



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

Facultad de Estudios Superiores
"CUAUTITLAN"

EVALUACION DE LA POTENCIA "IN VITRO" DE LA
VACUNA ANTIPOLIOMIELITICA ORAL (SABIN) CUANDO
ES EXPUESTA A CICLOS DE CONGELAMIENTO Y
DESCONGELAMIENTO.

T E S I S

Que para obtener el Título de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

presenta

ESTELA NAVARRO URIARTE

Director: M.V.Z. Gerardo Cruz Jiménez



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 está 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

	P A G I N A
I.- OBJETIVOS	1
II. GENERALIDADES	
2.1 INTRODUCCION	2
2.2 HISTORIA	3
2.3 AGENTE ETIOLOGICO	6
2.4 ETIOLOGIA Y EPIDEMIOLOGIA	9
2.5 MANIFESTACIONES CLINICAS	10
2.6 PATOGENESIS Y PATOLOGIA	12
2.7 DIAGNOSTICO DE LABORATORIO	14
2.8 PREVENCIÓN Y REHABILITACION	16
2.9 INMUNIDAD	17
2.10 VACUNAS	19
3.0 ANTECEDENTES HISTORICOS DEL ESTABILIZADOR Y LA INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA	23
III MATERIAL Y EQUIPO	30
IV PRODUCTOS DE ORIGEN BIOLÓGICO	33
V PREPARACION DE SOLUCIONES	37
VI METODOLOGIA	44
VII RESULTADOS	56
VIII ANALISIS ESTADISTICO	59
IX. DISCUSION	79
X. CONCLUSIONES	82
XI. APENDICE	83
XII BIBLIOGRAFIA	93

I. - O B J E T I V O S

- 1).- EVALUAR LA POTENCIA DE LA VACUNA ANTIPOLIOMIELITICA ORAL MONOVALENTE SEROTIPO I (Cepa LS_c2ab) "IN VITRO" SOMETIDA A TRATAMIENTOS DE CONGELACION Y DESCONGELACION EN PRESENCIA Y AUSENCIA DEL AGENTE ESTABILIZADOR CLORURO DE MAGNESIO (MgCl₂).
- 2).- EVALUAR LA CAPACIDAD DE PRESERVACION DEL MgCl₂ A TRATAMIENTOS SUCESIVOS DE CONGELACION-DESCONGELACION EN LA VIABILIDAD DE LOS POLIOVIRUS VACUNALES ATENUADOS.
- 3).- APLICAR LOS CONOCIMIENTOS TANTO TEORICOS COMO PRACTICOS DE LAS SIGUIENTES TECNICAS:
 - A) DESCONGELACION DE CELULAS.
 - B) DISGREGACION CELULAR.
 - C) CULTIVO DE CELULAS DE MAMIFEROS.
 - D) CONSERVACION DE CELULAS (CONGELACION)
 - E) TECNICA DE MICROTITULACION.
- 4).- LLEVAR A CABO LAS PRUEBAS DE POTENCIA DE VACUNAS VIRALES.
 - A) TITULACION DE VIRUS DE REFERENCIA COMO CONTROL DE SENSIBILIDAD DE CELULAS.
 - B) TITULACION DE LAS VACUNAS QUE SE SOMETIERON A LOS DIVERSOS TRATAMIENTOS.
- 5).- RECOPIRAR DATOS CON RESPECTO AL COMPORTAMIENTO DE LA VACUNA ANTIPOLIOMIELITICA QUE SE PRODUCE EN EL I.N.V. Y SUGERIR PRECAUCIONES PARA EL MANTENIMIENTO ADECUADO DE LA VACUNA, EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE UN AGENTE ESTABILIZADOR, ESPECIFICAMENTE EL MgCl₂.

II. GENERALIDADES

2.1 INTRODUCCION.

México es el único País de Latinoamérica que produce la vacuna contra la Poliomiélitis, enfermedad causada por 3 serotipos del poliovirus; epidemiológicamente en este país el serotipo I es el más común.

La importancia de producir esta vacuna radica en proteger a la niñez principalmente y en obstruir la diseminación de la enfermedad en la población en general, evitando así la patogenicidad del poliovirus manifiesta en contra de las neuronas motoras de la médula espinal a las que destruye y atrofia, originando la parálisis subsecuente de los miembros inferiores.

En la ciudad de México, el Instituto Nacional de Virología elabora la Vacuna antipoliomielítica Sabin, en dos presentaciones: la denominada Trivalente que contienen los 3 serotipos del poliovirus, y la denominada Monovalente que contiene exclusivamente el serotipo I del poliovirus, utilizando ambas Cloruro de Magnesio ($MgCl_2$) 1 Molar.

Para garantizar la buena calidad de los preparados inmunogénicos producidos por el I.N.V. existe un Departamento de Control Interno regido en base a Normas estrictas recomendadas por la Organización Mundial de la Salud. Debido a que el producto debe mantenerse congelado, en el Departamento surgió la necesidad de llevar a cabo un estudio para observar la influencia de los procesos de congelación-descongelación sobre la vacuna antipoliomielítica producida, porque se presentan diversos problemas desde su elaboración hasta su distribución como lo son la interrupción del sistema eléctrico o la descomposición de los congeladores.

2.2 HISTORIA:

Aún cuando la Poliomielitis probablemente ha sido un problema infeccioso desde la antigüedad, no se reconoció en toda su amplitud sino hasta en 1789 cuando se describió como una entidad clínica (9,19). Pero la enfermedad de la poliomielitis fue transmitida a un animal (mono) en forma experimental hasta 1909 (9,46).

En 1907, la Técnica de Cultivo de Tejidos sentó sus bases gracias a las experiencias de Harrison, quién demostró que las células cultivadas adecuadamente podían sobrevivir y realizar sus funciones normalmente "in Vitro", cumpliéndose de esta manera los dos postulados fundamentales de cultivo de tejidos que son: La Supervivencia y la Reproducción Celular. En 1916 Peyton Ross y Jones fueron los primeros en realizar preparaciones de células aisladas a partir de tejidos, utilizando tripsina para su preparación (Técnica que actualmente se le denomina Disgregación Enzimática).

En el año de 1930, fallaron los intentos de preparación de Vacunas Monovalentes del serotipo II de Poliovirus a partir de la Médula Espinal de ratones infectados.

En Estados Unidos durante año de 1939, se estableció la Fundación Nacional para Parálisis Infantil con el objetivo de investigar y prevenir esta enfermedad, así como la rehabilitación de los niños afectados, por medio de contribuciones voluntarias.

En 1940 se pensó que la poliomielitis podía estar ocasionada por más de un virus. En 1949, quedó demostrado que existen tres serotipos del agente causal (poliovirus), cada uno de ellos capaz de ocasionar la enfermedad y la parálisis subsiguiente, designados como poliovirus tipo 1, 2 y 3.

Tal descubrimiento significó que la vacuna contra la poliomielitis debería ser preparada conteniendo los tres serotipos del poliovirus.

Morgan demostró que una suspensión de médula espinal de mono conteniendo poliovirus podía ser no infecciosa por tratamiento con formalina y podía inducir la formación de anticuerpos e inmunidad contra la parálisis cuando fue administrada a un mono en forma experimental. (19).

Durante el año de 1949, también se estableció, la metodología mediante la cuál se desarrollan las modernas vacunas virales, trabajo realizado por Enders, Weller y Robins. (19,22). La contribución de los investigadores fué demostrar que el poliovirus podía desarrollarse en cultivo hístico, es decir, se pudiera cultivar in vitro en tejidos de primates de origen no nervioso, proveyendo recursos para preparar grandes cantidades de poliovirus libres de sustancias del Sistema Nervioso Central. Por este descubrimiento recibieron en 1954, el premio Nobel de Medicina y Fisiología. (9,15,16,52).

En el año de 1954, Jonas Salk preparó vacunas de poliovirus inactivados con formol para cada uno de los 3 serotipos, mediante pases repetidos en cultivo de tejido renal de mono. El día 12 de abril de 1955, el Dr. Thomas Francis Field y su grupo de evaluación de Michigan, después de un estudio exhaustivo, informó que la Vacuna de Salk era segura, inocua y eficaz. Debido al empleo masivo de la Vacuna Antipoliomielítica Salk, a partir de 1955 hubo una reducción importante en los casos de parálisis, siendo un ejemplo significativo el de Suecia, donde la poliomielitis parálítica se manifestó por primera vez en forma epidémica y que durante muchos años continuo teniendo las tasas más altas de poliomielitis en el mundo, y gracias al uso de esta vacuna, se logró erradicar la enfermedad (16,35, 52).

Entre 1952 y 1955 se desarrollaron 3 cepas candidatas para Vacunas de Virus Atenuados por los grupos de investigadores de Koprowsky, Cox, Norlon, Jervis, Nelson, Chadwick, Mayer y por el de Sabin empleando el serotipo II, el cuál fué atenuado mediante pases seriados en ratones, así no citopatogénico en cultivo de tejidos de embrión de pollo y mono, fué inoculado en grandes cantidades intracerebralmente en monos sin causar parálisis(19,50). Subsecuentemente, en estudios en placa demostraron que los serotipos del poliovirus no son homogéneos en sus propiedades neurotrópicas (10,15).

Entre 1961 y 1963 la Vacuna de Sabin fué elegida, autorizada para ser administrada masivamente en muchos países del mundo. Debido a pruebas de Campo y a la Introducción comercial, gradualmente fué reemplazando a la Vacuna de Salk o Inactivada (19, 32).

2.3 Agente Etiológico:

Los poliovirus pertenecen al grupo más importante de los patógenos humanos siendo los virus más pequeños, de ahí, el término Picornavirus que se deriva de pico, que significa pequeño, y RNA, que se refiere al tipo de ácido nucleico que constituye este grupo; que existe en tres serotipos estables (9,14).

La fina estructura de los picornavirus continúa siendo objeto de controversia por tener únicamente 20-30 nm. de diámetro. Los estudios de difracción con rayos X indica 60 unidades estructurales y el virión intacto siempre parece como una esfera lisa y no exhibe capsómeros(4,16). La nucleocápside tienen cierta simetría cúbica. El picornavirion contiene cerca del 70% de proteína y 30% de RNA (4).

El poliovirion es un icosaedro desnudo compuesto de 60 unidades idénticas de incrementada complejidad que consiste de cantidades equimolares que comprende cada una 4 proteínas estructurales en orden de decremento del peso molecular, 60 copias de VP_1 y VP_3 , 58 ó 59 copias de VP_2 y VP_4 , y también de 1 a 2 copias de VPo, el precursor desunido de VP_2 y VP_4 . Varios estudios han establecido que VP_1 es la proteína expuesta en la superficie predominantemente; VP_3 , VP_2 están también expuestas, pero a una menor amplitud y VP_4 parece estar interna completamente, en asociación estrecha con el RNA viral el cual tienen un 3' poliadenilato terminal (poli (A) secuencial y un 5'-terminal covalentemente adherido a una proteína Vg, formando el virión final. Carece de 7-Metil guanosina que lleva solo un grupo fosfato (4,14,17,30,47,61).

La composición de VP_1 , VP_2 y VP_3 es muy similar, la cisteína esta siempre presente y ausente en VP_4 . Como una diferencia adicional el N-terminal esta libre en los 3 polipeptidos grandes, y obstruido en VP_4 .

El RNA viral de los poliovirus es pequeño, menor de 50 $m\mu$, de polaridad positiva, en forma de filamento único con peso molecular de 2.6 millones de daltones, esta localizado a un lado de la cápside proteica, completamente protegido del medio. La secuencia del nucleotido completo del RNA viral de los tres serotipos es conocido (14,28,54,56,58,60,61).

Los poliovirus carecen de lípidos esenciales, causan cambios característicos y rápidos en las células que son infectadas por ellos. Por lo cual, los virus son altamente citocidas. Los efectos citopáticos progresan rápidamente, en tal forma que las células afectadas se retraen y desarrollan un aumento en la refractividad (4).

Los poliovirus tienen como único hùésped natural el aparato digestivo del hombre. Sin embargo el chimpancé y los monos son muy susceptibles a la parálisis, después de la inoculación intraespinal o intracerebral, causando lesiones del sistema nervioso, razón por la cuál se usan extensamente como controles en la vacuna (10).

PROPIEDADES FISICOQUIMICAS.

Virus entérico humano, la principal característica distinguible es su resistencia a la inactivación por pH ácido (pH 3.0), al deoxicolato, al eter y a otros solventes orgánicos, a la bilis del contenido intestinal, por carecer de lípidos esenciales, los poliovirus pueden sobrevivir por largos períodos en el drenaje, o aún en agua clorinada, a condición de que haya materia orgánica adecuada para protegerlos (4,9,24).

El virus de la polio es inactivado por agentes físicos como la luz ultravioleta y en general por la desecación. Por agentes químicos como la urea, el formol, concentraciones bajas de cloro, destruido lentamente por el alcohol.

A temperatura ambiente, la infectividad es estable sobre un amplio rango de pH, más o menos de pH 3 a 10. Entre un pH de 3 a 5 solamente de 1 a 3 horas conserva su infectividad. Preservado por congelación. Con una densidad de 1.32 a 1.35 g/ml. en CsCl. (4,22,24). Los poliovirus son estabilizados frente a la inactivación térmica por cationes bivalentes (Ca^{++} y Mg^{++}) en concentraciones molares, entre 4°C y 50 °C . De 1 a 3 horas a 50°C, a 37 °C durante 3 días, a temperatura ambiente (25-28 °C) 21 días. En las temperaturas no permisibles los polipeptidos virales parecen parcialmente bloqueados y degradados. La síntesis de RNA viral es discontinua después de 2 horas de infección y maduración de los poliovirus es inhibida (9,16,18,24).

2.4 ETIOLOGIA Y EPIDEMIOLOGIA:

La poliomiélitis es una enfermedad provocada por un virus que pertenece a la Familia Picornaviridae del Género de los Enterovirus (16). Denominada enfermedad infecciosa aguda cuyo nombre deriva del griego polios, que significa sustancia gris, myelos: médula espinal y el sufijo itis: inflamación, por lo que se le define como una enfermedad que es originada por un poliovirus que determina la inflamación o degeneración de la sustancia gris de las astas anteriores de la médula espinal y consecuentemente, la parálisis con atrofía de los músculos secundariamente interesados.

Desde el punto de vista epidemiológico, la poliomiélitis es una infección viral cosmopolita que se observa en todas las edades pero más frecuentemente en niños menores de 5 años (24). Se presenta en forma de brotes epidémicos, teniendo una alta frecuencia durante los meses de verano y otoño en zonas templadas y durante todo el año en los trópicos donde se considera endémica (24).

La prevalencia del virus está relacionada muy íntimamente con el nivel de vida, frecuente en los grupos socioeconómicos inferiores. Otros factores que intervienen son el clima, hábitos alimenticios y susceptibilidad al desarrollo de la infección. Esta enfermedad es provocada por falta de higiene, ya que una de sus principales fuentes de infección es el fecalismo al aire libre (35).

2.5 MANIFESTACIONES CLINICAS DE LA ENFERMEDAD:

Al quedar expuesta al virus una persona susceptible a la infección puede presentar los siguientes síntomas clínicos:

a).- Forma no Parálitica:

En este caso, las células de las astas anteriores no están intensamente afectadas por el proceso inflamatorio para determinar una verdadera parálisis. Solo existe una debilidad y dolor muscular, faringitis, fiebre, somnolencia, malestar, cefalalgia, rigidez de la nuca, pérdida del apetito, náuseas, vómito, estreñimiento, dolor abdominal. Al presentarse rigidez, dolor en la espalda y en el cuello puede indicar cierto grado de Meningitis Aséptica. El paciente se recupera en una semana y no quedan síntomas residuales (8,9,24,35).

b).- Forma Atáxica:

No hay lesión de las células motrices medulares, pero en la autopsia se encuentran afectados el cerebelo, las columnas de Clarke y los ganglios cerebro-espinales. Esta forma es muy rara, se caracteriza clínicamente por trastornos del equilibrio, incoordinación, ataxia, nistagmo, etc. Esta forma es la más grave y casi siempre fatal, ya que el poliovirus ataca el bulbo del cerebro, donde se encuentran los centros nerviosos que controlan los músculos a cargo de la respiración, por lo que se puede presentar parálisis respiratoria o fallo cardíaco.

c).- Forma Parálitica Espinal o Subcortical:

Esta forma, en la que la neurona motora periférica es la única afectada, y es evidentemente la más común. Esta lesión puede ser temporal o permanente, causa parálisis motora de las piernas y otras partes del cuerpo inervadas por las células afectadas. La manifestación más importante es una parálisis flácida y asimétrica de las extremidades, comenzando con una rigidez muscular.

d).- Forma Parálitica Central:

En esta forma se encuentra afectada la neurona motriz superior, de aquí lo de parálisis espasmódica. Observándose a menudo una exageración muy marcada de los reflejos, convulsiones graves y prolongadas que recuerdan ciertas crisis epilépticas, al estar afectada la neurona cortical.

La ceguera es una manifestación de la poliomielitis, difícil de clasificar, que depende de la neuritis y de la atrofia óptica.

2.6 PATOGENIA Y PATOLOGIA:

Los poliovirus siendo entéricos en su habitat, se pueden difundir por la vía feco-oral en medio subóptimo de higiene o diseminarse directamente de faringe a faringe a través de las secreciones orales. Por lo cual el virus penetra en el organismo humano por el conducto respiratorio y digestivo (aguas contaminadas, deyecciones humanas). El poliovirus tiene un tiempo de incubación de 7 a 14 días. La multiplicación primaria sucede en la bucofaringe y/o en el intestino delgado (en las amígdalas, placas de Peyer y ganglios linfáticos cervicales) (16,19).

Posteriormente el Sistema Nervioso Central es invadido por vía hemática. El poliovirus puede diseminarse a lo largo de los axones de los nervios periféricos hacia el Sistema Nervioso Central, de ahí continuar a lo largo de las fibras de las motoneuronas inferiores para afectar en forma creciente la Médula Espinal o el Encéfalo. Produciendo un proceso de multiplicación intracelular en las células afectadas, que las lesiona o destruye completamente. Se encuentra infiltración de tipo inflamatorio de la sustancia gris de las astas anteriores de la médula, destrucción y después fagocitosis de las neuronas que aquí tienen su sedes, y su sustitución por células del conjuntivo medular (neuroglia). Dado que las neuronas lesionadas constituyen una importante estación intermedia en la transmisión de los impulsos nerviosos a los músculos, se establece sucesivamente la parálisis de estos últimos. En el encéfalo casi siempre son afectados la formación reticular, los núcleos vestibulares, y los núcleos cerebelosos profundos. (16,35).

Además la poliomiелitis puede ocasionar la muerte por falla respiratoria o cardíaca, si el virus invade las células nerviosas de los centros bulbares vitales. Por consiguiente, además de las alteraciones patológicas en el sistema nervioso, puede haber miocarditis, hiperplasia linfática, ulceración de las Placas de Peyer, prominencia de los folículos y aumento de tamaño de los ganglios linfáticos (8,50).

2.7 DIAGNOSTICO DE LABORATORIO DE LA POLIOMIELITIS.

A. MUESTRAS CLINICAS: Líquido Cefaloraquídeo, sangre, heces fecales, raspados rectales, exudados faríngeos, (mantenidos en refrigeración).

B. MUESTRAS POST- MORTEM: Médula espinal, bulbo raquídeo, otros tejidos con lesiones patológicas del S.N.C. y Colon (deben mantenerse en formal 4%).

a).- Aislamiento del virus:

En los pacientes los virus pueden aislarse generalmente a partir de la faringe de 1 a 3 semanas y a partir de raspados rectales y de heces durante 6 semanas o más, ya que existe un elevado título de Anticuerpos en sangre. Las muestras pueden ser inoculadas en cultivo de tejidos de células primarias de mono o líneas celulares humanas, por ejemplo se utilizan el cultivo de riñon de Mono Rhesus (Macacca Mulata), Mono Verde Africano, de Eritrocebus Patas, de Mono Maccacca Vescicularis, riñon embrionario humano, Hela (línea celular derivada de un carcinoma de Cervix Humana), Hep-2C (línea celular derivada de carcinoma de laringe humana), etc., donde es observado el efecto citopático producido por el virus. Con el fin de confirmar que un poliovirus está destruyendo células en un cultivo celular determinado, el agente viral debe neutralizarse mediante antisuero antipoliomielítico específico (basado en la inhibición del efecto citopático).

Otro método es la formación de placas líticas en cultivos. Las placas formadas inducidas por el virus son demostrados como áreas incoloras de células muertas rodeadas por células viables coloreadas al ser teñidas con rojo neutro (22,35).

b).- Líquido Cefaloraquídeo:

Muestra un aumento en el número de leucocitos, generalmente entre 10 y 200/mm³. En la etapa temprana de la enfermedad, la reacción de polimorfonúcleares con respecto a linfocitos es alta, pero a los pocos días la relación se invierte. El contenido de proteínas del líquido cefaloraquídeo está ligeramente elevado (40 a 50 mg/100 ml). (9,22).

c).- Diagnóstico por detección de enzimas virales:

Por ejemplo la detección de proteasa para la Familia Picornaviridae(49).

d).- Post-Mortem:

En los enfermos que fallecen, el virus debe buscarse en los engrosamientos cervical y lumbar de la médula espinal, así como en el bulbo raquídeo y en el contenido del colon. Se debe hacer el examen histopatológico de la médula espinal y de partes del encéfalo.

e).- Dos antígenos específicos de tipo (N y C) se encuentran contenidos en las preparaciones de poliovirus y estos pueden ponerse de manifiesto por reacciones de precipitación y fijación de complemento(24).

f).- Serología:

Se toman dos muestras de suero, al inicio de la enfermedad, y la otra después de 3 a 4 semanas, para demostrar la elevación del título de Anticuerpos. Identificación por medio de los Métodos de Fijación de Complemento y de Neutralización con antisueros específicos. Los tres serotipos comparten antígenos comunes fijadores de complemento pero son distintos en las pruebas de Neutralización y muestran casi una ausencia absoluta de protección cruzada (22,24, 35, 42, 49).

2.8 PREVENCIÓN Y REHABILITACIÓN:

A. PREVENCIÓN

Con la vacunación se pretende crear un estado de inmunidad activa específica capaz de proteger el sistema nervioso central del organismo humano ante una agresión del virus productor de la poliomielitis y por consiguiente de la presentación de las formas paráliticas de la enfermedad, existiendo dos vacunas: La de Salk (poliovirus inactivados) y la de Sabin (poliovirus atenuados) que uniendo su inocuidad y una gran eficacia, al ser usadas en vastísima escala y con ayuda de organismos internacionales por ejemplo la Organización Mundial de la Salud, se ha logrado erradicar la enfermedad en varios países. Una manera más de prevención es tener las condiciones sanitarias higiénicas más adecuadas, y evitar el fecalismo al aire libre, impidiendo la diseminación del poliovirus.

B. TRATAMIENTO DE REHABILITACIÓN:

Es fundamental el reposo absoluto en cama, en un ambiente lo más tranquilo posible. Con respecto a las terapéuticas medicamentosas intentadas, los resultados obtenidos son muy discutible. La más apropiada es la terapéutica física, estabilizada la parálisis es necesario practicar con fines reeducativos, intensas curas físicas (masajes, gimnasia, electroterapia, cinesiterapia, etc) sobre los segmentos afectados con fines de rehabilitación (8,35).

2.9 INMUNIDAD.

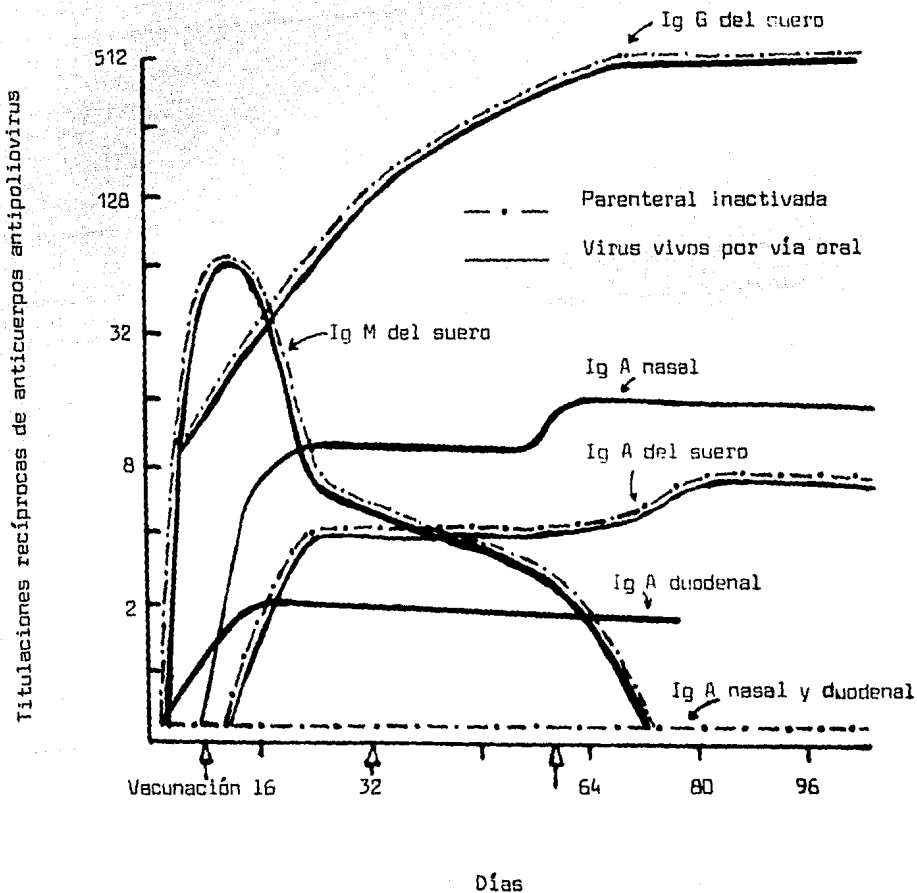
Se obtienen una inmunización activa por medio del uso de las Vacunas Sabin (virus atenuados) ó Salk (virus inactivados) como un medio de prevención, estimulando rápidamente la formación de anticuerpos, que pueden ser detectados desde los 3 días posteriores a la inmunización (19). La inmunidad protectora está correlacionada con la presencia de anticuerpos neutralizantes circulantes para los tres serotipos del poliovirus. La inmunidad para el serotipo que provoco la infección es permanente (19).

El estado inmune de los individuos en la comunidad se establece determinando sus títulos séricos de anticuerpos neutralizantes contra los tres serotipos. El título máximo de anticuerpos por lo general se detectan de 2 a 4 semanas y persisten a concentraciones más bajas por períodos que van de 8 años o más. Después de 5 años de una inmunización primaria, los anticuerpos del serotipo 1 se pueden detectar en un 92 a 98% de la población, del serotipo 2 en 98% y del serotipo 3 de un 84 a 87%(35,43).

La inmunidad pasiva es transferida por la madre hacia los hijos. Los anticuerpos de origen materno desaparecen gradualmente durante los primeros 6 meses de vida (24,35).

Los anticuerpos administrados pasivamente duran sólo de 3 a 5 semanas. La inmunidad pasiva proporcionada por la gama-globulina solo es efectiva para prevenir la parálisis durante un mes, y no tiene el poder de prevenir la infección o la replicación del virus de la poliomielitis en el tubo intestinal (19,24).

El virus presente en el encéfalo y en la médula espinal no es afectado por altos títulos de anticuerpos en la vía hemática (35,43).



Graf. (1) Respuesta de los anticuerpos séricos y secretores a la administración por vía oral de la vacuna de poliovirus vivos atenuados y a la inoculación intramuscular de la vacuna inactivada antipolio (43)

2.10 VACUNAS

PRINCIPALES DESVENTAJAS Y VENTAJAS DE LAS VACUNAS QUE PREVIENEN LA ENFERMEDAD DE LA POLIOMIELITIS

VACUNA SALK:

Trivalente, inactivada con formol, preparada a partir de poliovirus en cultivo de tejido renal de mono. Administrada mediante una serie de inyecciones subcutáneas que comienzan a la edad de 6 meses, y sigue con reactivaciones a intervalos aproximados de 1 mes, 1 año y posteriormente cada 3 ó 5 años. (19). Esta situación conduce a declinar los niveles de inmunidad en la población, considerándose una desventaja, además del costo en producción y para llevar a cabo su administración (35).

Debido a que contienen cantidades detectables de estreptomina y neomicina, existe la posibilidad de que se presenten reacciones de hipersensibilidad en personas susceptibles a estos antibióticos (35).

Para preparar las vacunas de virus muertos se continúa empleando el agente infeccioso virulento y un solo error en el sistema de procedimientos de seguridad podría dar lugar a una adversidad enorme si no es inactivado correctamente.

Los títulos de los anticuerpos resultantes son más altos en el suero, bajos en la mucosa del aparato respiratorio e insignificantes en el aparato digestivo. De acuerdo con esto, los anticuerpos inducidos por la vacuna de Salk tienen poco efecto en la implantación de poliovirus en el intestino, por lo que no se produce inmunidad local. De este modo los poliovirus vacunales pueden continuar multiplicándose en el intestino del vacunado y constituir una fuente de infección para otros individuos.

Aunque los anticuerpos protegen por neutralización contra la parálisis subsecuente si algún poliovirus pasa a la corriente sanguínea. La protección es de un 70 a un 90 % en el caso de los individuos que han recibido la serie completa de inyecciones.

Las ventajas más importantes de la administración de esta vacuna son:

- A. La ausencia del virus vivo en su preparación evita la posibilidad de mutaciones y la aparición de virulencia.
- B. Puede ser administrada a individuos con padecimientos que causan deficiencias inmunitarias, o bajo tratamientos supresores de la inmunidad.
- C. Puede ser combinada con las vacunas contra la difteria, la tosferina y el tétanos (10, 19, 35).

VACUNA SABIN:

Vacuna de poliovirus trivalente , administrada 3 veces a intervalos de 6 a 8 semanas y posteriormente un refuerzo 1 año más tarde, por vía oral. La vacunación primaria induce la formación de anticuerpos contra los tres serotipos en 95% de los receptores y esta inmunidad permanece durante varios años debido a que simula la infección natural por poliovirus (19,32).

Los factores limitantes en el empleo de esta vacuna son principalmente:

- A. La probable mutación retrospectiva a virulencia parcial del serotipo 3 , que puede causar poliomielitis parálitica en los individuos vacunados.
- B. La interferencia. El sistema digestivo del niño puede estar infectado por otros enterovirus en el tiempo en que la vacuna se administra, dichos virus interfieren bloqueando el establecimiento de la infección y por consiguiente de la inmunidad.
- C. La vacuna esta contraindicada en individuos con enfermedades que producen deficiencias inmunitarias, así como entre quienes están sometidos a tratamientos supresores de la inmunidad. (35).

Las principales ventajas son:

- A. Facilidad de la administración por vía bucal en gran escala por personal no necesariamente calificado.
- B. El hecho de que los virus vacunales se multiplican extensivamente en el tracto intestinal y son ampliamente diseminados en la comunidad dando por resultado inmunización secundaria por contacto a una gran proporción de individuos no inmunizados(19,32).
- C. La vacuna induce la formación no solamente de IgG sérica, sino también de IgA local, sintetizada por las células plasmáticas presentes en la pared del intestino, produciendo un estado de resistencia que llega a impedir la propagación del virus en la población.

En consecuencia el niño esta protegido contra la diseminación de los virus por la corriente sanguínea a la médula espinal y contra la multiplicación primaria del poliovirus en el intestino. Por lo cuál frente a una epidemia de poliomyelitis, la vacuna de virus vivo puede fácilmente ser administrada y por la rapidez con que estimula la inmunidad en el individuo detiene dicha epidemia (10, 16, 19, 24, 35, 50).

Aunque es muy claro que cualesquiera de las vacunas cuando se administran a las dosis recomendadas, así como a los intervalos apropiados son eficaces para inducir la inmunidad protectora, contra los serotipos de los poliovirus 1, 2 y 3, que producen un espectro similar de manifestaciones clínicas que van desde la infección asintomática hasta la enfermedad paralítica manifiesta (parálisis asimétrica y flácida de las extremidades con o sin parálisis bulbar)(19).

ANTECEDENTES HISTORICOS DEL ESTABILIZADOR Y LA INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA.

En 1950 se reportó por Adams y Lark que el Fago T₅ se inactiva rápidamente a 37°C en ausencia de cationes divalentes y se estabiliza completamente con CaCl₂ 10⁻³ M ó con MgCl₂ 10⁻² M. (31).

De 1951 a 1954 se estudio por Puck y Garen la importancia de la influencia de cationes divalentes en la colisión eficiente de fagos y bacterias(64)

Pollard (1953) sugirió que la inactivación del poliovirus a altas temperaturas se debe a la desnaturalización de algún componente proteico (11).

Eagle, Fisher y White (1957) hicieron unos estudios, en los que obtuvieron como resultado el conocer la importante función que tienen las diferentes sales en la regulación de la presión osmótica, el pH, así como la temperatura.

La proporción de inactivación para poliovirus reportado por Younger en 1957 fué de tipo exponencial (11).

Entre 1959 y 1960 Mc Laren, Holland y col., comprobaron que los iones Ca²⁺ y Mg²⁺ eran necesarios para la adsorción a células Por Coxsackie (64).

Batchold y col., (1957) demostraron que unos y otros de estos cationes divalentes (Ca y Mg) fomentaban la adición de poliovirus a células, siendo la concentración óptima de 1 mM (64).

Koch en 1960 y posteriormente en 1971 Breindl., concluyeron de sus investigaciones llevadas a cabo que a una temperatura de 47 °C el poliovirus pierde infectividad, la cuál se debe a una alteración de la cápside viral más que a una inactivación del RNA viral. Habiendo una reducción de 3 log 10 en infectividad después de la incubación de poliovirus sin estabilizador por 20 minutos a 47 °C y de 4 log 10 en pH de 10.5 a 40 °C, observandose la influencia del estabilizador y el pH del medio (11,15).

Calculos termodinámicos demostraron que la inactivación de poliovirus por altas y bajas temperaturas se llevan a cabo por diferentes mecanismos sugiriendo que por altas se debe a la desnaturalización de muchas proteínas (Woese, 1960) y para temperaturas menores a un daño causado en el RNA viral (Ginuza y col., 1964) basados en la evidencia de que existen dos antígenos específicos de tipo que se encuentran contenidos en las preparaciones de poliovirus, los antígenos N (nativos) concernientes a la neutralización que se pueden convertir a la forma C (calentados) mediante altas temperaturas y no a menores. La forma N representa partículas completas que contienen RNA y la forma C representa partículas vacías (Dimmock, 1967) (11).

Durante 1961 a 1963 Wallis y Melnick realizaron varios trabajos de investigación, en uno de ellos concluyeron que a altas concentraciones de cationes divalentes estabilizaban a los poliovirus durante períodos razonables a temperaturas de 4°C a 50°C

En 1961 Melnick concluyó que solo virus con simetría cúbica con RNA en su núcleo y libre de lípidos esenciales son estabilizados por Magnesio 1 M., como los enterovirus(63). En otro trabajo en 1962 reportaron que los echovirus y Coxsakievirus son estabilizados por $MgCl_2$ 1 M, $CaCl_2$ 1 M, $NaCl$ 2 M a tratamiento térmicos de 50 °C por 1 a 3 horas, a 37 °C solo el Mg^{2+} y el Ca^{2+} a una concentración 1 M estabiliza a los poliovirus por 3 días y el $NaCl$ a concentraciones mayores de 0.25 M los inactiva a esta temperatura (63).

En 1963 Melnick y Wallis reportaron no haber perdido infectividad en vacunas estabilizados con $MgCl_2$ al someterlas durante 20 días a temperatura ambiente (25 a 28 °C) utilizando cultivos primarios de células de mono Rhesus para evaluar la potencia.

Cuando la vacuna estabilizada con $MgCl_2$ fué almacenada a temperatura ambiente (25 a 28 °C) por 8 horas al día, durante un período de 60 días y colocadas por 16 horas cada día a 4 °C (refrigeración) hubo una pérdida en el título de 0.4 log 10 comparado a 3.9 log 10 de la vacuna sin estabilizar. En 30 días el título desciende solo de 0.1 a 0.5 log 10 a temperatura ambiente en presencia de estabilizador. En los viales sin preservador ($MgCl_2$), existe pérdida significativa de la potencia en 10 días a temperatura ambiente de 0.7 - 1.2 log 10; en 20 días 1.2 - 1.9 log 10; y en 30 días de 2.3 a 2.8 log 10. Almacenada la vacuna a 4°C en presencia del estabilizador ($MgCl_2$) en 12 meses no demuestra pérdida detectable de la infectividad. En ausencia del estabilizador las vacunas en 6 meses decre^{men}tan su infectividad en un 75%. (33,34).

En 1962 Melnick y Wallis reportaron que el cloruro de magnesio aumenta la susceptibilidad de células de riñón de mono a poliovirus atenuados de tipo 1 aumentando la DICT _{50%} en 0.8 log 10 en promedio de la poliovacuna oral en comparación a una poliovacuna sin preservador (33).

Melnick en 1963, Janda y Vonka en 1964 reportaron que una vacuna disminuye 0.5 log 10 su potencia en 30 días con un pH inicial de 6.4, llegando a un pH final mayor de 6.9 en presencia de $MgCl_2$ 1 M. (33).

Ketler y col., en 1962 y Dimmock, J.M. y Tyrell en 1964, comprobaron que la estabilidad en enterovirus es incrementada por altas concentraciones de Mg^{2+} . (11).

En 1967, Dimmock, J.N. sugirió las siguientes posibilidades para explicar la acción del $MgCl_2$, como estabilizador en la poliovacuna de virus atenuados, en base a sus experimentos.

- a). El $MgCl_2$ estabiliza las proteínas virales ya que la conversión del antígeno N fue retardada.
- b). Los iones Mg^{2+} incrementan el enlace entre los componentes protróicos adyacentes.
- c) El $MgCl_2$ protege a los poliovirus mejor en altas que en bajas temperaturas(11).

El poliovirus tratado a un pH alcalino produce un cambio en el polipeptido VP_4 de la cápside (Maizel, y col., 1967; Katagiri y col., 1971; Van Elsen & Boeyé 1966) in vitro (27). Incubaciones de viriones a pH 10.5 (Van Elsen & Boeyé, 1966) o a 56 °C (Breindl, 1971) resulta en liberación de VP_4 y conversión de los viriones en cápsides vacías (54).

Estudios hechos por Breindl (1971), Lonberg-Holm, 1973 concluyeron por medio de análisis de electroforesis en gel de poli(acrilamida), gradientes de sacarosa y por isotopos radioactivos, que el calor causa cambios en la integridad de el polivirion con la pérdida del polipeptido VP_4 de la cápside(5, 6).

La cepa LS_2ab (Sabin) de poliovirus tipo 1 es termo-susceptible debido a dos mecanismos:

- a). Primeramente a una respuesta celular involucrando la liberación de enzimas lisosomales de las células infectadas las cuales degradan el RNA viral.
- b). El otro podría ser el defecto genético de la cepa viral (Fizman, M., 1972). (18).

Lonberg- Holm & Whiteley en 1976, reportaron que el tratamiento con calor o pH "in vitro" inactiva a los poliovirus disminuyendo su infectividad, produciendo pérdida de VP_4 y la liberación de RNA viral de la cápside (6).

Existe información la cual indica que los polipéptidos de la cápside viral estan asociados por interacciones hidrofóbicas y electrostáticas (Ruekert, 1976) (Caliguiri, L.A., 1980) (6).

En 1976 Peetermans y col., reportaron que la Vacuna Antipoliomielítica trivalente Oral Sabin podría mantener su actividad, durante 15 meses a 4°C, al cabo de los cuales observaron una pérdida promedio de 0.2 log 10. Sin embargo utilizaron para realizar las titulaciones cultivo de células renales de mono en tubos, presentando este sistema menor sensibilidad a poliovirus, aproximadamente 1 log 10 en comparación con la obtenida en células Hep-2C observandose el efecto citopático completo y claro(45). Además Peetermans obtuvo pérdidas en título de 0.1, 0.3, 0.5, 1.4 y 2.12 log 10 al someter la vacuna antipolio trivalente a temperaturas entre 20 y 25 °C, durante 1,3,5, 12, y 24 semanas respectivamente (25,45).

Magrath (1976) a una temperatura ambiente reportó una pérdida promedio en título de 1.2 log 10 para el serotipo I de poliovirus en una vacuna trivalente oral (25).

Algunas veces la desnaturalización térmica de una proteína vírica específica, es la causa de la pérdida de infectividad de un virus, y puede estar sujeta a efectos ambientales (31).

En 1979 el Dr. Kado Boli y col., relizaron un estudio sobre la estabilidad de la Vacuna Antipoliomielítica de virus atenuados hacia varias temperaturas, concluyendo que por 6 meses la vacuna mantenida a temperatura de refrigeración (4-10°C) podía sufrir una disminución en su título original hasta de 0.3 log 10 y en ausencia del estabilizador obtuvieron los viales una pérdida en el título de 0.48 log 10 durante los primeros 3 meses. Y a una temperatura ambiente promedio de 22.4 °C la vacuna mostró una pérdida promedio en título de 0.1 log 10 por semana en presencia de cloruro de magnesio 1 M y de 0.2 log 10 por semana en ausencia del estabilizador (25).

En 1980 Caliguero y col., en base a sus resultados sugiere que el ca-

lor y el pH alcalino producen alteraciones físicas irreversibles de la cápside viral por diferentes mecanismos moleculares (6).

Por calentamiento se produce pérdida de RNA viral, VP₄ y varias cantidades de otros polipeptidos estructurales, especialmente VPO (47). Basándose en que la forma antígenica (N) representa partículas completas que contienen RNA asociadas a virus infecciosos y la forma C que representa cápsides vacías, sin RNA asociadas a virus no infecciosos obtenidos después de la exposición al calor o radiación, por álcalis o por ultravioleta. La infectividad está asociada con el antígeno N, responsable de la producción de anticuerpos neutralizantes (37,47,59).

La proteína cinasa o proteína fosfotransferasa está involucrada en la regulación de muchas vías bioquímicas notablemente en la proliferación celular; en la iniciación de la síntesis de proteínas, y en el control del metabolismo celular (Rosen & Krebs, 1981). La proteína cinasa ha sido detectada en un número de virus desnudos (Grubman y col., 1981). Existe evidencia que las cinasas son codificadas por genes virales (Blue & Stubbs 1981) (3,20 54).

La cantidad, tamaño, distribución y proporción de síntesis del RNA producido fue dependiente de la concentración de Mg²⁺, pH y temperatura "in vitro". (Tuschall, M.D. 1982) (61).

Shärli E.C. y col. (1984) estudiaron la actividad de proteínas cinasas virales en la presencia de Mg²⁺ y observaron como el γ - grupo fosforil (P) del ATP es transferido a las proteínas de la cápside viral. Concluyendo que la proteína cinasa asociada a poliovirus, no tienen actividad en ausencia de Mg²⁺, y la actividad óptima de la enzima observada fue a una concentración de 10 mM. de Mg²⁺. El rango de pH de actividad enzimática fue amplio, con un pH óptimo de 8.0 (54).

La exposición de poliovirus a 95 °C por 5 minutos destruye su actividad enzimática. Las proteínas virales fosforiladas "in vitro" son reconocidas por antisueros indicando que la fosforilación no altera los sitios antigénicos (54). La fosforilación de proteínas virales o del huésped pueden jugar un papel importante en la iniciación de la síntesis del RNA viral. Se requiere ATP y una proteína cinasa la cuál une el γ -fosfato de ATP a las proteínas virales de la cápside VP1, VP2 y VP3 (Morrow D.C. 1984) (38).

Teniendo como antecedente que el genoma RNA del poliovirus tiene 7433 nucleótidos poliadenilados en el 3' terminal y covalentemente unido por un enlace fosfodiéster a un residuo de tirosina unido a una pequeña proteína específica del virus Vg (22 aminoácidos) en el 5' terminal (2).

III. MATERIAL Y EQUIPO

Ampolletas

Asa de Platino

Autoclave

Balanza Analítica

Botellas de plástico (Falcon) 75 cm². de superficie, 250 ml.

Bulbos para pipetas

Cámara de Neubauer.

Cajas de Petri.

Centrífuga

Contador de Células

Cubreobjetos

Electrodo de Calomel

Electrodo de Vidrio

Engargoladora Manual

Espátula

Estufa a 37° C

Etiquetas

Filtros Millipore

Fascos con tapón de rosca

Fascos de vidrio de 5 ml.

Gargolas

Gasa

Gradillas para tubos

Jeringa automática Corwall de 10 ml.

Jeringa automática Repette de 2 ml.
Jeringas estériles de 10 ml.
Marcadores
Matraces Erlenmeyer graduados de 125 ml., 500 ml., y 1000 ml.
Membranas millipore de 47 mm. de diámetro, 0.22 µ de poro.
Microscopio Directo
Microscopio Invertido
Microplacas de plástico (Costar) de 96 pozos
Módulo de Flujo Laminar
Pajillas para Nitrógeno líquido
Papel filtro Whatman
Películas adhesivas para microplacas
pH- metro

Pipetas Pasteur
Pipeteros con pipetas de 1 ml. y 2 ml.
Pipeteros con pipetas de 5 ml. y 10 ml.
Pinzas
Pizetas
Probetas de 100 ml., 250 ml., y de 500 ml.
Recipiente para Nitrógeno Líquido (- 196°C)
Refrigerador Doméstico
Revco (Congelador - 70°C)
Soportes para filtros Millipore de 47 mm. de diámetro.
Tapones siliconizados
Termómetro

Tubos de Ensaye 16 x 150

Tubos de Hemolisis

Tubos para Centrifuga

Vasos de precipitados de plástico de 1000 ml.

IV. PRODUCTOS DE ORIGEN BIOLÓGICO

1.- VIRUS

a). Virus de la poliomielitis, cepas Sabin, propagados en cultivos primarios de riñón de mono de la raza Erythrocebus Patas, mantenidos a -70°C , los cuales se usan como Referencia en el Departamento de Control de Vacunas Virales del Instituto Nacional de Virología, Sector Salud. Poliovirus Serotipo I (Cepa LS_c2ab) codificado como: REF. 497/H DICT₅₀ $10^{7.6}$ /ml.

b). Vacuna Antipoliomielítica Monovalente (lote experimental) codificado como V/I/E, para este propósito se llenaron un total de 120 viales de vidrio con 5 ml. cada uno con MgCl_2 y sin MgCl_2 (Vacuna granel 497/H diluido en medio Earle, 0.1% glucosa, NaHCO_3 4.4%).

2.- CELULAS

a). Línea de Células Hep-2Cincinatti, pase 156, línea celular derivada de un carcinoma epitelial de laringe humana que fueron donadas por el DR. A. SABIN y conservadas en un recipiente de Nitrogeno Líquido a la temperatura de -196°C en el Banco de Células del Departamento de Control de Vacunas Virales del I. N.V., Sector Salud.

3. MEDIOS Y REACTIVOS PARA EL CULTIVO DE CELULAS.

Agua desionizada y tridestilada, estéril.

Alcohol etílico absoluto a una concentración final del 70%, utilizado como desinfectante.

Antibióticos: Mezcla de Penicilina G sódica, ampula con 1,000,000 U.I., y ampula con sulfato de estreptomycinina de 1 gr. concentración final 100 U.I. y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$., respectivamente.

Almacenados a -20°C .

Benzal (desinfectante)

Bicarbonato de Sodio (NaHCO_3)

Concentración 4.4%

Almacenado a 4 °C

Cloruro de Magnesio (MgCl_2)

Concentración 2 Molar

Almacenado a 4 °C

Cristal violeta

Concentración 0.1% en 0.1 M de Acido Citrico

Almacenado a temperatura ambiente

Dimetil Sulfóxido ($\text{CH}_3)_2\text{SO}$

Concentración final 7%

Almacenado a temperatura ambiente

Glucosa

Concentración final 1%

Almacenado a 4 °C

Hidrolizado de Lactoálbamina 0.5%

Almacenado a 4 °C

Medio Basal Eagle Diploide

Almacenado a 4 °C

Medio Earle

Almacenado a 4 °C

Rojo de Fenol

Concentración 1 %

Almacenado a temperatura ambiente

Suero de Ternera, codificado como S.T.E./1, obtenido por el M.V.Z. Ruiz F.
por donación del Instituto Nacional de Higiene, Sector Salud.

Almacenado a -20°C

Tripsina (Enzima proteolítica del Pancreas) 1:250

Concentración 5%

Almacenado a -20°C

Verseno al 0,05% en P.B.S. A Diluido

Verseno (E.D.T.A.)

Reguladora de Fosfatos Salina.

Almacenado a temperatura ambiente

P.B.S. (Solución Salina de Fosfatos)

Almacenado a 4°C .

Medios utilizados para la Prueba de Esterilidad

Agar Nutritivo

Agar Tioglicolato

Agar Sabouraud Dextrosa.

V. PREPARACION DE SOLUCIONES

a) Solución de Antibióticos:

Penicilina G sódica comercial (1,000000 U.I.).

Sulfato de Estreptomicina comercial (1gr. = 1,000000 μ gr).

Se diluyen en 10 ml. de agua tridestilada y desionizada, obteniéndose una concentración de 100000 U.I./ ml, y 100000 ug/ml. respectivamente

Posteriormente se toma una alícuota de 1 ml. y se afora a 1000 ml ó

se puede tomar una alícuota de 0.1 ml en 100 ml, obteniéndose una con

centración final de 100 U.I./ ml. de Penicilina y 100 ug/ ml. de Sul-

fato de Estreptomicina, en la mezcla final de antibióticos.

Esterilizar por Filtración por Millipore.

b) Sistema Buffer (bicarbonato de sodio) (NaHCO_3 4.4 %).

NaHCO_3 4.4 gr.

Rojo de Fenol 0.4% 0.5 ml.

Aforar con agua destilada a 100 ml.

Disolver el bicarbonato de sodio en agua destilada y adicionar el indicador, saturar con dióxido de carbono hasta un color rosa claro a un pH aproximado de 7.0.

Esterilización por autoclave a 10 lb/ in², por 15 minutos.

Distribuir en recipientes herméticamente cerrados en condiciones estériles.

c) Cloruro de Magnesio

$\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 406.5 gr.

Agua tridestilada desionizada 1000 ml.

Esterilización por autoclave a 15 lb/ in², por 15 minutos.

d) Cristal Violeta 0.1% en 0.1 M de ácido cítrico.

1. Se prepara una solución de ácido cítrico 0.1 M en agua. P.M. 210.14 gr/ mol. Disolver ácido cítrico 2.1 gr., en agua destilada y aforar a 100 ml.
2. En la solución de ácido cítrico se prepara el cristal violeta al 0.1% 0.1 gr del colorante en 100 ml. de solución.
3. Filtración por papel.

e) Componentes del medio de Mantenimiento:

Earle (gr/ lt).

NaCl	6.8	gr.
KCl	0.4	gr.
CaCl ₂	0.2	gr.
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0.10	gr.
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	0.125	gr.
Dextrosa	1.0	gr.
NaHCO ₃	2.2	gr.
Rojo de Fenol	0.05	gr.

5% CO₂ en aire.

Esterilizar en autoclave 110°C, 20 minutos.

f). Solución del Indicador Rojo de Fenol 1%

(Indicador ácido-base, intervalo de vire pH 6.8 amarillo, pH 8.6 rojo)

Rojo de Fenol	10	gr.
NaOH 1 N	30	ml.
Agua destilada	1000	ml.

Adicionar a una porción de agua el indicador, posteriormente 30 ml. de NaOH 1 N. Agitar de 1 a 2 horas a temperatura ambiente. Aforar a 1000 ml. con agua destilada.

Componentes del medio de crecimiento que se empleó para cultivo celular.

g) Medio Basal Eagle Diploide (gr/ lt).

Aminoácidos

1- Arginina	1.74 gr.	1-Fenil alanina	0.83 gr.
1- Histidina	0.32 gr.	1-Valina	2.00 gr.
1- Lisina	1.46 gr.	Cisteína	0.52 gr.
1 - Leucina	1.32 gr.	Treonina	1.19 gr.
1 - Isoleucina	2.60 gr.	Tirosina	1.18 gr.
1 - Triptofano	0.20 gr.	1-Glutamina	20.00 gr.
1 - Metionina	0.75 gr.		

Vitaminas

Colina	0.14 gr.	Riboflavina	0.035 gr.
Nicotinamida	0.12 gr.	Tiamina	0.340 gr.
Acido Pantotenico	0.20 gr.	Biotina	0.025 gr.
Piridoxal	0.205 gr.	Acido Folico	0.045 gr.

Sales (Earle)

NaCl	6.8 gr.	MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2 gr.
KCl	0.4 gr.	NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	0.15 gr.
CaCl ₂	0.2 gr.	NaHCO ₃	2.00 gr.

Carbohidratos

Glucosa	1.0 gr.
---------	---------

Preparación:

B.M.E.	9.3 gr.
NaHCO ₃	4.4 gr.
Rojo de Fenol (1% Sol. Stock)	0.1 ml.
Agua destilada (aforo)	1000 ml.
Dióxido de Carbono (CO ₂ seco)	5.0 gr.

pH final 7.1- 7.3

Esterilizar en autoclave a 110°C , 20 minutos.

h) Tripsina 5.0%

P.B.S. Solución A. 20 X	50 ml.
Agua destilada	950 ml.
Tripsina 1:250	50 gr.
NaOH 1 N.	pH 7.8

Mezclar P.B.S. 20 X y agua, adicionar el polvo de tripsina, agitar resuspenden y adicionar NaOH 1 N para ajustar el pH a 7.8. Agitar magnéticamente por una hora a temperatura ambiente. Reposar a 4 °C toda la noche. Clarificar por filtración a través de papel filtro Millipore.

i) verseno al 0.05% en P.B.S. (E.D.T.A.).

E.D.T.A.	0.5 gr.
P.B.S. Sol. A 20 X	50.0 ml.
Agua destilada	950.0 ml.
NaOH 1 N	pH 7.5 - 7.7

Diluir el E.D.T.A. en P.B.S. Sol. A, adicionar el agua. Ajustar el pH a 7.5 - 7.7 con NaOH 1 N.

Esterilizar a 110°C, 20 minutos.

j) Mezcla Tripsina-Verseno (Concentración final 0.05% en Verseno)

Solución tripsina 5 % 0.1 ml.

Verseno 0.05% 10.0 ml.

k) P.B.S. (solución salina de fosfatos) (regulador de pH) 20 X

La solución contienen

P.B.S. Sol A

NaCl 160 gr.

KCl 4 gr.

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 28 gr.

KH_2PO_4 4 gr.

Rojo de Fenol 1% 20 ml.

Agua destilada 1000 ml.

Esterilizar por autoclave a 110°C por 20 minutos.

P.B.S. Solución B

CaCl_2 2. gr.

Agua destilada 100 ml.

Esterilizar por autoclave .

Solución C

$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2. gr.

Agua destilada 100 ml.

pH 7.2

Esterilizar por autoclave a 110°C, por 20 minutos.

SUERO DE TERNERA

A).- OBTENCION DEL SUERO:

- a.- La sangre se deja coagular a temperatura ambiente a 37°C.
- b.- Cuando se forma el coágulo, se desprende suavemente del recipiente
- c.- Se centrifuga la sangre durante 10 minutos a 1000 g.
- d.- Inactivar el suero obtenido a 56°C durante 30'
- e.- Etiquetar el suero adecuadamente
- f.- Esterilización del suero por medio de Filtración con Millipore (22µ)
- g.- Realizar la prueba de esterilidad.
- h.- Mantener almacenado en congelación a - 20°C antes de su uso, durante su utilización a 4 °C.

B).- PRUEBA DE ESTERILIDAD:

Sembrar una porción de suero en los siguientes agares:

Agar Nutritivo: Observar Microorganismos aerobios.

Agar Tioglicolato: Observar microorganismos anaerobios.

Agar Sabouraud Dextrose (S.D.A.): Observar Hongos y Levaduras.

C).- PRUEBA DE INHIBIDORES INESPECIFICOS EN SUERO:

a).- Preparar cultivos de células Hep-2C en botellas Falcon.

1).- Uno con 10% de Suero de Referencia (Suero Fetal de Ternera)

2).- Uno con 10% de Suero de Prueba (Suero de ternera).

Observar Macroscopicamente y Microscopicamente. Debe Obtenerse 100% de Confluencia.

J.- TITULACION DEL VIRUS DE REFERENCIA (TECNICA DE MICROPLACA).

- 1.- Diluir el virus de Ref. 497/ H en medio de Mantenimiento.
- 2.- Preparar una microplaca con células Hep-2C con suero de referencia (suero fetal de ternera codificado como S.F.T. 36; Lote:
- 3.- Preparar una microplaca con células Hep2-C con suero de prueba (suero de ternera) , codificado como S.T./1.
- 4.- Inocular las mismas diluciones del virus de Referencia en ambas microplacas, 5 pozos por dilución, 0.1 ml. por pozo.
- 5.- Incubar a 37 °C durante 7 días.
- 6.- Observar los cultivos de células Hep-2 C en microplacas al 7º día al microscopio invertido y calcular el título por efecto citopático. Debe tener como resultado título aceptable del suero de prueba comparado con el del suero fetal de ternera.

VI. METODOLOGIA

A. Experimento:

Irmediatamente se prepararon viales con vacuna conteniendo $MgCl_2$ 1 M y otros viales sin $MgCl_2$, después de obtenerse un resultado satisfactorio en la prueba de esterilidad donde se seleccionaron aleatoriamente de cada grupo 5 viales, se prosiguió a someter las vacunas a los tratamientos de congelación y descongelación como se indica a continuación: 9 viales con $MgCl_2$ y 9 viales sin $MgCl_2$ a un tratamiento de congelación-descongelación y así sucesivamente la misma cantidad de viales a 4, 8, 12 y 16 y 20 tratamientos de congelación-descongelación a una temperatura de $- 26$ °C en promedio y a una temperatura ambiente promedio de 23 °C, respectivamente.

En todos los casos se llevó a cabo un registro adecuado de temperaturas, durante todo el periodo de experimentación.

A las vacunas monovalentes del lote experimental se les determinó el pH al inicio y al final del experimento.

A. MEDIO DE CRECIMIENTO

A.1 SUBCULTIVOS

FORMULACION (Pase Celular) (30 ml. por botella	(75 cm ²).
Medio Eagle	89.79%
Bicarbonato de Sodio 4.4%	0.11%
Suero	10.0%
Antibioticos (Penicilina-Estreptomicina)	0.1%
(100 U.I./ml, 100 ug/ml. respectivamente).	

A.2 MICROPLACAS

Formulación: (5 ml. cada microplaca)	
Medio Eagle	93.79%
Bicarbonato de Sodio 4.4%	0.11%
Suero	6.0 %
Antibioticos (Penicilina 100 U. I/ml, Estreptomicina 100 ug/ml).	0.1 %

A.3 CONGELACION

Medio Eagle	84.79%
Bicarbonato de Sodio 4.4%	0.11 %
Suero	15.00%
Antibioticos (Mezcla Penicilina/Sulfato de Estreptomicina)	0.1 %

B. SOLUCION TRIPSINA- VERSENO.

Solución de Verseno 0.05%	0.05%
Solución de Tripsina 5%	0.05%

C. MEDIO DE MANTENIMIENTO(METODO DE TITULACION)

Earle	99.58%	{	99.4 %
Hidrolizado de Lactoálbumina.			0.5 %
Glucosa			0.1 %
Bicarbonato de Sodio 4.4%			0.22 %
Antibioticos (Penicilina G sódica/ Sulfato de Estreptomicina)			0.1 %

B. TECNICAS:

B.1. DESCONGELACION DE LAS CELULAS Hep-2C (pase 156).

El ámpula que contiene las células en un recipiente de Nitrógeno Líquido a -196°C , se descongela lo más rápidamente posible, sumergiendola en un baño de agua a una temperatura de 37°C , agitandola suavemente, secarla y limpiarla

En un flujo laminar, en condiciones estériles, se procede a abrir la ámpula con una sierra, ambas, previamente desinfectadas con alcohol al 70%.

Extraer el contenido del ámpula con una pipeta de 1 ml. previamente impregnada con medio de crecimiento.

Se mezcla con cuidado el contenido celular con 10 ml. del medio de crecimiento que se encuentra en una botella ;falcón previamente preparado.

Se succiona con la pipeta 1 ml. de medio de crecimiento y se procede a lavar las paredes internas del ámpula descargando esta alícuota en la botella donde se transfirieron las células. ;

Adicionar lentamente el medio hasta obtener un volumen final de 40 ml. previamente medidos en una probeta.

Colocar el tapón de rosca a la botella y efectuar movimientos de vaiven suaves que permitan una distribución homogénea entre el medio y las células. Etiquetar la botella Falcón indicando, identidad de las células, número de pase celular, fecha de la operación.

Transferir la botella al cuarto-estufa de 36.5°C para su incubación.

A las 24 horas de la operación anterior, por la cara opuesta de la botella donde se encuentra la monocapa celular, se descarta el medio que es reemplazado con medio de crecimiento fresco, con el propósito de eliminar el Dimetil sulfóxido y evitar exista la posibilidad de que haya efecto tóxico en las células. Incubar nuevamente a 36.5°C hasta que los cultivos adquieran 100% de confluencia.

B. 2. METODO DE DISGREGACION CELULAR.

Sacar del cuarto- estufa la botella Falcón que contienen las células Hep-2C y observarlas microscópicamente y macroscópicamente, revisando que tengan 100% de confluencia celular.

El medio de crecimiento es decantado por la cara opuesta a la monocapa y con una pipeta que tenga adaptado un bulbo de hule, se adiciona una mezcla tripsina-verseno previamente preparado (precalentada la tripsina a 37°C) en solución salina de fosfatos, pH 7.2, en una proporción de 10 ml/ 150 cm². de superficie de crecimiento, mover en vaiven la botella para cubrir toda la monocapa celular.

La mezcla se deja en contacto con las células durante 10 seg. al término del cuál esta se decanta por la cara opuesta de la monocapa celular.

El cultivo se incuba a 36.5°C con los residuos de la mezcla tripsina-verse no de 5 a 10 minutos. Una vez que las células se han disgregado se resuspenden por pipeteo suave con 10 ml. del medio de crecimiento suplementado con 10% de suero de ternera, correspondiente, formandose una suspensión celular homogénea.

B. 3. METODO DE CONGELACION DE CELULAS Hep-2C COMO TECNICA DE PRESERVACION CELULAR.

Los cultivos 100% confluentes de células Hep-2C en botellas Falcon (175 cm² de superficie de crecimiento) se disgregan de acuerdo al método de disociación o disgregación enzimática descrito anteriormente, y se resuspenden con 10 ml. de medio de crecimiento (utilizando Medio Basal Eagle suplementado con 15% de suero).

Las suspensiones celulares se centrifugan a 60 g. por 10 minutos a 4°C, con el objetivo de eliminar residuos de la mezcla tripsina-verseno, se decanta el sobrenadante y el paquete celular se resuspende con 1.86 ml. del medio de crecimiento previamente preparado.

A continuación las suspensiones celulares se mantienen en refrigeración durante una hora, al término del cual, las células se homogenizan por pipeteo suave, se colocan en un baño de hielo y se adicionan 0.14 ml. de di-metil sulfóxido para obtener una concentración final de 7%.

Finalmente la suspensión se distribuye en ampollitas estériles a razón de 1 ml. en cada una y se sellan a la flama.

Las ampollitas perfectamente rotuladas se colocan en una caja de poliestireno con paredes de 1 cm. de grosor para que la velocidad de descenso de la temperatura sea de 1°C por minuto al colocar la caja en un congelador Revco de - 70°C durante una semana, al término de la cual se transfieren rápidamente a un recipiente especial con Nitrógeno Líquido y se mantiene indefinidamente a una temperatura de - 196°C.

B.4 TÉCNICA DE SUBCULTIVOS:

METODO PARA PREPARAR CULTIVOS DE CELULAS

Hep-2C POR PASES REGULARES.

Los cultivos de células Hep-2C, con 100% de Confluencia se disgregan por el método enzimático anteriormente explicado, obteniéndose una suspensión celular homogénea, la cual se distribuye en botellas Falcón de 175 cm². de superficie de crecimiento en proporción de pase 1:4, adicionando 30 ml. del medio de crecimiento suplementado con 10% de suero manteniendo la relación gas: fluido 9 :1.

Los nuevos cultivos obtenidos se incuban a 36.5°C hasta obtener 100% de confluencia y así tener un número suficiente de cultivos celulares para llevar a cabo el experimento propuesto.

B.5 PREPARACION DE MICROPLACAS:

El cultivo con 100% de Confluencia de células Hep-2C de una botella Falcon de plástico, se disgrega por el método enzimático.

Las células se centrifugan a 60 g. durante 10 minutos a 4°C para eliminar restos de tripsina.

El paquete celular obtenido se resuspende con 10 ml. de medio de crecimiento con pipeteo suave.

Tomar una alícuota de 0.5 ml. de la suspensión celular a la cual se le adiciona un volumen igual del colorante cristal violeta al 0.1% en ácido cítrico 0.1M. Con esto se obtiene una dilución 1:2. Homogenizar bien la mezcla formada y por medio de una pipeta Pasteur llenar la cámara de Neubauer. Hacer un recuento celular de las 4 áreas correspondientes a la cuenta de leucocitos, por medio de un microscopio directo, para determinar la concentración de células por ml. *

En base a la concentración celular obtenida se ajusta a 2.5×10^5 células por ml. con medio de crecimiento suplementado con 6% de suero.

Se siembra con una jeringa automática de 5 ml. una microplaca para cultivo de tejidos, a razón de 0.05 ml por pozo. Se procede a taparlas sin sellarlas.

Se rotula la microplaca indicando, identidad de células, número de pase celular, fecha de la operación y número consecutivo de la microplaca se incuba en el cuarto-estufa a 36.5 °C.

* RECuento CELULAR

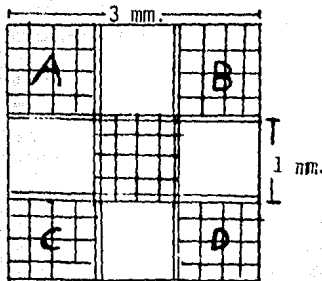


FIG. (2) DIAGRAMA DE LA PAUTA DE LA CAMARA DE NEUBAUER.

Los cuatro cuadrados de la esquina denominados A, B, C, D, en la figura son los empleados para el recuento celular.

- a). N = Número total de células contadas en los 4 cuadros esquinados.
- b). $\frac{N}{4}$ = Número de células en un cuadro esquinado.
- c). 1000 es el factor que transforma la superficie de los mm^2 a volumen en mililitros.
- d). Factor de Dilución (F.D.)
- e). El número total de células/ml. de suspensión celular

$$\frac{N}{4} \times 1000 \times \text{F.D.} \quad \text{para}$$

- f). Obtener la Dilución final de la suspensión celular para la preparación de Microplacas.

$$\frac{N}{4} \times 1000 \times \text{F.D.}$$

Concentración final de la suspensión celular(cel/ml)

B.6. METODO PARA DETERMINAR LA POTENCIA DE LA VACUNA ANTIPOLIOMIELITICA MONOVALENTE SABIN

TECNICA DE TITULACION DEL VIRUS DE LA POLIOMIELITIS POR EL METODO DE MICROENSAYO:

Se seleccionan dos ampollitas que contienen el virus de la poliomielitis denominado de referencia del serotipo 1 codificado como 497/ H, se desinfectan con alcohol etílico al 70%, se abren, se succiona el contenido, el cuál es mezclado para preparar dos series de diluciones decimales de 10^{-1} a 10^{-5} y con intervalos de $0.5 \log_{10}$ de $10^{-5.5}$ a 10^{-9} , en medio de mantenimiento. Los tubos son agitados magneticamente.

A partir de la dilución $10^{-5.5}$, se toman alícuotas de 0.1 ml. de cada dilución de virus a titular y se inocula en cada uno de los 5 pozos de la microplaca en las que previamente se sembraron 0.05 ml/ pozo de suspensión de células Hep-2C, así se continua sucesivamente hasta la dilución 10^{-9} . Se utiliza medio de mantenimiento para los controles. Esta técnica con referencia sirve para observar la susceptibilidad celular hacia los poliovirus.

De la vacuna experimental Monovalente (poliovirus, serotipo 1) preparada previamente y con los tratamientos de congelación y descongelación llevados a cabo, se hacen diluciones decimales de 10^{-1} a 10^{-3} y con intervalos de $0.5 \log_{10}$ de $10^{-3.5}$ a 10^{-7} , en medio de mantenimiento.

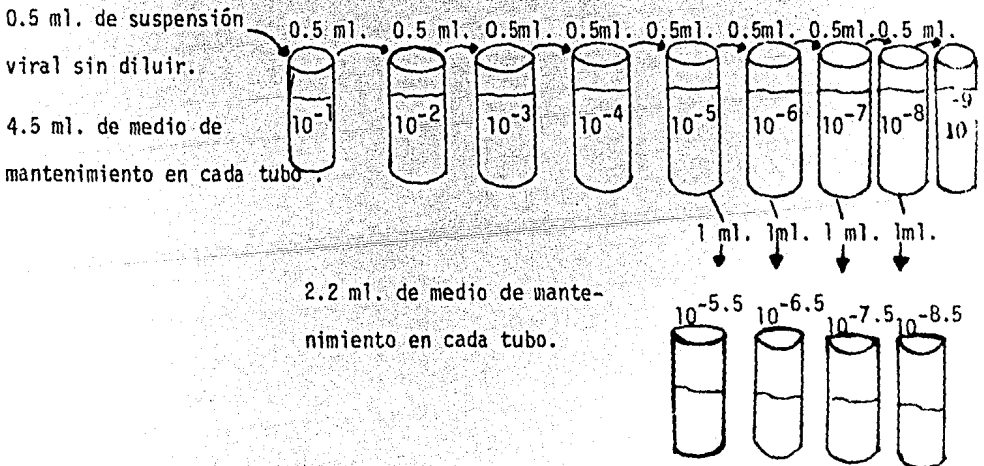
A partir de la dilución $10^{-3.5}$, se toman alícuotas de 0.1 ml. de cada dilución y se inoculan en cada uno de los 5 pozos de la microplaca hasta la dilución 10^{-7} . Se inoculan alícuotas de 0.1 ml. de medio de mantenimiento utilizado como medio de dilución, para el control en 16 pozos.

Las microplacas tanto del virus de referencia como del virus vacunal son

secadas con papel filtro ésteril y selladas con películas de plástico adhesivas, transparentes.

Posteriormente se rotulan con la codificación utilizada para la vacuna experimental y la referencia, respectivamente. Después las microplacas se transfieren al cuarto estufa de 36.5 °C, permaneciendo incubadas durante 7 días, con observación al 6º y 7º día después de la inoculación, en el microscopio invertido para registrar el efecto citopático (E.C.P.) causado por el poliovirus, en el cultivo celular.

Diluciones del virus de referencia (497/H) en medio Earle, hidrolizado de lactoalbúmina, 0.22% de NaHCO₃ y antibióticos (Penicilina 100 U.I./ml.), 0.1% Glucosa.

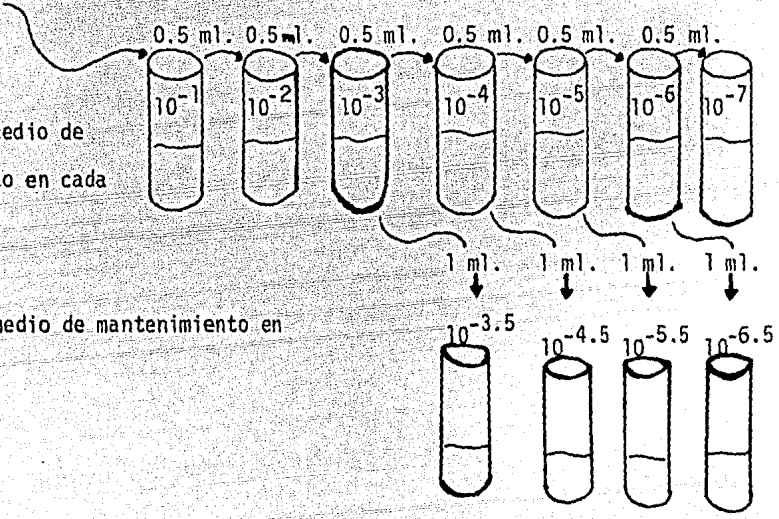


Diluciones del virus vacunal en medio Earle, Hidrolizado Lactoalbumina, 0.22 % de NaHCO_3 , y penicilina (100 U.I./ ml).

0.5 ml. de suspensión viral sin diluir.

4.5 ml. de medio de mantenimiento en cada tubo.

2.2 ml. de medio de mantenimiento en cada tubo.



EL TITULO SE CALCULA EN DOSIS INFECTIVA PARA CULTIVO DE TEJIDOS 50% POR MILILITRO ($DICT_{50}/ml$), POR EL METODO DE SPEARMAN- KARBER PARA DETERMINAR LA POTENCIA DE LAS SUSPENSIONES VIRALES.

$$\log DICT_{50\%} = -\Delta (S - 0.5)$$

m = log. de la dilución que contiene la más alta concentración del virus.

Δ = Diferencia logaritmica entre las diluciones

s = La suma de las proporciones de las respuestas positivas en todas las diluciones

0.5 = Constante que indica $D.L_{50\%}$

CRITERIOS DEL DEPARTAMENTO DE CONTROL INTERNO DE LA VACUNA ANTIPOLIOMIELITICA DEL I.N.V. PARA CONSIDERAR NO VALIDA LA PRUEBA ANTERIORMENTE MENCIONADA.

A. Si el titulo de la vacuna de referencia varía más de 0.5 log con respecto al titulo promedio establecido.

ó

B. La variación entre los diferentes viales de una misma vacuna es mayor de 0.5 log .

VII. RESULTADOS

SUERO

A. PRUEBA DE INHIBIDORES INESPECIFICOS DEL SUERO DE TERNERA

1.- Con ambos sueros se obtuvo un cultivo de células Hep-2C con 100% de Confluencia.

2.- Microplacas:

Referencia 497/H.	DIET. / ml. 50%
SUERO FETAL DE TERNERA	$10^{8.0}$ / ml.
SUERO DE TERNERA	$10^{7.9}$ / ml.

B. PRUEBA DE ESTERILIDAD: RESULTADO SATISFACTORIO (Sin contaminación de microorganismos).

VACUNA ANTIPOLIOMIELITICA ORAL SABIN MONOVALENTE

DEL LOTE EXPERIMENTAL

A. PRUEBA DE ESTERILIDAD: RESULTADO SATISFACTORIO.

C U A D R O I

B. DETERMINACION DEL pH:

	Con $MgCl_2$	Sin $MgCl_2$
pH Inicial:	6.4	6.4
pH Final:	7.4	8.6

CUADRO II

RESULTADOS OBTENIDOS DEL EXPERIMENTO REALIZADO

FACTOR CICLOS CONGELACION DESCONGELACION	FACTOR ESTABILIZADOR	
	EN PRESENCIA DE $MgCl_2$	EN AUSENCIA DE $MgCl_2$
	log DICT $\frac{50\%}{ml}$.	
1	6.35 (4) 6.25 (3) 6.15 (1) 6.05 (1)	5.85 (3) 5.75 (3) 5.65 (2) 5.55 (1)
4	6.15 (3) 6.05 (4) 5.95 (2)	5.45 (3) 5.25 (1) 5.55 (3) 5.65 (2)
8	6.05 (3) 5.95 (2) 5.85 (4)	5.55(2) 5.45 (4) 5.35 (1) 5.25 (2)

C U A D R O I I

datos obtenidos del experimento realizado

FACTOR CICLOS CONGELACION DESCONGELACION	FACTOR ESTABILIZADOR	
	EN PRESENCIA DE $MgCl_2$	EN AUSENCIA DE $MgCl_2$
	log DICT _{50%} /ml	
12	5.95 (1)	5.45 (2)
	5.85 (4)	5.35 (4)
	5.75 (4)	5.25 (2)
		5.15 (1)
16	5.85 (2)	5.25 (2)
	5.75 (3)	5.15 (3)
	5.65 (4)	5.05 (2)
		4.95 (2)
20	5.65 (4)	4.95 (3)
	5.55 (1)	4.85 (3)
	5.45 (3)	4.75 (2)
	5.35 (1)	4.65 (1)

() # de veces que se obtuvo el mismo resultado.

VII ANALISIS ESTADISTICO

CUADRO III

MEDIDAS DE TENDENCIA CENTRAL Y DE ESPARCIMIENTO:

FACTOR CICLOS CONGELACION DESCONGELACION	FACTOR ESTABILIZADOR	
	EN PRESENCIA DE	EN AUSENCIA DE
	Mg Cl ₂ log DICT 50%/ml.	
1	x = 6.26 n=9 σ n-1 = 0.1054 6.16 - 6.36	x = 5.74 n=9 σ n-1 = 0.1054 5.64 - 5.84
4	x = 6.01 n=9 σ n-1 = 0.0781 5.93 - 6.083	x = 5.50 n=9 σ n-1 = 0.1236 5.38 - 5.61
8	x = 5.94 n=9 σ n-1 = 0.0927 5.85 - 6.03	x = 5.4166 n=9 σ n-1 = 0.1236 5.31 - 5.52
12	x = 5.82 n=9 σ n-1 = 0.07071 5.88 - 5.75	x = 5.33 n=9 σ n-1 = 0.1118 5.24 - 5.42
16	x = 5.73 n=9 σ n-1 = 0.083 5.65 - 5.80	x = 5.10 n=9 σ n-1 = 0.113 5.21 - 4.99
20	x = 5.54 n=9 σ n-1 = 0.1166 5.65 - 5.43	x = 4.84 n=9 σ n-1 = 0.1054 4.74 - 4.94

x_G = Media Geométrica

σ n-1 = Desviación Estandard

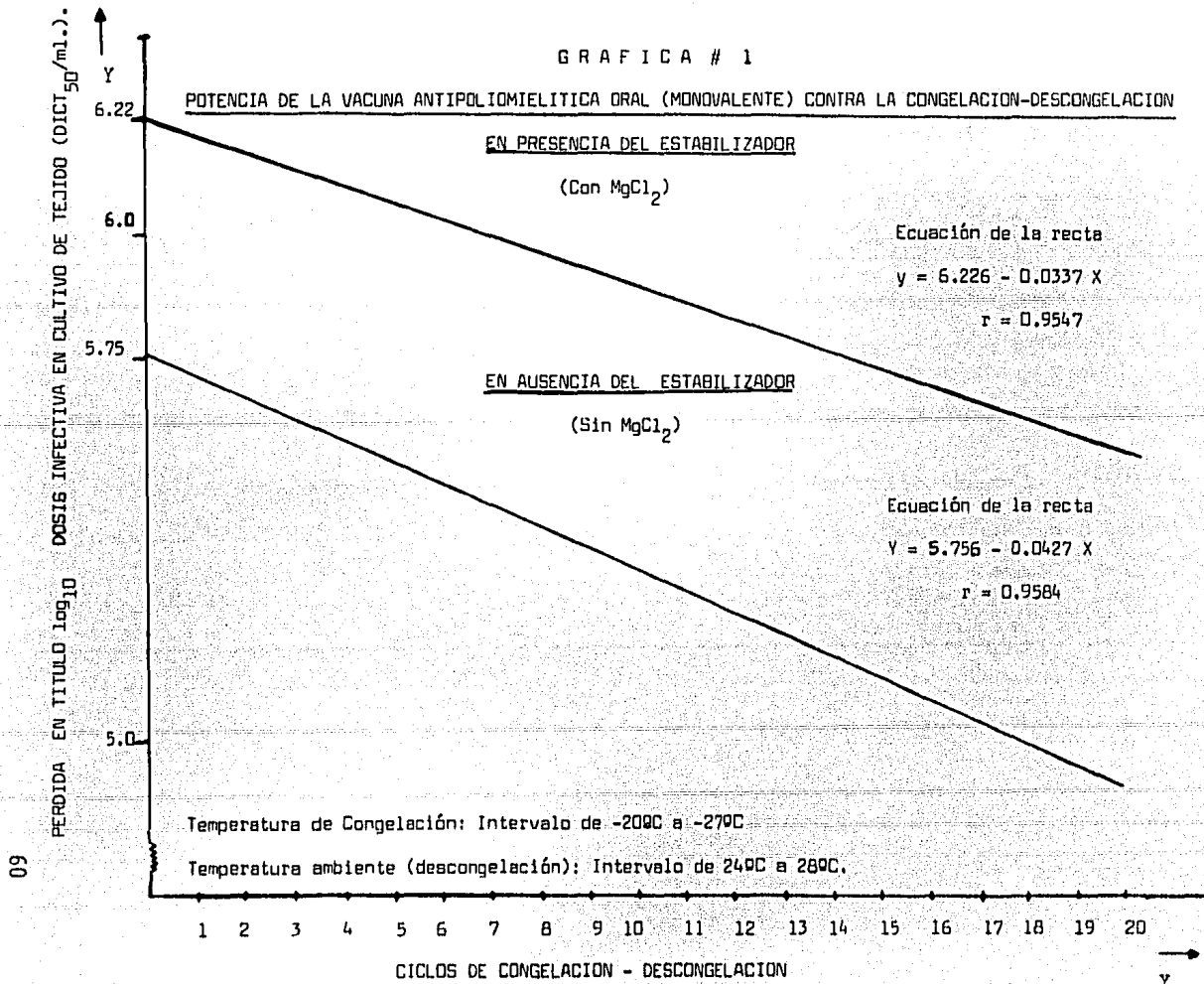
n = Tamaño de la muestra.

CUADRO IV
ANÁLISIS DE REGRESIÓN LINEAL

Factor Estabilizador	Método de Mínimos Cuadrados (Recta - Ajustada)	Coeficiente de Correlación
Presencia de $MgCl_2$	$y = 6.22622 - 0.0337 x$	- 0.9547
Ausencia de $MgCl_2$	$Y = 5.75585 - 0.0427 X$	- 0.9584

GRAFICA # 1

POTENCIA DE LA VACUNA ANTIPOLIOMIELITICA ORAL (MONOVALENTE) CONTRA LA CONGELACION-DESCONGELACION



CUADRO V

RESULTADOS OBTENIDOS INTERPOLANDO EN LA RECTA AJUSTADA EN

PRESENCIA DEL ESTABILIZADOR $MgCl_2$

CICLOS CONGELACION DESCONGELACION	TITULO DE LA VACUNA $\log DICT_{50\%}$	PERDIDA DEL TITULO $\times \log 10$
0	6.226	0 $\log 10$
1	6.193	0.0337 "
2	6.159	0.0674 "
3	6.126	0.1011 "
4	6.092	0.1348 "
5	6.058	0.1685 "
6	6.024	0.2022 "
7	5.990	0.2359 "
8	5.957	0.2696 "
9	5.923	0.3033 "
10	5.889	0.3370 "
11	5.856	0.3707 "
12	5.822	0.4044 "
13	5.788	0.4381 "
14	5.754	0.4718 "
15	5.721	0.5055 "
16	5.687	0.5392 "
17	5.653	0.5729 "
18	5.620	0.6066 "
19	5.586	0.6403 "
20	5.552	0.6740 "

*Límites recomendados por la O.M.S. ($\pm 0.5 \log 10$)

Determinación de Intervalo de Confianza para el valor medio.

En presencia del estabilizador: $Y = 6.226 - 0.0337 X$

1. Nivel de Confianza $\delta = 95\%$

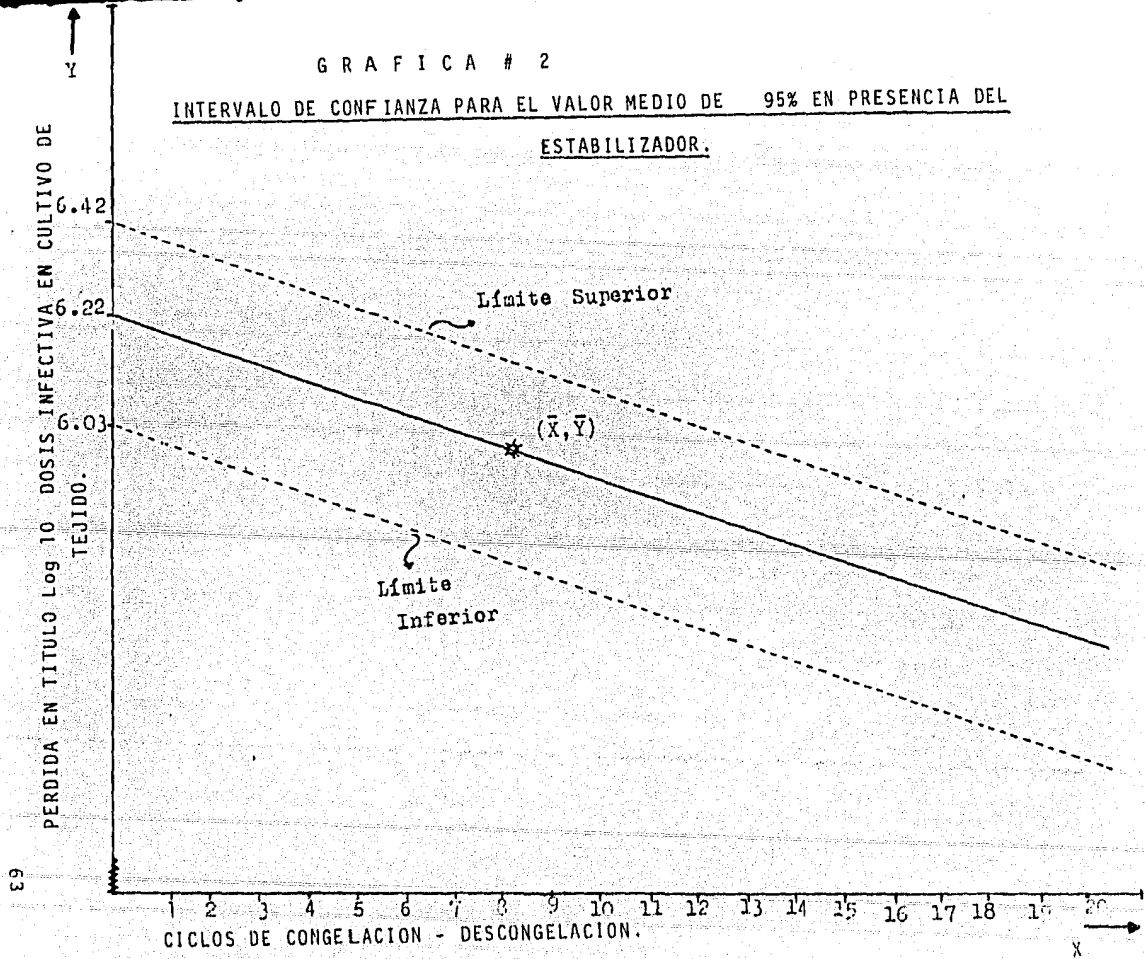
2. $F(C) = 0.975$ $n=54$ $g.l. = 52$ $F(z) = 2.01$

3. SX^2 SXY SY^2 C.R. q
 2347.5 -81.86 3.33 -0.034 25.815

X	h	k	<u>Intervalo de Confianza (95%).</u>		
			Límite Inferior	-	Límite Superior
0	0.1391	0.1975	6.03	-	6.42
1	0.1385	0.1966	5.99	-	6.39
4	0.1372	0.1948	5.89	-	6.29
8	0.1362	0.1934	5.76	-	6.15
12	0.1361	0.1933	5.63	-	6.01
16	0.1370	0.1946	5.49	-	5.87
20	0.1389	0.1972	5.35	-	5.75

GRAFICA # 2

INTERVALO DE CONFIANZA PARA EL VALOR MEDIO DE 95% EN PRESENCIA DEL ESTABILIZADOR.



CUADRO VI

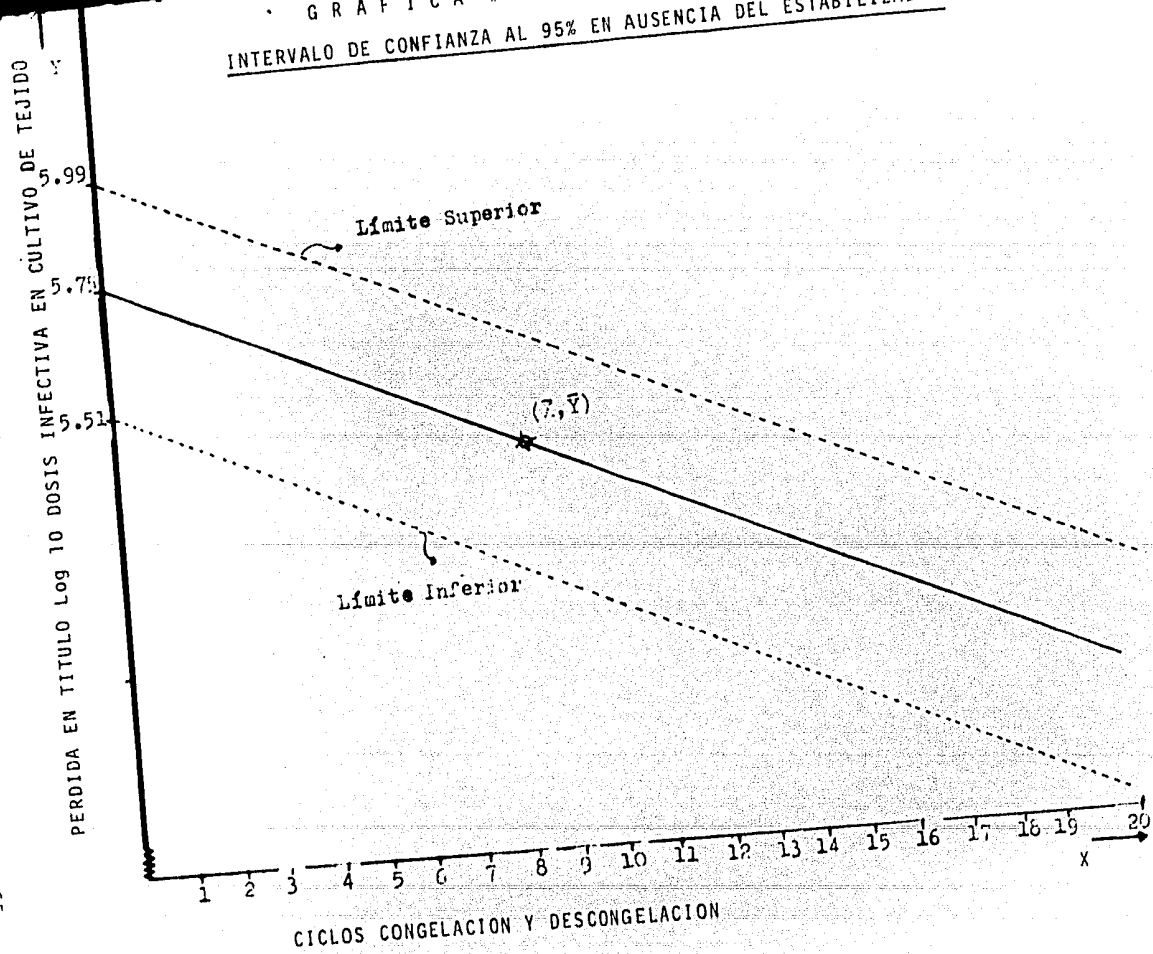
RESULTADOS OBTENIDOS INTERPOLANDO EN LA RECTA AJUSTADA EN

AUSENCIA DEL ESTABILIZADOR MgCl₂

CICLOS CONGELACION DESCONGELACION	TITULO DE LA VACUNA log DICT _{50%} /ml.	PERDIDA DEL TITULO x log 10
0	5.755	0 log 10
1	5.713	0.0427 "
2	5.670	0.0854 "
3	5.628	0.1281 "
4	5.586	0.1708 "
5	5.542	0.2135 "
6	5.499	0.2562 "
7	5.457	0.2989 "
* 8	5.414	0.3416 "
9	5.372	0.3843 "
10	5.329	0.4270 "
11	5.286	0.4697 "
12	5.243	0.5124 "
13	5.201	0.5551 "
14	5.158	0.5978 "
15	5.115	0.6405 "
16	5.073	0.6832 "
17	5.030	0.7259 "
18	4.988	0.7686 "
19	4.945	0.8113 "
20	4.902	0.8540 "

* Formación de un precipitado blanco causado por los ciclos de congelación
descongelación,

GRAFICA # 3
INTERVALO DE CONFIANZA AL 95% EN AUSENCIA DEL ESTABILIZADOR.



CICLOS CONGELACION Y DESCONGELACION

Determinación de Intervalo de Confianza para el valor medio.

En ausencia del estabilizador: $Y = 5.755 - 0.0427 X$

1. Nivel de Confianza $\alpha = 95\%$

2. $F (C) = 0.975$ $n = 54$ $g.l. = 52$ $F (Z) = 2.01$

3. SX^2 $S XY$ $S Y^2$ C.R. q
 2347.5 -100.45 5.048 -0.04279 39.74

X	k	h	<u>Intervalo de Confianza (95%)</u>		
			Límite Inferior - Límite Superior		
0	0.244	7.20	5.51	-	5.99
1	0.243	7.23	5.47	-	5.96
4	0.241	7.29	5.34	-	5.83
8	0.239	7.35	5.17	-	5.65
12	0.239	7.35	5.00	-	5.48
16	0.240	7.32	4.83	-	5.31
20	0.244	7.20	4.66	-	5.15

GRAFICA # 4

PERDIDA EN TITULO (X log 10) CONTRA LOS TRATAMIENTOS DE CONGELACION

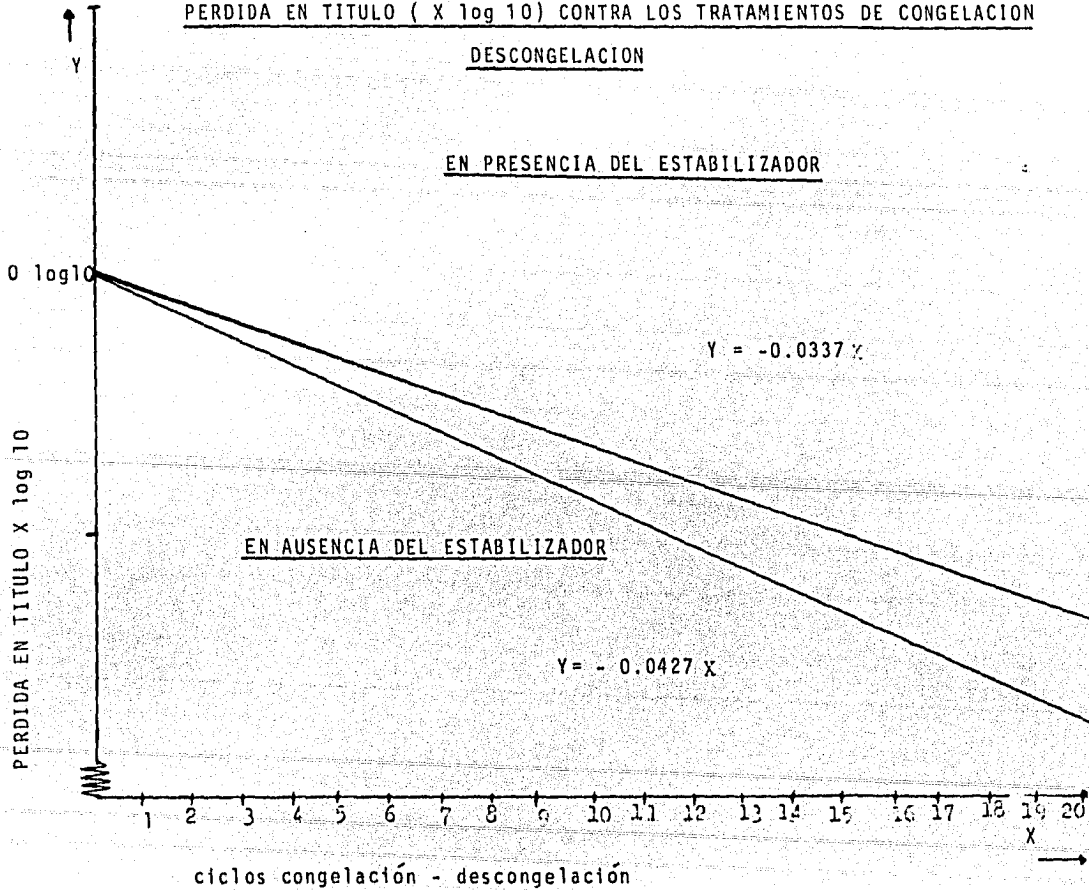
DESCONGELACION

EN PRESENCIA DEL ESTABILIZADOR

$$Y = -0.0337 X$$

EN AUSENCIA DEL ESTABILIZADOR

$$Y = -0.0427 X$$



Análisis de Covarianza
(Comparación de 2 rectas)

	Grados de libertad G.L.	Suma Cuadratica S.C.	Media Cuadratica M.C.
Con Mg Cl ₂	52	0.465	0.009
Sin MgCl ₂	52	2.017	0.039
Suma	104	2.482	0.048
Global	105	2.624	0.190
Recta Común	106	10.304	0.286

Distribución F

Factor	F _v	F _c	Probabilidad
Pendientes	0.231	< 5.94	< 0.05
Ordenadas al origen	0.231	< 307.52	< 0.001

Decisión: Se rechaza H₀

Se acepta H_A

H₀: Las pendientes y las ordenadas al origen de las rectas son iguales.

H_A: Las pendientes y las ordenadas al origen de las rectas no son iguales.

Conclusión Estadística:

Las pendientes y la ordenadas al origen son diferentes, por lo tanto el efecto causado por los ciclos de congelación-descongelación es diferente en cada una de las rectas, en presencia y ausencia del estabilizador, por lo que el efecto es independiente en cada una de estas rectas.

Análisis de Diseños de Comparaciones Pareadas

Frecuencia Congelación- Descongelación	Tratamiento A	Tratamiento B	Diferencia
	Con estabilizador	Sin estabilizador	
	X log 10		
0	6.226	5.755	-0.471
1	6.193	5.713	- 0.48
2	6.159	5.670	-0.489
3	6.126	5.628	- 0.498
4	6.092	5.586	- 0.506
5	6.058	5.542	- 0.516
6	6.024	5.499	- 0.525
7	5.990	5.457	- 0.533
8	5.957	5.414	- 0.543
9	5.923	5.372	- 0.551
10	5.889	5.329	- 0.56
11	5.856	5.286	- 0.57
12	5.822	5.243	- 0.579
13	5.788	5.201	- 0.587
14	5.754	5.158	- 0.596
15	5.721	5.115	- 0.606
16	5.687	5.073	- 0.614
17	5.653	5.030	- 0.623
18	5.620	4.988	- 0.632
19	5.588	4.945	- 0.641
20	5.552	4.902	- 0.650

Diferencia media $\bar{d} = - 0.560476$

Desviación estándar de las diferencias:

$$Sd = 0.0555$$

Hipótesis:

a) Nula

$$H_0: \mu \bar{D} = 0$$

b) Alternativa

$$H_A: \mu \bar{D} \neq 0$$

Estadística de Prueba:

$$t = -46.243139$$

Error estándar de la diferencia media

$$SD = 0.0121213$$

Decisión: Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Valor crítico de T = 1.7247

n-1 = grados de libertad

Distribución T de Student

T cal. T crit.

$$-46.243139 < 1.7247$$

Decisión: Se rechaza la hipótesis nula

Se acepta la hipótesis alternativa.

Conclusiones:

- a) Existe una diferencia significativa de la vacuna en presencia del estabilizador en título en comparación con la vacuna sin éste, en función de los efectos originados por los ciclos de congelación-descongelación.
- b). La vacuna con estabilizador es más eficaz que la vacuna que no lo tiene,

CUADRO VII

ANALISIS DE CORRELACION NO LINEAL:

FACTOR ESTABILIZADOR	CURVA EXPONENCIAL AJUSTADA	COEFICIENTE DE CORRELACION
PRESENCIA DE $MgCl_2$	$Y = 6.23169 e^{-5.72 \times 10^{-3} X}$	- 0.9578
AUSENCIA DE $MgCl_2$	$Y = 5.7695 e^{-8.09548 \times 10^{-3} X}$	- 0.9540

C U A D R O VIII

RESULTADOS OBTENIDOS INTERPOLANDO EN LA CURVA EXPONENCIAL

EN PRESENCIA DEL ESTABILIZADOR MgCl₂

CICLOS CONGELACION DESCONGELACION	TITULO DE LA VACUNA log DICT _{50%}	PERDIDA DEL TITULO X log 10
0	6.232	0 log 10
1	6.196	0.0355 "
2	6.161	0.0709 "
3	6.126	0.1060 "
4	6.091	0.1410 "
5	6.056	0.1757 "
6	6.021	0.2102 "
7	5.987	0.2446 "
8	5.953	0.2787 "
9	5.919	0.3127 "
10	5.885	0.3465 "
11	5.852	0.3800 "
12	5.818	0.4134 "
13	5.785	0.4466 "
14	5.752	0.4796 "
15	5.719	0.5124 "
16	5.687	0.5450 "
17	5.654	0.5774 "
18	5.622	0.6097 "
19	5.589	0.6418 "
20	5.558	0.6736 "

CUADRO IX

RESULTADOS OBTENIDOS INTERPOLANDO EN LA CURVA EXPONENCIAL

EN AUSENCIA DEL ESTABILIZADOR $MgCl_2$

CICLOS CONGELACION DESCONGELACION	TITULO DE LA VACUNA log DICT 50%	PERDIDA DEL TITULO $\times \log 10$
0	5.769	0 $\log 10$
1	5.723	0.0472 "
2	5.677	0.0927 "
3	5.631	0.1384 "
4	5.586	0.1838 "
5	5.540	0.2289 "
6	5.496	0.2735 "
7	5.452	0.3178 "
8	5.508	0.3618 "
9	5.364	0.4054 "
10	5.321	0.4486 "
11	5.278	0.4916 "
12	5.235	0.5341 "
13	5.193	0.5763 "
14	5.151	0.6182 "
15	5.110	0.6597 "
16	5.068	0.7009 "
17	5.027	0.7418 "
18	4.987	0.7823 "
19	4.947	0.8225 "
20	4.907	0.8625 "

C U A D R O X

DISEÑO FACTORIAL

$2 \times 6 = 12$

REPLICACIONES = 9 viales

FACTOR CICLOS CONGELACION DESCONGELACION	FACTOR ESTABILIZADOR		
	EN PRESENCIA DE $MgCl_2$	EN AUSENCIA DE $MgCl_2$	
1	$X_{c1p} = 56.35$	$X_{c1a} = 51.65$	$X_{c1} = 108$
4	$X_{c4p} = 54.55$	$X_{c4a} = 49.55$	$X_{c4} = 104.1$
8	$X_{c8p} = 53.45$	$X_{c8a} = 48.75$	$X_{c8} = 102.2$
12	$X_{c12p} = 52.35$	$X_{c12a} = 47.95$	$X_{c12} = 100.3$
16	$X_{c16p} = 51.55$	$X_{c16a} = 45.95$	$X_{c16} = 97.5$
20	$X_{c20p} = 49.85$	$X_{c20a} = 43.55$	$X_{c20} = 93.4$
	$X_{.p} = 318.10$	$X_{.a} = 287.4$	$X_{c.} = 605.5$
	$X_{.p} X_{.a} = 605.5$		

OBSERVACIONES: 108

CUADRO XI
DISEÑO FACTORIAL .

FACTOR CICLOS CONGELACION DESCONGELACION	FACTOR ESTABILIZADOR		
	EN PRESENCIA DE $MgCl_2$	EN AUSENCIA DE $MgCl_2$	
1	$\chi^2_{c1p} = 352.9025$	$\chi^2_{c1a} = 296.5025$	$\chi^2_{c1} = 649.405$
4	$\chi^2_{c4p} = 330.6825$	$\chi^2_{c4a} = 272.9225$	$\chi^2_{c4} = 603.605$
8	$\chi^2_{c8p} = 317.5025$	$\chi^2_{c8a} = 264.1625$	$\chi^2_{c8} = 581.665$
12	$\chi^2_{c12p} = 304.5425$	$\chi^2_{c12a} = 255.5425$	$\chi^2_{c12} = 560.085$
16	$\chi^2_{c16p} = 295.3235$	$\chi^2_{c16a} = 234.7025$	$\chi^2_{c16} = 530.025$
20	$\chi^2_{c20p} = 276.2225$	$\chi^2_{c20a} = 210.8225$	$\chi^2_{c20} = 487.045$
	$\chi^2_{.p} = 1877.175$	$\chi^2_{.a} = 1534.655$	
	$\chi^2_{.p} \chi^2_{.a} = 3411.83$		$\chi^2_{c.} = 3411.83$

C U A D R O XII

DISEÑO FACTORIAL

ANALISIS DE LA VARIANZA

FACTOR	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA CUADRATICA	MEDIA CUADRATICA (SC/GL)
	G.L.	S.C.	M.C.
ESTABILIZADOR	1	8.7268	8.7268
CICLOS	5	7.2505	1.4501
INTERACCION	5	0.1393	0.0278
ERROR EXPERIMENTAL	96	0.9888	0.0103
TOTAL	107	17.1054	

C U A D R O XIII

DISTRIBUCION F

FACTOR	FC	FT (NIVEL DE SIGNIFICANCIA 0,05)
ESTABILIZADOR	847.21	> 3.94 (1,100)
CICLOS	140.77	> 2.30 (5,100)
INTERACCION	2.70	> 2.30 (5, 96)
		* Contrastes lineales

CONCLUSIONES DEL ANALISIS ESTADISTICO

INTERACCION: (FACTOR ESTABILIZADOR Y FACTOR TRATAMIENTOS DE CONGELACION-DESCONGELACION).

Ho: No existe interacción entre el estabilizador y los tratamientos de congelación-descongelación que afecte la potencia de la vacuna.

HA: Existe interacción entre el estabilizador y los tratamientos de congelación-descongelación, que afecta la potencia de la vacuna.

DECISION: Se rechaza Ho; Se acepta HA; con un nivel de significancia de 0.05

CONCLUSION: La potencia de la vacuna depende en pequeña proporción de la interacción que existe entre el estabilizador y los tratamientos de congelación-descongelación .*

FACTOR ESTABILIZADOR:

Ho: La potencia de la vacuna no es afectada solo por el estabilizador.

HA: La potencia de la vacuna depende solo del efecto del estabilizador.

DECISION: Se rechaza Ho; Se acepta HA; con nivel de significancia de 0.05

CONCLUSION: La potencia de la vacuna depende del efecto del estabilizador en gran proporción, ya que esta se ve disminuida en ausencia del estabilizador.

FACTOR CICLOS O TRATAMIENTOS DE CONGELACION-DESCONGELACION.

Ho: La potencia de la vacuna no depende solamente de los tratamientos de congelación-descongelación.

HA: La potencia de la vacuna esta afectada solamente por los tratamientos de congelación-descongelación.

DECISION: Se rechaza Ho; con nivel de significancia de 0.05 y se acepta HA.

CONCLUSION: La potencia de la vacuna es afectada por los tratamientos de congelación-descongelación en menor proporción comparado con el efecto producido por el estabilizador.

I X. D I S C U S I O N

Entre los factores más importantes que influyen en la estabilidad y en consecuencia de la potencia de la vacuna antipoliomielítica de virus atenuados (Sabin) se encuentran, las condiciones de almacenamiento y las de su manejo durante su distribución para llevarse a cabo las campañas de inmunización de la población. La temperatura a la cual se almacena o se maneja la vacuna determinará que la potencia del inmunógeno se preserve o se vea afectada la actividad biológica de este, en consecuencia la pérdida de infectividad ocasionando la disminución de la potencia y tenga que ser eliminado al no encontrarse el título dentro de los límites de aceptabilidad $\pm 0.5 \log_{10}$ recomendados por la Organización Mundial de la Salud. Así podría influir a través de la cadena fría desde la elaboración de la vacuna hasta su utilización, variaciones en las condiciones de su mantenimiento como son congelación y descongelación del producto biológico, tratamiento que repetidamente puede deteriorar la viabilidad de las partículas virales provocando en el preparado inmunológico una disminución en su título y en consecuencia sea ineficaz como un medio de prevención, no estimulando la formación de anticuerpos para la protección del individuo contra la enfermedad de la poliomielitis.

Los títulos obtenidos para evaluar la potencia de la vacuna son expresados en términos de log base 10 D.C.T._{50%} y no en partículas virales viables por mililitro debido a que permite el fácil manejo para el adecuado análisis de datos.

De la gráfica obtenida (1) al realizar un análisis de regresión por medio del coeficiente de correlación de 0.9578 para la vacuna con

$MgCl_2$ y de 0.9584 sin éste, se observa que la disminución en título es de tipo exponencial, aunque semejante a esto también sigue una trayectoria lineal como lo podemos demostrar por su coeficiente de correlación de 0.9578 en presencia del estabilizador y en ausencia de éste de 0.9540. En base a lo anterior se llevó a cabo el cálculo de valores intermedios de los experimentales por medio de la curva graficada.

Así también la vacuna mostró una pérdida promedio en título de 0.0355 log 10 para cada uno de los tratamientos de congelación-descongelación en presencia del estabilizador 1 M en comparación con la vacuna que no lo contienen que tienen un valor de 0.0427 log 10 en las mismas condiciones, existiendo una diferencia de 0.0072 log 10. Con estos resultados se observa que la velocidad de inactivación de la vacuna de poliovirus es mayor sin el estabilizador que conteniendo este.

Con respecto a la pérdida significativa en el título con un pH final de 7.4 determinado en el experimento, a 20 ciclos de congelación descongelación en presencia de cloruro de magnesio se puede explicar probablemente en base a lo reportado a que se debe evitar que el pH ascienda sobre 7.0 si la vacuna ha sido estabilizada con $MgCl_2$, ya que a este pH disminuye el efecto estabilizador de la sal. El pH óptimo para el $MgCl_2$ actúa como estabilizador térmico es el intervalo de pH de 6.4 a 6.8 en viales herméticamente cerrados (34,35).

En el experimento se sometió a la vacuna monovalente a congelar y descongelar varias veces produciendo cambios bruscos afectando las propiedades físicoquímicas de la vacuna pasando de un estado físico sólido a un estado líquido varias veces consecutivas, sobre un producto biológico que

podría transformarlo en ineficaz, no conteniendo las partículas virales viables necesarias para producir una respuesta inmune apropiado contra este tipo de virus.

Si se analiza detenidamente la gráfica (1) correspondiente a la vacuna con $MgCl_2$ en comparación a la vacuna sin éste, expuesta a tratamientos de congelación-descongelación, se observa que las rectas calculadas interceptan al eje de las ordenadas en un punto diferente, ambas, teniendo a 0 tratamientos un título mayor con $MgCl_2$, y esto es debido posiblemente a la formación de agregados de virus o adsorción de virus a las paredes del recipiente, favorecida por la ausencia del preservador y la temperatura ambiente en que se llevo a cabo su preparación según lo reportado por el Dr. Kado B. en 1979(25).

En la vacuna antipoliomielítica monovalente tipo 1 en presencia del estabilizador se observa una pérdida de infectividad en su título original de 0.5 log 10 en 12 tratamientos de congelación-descongelación, variación que se encuentra dentro de los límites de confiabilidad, intervalo que garantiza la efectividad del biológico desde el punto de vista de su inmunogenicidad. En comparación con la vacuna sin el preservador, se encuentra este límite interpolando en la gráfica en un tratamiento de congelación - descongelación y se observó la formación de un pequeño precipitado blanco en 8 tratamientos de congelación - descongelación.

X. CONCLUSIONES

1. LA PERDIDA DE LA POTENCIA DE LA VACUNA ANTIPOLIOMIELITICA SE VE INFLUENCIADA PRINCIPALMENTE POR LA PRESENCIA O AUSENCIA DEL ESTABILIZADOR, SIENDO SENSIBLE PARTICULARMENTE A LOS TRATAMIENTOS DE CONGELACION Y DESCONGELACION, AMBOS FACTORES INDEPENDIENTEMENTE EN EL EFECTO QUE PRODUCEN EN LA PERDIDA DE INFECTIVIDAD DEL INMUNOGENO.
2. EL PRODUCTO BIOLÓGICO EN AUSENCIA DEL ESTABILIZADOR SIEMPRE DEBE MANTENERSE CONGELADO A UNA TEMPERATURA CONSTANTE (-20°C) HASTA SU USO, PARA PRESERVAR SU POTENCIA.
3. EL AGENTE ESTABILIZADOR (MgCl_2) UTILIZADO POR EL I.N.V. TIENE UNA BUENA CAPACIDAD DE PRESERVACION EN LA VACUNA ANTIPOLIOMIELITICA MONOVALENTE TIPO UNO, CUANDO SE SOMETE A TRATAMIENTOS DE CONGELACION-DESCONGELACION.
4. CON EL FIN DE QUE LAS PERSONAS NO SEAN INMUNIZADAS CON UN PRODUCTO IMPOTENTE SE DEBE EVITAR UN MANEJO INADECUADO ANTES DE SU ADMINISTRACION, COMO LO ES CONGELAR Y DESCONGELAR VARIAS VECES UNA VACUNA.
5. LAS CADENAS FRIAS DEBEN TENER UN EXCELENTE MANTENIMIENTO PARA EVITAR CONGELAR Y DESCONGELAR UNA VACUNA Y PROVOCAR LA DISMINUCION DE LA VIABILIDAD DE LAS PARTICULAS VIRALES.

X1. APENDICE

FORMULAS UTILIZADAS EN EL ANALISIS ESTADISTICO

MEDIA GEOMETRICA

$$G = \sqrt[N]{(X_1)(X_2)(X_3)\dots(X_N)}$$

$$\log G = 1/N \sum_{j=1}^N \log X_j$$

G = antologaritmo X

(Spiegel, R.M., 1973).

DESVIACION STANDARD DE LA MUESTRA

La variancia de la muestra se representa como S^2 que esta definida por la fórmula:

$$S^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{j=1}^n (X_j - \bar{X})^2$$

A la raíz cuadrada de S^2 se le denomina desviación standard (S) de la muestra definida como una medida de esparcimiento o variación de los valores de la muestra.

COEFICIENTE DE CORRELACION

$$r = \frac{\sum XY}{(\sum X^2)(\sum Y^2)}$$

(Spiegel, R.M., 1973; Kreyszig E. 1978).

AJUSTE POR EL METODO DE MINIMOS CUADRADOS

La recta de aproximación por mínimos cuadrados del conjunto de los puntos $(X_1, Y_1), (X_2, Y_2) \dots (X_N, Y_N)$ tiene la ecuación:

$$Y = a_0 + a_1 X$$

donde las constantes a_0 y a_1 se determinan mediante el sistema de ecuaciones:

$$\sum Y = a_0 N + a_1 \sum X$$

$$\sum X \cdot Y = a_0 \sum X + a_1 \sum X^2$$

que son las denominadas ecuaciones normales para la recta de mínimos cuadrados.

Las constantes a_0 y a_1 son obtenidas por las fórmulas:

$$a_0 = \frac{(\sum Y) (\sum X^2) - (\sum X) (\sum XY)}{N \sum X^2 - (\sum X)^2}$$

$$a_1 = \frac{N \sum XY - (\sum X) (\sum Y)}{N \sum X^2 - (\sum X)^2}$$

$$\sum X = \sum_{j=1}^N X_j \quad \sum Y = \sum_{j=1}^N Y_j$$

$$\sum XY = \sum_{j=1}^N X_j Y_j$$

$$\sum X^2 = \sum_{j=1}^N X_j^2$$

Determinación de un intervalo de confianza para el valor medio.

1. Nivel de Confianza (95%)

2. $F(c) = 1/2 (1 + \alpha)$

En la tabla de la distribución t con n-2 grados de libertad.

n= tamaño de la muestra.

3. $(n-1) S X^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{j=1}^n (X_j - \bar{X})^2$

$$(n-1) S Y^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{j=1}^n (y_j - \bar{y})^2$$

$$(n-1) S X Y = \frac{1}{n-1} \left(\sum_{j=1}^n X_j Y_j - n \bar{X} \bar{Y} \right)$$

$$C.R. = S X Y / S X^2$$

$$q = (n-1) (S y^2 - C.R. \cdot S X^2)$$

$$k(x) = C \frac{h \sqrt{q}}{\sqrt{n-2}}$$

$$h = \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(X - \bar{X})^2}{(n-1) S X^2}}$$

4. Intervalo de Confianza.

$$CONF \left\{ y - k(x) \leq \mu \leq y + k(x) \right\}$$

Límite

Límite

Inferior

Superior

Análisis de diseños de comparaciones pareadas

Medidas descriptivas:

n = número de parejas en el experimento

Media muestral de las diferencias:

$$\bar{d} = \sum_{i=1}^n d_i / n$$

d_i = diferencia observada entre el tratamiento A y el B en la i -ésima pareja.

Desviación estándar de las diferencias

$$S\bar{d} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (d_i - \bar{d})^2}{n - 1}}$$

Errorestándar de la diferencia media como estimador de μd

$$S\bar{D} = S\bar{d} / n$$

μd = media real (poblacional) de la diferencia

Hipótesis: Hipótesis nula: $H_0: \mu D = 0$

Hipótesis alterna $H_A: \mu D \neq 0$

Estadística de Prueba:

$$t = \frac{\bar{d} - \mu d}{S\bar{D}}$$

Decisión estadística:

$t_{calc.} > t_{crit.}$ Se rechaza H_0
Se acepta H_A

$t_{calc.} < t_{crit.}$ Se rechaza H_A
Se acepta H_0

Conclusión Estadística.

DISEÑO FACTORIAL

OBSERVACIONES: (BLOQUES) (TRATAMIENTOS)(REPLICACIONES)

M O D E L O

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + B_j + e_{ijk} + (\alpha B)_{ij}$$

$$i = 1, \dots, a; \quad j = 1, 2, \dots, b; \quad k = 1, 2, \dots, n;$$

Y_{ijk} Es un valor típico de la población general (log $DICT_{50}$ asociado al j-ésimo nivel del estabilizador al i-ésimo número de ciclos, al k-ésimo viable.

α_i Representa un efecto del número de tratamientos (Factor A)
(Congelación-Descongelación)

$$i = 1, \dots, 6 \qquad a = 6$$

B_j Representa un efecto debido al factor B (Estabilizador)

$$j = 1, 2 \qquad b = 2$$

e_{ijk} Representa un error experimental

$(\alpha, B)_{ij}$ Representa un efecto debido a la interacción de los factores A y B

Hipótesis: (a) Nula

No existe interacción entre los factores A y B.

$$H_0: \alpha_i = (\alpha B)_{ij} = B_j = 0$$

(b) Alterna

$$H_A: \alpha_i \neq (\alpha B)_{ij} \neq B_j \neq 0$$

DISEÑO FACTORIAL Y DISTRIBUCION F, APLICADO

A

UNA EXPERIMENTACION BIOLOGICA

ANALISIS DE VARIANCA

TABLA DE DATOS DE LA MUESTRA PARA EL DISEÑO FACTORIAL DE UN EXPERIMENTO
COMPLETAMENTE ALEATORIZADO DE DOS FACTORES

FACTOR A				FACTOR B		
	1	2	...	b	TOTALES	MEDIAS
1	X_{111} . . X_{11n}	X_{121} . . X_{12n}	X_{1b1} . . X_{1bn}	$T_{1..}$	$\bar{X}_{1..}$
2	X_{211} . . X_{21n}	X_{221} . . X_{22n}	X_{2b1} . . X_{2bn}	$T_{2..}$	$\bar{X}_{2..}$
a	X_{a11} . . X_{a1n}	X_{a21} . . X_{a2n}	X_{ab1} . . X_{abn}	$T_{a..}$	$\bar{X}_{a..}$
TOTALES	$T_{.1.}$	$T_{.2.}$...	$T_{.b.}$	$T_{...}$	
MEDIAS	$\bar{X}_{.1.}$	$\bar{X}_{.2.}$...	$\bar{X}_{.b.}$		$\bar{X}^{-}....$

10. Encontrar el total de:

a.- Factor A

$$\text{el total del } i\text{-ésimo del Factor A} = T_{a..} = \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^n X_{ijk}$$

$$\text{la media del } i\text{-ésimo del Factor A} = \bar{X}_{a..} = \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^n X_{ijk} / a$$

$$\text{y el gran total} = T... = \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^n T_{.b.} = \sum_{i=1}^a T_{a..}$$

$$\text{Media Total} = \bar{X}_T = \sum_{k=1}^n \sum_{j=1}^b \sum_{i=1}^a X_{ijk} / n$$

b). Factor B (Tratamientos).

$$\text{El Total del } j\text{-ésimo del Factor B} = T_{.b.} = \sum_{i=1}^a \sum_{k=1}^n X_{ijk}$$

$$\text{La media del } j\text{-ésimo del Factor B} = \bar{X}_{.b.} = \sum_{i=1}^a \sum_{k=1}^n X_{ijk} / b$$

2.- Análisis:

a. Suma total de los cuadrados:

$$S_c \text{ Total} = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^n (X_{ijk}^2) - C$$

$$\text{b. SC Tratamientos} = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b T_{ij.}^2 / n - C$$

c. Suma de los cuadrados para el Factor A

$$SC_A = \sum_{i=1}^a T_{i..}^2 / bn - C$$

d. Suma de los cuadrados para el Factor B.

$$S_{CB} = \sum_{j=1}^b T_{.j.}^2 / an - C$$

e. Suma de los cuadrados del Efecto de Interacción entre los Factores A y B.

$$SC_{AB} = SC_{TRATAMIENTOS} - SC_A - SC_B$$

f. Suma de los cuadrados del error experimental

$$SC_e = SC_{TOTAL} - SC_{TRATAMIENTOS}$$

g. Factor de Corrección:

$$C = \left(\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^n x_{ijk} \right)^2 / abn$$

h. Obtener los grados de libertad para los efectos principales:

FUENTE	G.L.
A	a-1
B	b-1
AB	(a-1)(b-1)
E. exp.	ab(n-1)
SC _{TOTAL}	abn-1

i. Obtener la Media Cuadratica.

A	MCA = SCA / (a-1)
B	MCB = SCB / (b-1)
AB	MCAB = SCAB / ((a-1)(b-1))
E. exp.	MC E = SCE / ab(n-1)

j. Obtener datos de la tabla de la Distribución F (Estimaciones de la Variancia). Obtener el valor crítico de F.

k.- Calcular el Valor de F_c

FUENTE	FC
A (a-1, abn-1)	= MCA / MCE
B (b-1, abn-1)	= MCB / MCE
AB (a-1)(b-1)(abn-1)	= MCAB / MCE

I. Comparación de la F de tablas (F_T) y la F calculada (F_C):

II. Decisión de Rechazar la Hipotesis Nula (H_0) ó la alterna (H_A).

$F_C \geq F_T$ Se acepta la Hipótesis Alterna
Se rechaza la Hipotesis Nula.

$F_C < F_T$ Se acepta la Hipótesis Nula
Se rechaza la Hipótesis Alterna.

m. Conclusiones del análisis Estadístico.

(Wayne W.D. 1984; Scheffler C.W., 1981).

Nota: El análisis Estadístico se realizó por:

- a) Computación (micro Computer System)
- b) Calculadora Casio PB-300
- c) Calculadora Casio fx-82.

MARCAS COMERCIALES:

1. Antibioticos de México, S.A.
2. Costar (205 Broadway, Cambridge, Mass.(U.S.A.)
3. D.I.F.C.O. Laboratories Detroit 1 Michigan,(U.S.A).
4. Divison of Becton, Dickinson and Co.,Cockeysville,(U.S.A.)
5. Dulbeco
6. Farmaceúticos Lakeside, S.A.(México)
7. Grand Island Biological Co. (Grand Island-New York) (G.I.B.C.O)
8. J.T.Baker, S.A. de C.V.(Xalostoc, Méx.)
9. Merck(México).

XII. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Albrecht P., Enterline C.J., Boone J.E., Klutch J.M. (1983). Poliovirus and polio antibody assay in Hep-2 and Vero Cell Cultures. *J. Biol. Stand.* 11(2): 91-97.
- 2.- Ambros, V., Baltimore D., (1978) Protein is linked to the 5'-end of Poliovirus RNA by a phosphodiester linkage to tyrosine. *J. Biol. Chem.* 253:5263-5266.
- 3.- Blue, W.T., Stubbs, D.G. (1981). Isolation of a protein kinase induced by herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* 38:383-388.
- 4.- Boeyé A. (1976) Picornaviral structure and protein synthesis. *Arch. Internat. Physiol. Biochim.* 84: 1027 - 1128.
- 5.- Breindl, M. (1971). The structure of heated Poliovirus particles. *J. Gen. Virol.* 11:147-156.
- 6.- Caliguiri A.L., Mc. Sharry J.J., & Lawrence W.G. (1980). Effect of Arildone on Modifications of poliovirus in vitro. *Virology* 105: 86-93.
- 7.- Carrasco L., Smith E.A. (1976). Sodium & the shut-off of host cell protein synthesis by picornaviruses. *Nature* 264: 807-809.
- 8.- Dabout E. (1979). *Diccionario de Medicina*. Ed. Nacional, S.A. impreso en México. p.p. 653-654.
- 9.- Davidsohn, I., Henry B.J. (1979). *Diagnóstico Clínico por el Laboratorio*, Salvat Editores, S.A. p.p. 1211-1217, 120-128.
- 10.- Dick A.W.G., Dane D.S. (1959). Vaccination against poliomyelitis in the United Kingdom. *Brit. Med. Bull.* 15(3): 205-209.
- 11.- Dimmock J.N. (1977). Differences between the thermal inactivation of Picornaviruses at "High" & "low" temperatures. *Virol.* 31:338-353.
- 12.- Dogherty R.M. (1962). Use of dimethyl Sulphoxide for preservation of tissue culture cells by freezing. *Nature* 193: 550-552.

- 13.- Dömök., I., Balayan M.S. &, Fayinka O.A. (1974). Factors affecting the efficacy of live poliovirus vaccine in warm climates. BULL.WHO. 51:333-347.
- 14.- Emini A.E., Bradford A.J. & Wimmer E. (1984). Identification of a New Neutralization antigenic site on poliovirus coat protein VP₂. 52(2): 719-721.
- 15.- Enders. F.J., Robbins. C.F. & Weller H.T. (1980). The Cultivation of the poliomyelitis viruses in tissue culture. Rev. Infect. Dis. 2(3): 493 - 503.
- 16.- Fenner F., White O.D. (1981). *Virología Médica*. Ed. La prensa Mexicana, S.A., Impreso en México. pp. 181, 208, 213-222, 313-320.
- 17.- Fernández B.C., Baltimore D. (1973). Morphogenesis of Poliovirus 12:5 1122-1130.
- 18.- Fiszman, M., Reynier M., Bucchini D., & Firard M. (1972). Thermosensitive Block of the Sabin Strain of Poliovirus Type 1. J. Virol. 10(6): 1143-1151.
- 19.- Fulginiti A.V. (1984). *Inmunizaciones en la Práctica Médica*, Ed. El Manual Moderno S.A. de C.V., Impreso en México. pp.144-155, 59.
- 20.- Grubman M.J., Baxt. B., La Torre .J.L. & Bacharach.H.L. (1981). Identification of a protein kinase activity in purified foot and mouth disease virus. J. Virol. 39:455-462.
- 21.- Hamish, C. (1975). *Cultivo de Tejidos. Virología*. Ed. El Manual Moderno, S.A. Impreso en Méx. p.p.
- 22.- Hsiung D.G. (1973). *Diagnostic Virology*. Printed in U.S.A. p.p.54-67.
- 23.- Jiang S. (1982). Stability of oral live poliovirus vaccine. J. Microbiol. Immunol. 2(2): 90
- 24.- Jawetz E., Melnick J.D., Adelberg A.E. (1979). *Manual de Microbiología Médica*. Ed. El Manual Moderno, S.A. 8 ed. Impreso en México. p.p.433-440.

- 25.- Kado B.G., Barrón I. & Sierra L, de la (1979). Estabilidad a temperatura de la Vacuna Antipoliomielítica de virus atenuados elaborados en el I.N. V. Salud Pública de México. Vol XXI (13): 263-270.
- 26.- Kado B.G. (1977) Relative sensitivity of three cell substrates to the Sa bin poliovirus strains. Dev. Biol. Stand. 37:261-264.
- 27.- Katagiri, S., Aikawa, S., & Hinuma, Y. (1971). Step-wise degradation of poliovirus capsid by alkaline treatment. J. Gen. Virol. 13:101-109..
- 28.- Kitamura, N., Semler B.L., Rothberg P.G., Larsen G.R., Adler C.J., Dorner A.J., Enini E.A., Hanecak R., Fee J.J., Vanderwerf S., Anderson. C.E., & Wimmer E. (1981). Primary structure, gene organization & polypeptide expresion of poliovirus RNA. Nature 291:547-553.
- 29.- Kreyzig E. (1978). Int. a la Estadística Matemática. Ed. Limusa, S.A. de C.V. Impreso en México. p.p. 234,243, 39-45, 316,619,359-364, 491-494.
- 30.- Larsen R.G. Semler F.B. & Wimmer E. (1981). Stable Hairpin structure within the 5'-terminal 85 nucleotides of poliovirus RNA. J. Virol. 37(1): 328-335.
- 31.- Luria S.E., Darnell E., (1977) Virología General, Ediciones Omega, S.A. Impreso en España. p.p. 114, 127-129,311.
- 32.- Melnick. L.J. (1978). Hospital Vaccines & Vaccine policy: The poliomyelitis Example. Hospital Practice. January. 41-48.
- 33.- Melnick J.L. & Wallis C. (1963). Effect of pH on thermal stabilization of Oral Poliovirus vaccine by Magnesium Chloride. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 112: 894-897.
- 34.- Melnick J.L., Ashkenazi A., Midulla V.C., Wallis C & Bernstein A. (1963) Immunogenic potency of MgCl₂-stabilized oral poliovaccine. J.A.M.A. 185: 406-408.
- 35.- Melnick L.J. (1980). Ventajas e inconvenientes de las vacunas antipoliomielíticas elaboradas con virus vivos o con virus muertos. Bol. of. Sanit. P. M. 88 (6): 507-529.

- 36.- Milstein J.B. (1977). Correlation of virus polypeptide structure with attenuation of poliovirus type 1. *J. Of. Virol.* 23(3):811-815.
- 37.- Minor T.E. (1981). Human infective dose determinations for oral polio virus type 1 vaccine in infants. *J. Clin. Microbiol.* 13(2):388-9.
- 38.- Morrow D.C., Hocko J., Nava B.M., & Dasgupta A. (1984). ATP is required for initiation of poliovirus RNA synthesis in vitro. *J. of Virol.* 50(2): 515-523.
- 39.- Moynihan M. & Petersen I. (1981) Antigenic Potency of inactivated polio-virus vaccine. *Dev. Biol. Std.* 47:129-133.
- 40.- Moynihan M., & Petersen I. (1982). The durability of inactivated polio-virus vaccine: studies on the stability of potency in vivo and in vitro. *J. Biol. Stand.* 10(3): 261-268.
- 41.- Nair C.N. (1981) Monovalent cation metabolism and cytopathic effects of Poliovirus. Infected HeLa cells. *J. Virol.* 37(1):268-273.
- 42.- Nottay K.B., Kew M.O., Hatch H.M., Hayward T.J., Obijeski R.J. (1981). Molecular variation of type 1 vaccine related and wild polioviruses during replication in humans. *Virology* 108:405-423.
- 43.- Ogra P.L., Fishaut M., & Gallagher R.M. (1980) Vaccination via the mucosal routes. *Rev. Infect. Dis.* 2: 352-369.
- 44.- O.M.S. (1972). Comité de Expertos en Patrones biológicos: Normas para la Vacuna Antipoliomielítica (Oral) Serie de Informes Técnicos 486:22-64.
- 45.- Peetermans. S.F., Collinet G., & Huygelen C. (1973). Stability of Freeze-Dried rubella virus vaccine at various temperatures. *J. Biol. Std.* 1:179-185.
- 46.- Perkins, F.T. (1973). Tissue Culture Media and reagents. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 48:747-750.
- 47.- Putnak J.R. & Phillips A.B. (1981). Differences between Poliovirus empty capsids formed in vivo and those formed in vitro: a role for the morpho-poietic factor. *J. Virol* 40(1):173-183.

- 48.- Rapicetta M.R. Santoro & Grandolfo (1977). A comparison of methods for the potency test of rubella vaccine. *J. Biol. Std.* 5:231-6.
- 49.- Richman D.F., Cleveland P.H., Redfield D.C., Oxman M.N. & Whal G.M. (1984) Rapid Viral Diagnosis. *The J. Infec. Dis.* 49(3):298-310.
- 50.- Sabin A.B. (1985) Oral Poliovirus Vaccine: History of its development and use and current challenge to eliminate poliomyelitis from the World. *J. Infec. Dis.* 151(3): 420-436.
- 51.- Sabin A.B., Boulger L.R. (1973). History of Sabin attenuated poliovirus Oral Live Vaccine Strains. *J. Biol. Stand.* 1: 115-118.
- 52.- Salk D. (1980). Erradication of Poliomyelitis in the United States. I.- Live Virus Vaccine/ Associated and Wild Poliovirus Disease. II.- Experience with killed poliovirus vaccine. *Rev. Inf. Dis.* 2(2): 228-257.
- 53.- Schaefer A., Kühne J., Zibirre R & Koch G. (1982). Poliovirus induce alterations in Hela Cell Membrane Functions. *J. of Virol.* 44(22):444-449.
- 54.- Schärli, E.C. & Koch G. (1984). Protein kinase activity in Purified Poliovirus particles and empty viral capsid preparations. *J. Gen. Virol.* 65: 129-139.
- 55.- Sxhefller C.W. (1981). *Biostatística*. Ed. Fondo Educativo Interamericano. Impreso en México, 134-139, 154-170, 178-186, 245-248.
- 56.- Spector D.M. & Baltimore D. (1975). *The Molecular Biology of Poliovirus*. *Sci. Am.* 232:25
- 57.- Spiegle M.R. (1973). *Estadística*. Ed. Mc Graw-Hill de México, S.A. de C.V. Impreso en México. 48-60, 217, 221, 244-245.
- 58.- Stanway G., Cann J.A., Hauptmann R., Hughes P., Clarke L.D., Mountford, R.C. Minor P.D., Schild G.C. & Almond J.W. (1983). The Nucleotide sequence of poliovirus type 1. *Nucleic Acids. Res.* 11: 5629-5643.
- 59.- Thorpe R., Minor D.P., Mackay A., Schild C.G. & Spitz M. (1982). Immunochemical studies of Immunoreactive Virus Capsid Polypeptides. *J. gen. Virol.* 63: 487-492.

- 60.- Toyoda.H., Kohara M., Kataoka Y., Suganuma T., Omata T., Inura N. & Nomoto A. (1984). Complete nucleotide sequences of all three poliovirus serotype genomes. Implication for genetic relationship gene function and antigenic determination. *J. Mol. Bio.* 174:561-585.
- 61.- Tuschall M.D., Hiebert E., Flanagan B.J. (1982). Poliovirus RNA/dependent RNA Polymerase synthesis full-length copies of poliovirion RNA, cellular mRNA, and Several Plant Virus RNAs "In Vitro" *J. Virol.* 44(1): 209-216.
- 62.- Van Dyke, T.A., Rickles R.J. & Flanagan J.B. (1982). Genome-length copies of poliovirion RNA are synthesized in vitro by the poliovirus RNA dependent RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* 257:4610-4617.
- 63.- Wallis C., & Melnick J.L. (1962). Cationic Stabilization. A New Property of enteroviruses. *Virology* 16:501-6.
- 64.- Wallis C., & Melnick J.L. (1962). Magnesium chloride enhancement of cell susceptibility to poliovirus. *Virology* 16:122-32.
- 65.- Wallis, C., & melnick J.L. (1961). stabilization of poliovirus by cations. *Texas Rep. Biol. Med.*, 19:683-701.
- 66.- Wasley G.D. (1972). *Animal Tissue Culture Advances in technique.* Ed. Blackwell Scientific Publications. Printed Great Britain. p.p. 1-19, 139-145.
- 67.- Wasley G.D. & May J.E. (1970). *Animal cell culture methods.* Ed. Blackwell Scientific Publications. pp. 136-144.
- 68.- Wayne W.D. (1984). *Bioestadística.* Ed. Limusa, S.A. de C.V. Impreso en México. p.p. 12-13, 150-152, 224-281.
- 69.- Yin, F.H. (1977). Involvement of viral procapsid in the RNA synthesis and maturation of poliovirus. *Virology* 82:299-307.
- 70.- Zuev. W. (1974). Preservation of cell cultures in liquid Nitrogen. *Veterinaria* (11):113-114.