CD-I. El problema se solucionó y por ésto se decidió repetir los tiempos donde se presentó el problema de animales muertos, pero negativos a rabia.

Los tiempos de 30 y 40 días fueron repetidos, ya que en la primera ocasión el título del CVS fué de $10^{-6.1}$, con lo cuál los resultados estaban dudosos. Como se contaba con vacuna y animales suficientes, se decidió correr estos tiempos con los que faltaban para tener más confianza en los datos arrojados. Podrá notarse que los índices de protección obtenidos en las dos pruebas a 30 y 40 días son similares, por lo que ésto parece indicar que el título de CVS no es demasiado importante para la conducción de ésta prueba, siempre y cuando haya suficiente virus CVS para desafiar a los ratones.

Uno de los índices de protección a cero horas no se tomó en cuenta -

por las razones antes anotadas.

Podemos observar que el índice de protección a 10 días es el más alto observado y la primera vez que se cuantificó el índice de protección a los 20 días no se tomó en cuenta debido a que el título del CVS era muy bajo. Debido a esto, la vacuna parecía no cumplir con los requisitos mínimos de protección. Se procedió a repetir la titulación de las muestras en este tiempo de incubación, dando un resultado que consideramos de mayor confiabilidad, por ser más cercano a los observados a los 10 y a los 30 días.

En los tiempos de 30 y 40 días podemos observar que no hay mucha variación en los resultados arrojados en las dos titulaciones efectuadas en cada periodo. Por lo tanto se procedió a sacar una media del índice de protección y otra de la DL50 contra las que protegió (ver cuadro 7 de resultados). Los tiempos de 30 y 40 días respectivamente dieron un resultado de mayor grado de confiabilidad por haberse obtenido índices de protección similares en cada caso y además cumple con los requisitos mínimos de protección en cada ocasión.

En los tiempos de 60 y 90 días podemos observar que la vacuna todavía confiere un grado de protección adecuado, que decae abruptamente a los 110 días no pasando los requisitos mínimos de protección establecidos para la prueba.

RESULTADOS

Cuadro 7.

Tiempo	Desafío	Indices de protección	DL50 contra las que protegió
0 horas	8-IV-85	(* 10 ⁻⁵)	(100,000)
0 horas	28-X-85	10 ^{-3.12}	1318
10 días	24-VI-85	10 ^{-4.92}	83,000
20 días	11-XI-85	(* 10 ^{-0.625})	
20 días	6-I-86	10 ^{-4.54}	35,160
30 días	9-IX-85	10 ^{-4.03}	10,800
			X = 10 ^{-4.165}
30 días	6-I-86	10 ^{-4.30}	20,280
			X = 15,540
40 días	9-IX-85	10 ^{-4.82}	66,000
			X = 10 ^{-4.375}
40 días	6-I-86	10 ^{-3.93}	8,690
			X = 37,345
60 días	6-I-86	10 ^{-4.32}	20,890
90 días	6-I-86	10 ^{-4.12}	13,210
110 días	6-I-86	10 ^{-0.52}	3.342 (&)

* No se tomaron en cuenta.

Para satisfacer los requisitos mínimos el grado de protección debe ser 1,000 DL 50.

(&) No pasa los requisitos mínimos.

DISCUSION

Las pruebas de capacidad inmunizante de las vacunas solo pueden hacer se directamente en animales, ya sea de laboratorio ó en los animales a que se destina un biológico. En el caso de la vacuna antirrábica inactivada -- con Beta propiolactona, la prueba de potencia de Habel (20) es una de las formas de evaluar la potencia conferida por la misma, pero está sujeta a numerosas variaciones. Una de las fuentes de variación en la prueba está dada por la cepa de desafío, que con frecuencia es afectada por contaminantes en el material de vidriería, etc. a pesar de las precauciones que se tomen a este respecto. La baja incontrolada del CVS causó que dos pruebas no fueron de utilidad en este estudio, por lo que fué necesario repetirlas.

Los índices de protección conferidos por la vacuna, después de ser -- inactivada a diferentes tiempos, no muestra diferencias importantes a lo largo de los 90 días del estudio, aún cuando se observa una clara tendencia a la baja. La caída abrupta de la antigenicidad a los 110 días, parecería indicar la conclusión de un proceso que venía sucediendo en forma parcial y que se manifiesta después de los 90 días.

Existen dos tipos de epítopo en la superficie de un antígeno: a) epítopo conformacional y b) epítopo secuencial, la desnaturalización térmica de los antígenos virales, principalmente glucoproteínas, causan la pérdida del primer tipo de epítopo al perderse la estructura tridimensional de las mismas. Este es un proceso gradual a 37°C. aún cuando se acelera rápidamente a mayor temperatura. El epítopo secuencial, codificado por la secuencia de aminoácidos, es más resistente a la deestructuración y requiere de rupturas de ligaduras covalentes, poco frecuentes a estas temperaturas, o bien por obliteración química de los sitios de interés. El único fenómeno que actúa en estas condiciones es el de Browning, que se presenta en soluciones de proteínas (19). Cuando afecta a las proteínas virales es de un efecto muy marcado sobre la antigenicidad u otra actividad de interés. La caída abrupta de la antigenicidad viral a los 110 días sugiere la posibilidad de una enzima presente (RNAasa, Peptidasa, etc.), que estuviera latente y que cuando se activa actúa en forma catalizadora, como es el caso del sistema tripsinogeno-tripsina en el intestino. Una vez activada la enzima, ésta -- transforma mayor cantidad de la misma, ocurriendo la destrucción rápida del antígeno. El motivo de ésta tesis, fué solo hacer estudios sobre el ti

po de cambio ocurrido en la vacuna durante su prolongada incubación, no empleando inhibidores de enzimas. No es posible distinguir entre las diversas posibilidades planteadas u otras sugeridas por otros autores. (19).

Lo único que resulta claro es que si bien es difícil destruir con temperatura a 37°C. la antigenicidad de la vacuna, los imponderables señalados arriba hacen que cada lote sea diferente en su resistencia a la temperatura y lo mejor es mantenerlos en las condiciones señaladas por el laboratorio - productor. Por otra parte el propósito de desarrollar una vacuna inactivada, es para las zonas poco accesibles de México, en donde no es siempre posible mantener la temperatura adecuada, ofreciendo una mayor resistencia a los - cambios de temperatura.

Probablemente su gran utilidad va a ser en campañas masivas de vacunación, donde es manejado en forma deficiente cualquier tipo de biológico, - por no contar con las condiciones mínimas para obtener una buena protección en los animales susceptibles.

CONCLUSIONES .

1.- Con el trabajo realizado, podemos afirmar que al aplicar la vacuna antirrábica Cepa V-319/Acatlán inactivada con Beta propiolactona, en zonas tropicales y subtropicales se tendría mayor estabilidad con éste biológico, redundando en una mejor inmunidad por su mayor resistencia a temperaturas.

2.- Una vacuna debe ser manejada a una temperatura de 4°C. que es la temperatura óptima en que deben ser mantenidos todos los biológicos. El hecho de que la vacuna haya retenido su índice de protección, a 37°C hasta por 90 días, no implica que pueda manejarse sin refrigeración, sino que en caso de una interrupción de la cadena fría desde el productor hasta el usuario, éste tenga una mayor seguridad de estar aplicando todavía un biológico en buen estado.

3.- Una recomendación importante de la vacuna antirrábica Cepa V-319/Acatlán inactivada con Beta propiolactona, es que durante la conducción de este trabajo fué mantenida alejada de la irradiación solar directa, ya que la vacuna se mantuvo a 37°C en una incubadora bacteriológica. Por lo tanto este biológico debe ser manejado a la sombra, ya que si se expone a la luz solar, la capacidad inmunizante puede sufrir un deterioro mas rápido.

B I B L I O G R A F I A

1. Alder, H.L. and Rossleer, E.B.: Introduction to probability and statistics 3ed. E.D. (1964) W.H. Freeman & Co. San Francisco. U.S.A.
2. Baer, G.: The natural history rabies, New York. Academic Press, 1975. U.S.A.
3. Baer, M. y Rivera, Cruz.: Títulos de sueroneutralización contra el Derriengue producido por una vacuna de alto pasaje y por una vacuna autógena. Tec.Pec.Mex. (7): 11-15 (1966).
4. Batalla, D., Arellano, C., Sureau, P.: Evaluación serológica de las vacunas antirrábicas para bovinos que existen actualmente en México. Iec. Pec.Méx. (18): 22:26 (1971).
5. Boletín Epizootiológico sobre rabia paralítica, Vol. 1: No.2, segundo trimestre de 1975. P.I.R.P.- I.N.I.P. (S.A.G.)
6. Boletín sobre rabia paralítica, 1976, vacuna antirrábica de origen murciélago-vampiro, cepa V-319/Acaltán para proteger al ganado bovino contra la rabia pasesiante, en México. P.I.R.P.- I.N.I.P. (S.A.G.).
7. Correa, G.P.: Enfermedades virales de los animales domésticos. (monográficos) Ed. F.H. Vol. 1 3a. edición (1981).
8. Correa, G.P.: La rabia, manifestaciones clínicas, transmisión prevención y tratamiento. Ciencia Veterinaria 3: 104-138 (1981)
9. Correa, G.P. y Solana, M.P.: Potencia de vacunas contra el derriengue adquiridas en farmacias veterinarias y sus laboratorios de producción. - Tec.Pec.Mex. (8): 10-18 (1966).
10. Flores, C.R., Morales, R.J.: Métodos para combatir los vampiros. Téc.Pec. Méx. : 29-73-80 (1975).
11. Hagan, W.A., Bruner, D.W. 1975. Enfermedades infecciosas de los animales domésticos. Ed. Prensa Médica Mexicana. México: 799-818.
12. Hernández B.E.: Patogenia de la rabia

Ciencia Veterinaria 2: U.N.A.M. 71-102 (1978)

13. Hernández, B.E.: La rabia parejante bovina, definición del problema y metodología de control. Ciencia Veterinaria 1: 104-125 (1976).
14. Hernández, B.E., Morales, R.J., Arellano, S.C., Campos, V.J., López, B.B., Pérez, R.H.: Evaluación de una vacuna comercial antirrábica inactivada - para bovinos, producida en cultivos de tejido (Alurabiffa). Téc. Pec. Méx. (30): 57-63 (1976).
15. López, B.B., Hernández, B.E.: Proposición de un método experimental para probar la potencia para vacunas antirrábicas de un virus modificado producidas en cultivos celulares. Tec. Pec. Mex. (32): 58-65 (1971).
16. Mancisidor, A.A.: El uso de una vacuna autógena en el control de un Brote de derriengue en México. Tec. Pec. Mex. (5): 27-29 (1965).
17. Melgarejo, B.A., Hernández, B.E.: Duración de la viabilidad de la vacuna antirrábica cepa V-319/Acatlán, después de reconstituida. Téc. Pec. Méx. (44): 96-101 (1983).
18. Morales, R., Flores, R.: Prevención de la rabia parálitica bovina control de la enfermedad. Tec. Pec. Méx. (29): 81-86 (1975).
19. Norman, W.: The technology of preservation
3ed. Westport, Conn, AVI, 1970.
20. Varios autores.: Técnicas de laboratorio aplicadas a la rabia.
Organización Mundial de la Salud: 116 - 119 (1959).