



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"CUAUTITLAN"

EVALUACION DE LA ESTABILIDAD DE UNA
VACUNA LIQFILIZADA DE Salmonella gallinarum
CEPA 9R A TRES DIFERENTES TEMPERATURAS

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
JOSE ALFREDO KEYES SANCHEZ

BAJO LA DIRECCION DE:
Q.F.B. MARIA DE LOURDES ONTIVEROS CORPUS
Q.F.B. LUIS BOJORQUEZ NARVAEZ

FALLA DE ORIGEN

1989



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.

INDICE

		PAGINA
1.0	INTRODUCCION.	2
1.1	CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS.	3
1.2	PROPIEDADES BIOQUIMICAS.	4
1.3	ANTIGENOS.	5
1.4	VARIACION.	10
1.5	TOXINAS.	10
1.6	ENTEROTOXINA.	10
1.7	PREPARACION DE ANTISUEROS ESPECIFICOS.	11
1.8	CLASIFICACION.	11
1.9	ENFERMEDAD EN LOS ANIMALES.	13
1.10	MANIFESTACIONES CLINICAS Y CAMBIOS PATOLOGICOS.	16
1.11	DIAGNOSTICO EN AVES.	17
1.12	TRATAMIENTO.	18
1.13	CONTROL EN AVES.	19
1.14	VACUNA 9R.	20
1.15	CONTROL DE CALIDAD DE LA VACUNA 9R DE <u>Salmonella gallinarum</u>	24
2.0	OBJETIVO.	26
3.0	MATERIALES Y METODOS.	27
4.0	PROCEDIMIENTO.	28
5.0	RESULTADOS.	30

6.0	DISCUSION.	55
7.0	CONCLUSIONES.	58
8.0	ANEXO.	59
9.0	BIBLIOGRAFIA.	63

* * *

RESUMEN

Con la finalidad de identificar el comportamiento de la vacuna Salmonella gallinarum cepa 9R a diferentes temperaturas se procedió a realizar pruebas de estabilidad acelerada en esta vacuna a 4, 20 y 37°C a los 0, 7, 10, 14, 22, 24 y 31 días. la titulación de la vacuna se evaluó mediante Cuentas-Viables utilizando el método de Control de Calidad de PRONABIVE (en botellas de dilución de leche). Al iniciarse la prueba la vacuna presentaba un título de 129.60×10^6 Unidades - Formadoras de Colonia (U.F.C.)/DOSIS al día 31 los títulos de la vacuna a 4°C fué de 106.11×10^6 UFC/Dosis, a 20°C - 37.5×10^6 UFC/Dosis y a 37°C 5.12×10^6 UFC/Dosis. Expresado en porcentaje la caída del título a 4°C fué del 18%, a 20°C 71.06% y a 37°C de 96.5%. Finalmente como medida comparativa de estos resultados, a los 11 meses de almacenado el producto a 4°C fue realizada una reprobación obteniéndose un valor de 125×10^6 UFC/ml.

Los resultados anteriores indican que la vacuna - - Salmonella gallinarum Cepa 9R es bastante estable a la temperatura de almacenamiento (recomendada de 4°C) y el título baja considerablemente si ésta es sometida por largo tiempo a temperaturas mayores.

INTRODUCCION

GENERALIDADES

Dentro de la Industria Farmacéutica, tanto en el área de farmacia como de producción de biológicos, uno de los principales requisitos es obtener productos que cuenten con estabilidad adecuada. En el área de biológicos la estabilidad que muestre un producto es factor determinante en sus características inmunizantes (1,12,15).

Se han sugerido una serie de procedimientos para evitar la descomposición de vacunas, conservarlas entre 2 y 8°C, recomendar el uso de refrigerante y cajas térmicas para el transporte del producto; estos pasos forman parte de la red fría que es actualmente el proceso recomendado para el transporte de biológicos (8,18,19,23,25).

Sin embargo se sabe que en muchas ocasiones este proceso no se lleva a cabo adecuadamente, ya sea por desconocimiento, por deficiencias o bien las distancias entre los lugares de distribución del producto y de uso del mismo son demasiado grandes y no permiten el acceso de un adecuado sistema de transporte como en el caso de muchas rancherías y poblados que se localizan en provincia (2,4,11,21,27).

Existen factores para mejorar la estabilidad de un producto ligados estrechamente a los laboratorios productivo-

res, la incorporación de un buen estabilizador, un proceso de liofilización que garantice una humedad baja así como vacío - adecuado en el producto. Finalmente y debido a la importancia que tienen los biológicos en el área salud éstos deben cumplir con requisitos estrictos en su control de calidad, entre los que se pueden mencionar, la titulación, inocuidad, cuenta viable, disociación y pureza. Se llevan a cabo también determinaciones físico-químicas como son pH, humedad y vacío (12, 25). Además debe establecerse un fecha de caducidad y ésta - ser corroborada al término por el laboratorio productor.

La determinación de la fecha de caducidad se basa en la estabilidad del producto y para esto es necesario evaluarlo a lo largo del tiempo de vigencia establecido. Otra manera más rápida es mediante el empleo de pruebas de estabilidad - acelerada, las cuales poseen la ventaja de que permiten llevar a cabo la evaluación del producto ante una serie de variables como pH, Humedad y Temperatura en un tiempo menor (1,7).

1.1 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

Los microorganismos del género Salmonella son bacilos móviles Gram negativos que en forma característica no fermentan la lactosa y que son patógenos para el hombre y los - animales por vía oral.

Las Salmonellas son bacilos Gram negativos no esporulados, de tamaño, entre dos y tres micras por 0.4 a 0.6, la - mayoría de las especies son móviles debido a flagelos peritri-

cos excepto Salmonella pullorum y Salmonella gallinarum. Las Salmonellas crecen fácilmente en los medios de cultivo ordinarios, son generalmente resistentes a la congelación en agua y a ciertos agentes químicos, por ejemplo, el Verde Brillante, el Tetratiónato de Sodio y el Deoxicolato de Sodio; tales compuestos inhiben a los bacilos coliformes y son por lo tanto útiles para el aislamiento de Salmonellas a partir de heces.

Las especies de Salmonella pueden ser identificadas por reacciones bioquímicas y por pruebas serológicas. Diversas cepas de la misma especie pueden ser clasificadas por el análisis con bacteriófagos específicos lo cual ayuda al rastreo epidemiológico en los casos de cuarentena (14).

1.2 PROPIEDADES BIOQUÍMICAS

La identificación de una bacteria como Salmonella no presenta dificultades, pero una vez que se ha realizado implica un complejo análisis serológico (y en ocasiones la tipificación por fagos) necesario para identificar las cepas con el detalle suficiente que puede ser de utilidad en la determinación de una fuente de infección. El análisis serológico y la tipificación por fagos no son procedimientos de rutina para un laboratorio clínico y los laboratorios de referencia están disponibles para ayudar en la mayor parte de los países. Han sido sugeridos esquemas simplificados de diagnóstico que emplean un número limitado de sueros y esto hace posible la serotipificación de la mayor parte de las

Salmonellas aisladas de material clínico. La table No. 1 - muestra las principales pruebas bioquímicas empleadas para la identificación de Salmonella gallinarum (9).

1.3 ANTIGENOS

Existen tres antígenos principales:

1.- Los antígenos flagelares, "H" son inactivados - por calentamiento a temperaturas superiores a 60°C, así como por pHs ácidos, para determinaciones serológicas se les prepara añadiendo formalina a cultivos móviles jóvenes en caldo, tales antígenos aglutinan rápidamente con sueros que contengan anticuerpos anti - H, formando grandes masas esponjosas. Los antígenos "H" contienen varios constituyentes inmunitarios; para una misma especie de Salmonella, los antígenos flagelares pueden presentarse en cualquiera de dos formas o de ambas llamadas fase 1 y fase 2, la fase 1 es compartida - sólo por unas cuantas especies diferentes, la fase 2 por muchas. Los microorganismos tienden a mudar de una fase a otra y a esto se le llama variación de fase, los anticuerpos contra los antígenos "H" son predominantemente IgG.

2.- Los antígenos "O" somáticos forman parte de la pared de la célula bacteriana y son resistentes al calentamiento prolongado a 100°C al alcohol y a los ácidos diluidos. Los antígenos "O" se preparan a partir de bacilos inmóviles - por tratamiento con calor y alcohol, con suero que contenga anticuerpos anti-"O", tales antígenos se aglutinan lentamente en masas granulares. Los anticuerpos contra antígenos "O"

Tabla No. 1. Pruebas bioquímicas para la identificación de Salmonella gallinarum.

Motilidad	-	Ramnosa	(+)
Pigmento	-	Salicín	-
Crecimiento en medio con KCN	-	Trehalosa	+
Citrato como fuente de carbono	-	O N P G	-
Gluconato	.	Prueba V-P	-
Malonato	-	Hidrolisis de la escualina	.
Carbohidratos: gas de la glucosa	-	Indol	-
Acido de: Adonitol	-	Hidrolisis de la gelatina	-
Arabinosa	+	Ureasa	-
Dulcitol	+	H ₂ S del FTA	.
Glicerol	(+)	Deshidrolasa de la arginina	(+)
Inositol	-	Descarboxilasa de la lisina	+
Lactosa	-	Descarboxilasa de la ornitina	-
Maltosa	+	Fenilalanina	-
Mánitol	+		
Catalasa	+		
Oxidasa	-		

OBTENIDO DE COWAN y STEEL (9).

<u>Símbolo</u>	<u>Significado y equivalente descriptivo</u>
+	95-100% de las cepas son positivas (por lo general todas).
d	16-84% de las cepas son positivas.
-	0-15% de las cepas son positivas.
(')	Reacción retardada en una prueba o crecimiento tardío.
	No conocida.

son predominantemente IgM estos antígenos poseen la estructura general siguiente: las cadenas específicas "O", formadas por unidades repetidas (oligosacáridos) se hallan unidos a un polisacárido nuclear basal, el cual se halla a su vez unido al lípido A; este conjunto forma un lipopolisacárido (LPS), las diferencias en las cadenas específicas O y en los antígenos flagelares y capsular es la base para la serotipificación de Salmonella, con más de 1700 serotipos adecuadamente identificados, ver figura No. 1.

Estas variaciones en la cadena O específica también tiene implicaciones biológicas debido a que sus características confieren reconocimiento y especificidad antigénica al sistema inmunológico del huésped. Esta especificidad permite tanto la respuesta humoral como celular contra cualquier sero tipo invasor de Salmonella y el desarrollo de anticuerpos mediados al LPS del serotipo específico de Salmonella. Estructuralmente se le ha asociado con la invasividad de la bacteria, la producción de enterotoxinas y con la gran sobrevivencia en animales infectados experimentalmente, en donde se ha visto que cepas incompletas (rugosas) poseen poca habilidad para invadir el epitelio de la mucosa intestinal y originan una respuesta inflamatoria muy débil. La estructura del LPS también ha sido asociado con la capacidad de algunas cepas de Salmonella typhimurium para colonizar el colon de ratón y puede influir en la adhesión bacteriana a las células epiteliales del intestino.

Los efectos biológicos más frecuentemente asociados con el LPS son los efectos mediados por la endotoxina, - atribuidos a la porción del lípido A. Muchos de estos efectos parecen ser debidos a la interacción endotoxina-macrófagos. Esta interacción origina la liberación de mediadores, - los cuales originan los eventos asociados con el shock séptico, por momentos la Interleucina 1, la cual es producida por macrófagos activados, estimula la actividad de linfocitos T- y B y la producción en hígado de muchas proteínas séricas -- asociadas con el proceso de inflamación aguda y acción en el hipotálamo para inducir fiebre, otro macrófago produce la activación de diversas vías metabólicas incluyendo la síntesis de prostaglandinas y la cascada de coagulación. Por lo tanto el LPS tiene un amplio espectro de actividad biológica que - origina la diversidad de signos clínicos encontrados en casos de Salmonelosis entérica (20).

3.- Los antígenos "Vi", antígenos K capsulares especializados que se encuentran en la extrema periferia de la - bacteria, a menudo interfieren con la aglutinación de cepas aisladas recientemente por los antisueros que contienen primordialmente aglutininas anti-O. Los antígenos Vi son destruidos por calentamiento durante una hora a 60°C y por los ácidos y el fenol. Los cultivos que poseen antígenos Vi tienen a ser más virulentos que los que no los tienen. Algunos antígenos K se parecen a los polisacáridos capsulares de los Meningococos ó Haemophilus.

1.4 VARIACION

Las Salmonellas pueden perder antígenos H y volverse inmóviles, la pérdida del antígeno O está asociada con el cambio de morfología colonial lisa a rugosa. El antígeno Vi - puede perderse parcial o totalmente, los antígenos pueden ser adquiridos o perdidos mediante el proceso de transducción.

1.5 TOXINAS

Como en todas las bacterias Gram negativas, las membranas de las Salmonellas contienen lipopolisacáridos, que al ser liberados por Lisis Celular actúan como endotoxinas (14).

1.6 ENTEROTOXINA

La diarrea profusa que generalmente acompaña a la Salmonelosis difiere de la diarrea en animales a los cuales se les administra la toxina en forma experimental. Diversos serotipos de Salmonella, producen una enterotoxina que es similar a la producida por Vibrio cholera y Escherichia coli. Estas enterotoxinas se unen a las células epiteliales de la mucosa intestinal y estimulan el incremento del Monofosfato de Adenosín Cíclico, el cual origina la secreción de iones cloruro, sodio, agua y dependiendo del segmento del intestino afectado, bicarbonato hacia el lumen intestinal, lo cual origina la diarrea la cual en combinación con los efectos de la endotoxina puede provocar una deterioración extremadamente rápida (19).

1.7. PREPARACION DE ANTISUEROS ESPECIFICOS

Cuando se inmunizan animales con cepas móviles de bacilos entéricos muertos por formal, los antisueros contienen anticuerpos anti-H y anti-O, los anticuerpos frente a H presentan generalmente un título más elevado que los anticuerpos frente a O (esta diferencia puede deberse en mayor parte a la inmunogenicidad del antígeno proteico H comparado con el antígeno polisacárido O y en parte a la mayor sensibilidad de la prueba de aglutinación H) si la cepa inmunizante posee también un antígeno capsular (Vi), el antisuero contendrá además anti-Vi.

Los antisueros que reaccionan con antígenos individuales de superficie en las pruebas de aglutinación se preparan mediante adsorción selectiva. Así, por ejemplo, el anticuerpo anti-H puede ser eliminado por adsorción mediante una suspensión de flagelos homólogos (eliminados por medios mecánicos) o mediante suspensiones de mutantes que poseen los flagelos de las células inmunogénicas aunque carezcan de antígenos Vi u O, los anticuerpos anti-O o anti-Vi pueden ser eliminados de forma selectiva utilizando los extractos bacilares adecuados.

1.8 CLASIFICACION

Las complejidades antigénicas de los bacilos entéricos han sido ampliamente puestas de manifiesto en el género Salmonella en gran parte como resultado de los estudios sistemáticos de Kauffman en Dinamarca y White en Inglaterra; se

han identificado aproximadamente 1000 variedades en relación con los antígenos específicos H, O y Vi mediante pruebas exhaustivas de adsorción y reacciones cruzadas, mediante esta técnica a las reacciones de aglutinación H, O y Vi se ha conseguido identificar más de 1000 tipos de Salmonella. Solo los grandes centros de tipificación de Salmonellas (Copenhage, Londres, Atlanta, etc.) disponen de las colecciones necesarias de antisueros específicos para tal trabajo, en la mayor parte de los laboratorios de diagnóstico las cepas son clasificadas únicamente por sus características fermentativas y reacciones de aglutinación practicadas con antisueros específicos de grupo (10).

Las reacciones cruzadas demuestran que cada antígeno O de Salmonella posee dos o tres determinantes específicos, cada uno de los cuales recibe un número y es compartido por otros antígenos O, considerando ciertos determinantes de mayor capacidad reactiva las Salmonellas han sido clasificadas en grupos O de los cuales los primeros 26 son designados mediante letras (A-Z) y los siguientes mediante los números correspondientes a sus antígenos determinantes de grupo (50, 51, 52, etc.), cada grupo posee su determinante O principal característico, así por ejemplo en el grupo C (antígeno O 6,7) el determinante principal es el factor 6. Alrededor de un 90% de las cepas aisladas en la especie humana corresponde a los grupos A a E, mediante el empleo de determinantes de menor importancia se pueden establecer divisiones de

tro de cada grupo (14).

Los miembros de cada grupo establecido en relación con los antígenos O pueden subdividirse en especies, según sus antígenos flagelares proteicos H en la clasificación de Kauffman-White los antígenos flagelares de la fase 1 se indican por letras minúsculas y los antígenos de la fase 2 por números (ver tabla No. 2). En el esquema de Kauffman-White, la elaboración del antígeno polisacárido Vi, por una determinada especie, se indica con las letras Vi, situadas convencionalmente después de los números que indican los distintos antígenos O ya que la cubierta superficial formada por Vi impide la aglutinación con anticuerpos anti-O homólogos (aunque permite la adsorción de anticuerpos) no puede establecerse la diferenciación en este grupo a partir de dicha reacción (10).

1.9. ENFERMEDAD EN LAS AVES.

Las Salmonellas tienen una gama muy amplia de huéspedes animales, tanto domésticos como silvestres, la infección puede manifestarse clínicamente o no, en la forma subclínica el animal puede tener una infección latente, albergando al patógeno en sus ganglios o puede ser portador y eliminador del agente por materias fecales en forma transitoria, intermitente o persistente. En los animales domésticos existen varias entidades clínicas bien determinadas debidas a especies adaptadas a diferentes huéspedes, como por ejemplo Salmonella pullorum, otras infecciones con o sin manifestación clínicamente se deben a serotipos de huéspedes múltiples.

Tablas No. 2. Clasificación serológica (Kauffmann-White)
y química de las especies más frecuentes de
Salmonella.

ESPECIE	GRUPO	ANTIGENO O*	ANTIGENO H	
			FASE 1	FASE 2
<u>S. paratyphi A</u>	A	(1),2,12	a	-
<u>S. schottmuelleri</u>	B	(1),4,(5),12	b	1,2
<u>S. typhimurium</u>	B	(1),4,(5),12	f	1,2
<u>S. paratyphi C</u>	Cf	6,7,V1	c	1,5
<u>S. choleraesuis</u>	C1	6,7	c	1,5
<u>S. montevideo</u>	Ci	6,7	g,m,s	-
<u>S. newport</u>	C2	6,8	e,h	1,2
<u>S. typhi</u>	D	9,12,V1	d	-
<u>S. enteritidis</u>	D	(1),9,12	g,m	-
<u>S. gallinarum</u>	D	1,9,12	-	-
<u>S. anatum</u>	E	3,10	e,h	1,6

Obtenido de Davis, et. al (10).

* Los números en negrita corresponden a los determinantes principales (factores) del grupo. Los determinantes corresponden a una subdivisión de los antígenos O. Las cifras en paréntesis indican que el determinante es de difícil detección.

Muchas otras Salmonellas se aíslan frecuentemente en aves domésticas, por lo que se considera que son uno de sus principales reservorios. Entre las especies de múltiples huéspedes que infectan a las aves Salmonella typhimurium es especialmente importante (6,21).

La pullorosis y la fiebre tifoidea son enfermedades que producen graves pérdidas económicas en la avicultura si no son adecuadamente controladas. Ambas tienen una distribución mundial y dan lugar a brotes con alta morbilidad y mortalidad (5). Salmonella gallinarum es responsable de la fiebre tifoidea, esta bacteria se encuentra ampliamente distribuida afectando gallinas en todo el mundo, además se han descrito numerosos brotes en pavos y patos; existiendo publicaciones que mencionan la infección en codornices, palomas y aves silvestres (6).

En gallinas se sabe que las razas pesadas son más susceptibles que las livianas; además la mayoría de los brotes ocurren en aves ponedoras. En los pollitos hay relativamente pocos casos de infección, aún cuando ésta ocurre a través del huevo. La transmisión ocurre después de la ingestión de alimentos contaminados, los cuales desempeñan un papel muy importante al servir de vehículo de la infección. Algunos ingredientes, tales como harina de huesos, de carne o de pescado, son especialmente incriminados, también el agua contaminada puede ser fuente de infección para el hombre y los animales. Además la bacteria puede ser introducida a la

parvada con los zapatos y la ropa del personal que labora en las granjas. La Salmonella gallinarum puede sobrevivir hasta siete meses, por lo que los animales que se alimentan de cadáveres infectados pueden acarrear el microorganismo y diseminar la enfermedad a otras granjas. El equipo e implementos de trabajo empleados en las granjas juega un importante papel en el proceso de diseminación de la infección (21).

El período de incubación de la enfermedad varía de cuatro a seis días, sin embargo, la muerte puede ocurrir en las 48 horas siguientes a la infección. En brotes subagudos los síntomas duran cinco a seis días, la mortalidad varía notablemente pudiendo llegar a ocurrir entre un 10 y un 50%. En zonas endémicas la presentación de la enfermedad es crónica y la muerte de las aves ocurre en forma esporádica (15).

1.10 MANIFESTACIONES CLÍNICAS Y CAMBIOS PATOLÓGICOS

En casos agudos la muerte súbita es el indicio de que existe la enfermedad en la parvada, un número considerable de aves presentan diarrea fétida, de color amarillento; hay pérdida de apetito y debilidad. El cuadro clínico en general es sugestivo de un proceso septicémico, la mortalidad es elevada, a la necropsia se observan focos necróticos en hígado y corazón además hay esplenomegalia, los pulmones están congestionados y edematosos.

En aves ponedoras los ovarios presentan degeneraciones similares a las que ocurren en casos de pullorosis, las cuentas de células sanguíneas revelan leucocitosis y ane-

mia. Es común la existencia de portadores sanos, los cuales al recuperarse de la enfermedad continúan excretando gérmenes en sus deyecciones, la eliminación a través del huevo -- ocurre también con frecuencia y aunque los brotes en polluelos son escasos, la mortalidad puede ser alta. La gravedad de esta enfermedad radica en la marcada reducción en los porcentajes de postura, así como en la escasa fertilidad e incubabilidad del huevo (6).

1.11 DIAGNOSTICO EN AVES

a) Cuando hay aves disponibles, ya sea muertas o en estados avanzados de enfermedad, estas deben ser enviadas al laboratorio para que se realicen cultivos a partir -- de hígado, bazo, vesícula biliar, ovarios, pulmones y corazón, los medios de cultivo de elección son inhibitorios como Verde Brillante o Tetrationato de Sodio, selectivos como -- agar SS y agar de Citrato de Deoxicolato y finalmente medios diferenciales entre los que figuran los medios de Eosina-Azul de metileno, agar Mac Conkey y Desoxicolato de Sodio (14).

b) Examen seriológico: numerosos procedimientos tendientes a identificar la presencia de anticuerpos contra Salmonella particularmente Salmonella gallinarum y Salmonella pullorum en gallinas y pavos, han sido descritos en la literatura. Entre las pruebas más comúnmente empleadas se encuentran: Aglutinación, microaglutinación, hemoaglutinación con antiglobulina así como la prueba de la microantiglo

bulina. De estas técnicas las que se usan con más frecuencia y que en la mayoría de los países se considera como prueba - estándar de control, son las de aglutinación en tubo y la -- prueba an placa con sangre completa en la cual se utiliza el antígeno K polivalente el cual posee la ventaja de no detectar los anticuerpos producidos a consecuencia de vacunacio-- nes ya que es preparado con cepas lisas (6).

1.12. TRATAMIENTO

Existen numerosas publicaciones que coinciden en recomendar el empleo de furazolidona para el tratamiento de Salmonelosis, Gordon (6) sugirió la administración de este medicamento en concentraciones de 0.04% en el alimento, debiendo aplicarse durante días; esto proporciona buenos resultados siempre y cuando se administre durante los primeros -- días de iniciado el brote. La efectividad de Sulfas y anti-- bióticos, entre otros, ha sido investigada tanto in vivo como in vitro, encontrándose en la mayoría de los casos resultados poco alentadores; ya que logran controlar el brote desde el punto de vista clínico, pero la mayoría de las aves -- desarrollan un estado de portadores sanos. Es por esto que -- el uso de agentes quimioterapéuticos debe quedar supeditado a las condiciones prevaletientes en cada granja, tanto desde el punto de vista técnico como económico. Es muy recomendable practicar pruebas de sensibilidad a los antibióticos, -- sulfas y nitrofuranos, con las cepas aisladas en la granja -- problema, con el objeto de seleccionar en forma adecuada el

producto que muestre los mejores resultado.

En 1987, Reddy y colaboradores (23) evaluaron la eficacia de Trimetoprim y Sulfadiazina y concluyeron que -- estos medicamentos al administrarse en el agua de bebida de los animales en una concentración de 60 y 300 mg/l, disminuyen notablemente las lesiones post-mortum y el número de bacterias aisladas de los órganos de pollos infectados con Salmonella gallinarum.

1.13. CONTROL EN AVES

Una vez que se establece el diagnóstico, las -- aves enfermas deberán sacrificarse y sus cadáveres deben ser incinerados o enterrados profundamente y cubiertos con cal viva. Los locales, vestuario del personal, bebederos y demás equipos importantes en la diseminación de la infección deben ser desinfectados en forma adecuada (6).

En las condiciones actuales de cría de ganado y -- de aves, así como de transporte, comercialización, concentración de animales antes del sacrificio y prácticas de procesamiento de alimentos no se pueden obtener alimentos de origen animal libres de Salmonellas, por ahora, el control radica en la protección al hombre de la infección y de la reducción en la prevalencia en los animales. La inspección veterinaria de carnes y del sacrificio de aves, así como la supervisión de la leche y de productos de huevo, son importantes en la protección del consumidor.

En los animales el control de la Salmonelosis consiste en:

- a) Eliminación de portadores detectados por medio de pruebas serológicas.
- b) Control bacteriológico de los alimentos, tales como harina de pescado, de carne y de hueso.
- c) Manejo apropiado del criadero de aves.
- d) Adecuados procesos de inmunización con inmunógenos de alta calidad(21).

1.14. VACUNA 9R

Smith en 1956, publicó que puede provocarse una buena protección contra la infección oral de Salmonella gallinarum, usando inmunógenos elaborados a partir de cepa 9R, la cual se sometió a nueve pases continuos en medios semisintéticos incubados a 20°C y estabilizados en fase rugosa mediante el empleo de bacteriófagos (3).

Las evidencias indican que las vacunas con microorganismos muertos tienen poca importancia en el control de la enfermedad.

Silva y colaboradores (25) al evaluar la protección obtenida con la cepa 9R en comparación con dos vacunas emulsificadas elaboradas tanto con una cepa lisa de Salmonella gallinarum inactivada con beta-propiolactona y otra con cepa 9R viva, observaron que la vacuna inactivada produce una mayor y más uniforme respuesta de anticuerpos, sin embargo el nivel de mortalidad en aves desafiadas no guarda correlación-

con el nivel de protección esperado, por lo que considera que la protección depende probablemente de un mecanismo inmune mediado por células. Menciona que las diferencias en los niveles de anticuerpos entre las aves vacunadas con una cepa lisa y que fueron mayores a los niveles mostrados por aves vacunadas con 9R puede servir para distinguir entre aves vacunadas y aves infectadas.

De igual manera se observa en base a los datos obtenidos en el desafío de los animales y que fueron vacunados con 9R emulsificada, que esta es la que menos protege, probablemente por alguna interferencia del adyuvante oleoso, sin embargo se sabe que el uso del adyuvante completo de Freund's aumenta la protección de la vacuna.

En 1979, Cameron (5) al evaluar las diferencias de protección obtenida por una vacuna viva elaborada con cepa 9R y precipitada con polietilenglicol y una vacuna emulsificada elaborada con una cepa lisa de Salmonella gallinarum inactivada con formalina, plantea el siguiente esquema de inmunización en pollos de 10 semanas de edad:

a) Dosis única de vacuna viva; b) dos dosis de vacuna viva, con un intervalo de 14 días entre cada aplicación y c) Dosis única de vacuna emulsificada y posterior aplicación de una dosis de vacuna viva a los 14 días. Una parte de cada grupo de estos animales fueron desafiados a los 2, 4 y 6 meses después de la inmunización y los animales sobrevivientes así como el resto de cada grupo recibieron un refuerzo de

vacuna viva, encontrándose que en los tres casos se muestra un nivel de protección muy similar cuando se desafiaron a los dos y cuatro meses, de hecho la respuesta estimulada por la vacuna es buena y permanece con niveles altos durante dos meses, después del cual disminuye entre los tres y cuatro meses en aproximadamente un 50% y a los seis meses ya es muy pobre sin embargo la aplicación del refuerzo restablece el nivel en los tres grupos en aproximadamente un 50%, nivel que persiste durante seis meses más, lo que implica que las aves inmunizadas a la edad de dos meses que es la recomendada deben ser reinmunizadas a los ocho meses si es que van a estar expuestas a condiciones que favorezcan la enfermedad, sin embargo, bajo condiciones normales el nivel de exposición debe ser más bajo que el utilizado en una experimentación y es raramente necesario reinmunizar a las aves.

De igual manera menciona que los resultados obtenidos en los animales que recibieron dos aplicaciones de vacuna viva en forma consecutiva no concuerdan con la afirmación hecha de que este esquema de inmunización origina una disminución en el nivel inmunológico en el animal (10).

Se tienen evidencias de que la vacuna 9R de Salmonella gallinarum induce una buena protección en aves de aproximadamente 18 días de edad contra Salmonella pullorum, además de que los aislamientos de la cepa de desaffo en hfga do fué menor que en aves sin vacunar sacrificadas 96 horas después de la infección. Smith (1956) reportó que el grado -

de protección obtenido con cultivos de Salmonella pullorum es igual al inducido por Salmonella gallinarum por lo que el considera que Salmonella pullorum es una variante de Salmonella gallinarum (13).

La vacunación con 9R se recomienda siempre aunada a la aplicación de medidas sanitarias estrictas, y a la -- eliminación previa de las aves que resulten rectoras a la -- prueba de aglutinación, la vacunación en parvadas que estan -- infectadas está contraindicada pues solo se logra incrementar la severidad del brote. La inmunización en aves reproductoras solo está indicada en zonas enzooticas con altos porcentajes de prevalencia (6).

Flores Castro en 1975, encontró que la vacunación de inmunógenos de Salmonella gallinarum cepa 9R, no altera la producción de huevo ni disminuye el peso de las aves inmunizadas, así mismo corroboró los resultados de otros autores en cuanto a la buena respuesta inmune de la cepa 9R y la no eliminación de la misma a partir de huevo y heces en animales vacunados (3).

En México, la vacuna 9R se produce desde 1967 en el Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias y en la actualidad es elaborada por la Productora Nacional de Biológicos Veterinarios (PRONABIVE), donde el producto se somete a rigurosas pruebas de control de calidad. Desafortunadamente el mismo inmunógeno es preparado en forma clandestina por numerosos laboratorios en los que el Control de Calidad no se --

realiza, o bien se efectúa en forma muy superficial. Lo anterior da como resultado el uso indiscriminado de un producto que bajo esas circunstancias podría llegar a producir más daños que beneficios, un ejemplo de esto es que la vacunación se esta efectuando en forma masiva en aves reproductoras de todas las edades y sin la eliminación previa de aves reactivas (6).

1.15 CONTROL DE CALIDAD DE LA VACUNA 9R DE Salmonella gallinarum

El control de calidad de este producto, así como los demás que se elaboran en la Productora Nacional de -- Biológicos Veterinarios inicia desde el momento que ingresa la materia prima con la cual se llevará a cabo su producción, así como de los materiales necesarios como son frascos de vidrio, tapones y retapas. De igual manera, en el departamento de producción son llevados a cabo los cuidados y métodos de asepsia más estrictos tanto en áreas como en el material utilizado, con el fin de evitar probables contaminaciones en el producto.

La vacuna 9R debe de cumplir dos etapas importantes en su control de calidad en cuanto a los requisitos establecidos por la empresa y a nivel nacional, estas son: a) Al producto en proceso y b) Al producto terminado. Durante estas etapas se evalúa tanto pureza como disociación y cuenta viable, además de que el producto ya liofilizado es evaluado en cuanto a humedad, pH y vacfo.

De igual manera es establecida una fecha de caducidad, la cual define el Código Federal de Regulación (C.-F.R.) como: una fecha que marca el final de el período durante el cual, un producto biológico, cuando es apropiadamente almacenado y manipulado, puede esperarse con certeza que sea eficaz (7).

OBJETIVO

En base a la definición del C.F.R. y considerando que el producto no siempre es apropiadamente manipulado y almacenado, en este trabajo se lleva a cabo la evaluación de la estabilidad de la vacuna Salmonella gallinarum cepa 9R a tres diferentes temperaturas con objeto de conocer el posible comportamiento del producto en condiciones adversas de temperatura, así mismo, se estudiará la influencia de la presencia o ausencia de vacfo en las condiciones mencionadas anteriormente.

3.0. MATERIALES Y METODOS

MATERIAL DE VIDRIO Y EQUIPO

Pipetas graduadas de 10 ml 1/10
Pipetas graduadas de 1.0 ml
Asas pasteur de vidrio
Cajas de Petri de 100 x 20 mm
Botellas de dilución de leche de 160 ml.
Cuenta Colonias marca Sol-Bat
Mecheros de Fisher
Aparato de Tessler
Propipeta

REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO

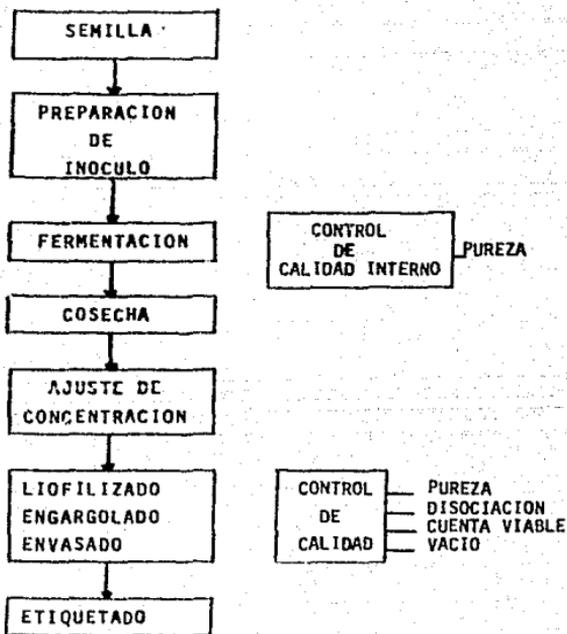
Peptona de Carne	Marca Bioxon
Tripticáseina Soya Agar	Marca Bioxon
Cloruro de Sodio	Marca Merck

MATERIAL BIOLÓGICO

Vacuna Salmonella gallinarum cepa 9R No. de lote 131222
Diluyente de 500 ml. No. de lote 131222

4.0 PROCEDIMIENTO

La producción de la vacuna Salmonella gallinarum es descrito en forma muy general por el siguiente diagrama - de bloques:



Una vez terminado el proceso de liofilización y engargolado en la vacuna, estas se sometieron a la prueba de vacío -- utilizando para ello el aparato de Tessler, en base a esto se-

realizó la división en dos grupos de 30 frascos cada uno, - uno de los grupos constituido por producto con vacfo y el -- otro sin vacfo.

Se tomaron dos frascos de cada grupo y se proce-- dió a realizarles cuenta viable, con objeto de establecer la concentración inicial del producto.

PRUEBA DE ESTABILIDAD ACELERADA : Se colocaron diez frascos de cada grupo a temperaturas de 4,20 y 37°C, - los cuales se evaluaron a lo largo de 31 días en su Cuenta - Viable empleando la técnica de diluciones decimales; la vacu- na fue reconstituida con solución Buffer Fosfatada y diluida en seis ocasiones en forma seriada empleando Solución Salina Peptonada (pH 7.2). A continuación tres cajas de Petri que - contenían medio de Tripticaseína Soya Agar fueron inoculadas en forma estéril con 0.1 ml de cada una de las tres últimas di- luciones e incubadas a 37°C durante 24 horas, al término de- este tiempo se cuentan las colonias, se obtienen promedios - por dilución y se lleva a cabo el cálculo de las Unidades -- Formadoras de Colonia por mililitro (U.F.C./ml.)

5.0 RESULTADOS

La tabla No.3 muestra los valores de Cuenta Viable obtenidos en cada grupo durante los 31 días de prueba a las diferentes temperaturas de exposición, a su vez, en las figuras 2 a 7 se encuentran graficados, la determinación del orden de reacción se realizó en base al método de sustitución propuesto por Martín (16), siendo ésta de primer orden por lo que se puede plantear el siguiente modelo:

$$\frac{dC}{dt} = -k C$$

$$\text{Integrando: } \int_{C_1=C_0}^{C_2=C_t} \frac{dC}{C} = -k \int_{t_1=0}^{t_2=t}$$

$$\text{Resolviendo: } \ln C_t - \ln C_0 = -k t$$

$$\text{Reagrupando: } \ln C_t = \ln C_0 - k t$$

Esta ecuación representa una línea recta donde:

$\ln C_t$ = Logaritmo natural de la Cuenta Viable a un tiempo t

$\ln C_0$ = Logaritmo natural de la Cuenta Viable inicial

K = Constante de velocidad de la disminución de la Cuenta Viable en el producto en función del tiempo.

t = Tiempo

Si esta ecuación se representa en forma logarítmica, obtenemos:

$$C_t = C_0 e^{-K \cdot t}$$

la cual a su vez explicaría el comportamiento logarítmico de la disminución de la Cuenta Viable en el producto.

FIG. No. 2. Cuenta Viable Vs. Tiempo
Vacuna a 37°C con vacfo

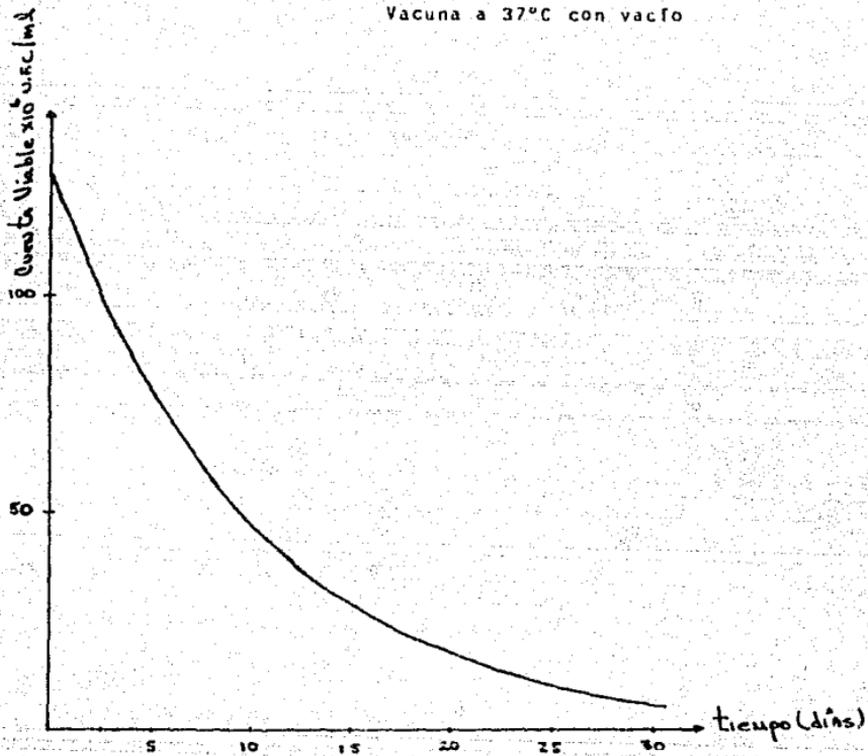


FIG. No. 5. Cuenta Viable Vs. Tiempo
Vacuna a 20°C con vacfo

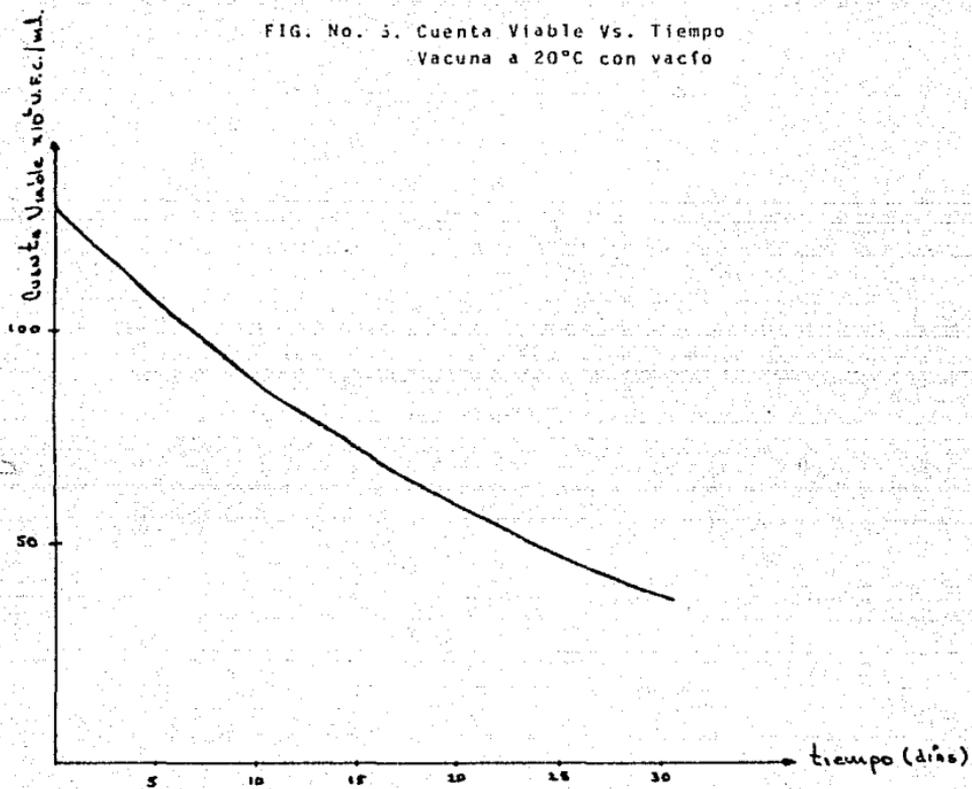


FIG. No. 4. Cuenta Viable Vs. Tiempo
Vacuna a 4 °C con vacío

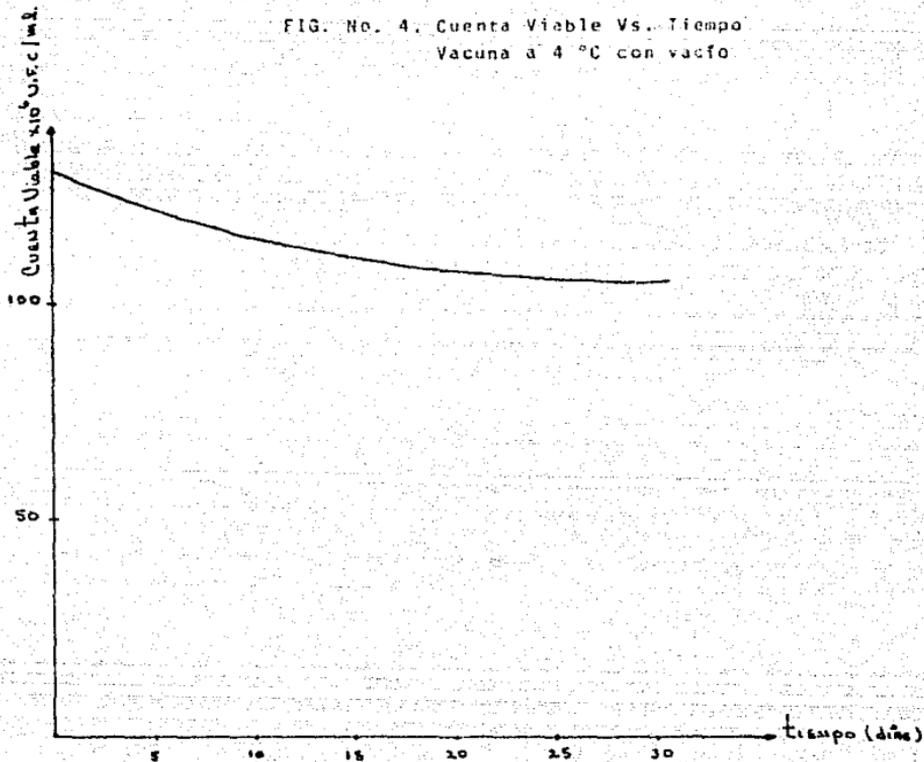


FIG. No. 5. Cuenta Viable Vs. Tiempo
Vacuna a 37°C sin vacfo

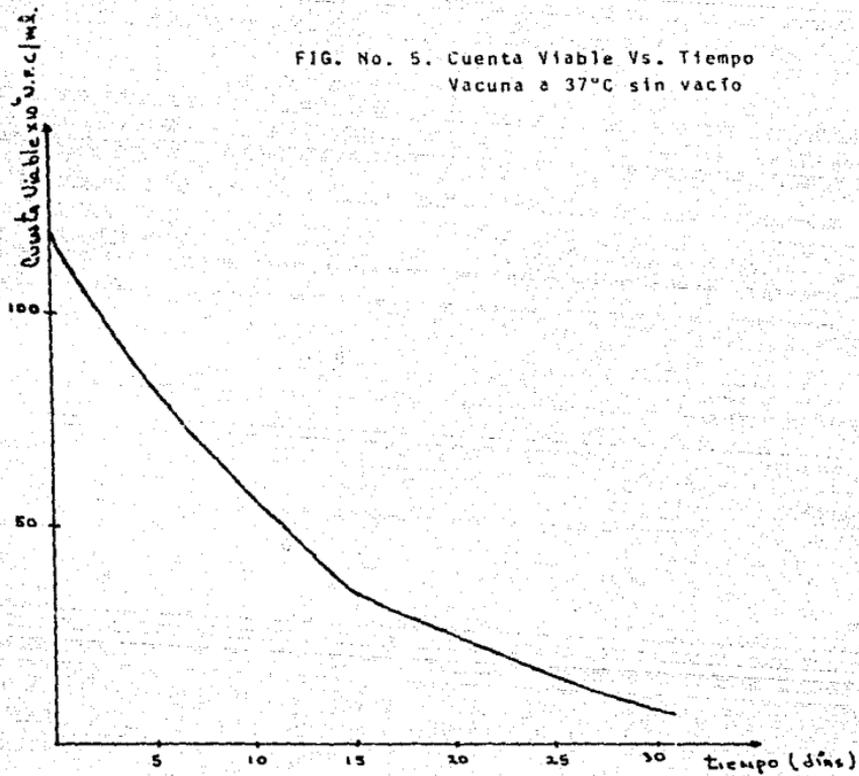


FIG. No. 6. Cuenta Viable Vs. Tiempo
Vacuna a 20°C sin vacfo

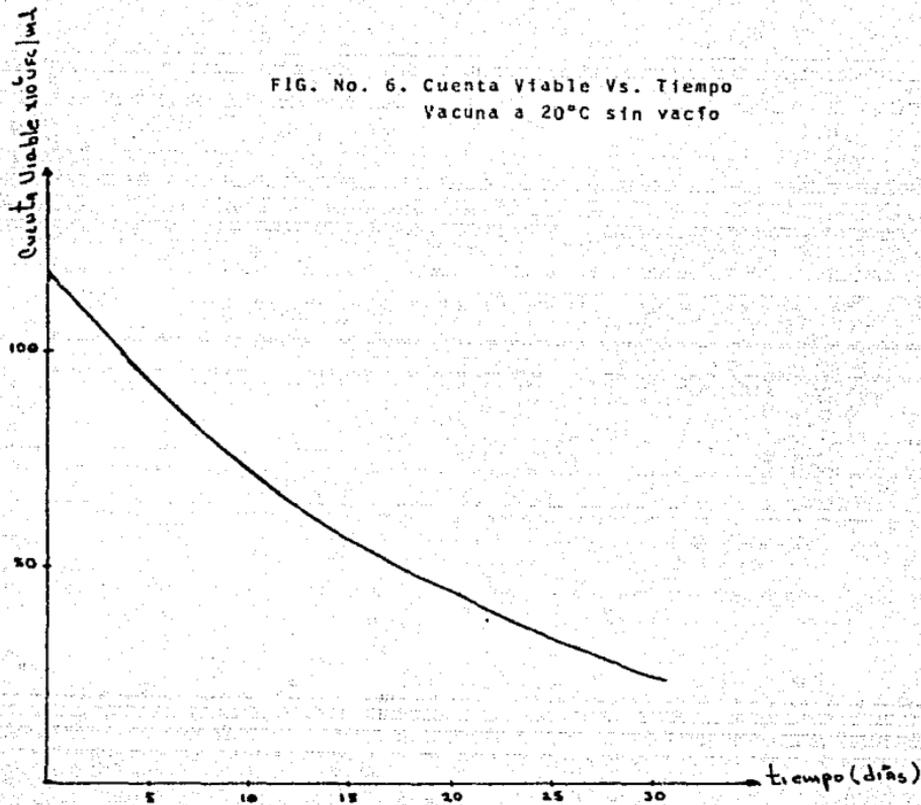
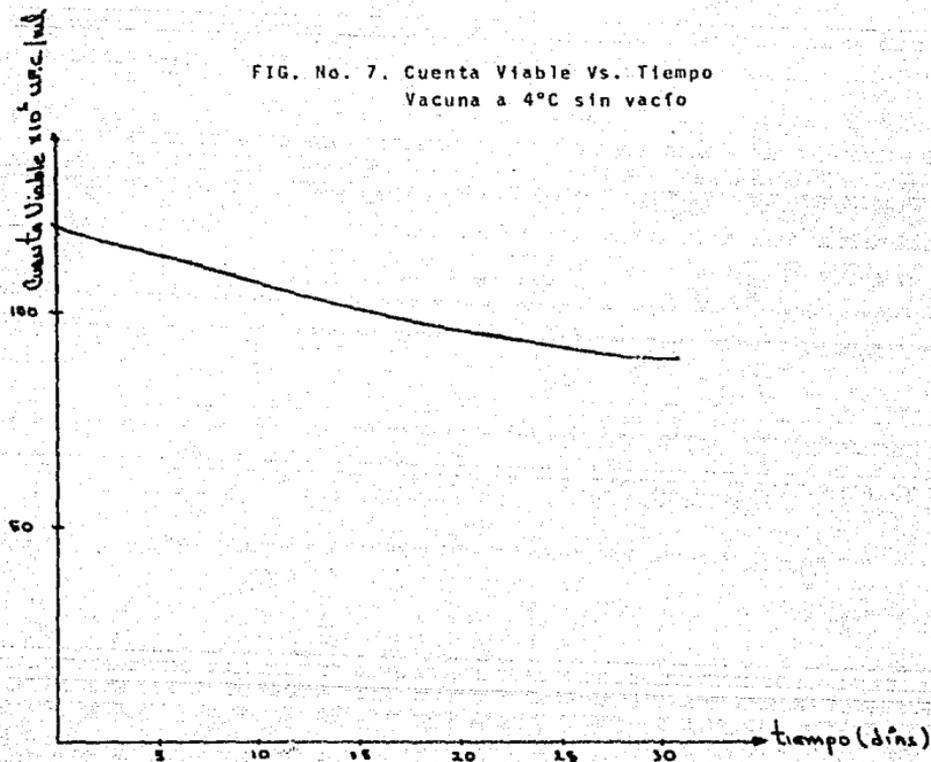


FIG. No. 7. Cuenta Viable Vs. Tiempo
Vacuna a 4°C sin vacfo



En la tabla No. 4 se encuentran tabulados los valores del logaritmo natural de la Cuenta Viable y el tiempo en que se realizó la prueba, los cuales se encuentran -- graficados en las figuras 8 a 13. En base a estos datos es posible calcular para cada vacuna tanto la pendiente como la ordenada al origen para poder establecer la ecuación correspondiente a cada temperatura.

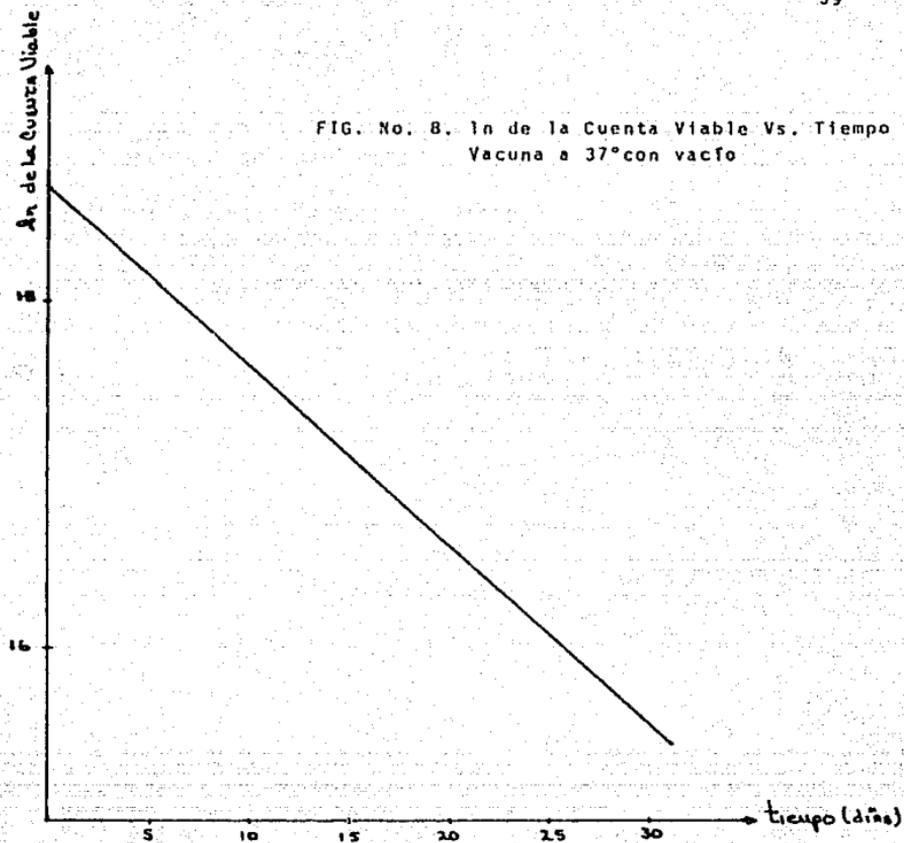
Tabla No. 3. Valores obtenidos de Cuenta Viable ($\times 10^6$ UFC/ml) a lo largo de 30 días, en los dos grupos sometidos a diferentes temperaturas.

Tiempo (días)	Vacuna a 37°C		Vacuna a 20°C		Vacuna a 4°C	
	Con vacfo	Sin vacfo	Con vacfo	Sin vacfo	Con vacfo	Sin vacfo
0	129.60	118.44	129.60	118.44	129.60	118.44
7	64.35	75.05	97.95	82.63	116.10	106.11
10	47.20	57.05	86.87	71.12	114.94	104.01
14	30.70	38.64	74.03	58.82	92.24	86.87
22	13.25	17.54	53.75	39.03	125.77	116.10
24	10.74	14.30	49.62	35.32	108.25	94.11
31	5.12	7.20	37.50	24.89	106.11	89.52

Tabla No. 4. Logaritmo natural de la cuenta Viable a los diferentes tiempos de prueba.

Tiempo (dias)	Vacuna a 37°C		Vacuna a 20°C		Vacuna a 4°C	
	Con vacfo	Sin vacfo	Con vacfo	Sin vacfo	Con vacfo	Sin vacfo
0	18.68	18.59	18.68	18.59	18.68	18.59
7	17.98	18.16	18.40	18.23	18.57	18.48
10	17.67	17.87	18.28	18.08	18.56	18.46
14	17.24	17.47	18.12	17.89	18.34	18.28
22	16.40	16.68	17.80	17.48	18.65	18.57
24	16.19	16.48	17.72	17.38	18.50	18.36
31	15.45	15.79	17.44	17.03	18.48	18.31

FIG. No. 8. ln de la Cuenta Viable Vs. Tiempo
Vacuna a 37° con vacfo



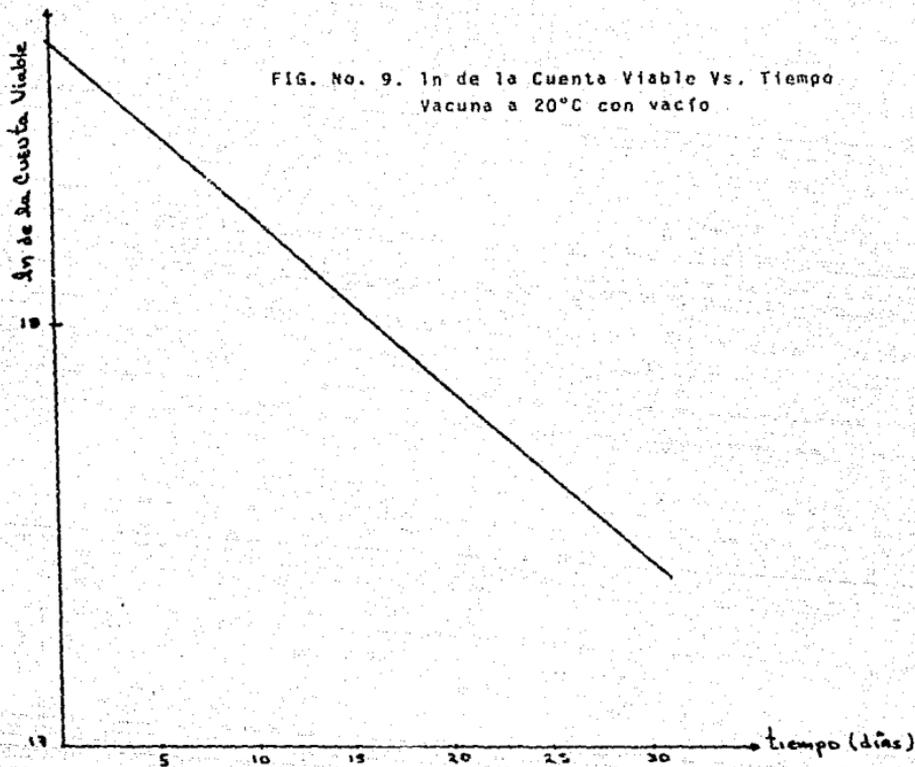
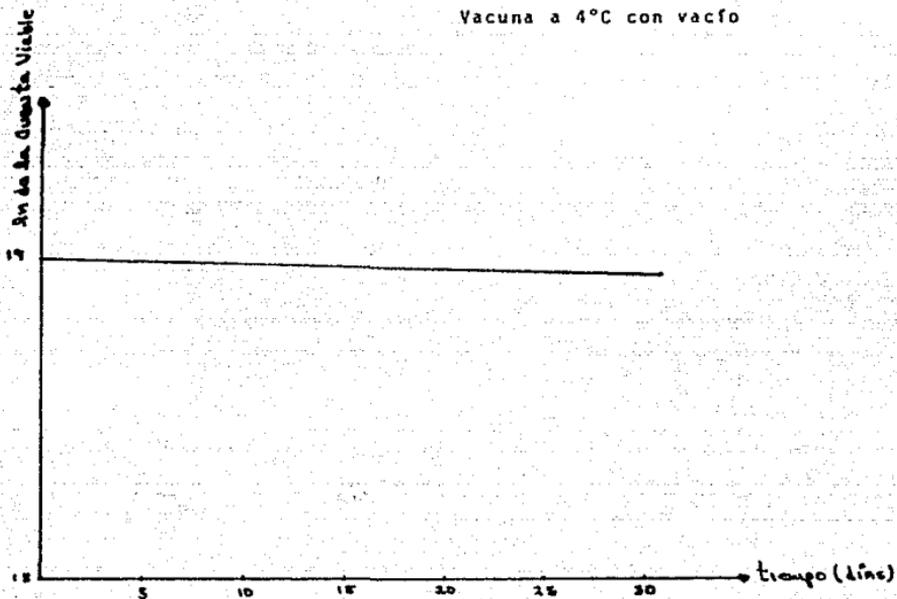
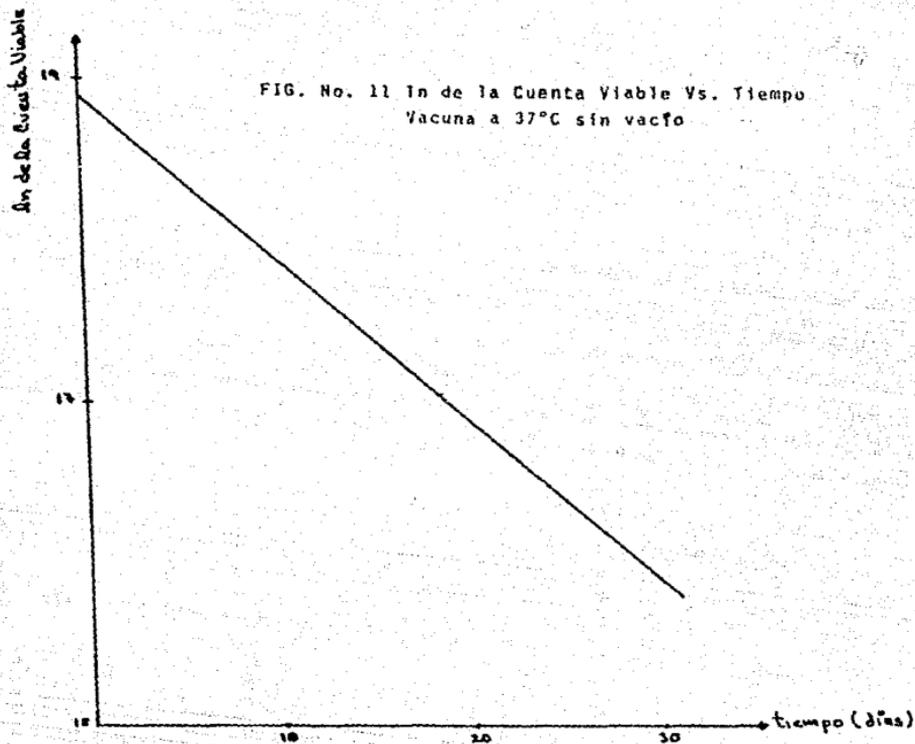


FIG. No. 10 ln de Cuenta Viable Vs. Tiempo
Vacuna a 4°C con vacfo





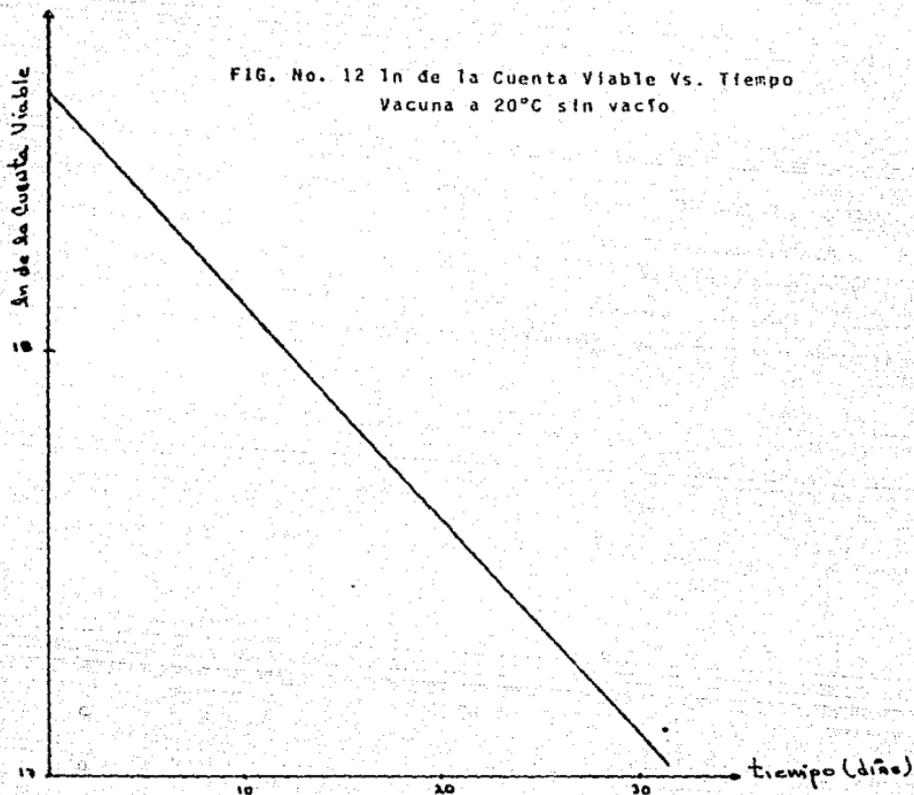
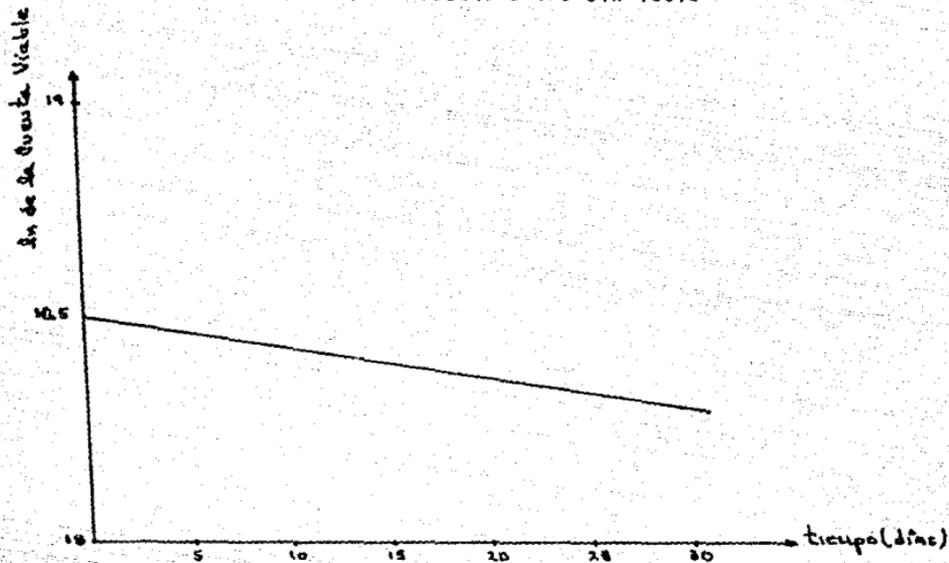


FIG. No. 13 ln de la Cuenta Viable Vs. Tiempo
Vacuna a 4°C sin vacfo



Obtención de los parámetros de la recta mediante el método de
Mínimos Cuadrados (2B)

<u>37°C Con vacío</u>	Pendiente: $-0.1046 \pm 0.0013 \text{ días}^{-1}$
Ordenada al origen:	18.70
	$r = -0.9999$
<u>37°C Sin vacío</u>	Pendiente: $-0.0988 \pm 0.0032 \text{ días}^{-1}$
Ordenada al origen:	18.85
	$r = -0.9970$
<u>20°C Con vacío</u>	Pendiente: $-0.0400 \pm 0.0015 \text{ días}^{-1}$
Ordenada al origen:	18.68
	$r = -1.0$
<u>20°C Sin vacío</u>	Pendiente: $-0.502 \pm 0.0008 \text{ días}^{-1}$
Ordenada al origen:	18.59
	$r = -1.0$
<u>4°C Con vacío</u>	Pendiente: $-0.040 \pm 0.0042 \text{ días}^{-1}$
Ordenada al origen:	18.60
<u>4°C Sin vacío</u>	Pendiente: $-0.0063 \pm 0.0040 \text{ días}^{-1}$
Ordenada al origen:	18.53

Por lo tanto la ecuación que representaría el comportamiento a las diferentes temperaturas sería:

<u>37°C Con vacío</u>	$\ln Ct = 18.70 - 0.1046 \pm 0.0013.t$
<u>37°C Sin vacío</u>	$\ln Ct = 18.85 - 0.0988 \pm 0.0032.t$
<u>20°C Con vacío</u>	$\ln Ct = 18.68 - 0.04 \pm 0.0015.t$
<u>20°C Sin vacío</u>	$\ln Ct = 18.59 - 0.0502 \pm 0.0008.t$
<u>4°C Con vacío</u>	$\ln Ct = 18.60 - 0.004 \pm 0.0042.t$
<u>4°C Sin vacío</u>	$\ln Ct = 18.53 - 0.0063 \pm 0.004.t$

La figura 14 muestra la Cuenta Viable en función del tiempo de los dos grupos a las diferentes temperaturas de exposición, de igual manera la figura 15 muestra los valores graficados del logaritmo natural de la Cuenta Viable durante

FIG. No. 14. Cuenta Viable Vs. Tiempo

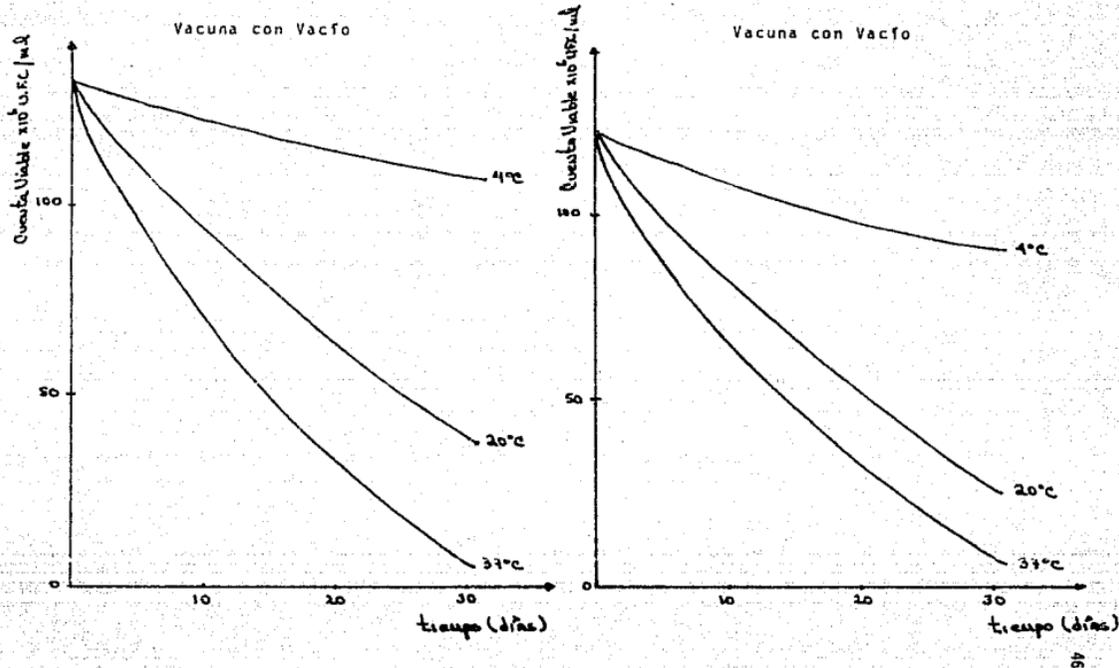
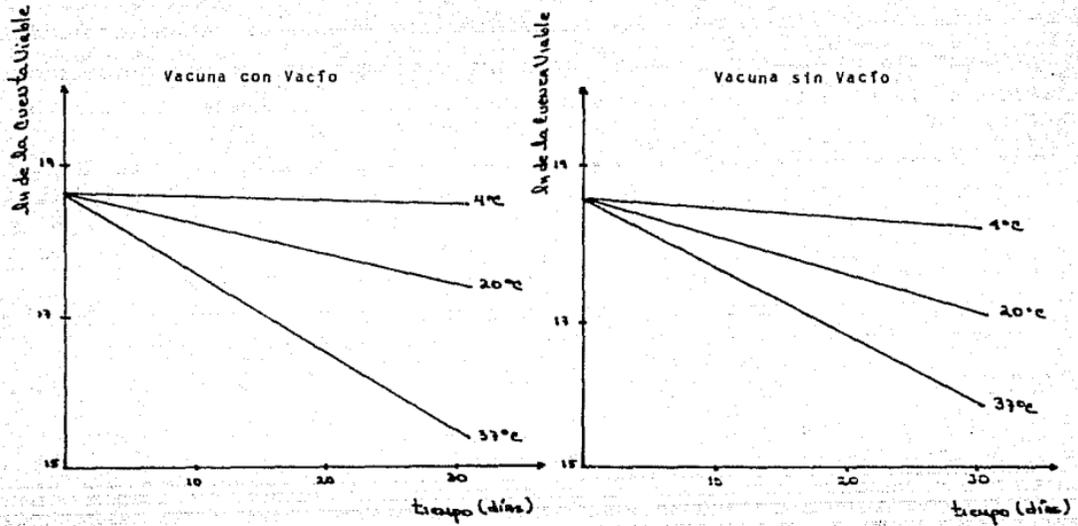


FIG. No. 15 In de la Cuenta Viable Vs. Tiempo



el periodo de prueba.

En base a las ecuaciones planteadas para cada temperatura y conociendo los respectivos valores de la constante de velocidad (K) es posible llevar a cabo la determinación de la dependencia del producto con respecto a ésta, utilizando la ecuación de Arrhenius (16)

$$\ln k - \ln A = E_a/R \cdot 1/T$$

donde:

$\ln k$ = logaritmo natural de la constante de velocidad de disminución de la Cuenta Viable.

T = Temperatura en grados Kelvin.

En la tabla No. 5 se encuentran tabulados el logaritmo natural de la constante de velocidad (K) y el inverso de la temperatura (en grados Kelvin⁻¹), dichos valores a su vez se encuentran graficados en la figura No. 16 para el producto con vacío y en la figura No. 17 para el producto sin vacío.

Considerando que el requisito mínimo establecido como satisfactorio es de 25×10^6 U.F.C./ml, se puede realizar un cálculo aproximado del tiempo en el cual se alcanzaría ese valor al someter el producto a las mismas condiciones de temperatura, para lo cual se lleva a cabo el despeje de la variable tiempo de la ecuación correspondiente de primer orden.

Para 37°C con vacío

$$\ln \text{ de la Cuenta Viable inicial } (129.60 \times 10^6 \text{ UFC/ml}) = 18.68$$

$$\ln \text{ de la Cuenta Viable deseada } (25 \times 10^6 \text{ UFC/ml}) = 17.03$$

$$K = 0.1046 \text{ días}^{-1}$$

Por lo cual al realizar el despeje tendríamos:

$$t = \frac{\ln C_0 - \ln C_t}{k}$$

Sustituyendo valores: $t = \frac{18.68 - 17.03}{0.1046 \text{ días}}$

$$t = 15.77 \text{ días}$$

Empleando el mismo criterio para los demás valores - se obtienen los valores mostrados en la tabla No. 6.

La tabla No. 7 presenta el porcentaje de pérdida de la Cuenta Viable durante el tiempo de prueba a las diferentes temperaturas de exposición.

Tabla No. 5. Valores empleados para la elaboración de la gráfica de Arrhenius.

<u>Temperatura (°C)</u>	<u>PRODUCTO CON VACIO</u>	
	<u>ln K</u>	<u>1/K° (X 10⁻³)</u>
37	- 2.2576	3.2258
20	- 3.2189	3.4129
4	- 5.5215	3.6101
	<u>PRODUCTO SIN VACIO</u>	
37	- 2.3147	3.2258
20	- 2.9917	3.4129
4	- 5.0672	3.6101

FIG. No. 16. GRAFICA DE ARRHENIUS

Vacuna con Vacfo

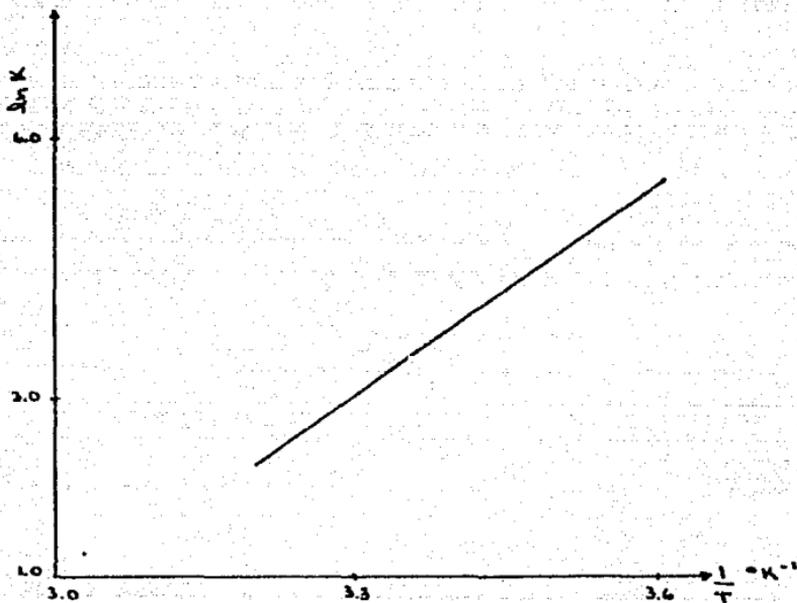


FIG. No. 17. GRAFICA DEARRHENIUS
VACUNA SIN VACIO

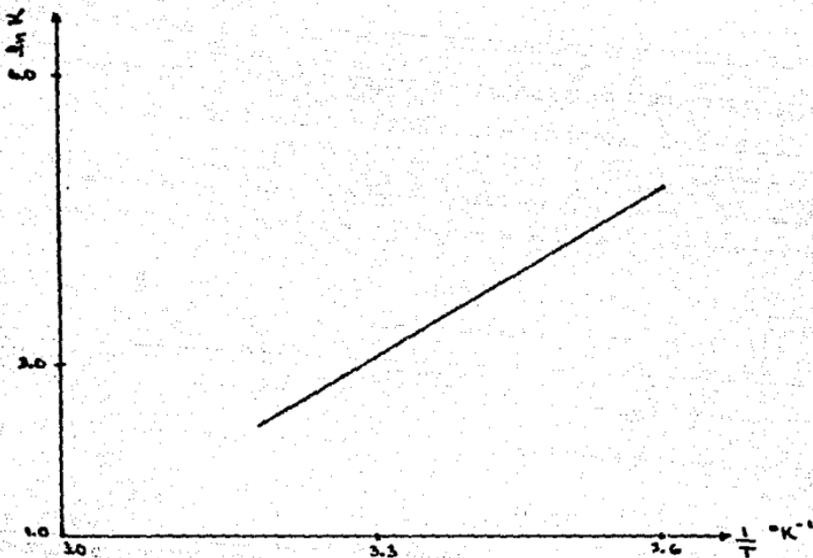


Tabla No. 6.- Tiempo estimado para que el producto alcance su requisito mínimo a las tres diferentes - temperaturas de prueba.

<u>PRODUCTO</u>	<u>Tiempo calculado (dias)⁺</u>
Vacuna a 37°C con vacfo	16
Vacuna a 37°C sin vacfo	16
Vacuna a 20°C con vacfo	41
Vacuna a 20°C sin vacfo	31
Vacuna a 4°C con vacfo	412.5 14 meses
Vacuna a 4°C sin vacfo	287.6 8.3 meses

+ Valores redondeados.

Tabla No. 7. Pérdida en porcentaje de la Cuenta Viable a los 30 días de exposición a las diferentes temperaturas de prueba.

<u>VACUNA CON VACIO</u>			
<u>Temperatura</u> (°C)	<u>Cuenta viable</u> <u>inicial</u>	<u>Cuenta viable</u> <u>final</u>	<u>Pérdida</u> (%)
37	129.60 X 10 ⁶ UFC/ml	5.12 X 10 ⁶ UFC/ml	96.05
20	129.60 X 10 ⁶ UFC/ml	37.50 X 10 ⁶ UFC/ml	71.06
4	129.60 X 10 ⁶ UFC/ml	106.11 X 10 ⁶ UFC/ml	18.13
<u>VACUNA SIN VACIO</u>			
37	118.44 X 10 ⁶ UFC/ml	7.20 X 10 ⁶ UFC/ml	93.92
20	118.44 X 10 ⁶ UFC/ml	24.89 X 10 ⁶ UFC/ml	78.99
4	118.44 X 10 ⁶ UFC/ml	89.52 X 10 ⁶ UFC/ml	24.42

6.0.- DISCUSION.

La tabla No. 7 muestra los resultados de la Cuenta Viable inicial y final durante los 31 días de exposición a 37, 20 y 4°C, se puede apreciar que en la vacuna a 37°C con y sin vacfo disminuye considerablemente, lo que es lógico de esperar ya que las pastillas cerca de la etapa final de la prueba mostraron variaciones en su forma y tamaño debido a la deshidratación originada por la temperatura de prueba, lo cual se manifestó en forma notoria en los resultados tan bajos.

A 20°C la vacuna no mostró variaciones en la forma de la pastilla, sin embargo, presenta una disminución en su Cuenta Variable en forma considerable, la cual, pese a que al finalizar el período de prueba muestra un valor aceptable respecto al requisito establecido de $25-150 \times 10^6$ UFC/ml, es seguro el esperar que si se hubiera continuado durante un tiempo mayor, ésta hubiera descendido. Esta observación sería válida también para el producto sin vacfo sometido a la misma temperatura, el cual muestra un Valor de Cuenta Viable muy cercano al requisito mínimo.

A 4°C, el producto con vacfo conserva un Valor de Cuenta Viable aceptable y muy cercano al valor de inicio, sin embargo el producto sin vacfo presenta una caída más drástica pese a que ninguno de estos productos mostró variaciones en la pastilla.

Respecto a los resultados mostrados en la tabla No. 6, referente a los tiempos estimados para que el producto al-

cance su requisito mínimo a las diferentes temperaturas de prueba, se observa que a 37°C pese a que el producto con vacío y sin vacío muestran el mismo valor, esto puede ser debido a la duración del tiempo de prueba y a que es un producto recién elaborado.

A 20 y 4°C, los resultados muestran que en ambos casos el producto sin vacío alcanza primero este valor, lo cual manifiesta en forma más marcada que un producto sin vacío pese a que se conserve a una temperatura adecuada, disminuye en forma notoria su Cuenta Viable a medida que aumenta el tiempo.

Con objeto de evaluar más a fondo el efecto del vacío en las vacunas y considerando que las evaluaciones no deben realizarse exclusivamente por apreciación directa en las gráficas, en el anexo Uno se presenta la comparación de las pendientes para los diferentes grupos de prueba mediante el empleo del análisis de covarianza.

Se observa que se tienen diferencias significativas ($p < 0.05$) en las vacunas sometidas a 37 y 20°C, mientras que a 4°C no se presenta significancia entre las pendientes; estos resultados son lógicos ya que a 4°C por ser la temperatura recomendada y debido al tiempo de prueba, la falta de vacío en el producto no alcanza a manifestarse plenamente.

Un aspecto interesante de esta prueba se puede observar en las vacunas sometidas a 20 y 37°C respectivamente ya que las diferencias entre pendientes observadas para el producto con vacío y sin vacío en cada una de estas temperaturas son muy cercanas. Sin embargo, el estudio de covarianza -

muestra que si existe diferencia significativa entre las pendientes apoyándose en el hecho de la evaluación de las desviaciones en la regresión que muestra cada recta.

Finalmente debe considerarse que en estudios de estabilidad que muestren cinética de primer orden se recomienda el realizar variaciones en la concentración del producto al inicio de la prueba, ya que esto permite establecer un rango de tiempo en el cual el producto alcanzará su requisito mínimo.

De igual manera los estudios de estabilidad acelerada realizados en productos biológicos pueden tener aplicaciones importantes en los respectivos procesos de producción, ya que al conocer la constante de velocidad promedio de disminución del título, pueden correlacionarse los valores iniciales de concentración del producto mediante el empleo de la respectiva curva de crecimiento, lo que implicaría un ahorro en los tiempos de producción.

7.0 CONCLUSIONES

- 1.- La vacuna sin vacfo presenta disminuciones mayores en su Cuenta Viable a medida que aumenta el tiempo.
- 2.- La predicción de una fecha de caducidad en base a este tipo de pruebas, debe ser confirmada mediante reprobadas a lo largo del periodo de vigencia establecido para el producto.
- 3.- Las pruebas de estabilidad acelerada deben de ser realizadas durante un tiempo suficientemente largo, que permita observar en forma notoria la disminución de la Cuenta Viable del producto principalmente a 4°C.
- 4.- El diseño de este tipo de estudios debe ser realizado de manera que permita el establecimiento de límites de confianza adecuados que aseguren la confiabilidad de los resultados.
- 5.- La evaluación de la Cuenta Viable debe de ser realizada de preferencia por un solo técnico para disminuir las variaciones en el grado de error en la realización de la técnica.
- 6.- La vacuna Salmonella gallinarum con vacfo muestra una excelente estabilidad, al ser almacenada o manipulada adecuadamente a la temperatura recomendada de 4°C.
- 7.- El método es adecuado para la evaluación de la estabilidad de productos biológicos.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

A N E X O 1

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Andonegui, L.H.; 1988: La Industria Farmacéutica como Productora de Biológicos.
Avirama, año 7, vol. VII, No. 73, pp. 10-14.
- 2.- Batalla, C.D.; 1988: Problemas Post-vacunales en bovinos.
Avirama, año 7, vol. VII, No. 73, pp. 37-38.
- 3.- Bojórquez, N.L.; 1986: Producción Control de vacuna Salmo nella gallinarum Cepa 9R. Primera reunión. Décimo aniversario. Productora Nacional de Biológicos Veterinarios.
- 4.- Camacho M.L.; 1988: Evaluación de la cadena fría en los -
dfas nacionales de vacunación antipoliomielítica en 15 es
tados de la República Mexicana.
Avirama, año 7, vol. VII, No. 73, pp. 39-40.
- 5.- Cameron, C.M., Buys, S.B.; 1979: Production and application
on a live Salmonella gallinarum vaccine.
Onderstepoort Journal of Veterinary Research, 46, pp. 185-
189.
- 6.- Ciencia Veterinaria; 1981: Epizootiología de la Salmonelosis en Bovinos, porcinos y aves.
Universidad Nacional Autónoma de México, pp. 162-170.
- 7.- Code of Federal regulations; Production Requirements for -
Biological Products.
Parts 1 to 199, part 144, pp. 504-505.
- 8.- Cortez, H.S.; 1988: Factores que influyen en la calidad de un biológico.
Avirama, año 7, vol. VII, No. 73, pp. 31-32.

- 9.- Cowan, S.T., Steel, K.J.; 1979: Manual para la identificación de bacterias de importancia médica.
2a. ed. Ed. Compañía Editorial Continental S.A., México, pp. 156-163.
- 10.- Davis, D., et al; 1983: Tratado de Microbiología.
2a. ed. Ed. Salvat, Barcelona, pp. 781-790.
- 11.- Flores, C.R.; 1988: Diferentes aspectos que afectan la -
Inmunización de los bovinos.
Avirama, año 7, vol. VII, No. 73, pp. 35-36.
- 12.- González, P.M.; 1984: Almacenamiento y distribución de -
Biológicos.
Curso Internacional sobre el control de vacunas virales.
Oct.-Nov., México, OPS-OHS.
- 13.- Gupta, B.R., Mallick, B.B.; 1977: Use of 9R Strain of -
Salmonella gallinarum as vaccine against Salmonella pollo
rum infection in chicks.
Indian Veterinary Journal (53), pp. 331-333.
- 14.- Jawetz, E., et al; 1981: Manual de Microbiología Médica.
9a. ed. Ed. El Manual Moderno, pp. 226-231.
- 15.- Lozano, D.B.; 1988: Fallas en la inmunización, análisis y
experiencias de campo en la clínica aviar.
Avirama, año 7, vol. VII, No. 73, pp. 15-18.
- 16.- Martín, N.A.; 1983: Physical Pharmacy Principles in the -
Pharmaceutical Sciences.
LEA & FEBIGER, Philadelphia, pp. 52-360.

- 17.- Morilla, G.A.; 1988: Fallas vacunales debidas a factores de los animales.
Avirama, año 7, vol. VII, No. 73, pp. 28-29.
- 18.- Morilla, G.A.; 1988: La cadena frfa en la vacuna contra Cólera Porcino.
Avirama, año 7, vol. VII, No. 73, pp. 42-43.
- 19.- Murray, M.J.; 1986: Salmonella: Virulance factors and -
enteric Salmonellosis.
Journal of the American Veterinary Medical Association.-
189 (2), pp. 145-147.
- 20.- Padilla, S.J.; 1988: La red frfa en productos biológicos para pequeñas especies.
Avirama, año 7, vol. VII, No. 73, pp. 33-34.
- 21.- Acha, N.P., Szyfres, B.; 1977: Zoonosis y enfermedades -
transmisibles comunes al hombre y a los animales.
Organización Panamericana de la Salud. Publicación Científica, No. 354, pp. 86-92.
- 22.- Raya, R.R.; 1988: Consideraciones sobre el uso adecuado de los inmunógenos.
Avirama, año 7, vol. VII, No. 73, pp. 19-25.
- 23.- Reddy, G.A., et al; 1987: Efficacy of Sulphadiazine-Tri-methoprim Combination Against Salmonella gallinarum.
Indian Veterinary Journal (64), pp. 218-222.
- 24.- Sarfati, M.N.; 1988: La cadena frfa en los productos biológicos para aves.
Avirama, año 7, vol. VII, No. 73, pp. 6-8.

- 25.- Silva, R., et al; 1980: Studies on the use of 9R Strain of *Salmonella gallinarum* as a vaccine in chickens. *Avian Diseases*, 25 (1), pp. 35-81.
- 26.- Villalobos, F.A., et al ; 1988: Cadena frfa para productos biológicos de uso en bovinos. *Avirama*, año 7, vol. VII, No. 73, pp. 45-58.
- 27.- Wayne, W.D.; 1983: *Bioestadfstica*. Ed. Limusa, México, pp. 255-272.