

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**Duración de la Viabilidad de la Vacuna Antirrá-  
-bica Cepa V-319/Acatlán, después  
de Reconstituida**

**T E S I S   P R O F E S I O N A L**

Que para obtener el título de  
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P r e s e n t a

**ANA VEL MELGAREJO BAÑOS**

Asesor: M.V.Z., M.S., Ph. D.

Eliseo Hernández Baumgarten

MEXICO, D. F.

**TESIS DONADA POR  
D. C. L. - ONAMI**

1981



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## C O N T E N I D O

	Página
RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
OBJETIVO	6
MATERIAL	7
METODOS	10
RESULTADOS	14
DISCUSION	19
CONCLUSIONES	20
BIBLIOGRAFIA	21

" DURACION DE LA VIABILIDAD DE LA VACUNA ANTIRRABICA CEPA  
V-319/ACATLAN, DESPUES DE RECONSTITUIDA "

R E S U M E N

Se estudió el lote 79-2-B de la vacuna antirrábica cepa V-319/Acatlán elaborada en el Departamento de Investigación en Producción de Biológicos del Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias, de la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. (I.N.I.P., S.A.R.H.), con el objeto de obtener el tiempo -- que dura viable después de reconstituida, a temperaturas de 4°C y 28°C.

Se reconstituyeron las vacunas, haciendo dos mezclas y se mantuvieron una a 4°C y la otra a 28°C, a partir de éstas, fueron tomadas a diferentes tiempos alícuotas de 0.5ml., para hacer diluciones decimales y con ellas inocular a camadas de ratones lactantes de cepa CD-1, por vía intracerebral. La titulación de virus se hizo por el método de Reed y Muench.

A cada uno de los títulos obtenidos se les calcularon los límites de confianza al 90% con el método de Pizzi.

En las gráficas correspondientes, se trazó una línea cuya inclinación indicó el tiempo de viabilidad del producto al momento de cruzar la línea del título mínimo de protección. La inclinación de dicha línea fué calculada por la técnica de cuadrados mínimos.

Los resultados indican, que la vacuna, una vez reconstituida a una temperatura de 4°C tiene una viabilidad de 15.5 horas y a 18°C de 4.5 horas.

## I N T R O D U C C I O N

Uno de los problemas con que se enfrenta la ganadería en México es la rabia paralítica, enfermedad viral de bovinos y otras especies, caracterizada fundamentalmente por una parálisis simétrica, progresiva y ascendente de tipo Landry, transmitida por la mordedura de un murciélago hematófago, siendo el más común el Desmodus rotundus, que actúa como reservorio y vector de esta enfermedad. Es el más abundante en México tanto por el número de individuos como por su amplia distribución geográfica, que va -- desde el Norte de México hasta la región central de Argentina. -- El Diphylla ecaudata es raro encontrarlo en México y el Diaemus youngi no existe en nuestro país (10, 15, 6).

La rabia paralítica se presenta principalmente en las zonas tropicales y subtropicales en México. (Jalisco, Oaxaca, Guerrero, Sinaloa, Veracruz, Yucatán, Puebla, Morelos, Colima, Nayarit, Chihuahua, Zacatecas, Durango, Campeche, Chiapas, Tabasco, San Luis Potosí, Nuevo León), donde habita este quiróptero hematófago, causando los brotes de rabia paralítica, durante todos los meses del año, siendo mas frecuentes en los meses de Abril y Mayo (10, 6, 19).

El agente causal de la rabia es un virus que está clasificado dentro de la familia Rhabdoviridae y en el género de los lyssavirus, tiene forma de bala, posee peplómeros, mide de 150 a -- 200 nm de longitud por 100 nm de ancho, es un virus filtrable -- que no es posible observarlo mediante el microscopio óptico común (11, 17).

Para el control y prevención de la enfermedad se han desarrollado vacunas con diferentes técnicas y métodos de producción, actualmente en el mercado, se encuentran vacunas de virus vivo -- atenuado o modificado (4).

En 1911 Semple y colaboradores reportaron las primeras vacunas antirrábicas inactivadas con formalina (3).

Posteriormente, aparecieron vacunas de virus vivo modificado, como es el caso de las vacunas avianizadas, producidas en -- embrión de pollo. (12).

En 1948, Koprowsky y colaboradores, adaptaron la cepa flury en embrión de pollo, efectuando de 40 a 50 pases y fué conocido como cepa flury de bajo pasaje, después aumentaron los pases en embrión de pollo hasta 142 6 156 y se denominó cepa flury de alto pasaje (3). Esta vacuna fué introducida a México en 1957, -- por Camargo y Velazquez (8). En 1962 Mac Pherson y Stoker, obtuvieron la línea celular BHK-21 (Baby Hamster Kidney, Batch-21) - (16). En la cual demostraron que el virus de la rabia se multiplicaba rápidamente produciendo inclusiones intracitoplasmáticas y citolisis parcial.

A partir de estos descubrimientos se han seguido estudios -- diversos y en la actualidad es posible cultivar una gran variedad de células para la adaptación de diferentes virus a estos -- cultivos celulares (16, 20) un ejemplo de esto es la vacuna anti -- rrábica cepa "ERA" desarrollada en 1964 por Abelseth, en células de riñón de cerdo, la cual confería una inmunidad de 4 años (2, 4), los biológicos antirrábicos elaborados en cultivos celulares con diversas cepas de virus, son productos antigénicos inocuos y que generan protección durante periodos largos de tiempo (5, 13).

La vacuna antirrábica V-319/Acatlán, también es elaborada a partir de cultivos celulares. Esta vacuna se aisló a partir de un vampiro macho, capturado en San Vicente Oaxaca, con infección generalizada. Se procedió a infectar monoestratos de cultivos -- celulares de vampiro, con una suspensión al 20% de cerebro infec -- tado, después de 4 pases en células embrionarias de vampiro, se obtuvo un título máximo de  $10^{2.6}$  DL50 para ratón lactante (7). -- Dado que estos títulos eran muy bajos y debido al hecho de que -- el virus de la rabia producía títulos mas altos en la línea celu -- lar BHK-21, se cultivó la cepa V-319/Acatlán en esta línea celu -- lar. Después de varios pases, dicha cepa adquirió la capacidad de formar placas en suspensión agarosa por lo que se procedió a

purificar el virus por clonación, seleccionando una caja de petri que contenía una sola placa.

Esta clona V-319/cl-476, alcanzó entonces un título de  $10^{9.0}$  UFP\*/ml. En 3 pases más, estabilizándose en este título (7). A partir de esto se le hicieron una serie de pruebas y ha salido -avante de todas ellas. En la actualidad se sabe que confiere -- una protección de 3 años (7).

Es de todos conocido el hecho, de que aún cuando el producto sea bueno, y que haya sido elaborado bajo normas estrictas de esterilidad y pasando las pruebas de pureza, inocuidad, viabilidad y potencia, (9) su efectividad dependen en gran parte del manejo que se le dé a éste en el campo o al momento de su aplica--ción.

Se ha recomendado no emplear la vacuna antirrábica una hora después de reconstituida (16), pero desconocemos el tiempo en -- que esta pierde su viabilidad. Sabemos bien que quien la reconstituye y mantiene en refrigeración al efectuar la vacunación de unos cuantos animales no tendrá problemas con descenso del título. Pero nos preguntamos, que ocurre cuando una vez reconstituida la vacuna y mantenida en hielo o al medio ambiente pasan varias horas entre una vacunación y otra, como sucede con mucha -- frecuencia durante las campañas de vacunación antirrábica, o -- bien durante una vacunación masiva en un rancho en donde la sujeción de los animales a vacunar, representa serios problemas por carecer de mangas de manejo o equipo adecuado.

Ante esta situación se ha decidido determinar la duración - de la viabilidad de la vacuna antirrábica cepa V-319/Acatlán, -- una vez reconstituida, tanto a 4°C como a 28°C, durante un lapso de tiempo de 24 horas.

\* Unidades Formadoras de Placas.

El enfoque de este experimento va mas bien dirigido al técnico, ya sea elaborador o distribuidor del producto, para que a nivel campañas de vacunación no se especule con el tiempo y la viabilidad de éste ocasionando con esto un mal empleo del mismo y en esta forma perjudicar la debida respuesta inmunológica del animal vacunado.



O B J E T I V O

Indicar la duración de la viabilidad de la vacuna antirrábica cepa V-319/Acatlán, después de reconstituida a temperatura de 4°C y 28°C, para mejorar las condiciones de manejo de la misma en el campo y en las campañas de vacunación antirrábica.

## M A T E R I A L

### Material Biológico

- Ratones blancos cepa CD-1, lactantes de 0 a 2 días de edad, estos ratones fueron proporcionados por el Depto. de Bioterio -- del I.N.I.P., S.A.R.H.
- Suero de Ternera.- El suero se separó del coágulo, fué centrifugado 2 veces a 3000 rpm. durante 20 minutos en cada centrifugación, y se esterilizó por filtración con filtros millipore con presión positiva, fué envasado en volúmenes de 400 ml y congelado a una temperatura de -20°C. Al descongelarse fué inactivado en baño maría a 56°C durante 30 minutos y se conservó en refrigeración a 4°C.
- Vacuna antirrábica cepa V-319/Acatlán, frascos de 1 dosis. Esta vacuna fué elaborada en el laboratorio de Investigación en Producción de Biológicos del I.N.I.P. y pertenecientes al lote - 79-2-B, con un título oficial de  $10^{-5.6}$ .

### Material Químico

- Medio BKH-21 (Gibco).- Este medio es preparado de acuerdo - con las instrucciones del fabricante (12.57 grs de medio más 2.75 grs de  $\text{NaHCO}_3$  por litro de agua deionizada). El pH al que se - ajustó fué de 7.1 utilizando para este HCl al 0.1N. Se esterilizó por filtración en filtros millipore con presión positiva, y - envasó en volúmenes de 400 ml conservandose en refrigeración a - 4°C.
- Diluyente propio de la vacuna.- Es una mezcla de los si--- guientes compuestos.

$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	1.54 grs
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	12.6 grs
Rojo de fenol al 1%	1.5 ml
$\text{H}_2\text{O}$ deionizada	1000 ml

- Antibióticos. Es una mezcla de penicilina estreptomicina, - preparandose de la siguiente forma: 20 gr de estreptomicina base más 20,000,000 U.I. de penicilina sal sódica en 1 litro de agua - deionizada. Se esterilizó por filtración con filtros millipore y se envasó en volúmenes de 2 ml conservandose a -20°C.

Material Físico

- Jaulas de ratones con bebederos.
- Jeringas de tuberculina de 0.25 ml.
- Agujas del No. 27.
- Cámara fría a 4°C.
- Estufa a 28°C.
- Pipetas de 1, 5 y 10 ml.
- Tubos de ensaye.
- Gradilla.
- Guantes de latex.
- Algodón.
- Gasa.
- Baño de hielo.

## M E T O D O S

### I. Tratamiento de la vacuna.

Se reconstituyeron 8 frascos de vacuna antirrábica de la cepa V-319/Acatlán de 1 dosis cada uno con 2 ml para cada frasco - del diluyente recomendado por el productor, posteriormente fueron vertidos en un frasco estéril con el fin de hacer una mezcla homogénea, dicha mezcla fue conservada a 4°C. De la misma forma se hizo otra mezcla que se mantuvo a 28°C, a partir de estas fueron tomadas a diferentes tiempos alícuotas de 0.5 ml para realizar diluciones decuples, utilizando como diluyente medio BHK-21 más 2% de suero de ternera inactivado y 0.5% de antibióticos. - Esto se hizo con el fin de proteger el título vacunal remanente y evitar que bajara violentamente al hacer las diluciones.

Las diluciones decimales fueron hechas a partir de la dilución  $10^{-1}$  hasta  $10^{-7}$ .

Todas las vacunas empleadas fueron del lote 79-2-B, producidas en el Depto. de Investigación en Producción de Biológicos del I.N.I.P. y con un título oficial de  $10^{-5.6}$  calculado por el MVZ. Octavio Hernández Baumgarten.

El motivo por el cual las mezclas son mantenidas a 4°C y 28°C es saber el tiempo que dura viable cuando se trabaja a una temperatura óptima y cuando la vacuna es manejada a una temperatura promedio del rango de temperatura existente en las zonas tropicales y subtropicales de México.

### II. Titulación de la vacuna.

La titulación se efectuó en los siguientes tiempos:

Inmediatamente, 1, 2, 3, 6, 12 y 24 horas después de haber hecho la mezcla tanto a 4°C como a 28°C. Para este fin se utilizaron camadas de ratones lactantes, seleccionando hembras con no

menos de 5 ratones, aquellas que tenían más se les quitaron para ser donadas a las hembras que tenían 5 ó 6 ratones, de tal modo que todas las hembras quedaron con 7 ratones c/u y con una edad de 0 a 2 días.

Todas las camadas tuvieron un período de adaptación al cuarto de ratones de 24 horas, que sumadas a su edad, resultaron camadas de 1 a 3 días.

El local se mantuvo a una temperatura de 18 a 25°C.

Las camadas fueron divididas en dos lotes A y B y a su vez c/u de ellos constó de 7 sublotos con 7 camadas cada uno. Los ratones fueron inoculados por vía intracerebral con 0.02 ml/ratón de la dilución correspondiente.

Las diluciones fueron utilizadas a partir de  $10^{-2}$  hasta  $10^{-7}$ , duplicando la dilución  $10^{-4}$ , por considerarse como crítica tomando en cuenta el título oficial, se esperaba que éste bajara. Por lo tanto se utilizaron 7 camadas para cada uno de los tiempos antes mencionados, y una camada por cada dilución decimal. Cada una de las camadas inoculadas fué perfectamente identificada con la hora, la fecha y la dilución correspondiente.

Los animales fueron observados diariamente durante un período de 21 días, los que murieron durante los primeros 3 días no se tomaron en cuenta para los resultados ya que se consideraron como muertos por traumatismo.

### III. Análisis estadísticos.

El título de virus fué calculado por el método de Reed y Muench (14) sacandose la DL50 y el título de la vacuna en cada uno de los diferentes tiempos en los que se inoculó. A cada uno de estos títulos se les calcularon los límites de confianza al 90% por el método de Pizzi (18).

Al término de esta primera parte del trabajo, los resultados indicaron que a las 24 horas después de reconstituida la vacuna, conservaba un buen título, por lo que se optó por extender el experimento a un período de 48 horas, inoculando en esta segunda parte en los siguientes tiempos: Inmediatamente, 3, 24, 30, 36, 42 y 48 horas.

Tomando un promedio de los tiempos repetidos o sea: inmediatamente, 3 y 24 horas.

Con los resultados de los títulos y los límites de confianza de cada uno, se elaboró una curva de inactivación, calculada por el método de cuadrados mínimos (1).

## FORMULAS EMPLEADAS

### ■ Reed y Muench (14)

$$D_p = \frac{DL > 50 - 50}{DL > 50 - dl < 50} = X + FD + 1.7 = DL_{50}$$

$D_p$  = Distancia proporcional

$DL$  = Dosis Letal

$FD$  = Factor de dilución mayor a la dosis letal que se este calculando

1.7 = Al factor de corrección de la cantidad inoculada (0.02 ml.)

### ■ Método de Pizzi (18)

$$DL_{75} = \frac{DL > 75 - 75}{DL > 75 - dl < 75} = X + FD$$

$$DL_{25} = \frac{DL > 25 - 25}{DL > 25 - dl < 25} = X + FD$$

$$n = \frac{(R^2 + R^3 + R^4 + 12^5 + 12^6 + R^7)}{\text{No. de diluciones}}$$

donde  $R$  = al número de ratones, utilizados por cada dilución

$$LC = \sqrt{\frac{(0.79)(h)(R)}{n}} = X(1.79)$$

donde:  $h$  = intervalo común

$R$  = rango intercuartorio (diferencia entre  $DL_{75}$  y  $DL_{25}$ )

$n$  = número de observaciones

$LC$  = límite de confianza

$DL_{50}$      $LC$

### ■ Método de cuadrados mínimos (1)

$$b = \frac{\sum X Y - n \bar{X} \bar{Y}}{\sum X^2 - n \bar{X}^2}$$

$$a = \bar{Y} - b \bar{X}$$

$$Y_e = a + bX$$

Donde:  $X$  = al tiempo de inoculación

$Y_e$  = al título obtenido en cada tiempo



## R E S U L T A D O S

La titulación de las diferentes alícuotas de la vacuna, tratadas como se indicó en material y métodos, arrojó algunos datos un tanto desconcertantes, ya que con frecuencia murieron uno o varios ratones en diluciones altas, estando separadas estas muertes en algunas ocasiones por dos o más diluciones sin mortalidad. Por ejemplo en la titulación de 3 horas a 28°C en la segunda parte del experimento en la que las diluciones  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  no causaron ninguna muerte en tanto que la dilución  $10^{-7}$  causó 7 muertes. Estos resultados se vaciaron en el cuadro No. 1 a fin de que pueda emplearse estos resultados con las reservas del caso.

En el cuadro No. 2 se anotaron los títulos de virus obtenidos con las diferentes muestras, así como los límites de confianza al 90% de las titulaciones, calculados según el método de Pizzi (18).

La gráfica No. 1 muestra la cinética de inactivación del virus rábico a 4°C, en donde puede apreciarse que el tiempo crítico en el cual la vacuna deja de ser adecuada, es decir cuando el título bajó de 5.85 DL50 para ratón lactante, lo cual ocurre a las 15 horas y 36 minutos.

La inclinación de la línea fué calculada con la técnica de cuadrados mínimos (1), y el tiempo crítico se definió como el punto de cruce entre la línea de inactivación viral con el título mínimo de la vacuna en forma gráfica directa.

La gráfica No. 2 ilustra, de manera similar la cinética de inactivación viral a 28°C y el tiempo crítico en este caso ocurre a las 4 horas con 24 minutos.

CUADRO 1							
DATOS DE MORTALIDAD QUE RESULTARON SER UN TANTO EXTRAÑOS							
DILUCIONES						Tiempo de inoculación	Temperatura
10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>		
7/7	6/7	11/14	1/7	2/7	3/6	2 horas	4° C
7/7	5/7	8/14	3/7	1/7	3/7	3 "	4° C
7/7	7/7	7/14	1/7	0/7	2/7	6 horas	4° C
7/7	7/7	7/14	0/7	1/7	2/7	24 "	4° C
7/7	4/7	7/14	2/7	1/7	5/7	1 "	28° C
7/7	5/7	11/14	0/7	0/7	2/7	2 "	28° C
7/7	7/7	4/14	0/7	0/7	2/7	3 "	28° C
7/7	5/6	11/14	1/7	1/7	3/7	12 "	28° C
*7/7	5/7	1/7	0/7	0/7	7/7	3 "	28° C

\*Estos datos ocurrieron en la segunda parte del experimento, los demás corresponden a la primera parte del mismo.

A.M.B. - Oct. 1981

CUADRO 2

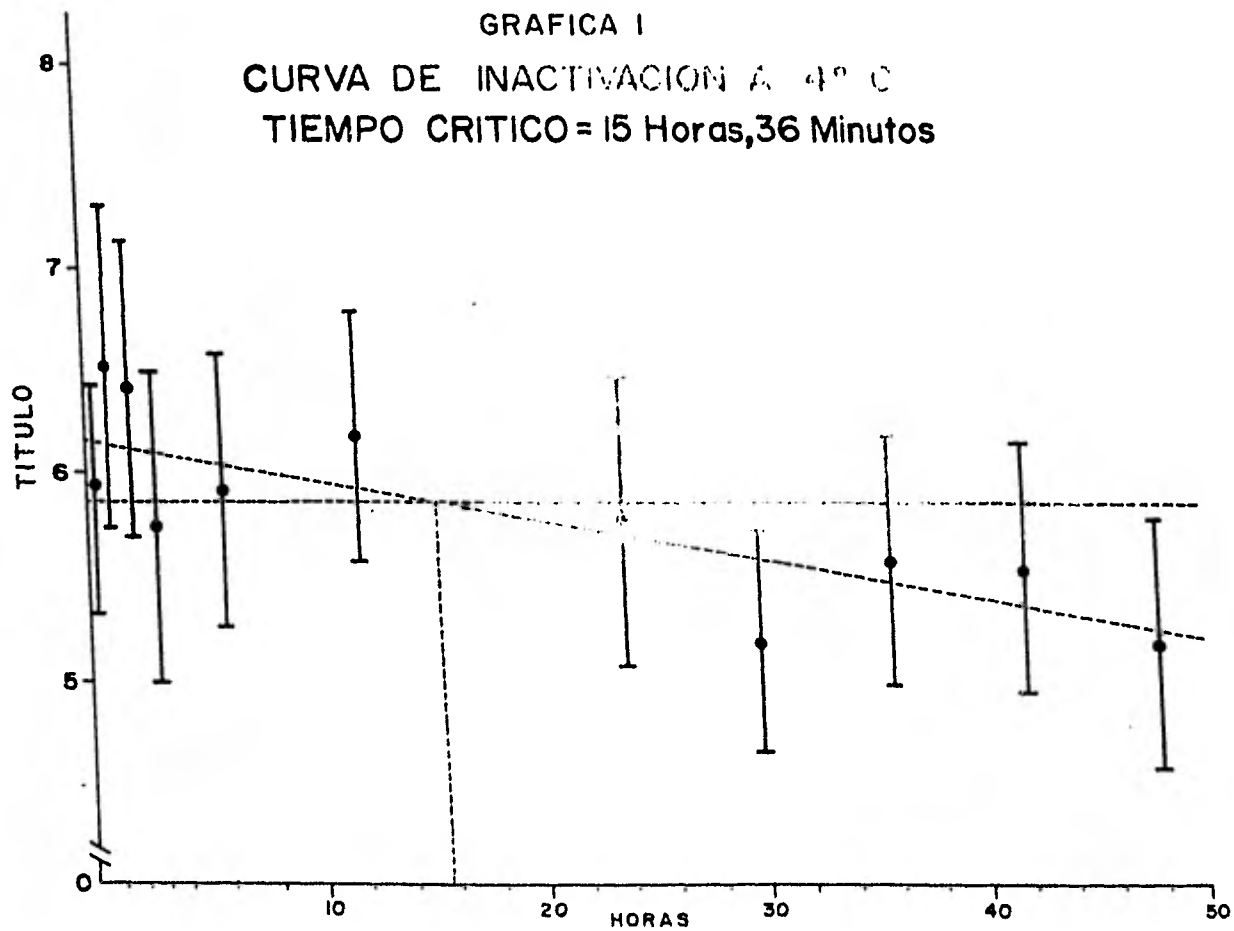
RESULTADOS DE TITULACION Y LIMITES DE CONFIANZA DE LOS  
DIFERENTES TIEMPOS Y TEMPERATURAS

Tiempo de Inoculación	4° C		28° C	
	Título	L C al 90 % (Pizzi)	Título	L C al 90 % (Pizzi)
Inmediatamente *	10 <sup>-5.87</sup>	± 0.56	10 <sup>-5.52</sup>	± 0.62
1 Hora	10 <sup>-6.62</sup>	± 0.78	10 <sup>-6.09</sup>	± 0.92
2 Horas	10 <sup>-6.41</sup>	± 0.72	10 <sup>-6.08</sup>	± 0.61
3 Horas *	10 <sup>-5.73</sup>	± 0.75	10 <sup>-5.29</sup>	± 0.69
6 Horas	10 <sup>-5.91</sup>	± 0.66	10 <sup>-5.77</sup>	± 0.66
12 Horas	10 <sup>-6.18</sup>	± 0.61	10 <sup>-6.34</sup>	± 0.74
24 Horas *	10 <sup>-5.77</sup>	± 0.7	10 <sup>-5.98</sup>	± 0.84
30 Horas	10 <sup>-5.18</sup>	± 0.53	10 <sup>-4.82</sup>	± 0.96
36 Horas	10 <sup>-5.57</sup>	± 0.61	10 <sup>-4.24</sup>	± 0.72
42 Horas	10 <sup>-5.53</sup>	± 0.61	10 <sup>-4.27</sup>	± 0.72
48 Horas	10 <sup>-5.16</sup>	± 0.61		

\*Estos resultados son el valor promedio de dos titulaciones.

A.M.B.— Oct. 1981

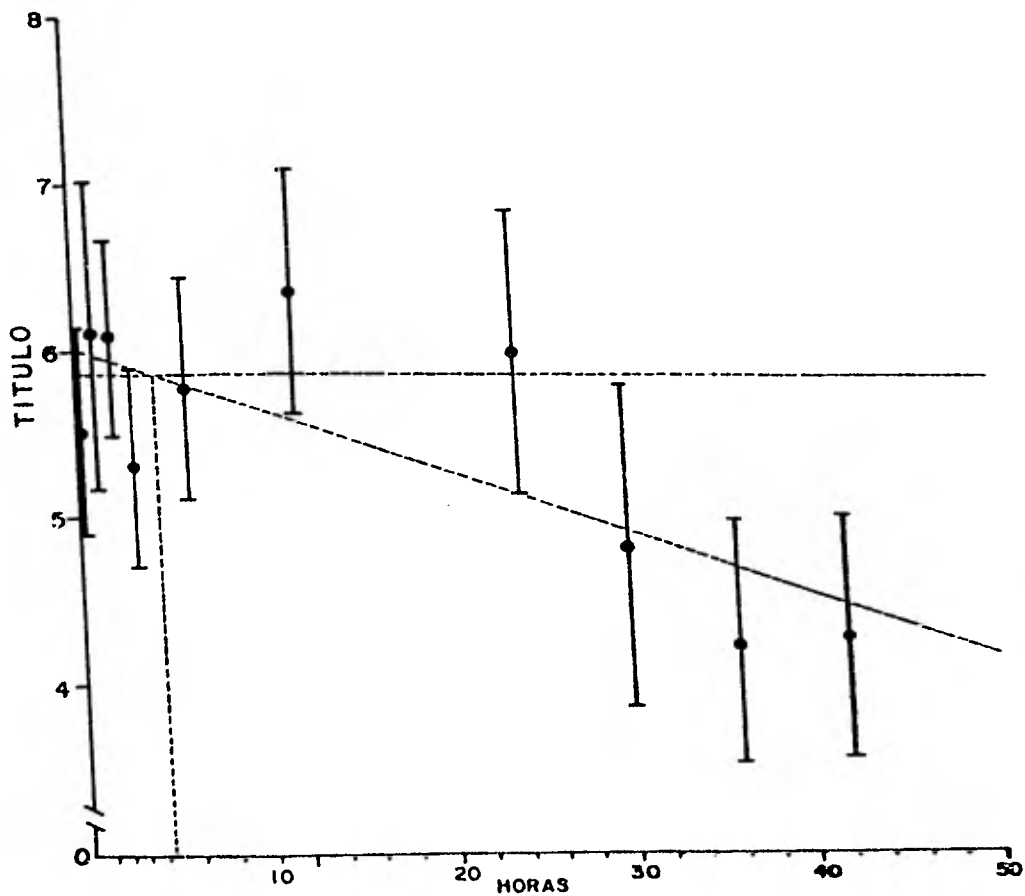
GRAFICA I  
CURVA DE INACTIVACION A 4° C  
TIEMPO CRITICO = 15 Horas,36 Minutos



A.M.B. - Oct. 1981

GRAFICA 2

CURVA DE INACTIVACION A 28° C  
TIEMPO CRITICO = 4 Horas, 24 Minutos



A.M.B.-Oct. 1981

## D I S C U S I O N

Como puede observarse en las gráficas uno y dos, los títulos de la vacuna varían considerablemente, de una muestra a otra, por lo que se hace necesario determinar los límites de confianza de cada titulación. Es evidente que aún con las grandes variaciones obtenidas en muestras cercanas, en las que no se esperan grandes variaciones en el título, todavía caen dentro de los límites de confianza. La prueba en ratones lactantes muestra estas características (cuadro 1) en su empleo, de ahí que sea necesario aplicar métodos estadísticos para reducir las variaciones al mínimo.

Como se puede ver, los títulos arrojados por las diferentes alícuotas tomadas de la mezcla mantenida a 4°C no muestran diferencias significativas, más aún cuando les son aplicados los límites de confianza al 90%, debido a esto se utilizó la técnica de cuadrados mínimos para establecer una pendiente, y con ello - lograr precisar en que tiempo dicha pendiente cruza la línea del título mínimo de protección, que es de  $10^{-5.85}$ . En el caso de - 4°C resultó ser a las 15 horas y 36 minutos.

De los títulos obtenidos de las alícuotas, tomadas de la -- mezcla que fué mantenida a 28°C, se puede observar que a partir de las 30 horas los títulos muestran una clara disminución, aún cuando les eran aplicados los límites de confianza al 90%, es por eso que se optó por no tomar la alícuota correspondiente a las - 48 horas considerándose incesario. Al trazar la pendiente en la gráfica, se puede notar que el tiempo crítico es de 4 horas y 24 minutos.

Se notará que el título obtenido al tiempo "0" es superior al título oficial obtenido por el M.V.Z. Octavio Hernández B., - también es importante considerar que el título mínimo inmunizante de la vacuna. Quizá por esto los tiempos de viabilidad de la vacuna sea tan cortos; es de esperarse que con vacunas de título inicial mas alto, estos tiempos cambien.

## CONCLUSIONES

1. Cuando una vacuna es mantenida a 4°C, siendo esta temperatura la óptima para el manejo de la misma, sabemos que después de reconstituida tiene una viabilidad de 15.5 horas, lo cual permitirá en muchos casos no desechar los sobrantes de las vacunas que no se han utilizado, significando una ganancia económica.
2. Cuando la vacuna es destinada para su aplicación en animales de las zonas Tropicales y Subtropicales de nuestro país, en donde condiciones de campo es muy difícil mantener una vacuna a 4°C, sabemos ya, que a una temperatura promedio de 28°C, el biológico tendrá una viabilidad después de haberse reconstituido de 4.5 horas.
3. Los resultados de éste trabajo no deberán tomarse para abusar del producto, sino más bien como un margen de seguridad para quienes tengan la necesidad de utilizar la vacuna anti rrbica.
4. Mediante este trabajo se determinó en que período de tiempo empieza a descender nuestro título viral, tomando en cuenta el factor temperatura, que es fundamental para lograr el manejo adecuado del producto y así modificar las recomendaciones en cuanto a la viabilidad del biológico.

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

1. Alder, H.L. and Rossler, E.B.: Introduction to probability and Statistics 3ed. Ed. (1964) W.H. Freeman & Co. San Francisco U.S.A.
2. Arellano, C., Sureau, P. y Batalla, D.: Evaluación de la eficiencia de la vacuna antirrábica cepa ERA en bovinos: I antigenicidad. Tec.Pec.Mex. 18: 12-14 (1971).
3. Baer, G.: The natural history rabies, New York Academic Press, 1975.
4. Batalla, D., Arellano, C., Sureau, P.: Evaluación serológica de las vacunas antirrábicas para bovinos que existen actualmente en México. Tec.Pec.Mex.; 18:22-26 (1971).
5. Boletín Epizootiológico sobre rabia paralítica, Vol. I: No. 2, segundo trimestre de 1975 P.I.R.P. - I.N.I.P. (S.A.G.).
6. Boletín Epizootiológico, sobre rabia paralítica; Vol. I: No. 3, tercer trimestre de 1975 P.I.R.P. - I.N.I.P. (S.A.G.)
7. Boletín sobre rabia paralítica, 1976, vacuna antirrábica - de origen murciélagos - vampiro, cepa V-319/Acatlán para proteger al ganado bovino contra la rabia pasesiante, en México P.I.R.P. - I.N.I.P. (S.A.G.).
8. Camargo, N. y Velázquez, A.: Desarrollo y producción en México de la vacuna avianizada para el control del derringue. Bot. Of. Sanit. Panam.: 43: 251-259 (1975).
9. Departamento de control de productos biológicos, farmacéuticos, alimenticios y equipo para animales.; Requerimientos mínimos de calidad que deberán llevar los productos biológicos para uso veterinario Cap. II ; B-1, B-2 (1977).
10. Flores, C.R., Morales, R.J.: Métodos para combatir los vampiros. Tec.Pec.Méx.; 29-73-80 (1975).
11. Hernández B.E.; El virus rábico, morfología, morfogenesis y crecimiento en cultivos celulares. Ciencia Veterinaria, segunda edición. U.N.A.M. 1-34 (1978).



12. Hernández, B.E.; La rabia parejante bovina, definición del problema y metodología de control. Ciencia Veterinaria, primera edición U.N.A.M. 104-126 (1976).
13. Hernández, B.E., Morales, R.J., Arellano, S.C. Campos, V.J., López, B.B., Pérez, R.H.: Evaluación de una vacuna comercial antirrábica inactivada para bovinos, producida en cultivo de tejidos (Alurabiffa). Tec.Pec.Mex.; 30: 57-63 (1976).
14. Kaplan, M.M. and Koprowsky, H. Ed. Laboratory techniques in rabies World Health organization, monograph. Series # 23, Third ed., 329-332 (1973).
15. Mancisidor, A.A.: El uso de una vacuna autógena en el control de un brote de derriengue en México. Tec.Pec.Mex., 5: 27-29 (1965).
16. Mancisidor, N.A.: Aislamiento de virus rábico en cultivos celulares a partir de salivas. Tec.Pec.Mex. 18: 89-92 (1971).
17. Morales, R. y Flores R.: Prevención de la rabia paralítica bovina control de la enfermedad Tec.Pec.Mex.; 29: 81-86 (1975).
18. Pizzi, M.: Sampling variation of the fifty percent end-point determined by the Reed and Muench (Behrens) method. Hum. Biolo., 22: No. 3, 151-190 (1950).
19. Smithkline.: Noticias Norden. Rabia transmitida por murciélagos. Vol. 1, No. 7. (1980).
20. The National Archives of the United States.: Code of Federal regulations. U.S Government Printing Office Washinton: 295-01 (1977).

