

14-26



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

DURACION DE LA VIABILIDAD DE LA VACUNA ANTIRRABICA
CEPA V-319/ACATLAN DESPUES DE RECONSTITUIDA, DETER-
MINADA MEDIANTE LA PRUEBA DE MICROFOS FLUORES-
CENTES.

Tesis presentada ante la División de Estudios Profesionales de
la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad
Nacional Autónoma de México

Para la obtención del título de
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
p o r

JULIAN ARMADA RUIZ



A s e s o r:
M.V.Z. Msc. Ph. d. Eliseo Hernández Baumgarten

México, D. F.

1984



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	5
MATERIAL Y METODOS	6
RESULTADOS	15
DISCUSION	19
CONCLUSIONES	20
LITERATURA CITADA	21

DURACION DE LA VIABILIDAD DE LA VACUNA ANTIRRABICA CEPA V-319/ACATLAN,--
DESPUES DE RECONSTITUIDA, DETERMINADA MEDIANTE LA PRUEBA DE MICROFOCOS--
FLUORESCENTES.

JULIAN ARMADA RUIZ

Asesor: M.V.Z, Msc. Ph.d. Eliseo Hernández Baumgarten.

R E S U M E N

Se reconstituyó la vacuna antirrábica Cepa V-319/Acatlán del lote--
82-2 elaborada en el Departamento de Investigación en Producción de Bio--
lógicos (J.N.I.P. - S.A.R.H.) para determinar el tiempo que dura viable--
la vacuna después de reconstituída a temperaturas de 4 C y 28 C .

Se tomaron muestras de .5 ml. cada 6 horas de la vacuna reconstituí--
da, con cada muestra se infectaron cultivos celulares contenidos en tu--
bos de Leighton.

Se tituló el virus residual en la vacuna reconstituída mediante la--
prueba de microfocos fluorescentes.

Los títulos obtenidos se graficaron y se trazó una curva de inacti--
vación, para saber el tiempo en que cruzaba la línea del título mínimo--
de protección.

Los resultados de éste trabajo indican que la vacuna antirrábica- -
Cepa V-319/Acatlán, después de reconstituída y mantenida a 4 C, tiene- -
una viabilidad de 21 horas 52 minutos, y a 28 C tiene una viabilidad de--
11 horas 38 minutos.

INTRODUCCION:

La rabia pareasiente bovina o derriengue es una de las enfermedades - que causa problemas a la ganadería de México, ya que ésta, causa la muerte de gran cantidad de animales (3,4,6,7,11,12), debido a que la rabia pareasiente bovina se presenta en forma enzootica en México y países de Centro y Sudamérica (4).

Se presente la rabia pareasiente en México ya que ésta es transmitida por los murciélagos hematófagos o vampiros (4,7,11). Los vampiros de mayor importancia en México son: Desmodus rotundus y Desmodus r. murinus, - los cuales son reservorios del virus, ya que no muestran signos de la enfermedad y excretan virus rábico en la saliva, por períodos hasta de cinco meses, y además el único alimento que toman los vampiros, es la sangre (9). Por lo que, el vampiro al morder al animal, le transmite la enfermedad (4,7,11).

El agente etiológico de la rabia pareasiente bovina es un virus, que pertenece al género Lissavirus, familia Rhabdoviridae, tiene forma de bala y mide aproximadamente 60-80 nanómetros (nm) de ancho por 170-180 nanómetros (nm) de largo, y su ácido nucleico está constituido por ARN (4,7).

Se han empleado dos métodos de control del problema del derriengue:-

- 1.- Control del murciélago hematófago (Desmodus rotundus) (9).
- 2.- Vacunación antirrábica bovina (2,5,12).

Ninguno de estos métodos resolverá por si solo el problema, y se requiere de su aplicación conjunta. Por lo que se refiere a la vacunación antirrábica, se requieren vacunas que inmunicen adecuadamente al ganado, - en otras palabras, que generen una respuesta inmunológica duradera y específica (11).

En la actualidad las vacunas elaboradas en cultivos celulares contienen antígenos depurados y generan una inmunidad adecuada (12), las vacunas elaboradas en cultivos celulares que se han aplicado al ganado en México, han demostrado ser eficaces a nivel de campo, confiriendo una adecuada inmunidad por períodos largos (2,5,11). En el caso de las vacunas antirrábicas, elaboradas con virus activo, protegen en base al estímulo antigénico que producen, y esto a su vez está condicionado por la multiplicación local del virus en el animal (4).

Intervienen diversos factores que pueden hacer que una vacuna no proteja, como son, entre otros: Mal manejo de la vacuna antes y después de -

que lleguen al ganadero, o bien que las vacunas no llenen los requerimientos mínimos antes de salir del laboratorio productor (6).

En cuanto al manejo de la vacuna antirrábica, durante la vacunación masiva de animales, la vacuna es reconstituída y mantenida en hielo o al medio ambiente, pudiendo pasar varias horas entre una vacunación y otra -- por carecer de instalaciones adecuadas para el manejo del ganado. Esto es causa de desperdicio de vacuna, ya que se recomienda a priori, que la vacuna no utilizada se deseche después de una hora de reconstituída. Ante esta situación se decidió determinar la duración de la viabilidad de la vacuna antirrábica Cepa V-319/Acatlán, una vez reconstituída, tanto a 4 C como a 28 C durante un lapso de 36 horas. Un estudio previo sobre la viabilidad de la vacuna reconstituída se ha efectuado ya (17), utilizando ratones lactantes para titular el virus residual a diversos tiempos. Ahora con la técnica de cultivos celulares podemos aislar, multiplicar y titular a los virus (20). Una prueba para la titulación y viabilidad del virus de la rabia es la prueba de microfocos fluorescentes, la cual es una técnica in vitro para la titulación y seroneutralización del virus de la rabia (10).

La prueba de microfocos fluorescentes se basa en que las células infectadas con virus rábico acumulan material que se tiñe con anticuerpos -- fluorescentes, y que a mayor adaptación del virus al cultivo celular, la cantidad de células infectadas será mayor (13). Dependiendo de la replicación del virus rábico y la línea celular empleada el antígeno puede ser detectado dentro de las células mediante la técnica de anticuerpos fluorescentes directa, a varios tiempos después de la infección (15), esta característica del virus de la rabia ha sido empleada con éxito para la titulación de anticuerpos, así como para pruebas de la viabilidad del virus de la rabia adaptada a cultivos celulares (13), por lo tanto, el uso de la -- prueba de microfocos fluorescentes, como el de todas las pruebas in vitro -- está restringido, en el caso del virus de la rabia, a cepas adaptadas a -- cultivos celulares (10), y por esta razón, es que en el presente trabajo -- se empleó la vacuna antirrábica Cepa V-319/Acatlán, la cual se adaptó y -- elabora en cultivos celulares (5).

En este trabajo se determinó la duración de la viabilidad de la vacuna antirrábica Cepa V-319/Acatlán, después de reconstituída, utilizando la técnica de microfocos fluorescentes, como un complemento al trabajo de Melgarejo (17), que se mencionó antes, a fin de obtener un punto de vista complementario sobre este importante aspecto del empleo de la vacuna antirrábica.

antirrábica Cepa V-319/Acatlán.

OBJETIVO.

Determinar la duración de la viabilidad de la vacuna antirrábica Cepa V-319/Acatlán, después de reconstituida a temperatura de 4 C y 28 C, titulando la vacuna mediante la prueba de microfocos fluorescentes.

MATERIAL.

Material biológico.

1.- Línea celular 13S clona 7.- Esta línea celular es una clona de la línea BHK-21, obtenida de riñón de hamster lactante y adquirida por el I.N.I.P., del Instituto Wistar de Filadelfia E.U.A.

2.- Vacuna antirrábica Cepa V-319/Acatlán, frascos de 5 dosis. Esta vacuna fue elaborada en el laboratorio de Investigación en Producción de Biológicos del I.N.I.P., y pertenecientes al lote 82-2, con un título oficial de 10^{-7} DLRL 50%.

3.- Suero de ternera.- El suero se obtuvo de sangre proveniente de rastro. El suero se separó del coágulo, fue centrifugado dos veces a - - 3000 RPM, durante veinte minutos en cada centrifugación, y se esterilizó por filtración con filtros Millipore con presión positiva, fue envasado - en volúmenes de 400 ml. y congelado a una temperatura de -20 C. Al des-- congelarse fue inactivado en baño maría a 56 C durante 30 minutos y se -- conservó en refrigeración a 4 C.

4.- Conjugado Antirrábico (anticuerpos fluorescentes).

BBL Cockeysville, Maryland.

21030 U.S.A.

Div. Becton, Dickinson & CO. .

De este conjugado se utilizó un frasco ampula liofilizado el cual se reconstituyó con 5 ml. de agua deionizada estéril (dilución concentrada)- poniéndose en viales de .5 ml. y con cada .5 ml. se hizo una dilución - - 1:20.

5.- CVS.- Virus rábico al 20 %, obtenido de cerebro de ratón de 21 días de edad. Proporcionado por el Departamento de Epizootiología perteneciente al I.N.I.P.

6.- CN.- Cerebro normal de ratón de 21 días de edad en suspensión al 20%, proporcionado por el Departamento de Epizootiología perteneciente al I.N.I.P.

MATERIAL QUIMICO.

1.- Medio BHK-21 (Gibco), en solución.

Medio BHK-21 (Gibco), en polvo	12.57 g.
NaHCO ₃ (Bicarbonato de sodio)	2.75 g.
Agua deionizada.	1000 ml.

Se disolvió por separado el NaHCO₃ en 100 ml. de agua deionizada, y por separado se disolvió el BHK-21 en los 900 ml. restantes, ya disuelto se le agregaron los 100 ml. en donde está disuelto el NaHCO₃. Se ajustó el pH 6.9 -7.1 con HCL 1 N.

Se esterilizó con filtro Millipore con una membrana de 0.22 micras, y se envasó en volúmenes de 500 ml.

2.- Caldo de triptosa fosfatada (TPB) (Broth).

Caldo de triptosa fosfatada (en polvo).	29.5 g.
Agua deionizada.	1000 ml.

Se envasó en volúmenes de 500 ml. y se esterilizó en autoclave a 15 libras de presión durante 15 minutos.

3.- Diluyente de la vacuna.

NaH ₂ PO (fosfato de sodio monobásico)	1.54 g.
Na ₂ HPO ₄ (fosfato de sodio dibásico)	12.60 g.
Rojo fenol al 1%	1.50 ml.
Agua deionizada	1000 ml.

4.- Antibióticos.

Penicilina G. potásica.	20 000 000 U.I.
Estreptomina base	20 g.
Agua deionizada	1000 ml.

Se agitó durante 30 minutos, después se filtró por sistema Millipore se envasó en frascos de 5 ml. y se almacenó a -20 C.

5.- Solución fosfatada (PBS) sin Ca y Mg pH7.2.

Fosfato potásico monobásico	2.55 g.
Fosfato sódico dibásico	7.98 g.
Cloruro de sodio	4.25 g.
Agua deionizada	1000 ml.

Se envasó en volúmenes de 500 ml. y se esterilizó en autoclave a 15 libras de presión durante 15 minutos.

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

Tripsina	.25 g.
PBS (sin Ca y Mg) 100 ml.	

Se disolvió con un agitador magnético durante dos horas a 4 C.

Se esterilizó con filtro Millipore con membrana de 0.22 micras y se envasó en volúmenes de 5 ml., se almacenó a -20 C.

7.- DEAE dextran (Pharmacia, Fine Chemicals AB Upsala, Suecia), con un peso molecular de 2×10^6 .

DEAE dextran	.5 g.
PBS (libre de Ca y Mg)	100 ml.

Se agitó durante 6 horas a temperatura ambiente, se esterilizó con filtros Millipore con presión positiva, se envasó en volúmenes de 20 ml. guardándose a -20 C.

8.- Acetona (Merck)

9.- Eter etílico (Merck)

10.- Medio de crecimiento.

Medio de BHK-21 (en solución)	80%
Caldo triptosa fcsfatado (en solución)	10%
Suero de ternera inactivado	10%
Antibióticos 1 ml./100 ml. de medio.	

11.- Medio de mantenimiento.

Medio BHK-21 (en solución)	97%
Suero de ternera inactivado	2%
Antibióticos 1 ml./100 ml. de medio	1%

12.- Medio de infección.

Medio BHK-21 (en solución)	96.5%
Suero de ternera inactivado	2.0%
DEAE-Dextran .5%	1.5%

13.- Elvanol (polivinil alcohol) grado 51-05 (Dupont) se agregó 20 g. de Elvanol lentamente en 80 ml. de PBS (sin Ca y Mg) y se agitó durante 16 horas con un agitador magnético, después se le añadió 40 ml. de glicerol y se agitó otra vez por 16 horas. Se centrifugó a 1200 RPM durante 20 minutos para separar el Elvanol no disuelto, se envasó en frascos de 5 ml. y se guardaron a 4 C. El Elvanol es de una consistencia oleosa y al tacto es un líquido pegajoso.

MATERIAL FISICO.

Campana de flujo laminar.

Estufa con flujo continuo de aire con 5% de CO₂.

Cámara fría a 4 C.

Estufa a 28 C .
 Microscopio invertido.
 Microscopio de fluorescencia.
 Centrífuga refrigerada.
 Congelador a -70 C.
 Congelador a -20 C.
 Agitador vortex.
 Balanza eléctrica.
 Tubo de Leighton de 16 x 150 mm. con tapón de rosca.
 Cámara cuenta glóbulos de Neubauer modificada.
 Cubreobjetos de 7 x 35 mm.
 Lápiz con punta de diamante.
 Gradilla para tubos de Leighton.
 Cristalería miscelánea.

MÉTODOS.

1.- Exposición de la vacuna antirrábica Cepa V-319/Acatlán, a 2 temperaturas (4 C y 28 C).

Se tomaron 4 frascos de vacuna antirrábica Cepa V-319/Acatlán, del lote 82-2, elaborada en el Departamento de Investigación en Producción de Biológicos, perteneciente al I.N.I.P., esta vacuna fue dada de alta con un título oficial de 10^{-7} DLRL 50% .

Cada vacuna fue reconstituida con 10 ml. de diluyente, se hizo después una mezcla homogénea de 40 ml. de vacuna reconstituida, a partir de esta mezcla, se tomaron 20 ml. y se pusieron en un frasco, el cual se puso en un cuarto refrigerado a 4 C, y los otros 20 ml. en otro frasco, que se puso en una estufa a 28 C.

Se tomaron alícuotas de 0.5 ml. de cada frasco, cada 6 horas durante 36 horas. La hora de reconstitución fue tomada como hora 0 y los tiempos en que se tomaron las alícuotas fueron: 0,6,12,18,24,30,36 horas después de haber reconstituido la vacuna.

Las muestras se colocaron en frascos, identificados con la hora y -- temperatura a la que pertenecían, estas muestras se guardaron a -70 C, pa posteriormente infectar los monoestratos.

2.- Titulación del conjugado antirrábico.

Para el desarrollo de la prueba de microfocos fluorescentes, se empleó conjugado antirrábico, por lo que, el objetivo de titular el conju-

gado fue el de hallar la dilución adecuada, en la que hubiera menos tinción inespecífica, tanto con cerebro normal de ratón, como con CVS.

Se evaluó el conjugado en diluciones: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, mezclando por separado el conjugado antirrábico, con suspensión de cerebro normal de ratón al 20% y CVS, con estas diluciones del conjugado se tiñeron monoestratos de células 13Sc1-7, infectadas con virus rábico. La tinción se efectuó mediante la técnica directa de anticuerpos fluorescentes.

Se observaron al microscopio de fluorescencia y se encontró que la mejor tinción estaba entre las diluciones 1:16 y 1:32, por lo que se optó por usar una dilución intermedia que fue de 1:25, tanto por CVS, como con cerebro de ratón normal.

3.- Sembrado de las células 13Sc1-7, fue a partir de un monoestrato confluyente, contenido en una botella de Blake chica, de la que se desprendieron y separaron las células mediante la tripsinización, utilizando tripsina al 0.25% (Difco), ya desprendidas las células se determinó la cantidad en la suspensión, para lo cual se siguió la técnica de conteo celular, en la cámara de cuentaglóbulos de Neubauer modificada (18).

Se resuspendieron las células en medio de crecimiento, ajustando la concentración celular a 100,000 células/ml.

De la suspensión de células en medio de crecimiento se sembró 1.5 ml. en cada tubo de Leighton, que contenían cubreobjetos de 7 x 35 mm. estériles.

Los tubos se pusieron en una estufa a 37 C con 95% de aire y 5% de CO₂ se revisaron diariamente y a las 72 horas se procedió a infectar los monoestratos con 80% de confluencia.

4.- Se tomó del congelador de -70 C una muestra de 0.5 ml. de vacuna reconstituida, por cada temperatura (4 C y 28 C) de una hora determinada y se elaboraron diluciones décuples en medio de infección, desde 10⁻¹ hasta 10⁻⁸, después se desechó el medio de crecimiento de los tubos de Leighton y se lavaron 2 veces con solución salina fosfatada (PBS) los monoestratos se infectaron 3 monoestratos por cada dilución correspondiente, por lo tanto, se infectaron 24 monoestratos de células 13Sc1-7 con 8 diluciones de la vacuna reconstituida expuesta a 4 C y 24 monoestratos con 8 diluciones de la vacuna reconstituida expuesta a 28 C. Los tubos de Leighton se metieron a una estufa durante una hora a 36 C, a fin de permitir la adsorción del virus a las células después se desechó el medio de infección, el cual contenía el virus residual no adsorbido. Se lavó 2

veces los monoestratos con solución salina fosfatada (PBS) y se puso 1.5-ml. de medio de mantenimiento en los tubos de Leighton que contenían los monoestratos infectados, manteniéndose en una estufa a 32 C durante 30 horas.

5.- Fijación con acetona de los monoestratos infectados.

A las 30 horas de incubación se sacaron las laminillas de los tubos de Leighton, ya que a este tiempo los cuerpos de inclusión primarios alcanzan su máximo desarrollo y los focos secundarios aún no se empiezan a manifestar (13).

Las laminillas se insertaron en una hendidura hecha a aplicadores de madera, colocados así, se lavaron los monoestratos infectados con 2 lavados con solución salina fosfatada (PBS) y después una vez con agua destilada, se dejaron secar al aire, se metieron en acetona durante media hora a -20 C (8)(20), para lograr una buena fijación de los monoestratos infectados, después se sacaron las laminillas y se dejaron secar al aire.

Se cortó cada cubreobjeto con un lápiz con punta de diamante en 3 partes, de 11 x 7 mm. c/u, de las que se usaron 2 para montarse en el portaobjetos y la parte restante se guardó.

Una vez cortados los cubreobjetos se pegaron, 2 cubreobjetos con cemento para plástico, especial para modelismo (lodela), quedando las células fijadas hacia arriba. La identificación y disposición de los monoestratos en el portaobjetos, se ilustra en la figura 1.

IDENTIFICACION Y DISPOSICION EN EL PORTAOBJETOS DE LOS MONOESTRATOS INFECTADOS.

Hora del muestreo después de reconstituída la vacuna.

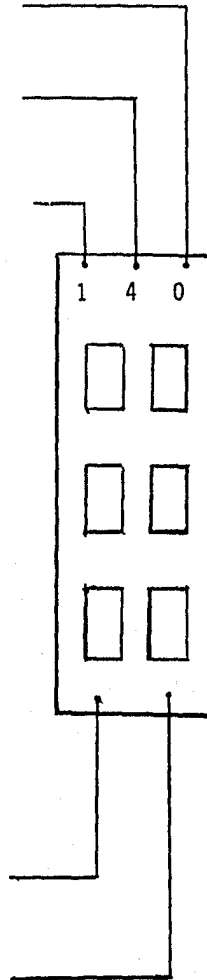
Temperatura a la que fue expuesta la vacuna.

Número de dilución.

Figura 1

Laminillas teñidas con CN + conjugado.

Laminillas teñidas con CVS + conjugado.



6.- Tinción de los monoestratos infectados.

A cada monoestrato se les puso una gota de conjugado antirrábico, ya sea con CVS o con CN, en la disposición en la que se mostró en la figura-1, se metieron los portaobjetos en una cámara húmeda en una estufa a 37 C durante 30 minutos. después se enjuagaron con solución salina fosfatada - para quitar el exceso de conjugado, y se metieron en un segundo lavado en solución salina fosfatada (PBS) durante 10 minutos, y al término de éstos se lavaron las laminillas con agua destilada, y se dejaron secar al medio ambiente. Se les puso una gota de Elvanol sobre los monoestratos teñidos y sobre éstos un cubreobjeto.

7.- Lectura de las laminillas.

La lectura de las laminillas se realizó, observando al microscopio - de fluorescencia y contando el número de microfocos fluorescentes en el - área de 77nm^2 de cada monoestrato teñido con CN+ conjugado, ésta área se relaciona directamente al volumen original de la vacuna concentrada.

La interpretación de la lectura, de las laminillas, se hizo de la siguiente manera:

Confluente: Es cuando todo o la mayor parte del monoestrato se encuentra infectado.

Microfoco fluorescente: Se consideró desde una célula claramente infectada, hasta un grupo de 4 o más células en tanto que cada área fluorescente se encontró aislada de las demás.

El título del virus se expresó en unidades formadoras de microfocos-fluorescentes por ml. de la suspensión concentrada (UFM/ml.).

8.- Análisis estadístico.

8.1.- Cálculo de la concentración de unidades formadoras de microfocos fluorescentes por ml. en la vacuna reconstituida, sin diluir, mediante el método de titulación viral, basado en el conteo de placas (lecciones) en monoestratos celulares (15).

$$X = \frac{N}{K \cdot d}$$

N= Número total de microfocos fluorescentes contados en las laminillas, monoestratos empleados para la evaluación de X.

X= Cantidad de UFM/ml.

d= Diluciones en las que se contó.

K= Número de monoestratos que se usaron en cada dilución.

8.2.- El valor de X obtenido a partir de la fórmula anterior se considera como una aproximación a la concentración original de UFM/ml., por lo que fue necesario calcular la desviación standar a cada título obtenido y estimar así con mayor precisión la concentración original de UFM/ml. (15)

$$S(X) + \frac{X}{K \cdot d} = X \pm S(X)$$

8.3.- Se elaboró una curva de inactivación, calculada por el método de cuadrados mínimos (1).

$$Y_e = a + b x$$

X = Hora de la muestra.

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

Y = Título obtenido de la muestra.

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

8.4.- Error standar de estimación.

$$S_e = \frac{(Y_1 - Y_1^2)}{n - 2} \times 1.96$$

RESULTADOS.

Al observar la gráfica 1 correspondiente a la temperatura de 4 C y la gráfica 2 que corresponde a la temperatura de 28 C, se aprecia que la pendiente calculada por el método de mínimos cuadrados es más pronunciada en la gráfica 2 (28 C), con respecto a la gráfica 1 (4 C), lo que nos indica que la vacuna reconstituida dura menos tiempo viable a una temperatura de 28 C.

Lo anterior se confirma ya que se observa en la temperatura a 4 C la pendiente trazada cruza el título mínimo de protección, (representada en la gráfica por una línea punteada) a las 21 hrs. y 52 minutos, y a la temperatura de 28 C en cambio ocurre que la vacuna ya no es viable a las 11 hrs. y 28 minutos.

En el cuadro de resultados se exponen los títulos de las muestras, que se obtuvieron a las diferentes horas de muestreo y en cada una de las temperaturas (4 C y 28 C), así como la desviación standar de cada título.

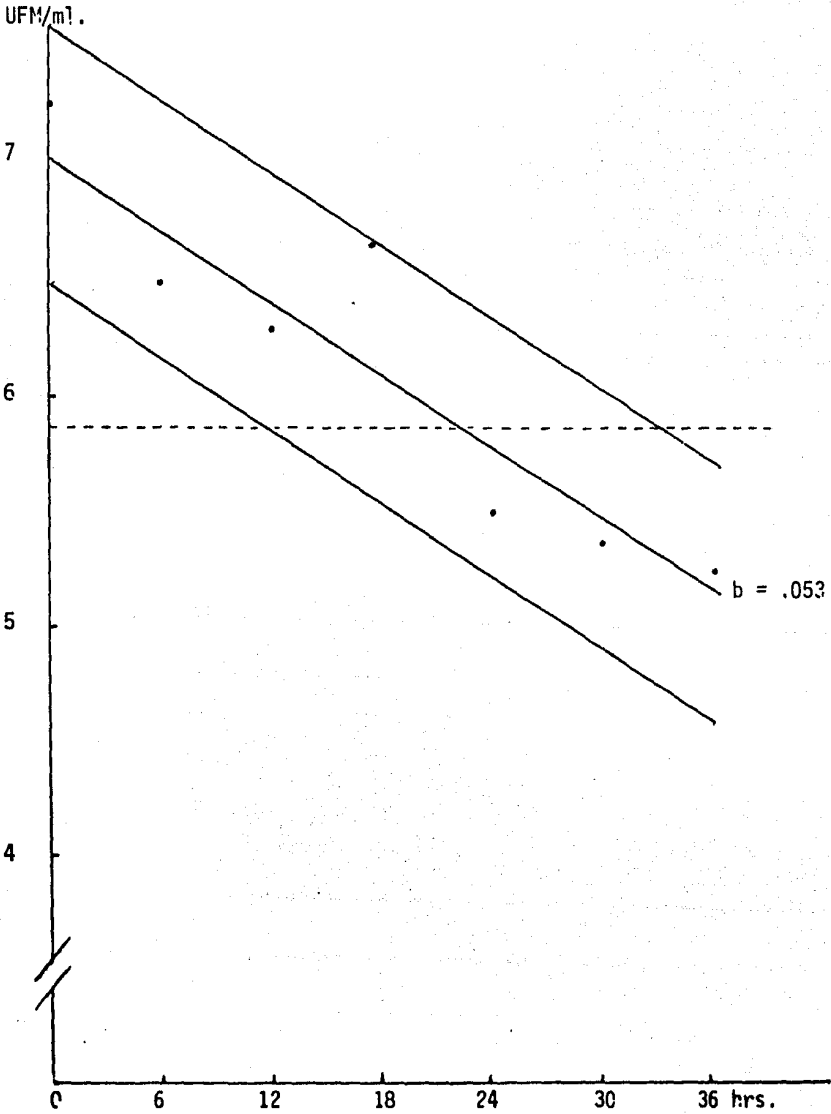
CUADRO DE RESULTADOS.

TITULOS OBTENIDOS DE LAS MUESTRAS DE LA VACUNA RECONSTITUIDA.

4 C			28 C		
Hrs.	Título de la vacuna reconstituída.UFM/ml.	S(X)	Hrs.	Título de la vacuna reconstituída.UFM/ml.	S(X)
0	$10^{-7.24}$	$\pm .03$	0	$10^{-7.24}$	$\pm .03$
6	$10^{-6.46}$	$\pm .02$	6	$10^{-6.33}$	$\pm .01$
12	$10^{-6.25}$	$\pm .03$	12	$10^{-5.45}$	$\pm .02$
18	$10^{-6.51}$	$\pm .02$	18	$10^{-5.25}$	$\pm .02$
24	$10^{-5.46}$	$\pm .01$	24	$10^{-4.35}$	$\pm .01$
30	$10^{-5.33}$	$\pm .02$	30	$10^{-4.46}$	$\pm .02$
36	$10^{-5.21}$	$\pm .02$			

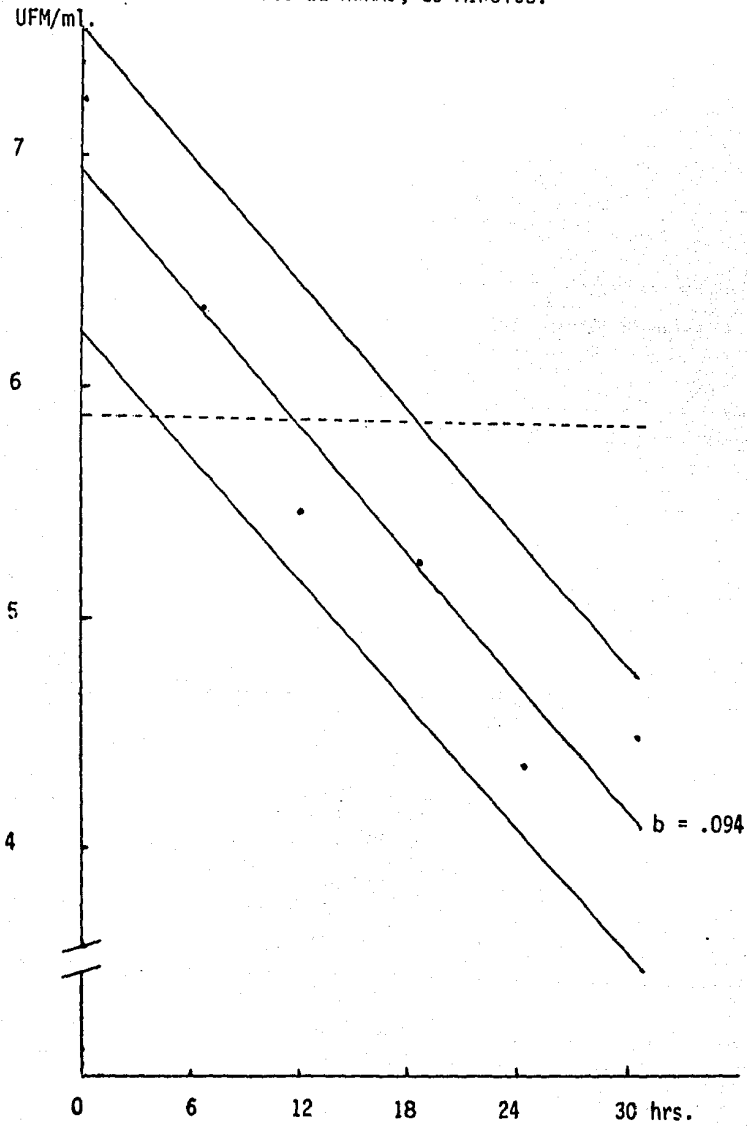
GRAFICA I

CURVA DE INACTIVACION DEL VIRUS RABICO A TEMPERATURA DE 4 C.
TIEMPO CRITICO 21 HRS., 52 MINUTOS.



18
GRAFICA II

CURVA DE INACTIVACION DEL VIRUS RABICO A TEMPERATURA DE 28 C.
TIEMPO CRITICO 11 HORAS, 38 MINUTOS.



DISCUSION.

Al obtener los títulos de las muestras de la vacuna antirrábica después de reconstituída (cuadro de resultados) a las diferentes horas y temperaturas, se procedió a graficar los resultados.

A los datos obtenidos, se les calculó la desviación standar a cada título obtenido. La colocación de los puntos graficados no dió una recta perfecta, por lo que se calculó una curva de inactivación mediante el método de mínimos cuadrados, y así poder determinar con exactitud la hora en que la vacuna ya no es viable, es decir, cuando hubo rebasado el título mínimo de protección.

Se calculó el error standar de estimación para dar un límite de confianza de 95 %, a los títulos de la vacuna.

Por otra parte se estudió las muestras de vacuna reconstituída hasta 36 hrs. después en la temperatura de 4 C , ya que se consideró que los datos obtenidos por debajo del título mínimo de protección hasta esa hora -- eran suficientes.

En el caso de la temperatura de 28 C, se estudió hasta las 30 horas - debido a que los títulos que se estaban obteniendo, ya eran por debajo -- del título mínimo de protección, por lo que se consideró innecesario seguir titulado las muestras.

Para la consideración de las observaciones obtenidas, hay que tomar en cuenta que lo que se hace en el laboratorio no indica que pasará en el campo con la vacuna, ya que el manejo que se le dá es diferente y por lo tanto intervienen otras variables, entre otras, la irradiación solar.

Por otra parte la curva de inactivación de la vacuna reconstituída a cada una de las temperaturas, tiene un comportamiento esperado, ya que tiene un estabilizador y un diluyente con pH controlado. Las curvas de inactivación son similares a las obtenidas por Melgarejo (1981).

Pero no se puede inferir de los resultados obtenidos a partir de este lote de vacuna con diferente título, pues los tiempos críticos varían con el título inicial de la vacuna.

CONCLUSIONES.

Cuando una vacuna antirrábica Cepa V-319/Acatlán, con título $10^{-7.24}$ UFM/ml., y después de reconstituida, es mantenida a 4 C, tiene una viabilidad de 21 horas, 52 minutos.

Cuando una vacuna antirrábica Cepa V-319/Acatlán, con título $10^{-7.24}$ UFM/ml., y después de reconstituida, es mantenida a 28 C, tiene una viabilidad de 11 horas, 38 minutos.

LITERATURA CITADA.

- 1.- Alder, H.L. and Rossler, E. B. : Introduction to probability and - Statistics. 3th ed. W. H. Freeman & Co. San Francisco, U.S.A. (1964).
- 2.- Arellano, C. y Sureau, P. y Batalla, D.: Evaluación de la efi--- ciencia de la vacuna antirrábica Cepa ERA en bovinos I antigenicidad. Tec. Pec. Mex. (18) : 12-14 (1971).
- 3.- Baer, M. y Rivera, Cruz: Títulos de sueroneutralización contra - el derriengue producido por una vacuna de alto pasaje y por una vacuna au- tógena. Tec. Pec. Mex. (7) : 11-15 (1966).
- 4.- Batalla, D. y 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 sobre rabia paralítica: Vacuna antirrábica de origen mur- ciélagovampiro, Cepa V-319/Acatlán, para proteger al ganado bovino contra la rabia pasesiente, en México. P.I.R. - I.N.I.P. (S.A.G.) (1976).
- 6.- Correa, P. y Solana, M.P. : Potencia de vacunas contra el de- -- rriengue adquiridas en farmacias veterinarias y en sus laboratorios de pro- ducción. Tec. Pec. Mex. (8) : 10-18 (1966).
- 7.- Correa, G.P. : La rabia, manifestaciones clínicas, transmisión - prevención y tratamiento. Ciencia Veterinaria 3 : 104-138 (1981).
- 8.- Dean, D. and Abel Seth, M. K. : The fluorescent antibody test, - Laboratory Techniques in rabies. Edited by: WHO monograph series U.S.A. - - 73-80 (1973).
- 9.- Flores Crespo R.: La rabia, los murciélagos y el control de los- hematófagos. Ciencia Veterinaria 2 : 38-67 (1978).
- 10.- Hernández, B.E. y Bijlenga G.D.: La prueba de microfocos fluo- rescentes: Una nueva técnica in vitro para titulación y seroneutralización del virus rábico. Tec. Pec. Mex. (24): 41-46 (1973).
- 11.- Hernández, B.E., Morales, R.J., Arellano, S.C., Campos, V. J. y López, B.B.: Evaluación de una vacuna comercial antirrábica inactivada pa- ra bovinos producida en cultivo de tejidos (Alurabiffa). Duración de inmu- nidad con desafío a 3 años. Tec. Pec.Mex. (30): 57-63 (1975)
- 12.- Hernández, B.E.: La rabia pasesiente bovina, definición del pro- blema y metodología de control. Ciencia Veterinaria I: 104-126 (1976).
- 13.- Hernández, B.E.: El virus rábico, morfología, morfogénesis y cre- cimiento de cultivos celulares. Ciencia Veterinaria 2: 1-34 (1978).

14.- Hoel, P.G.: Estadística Elemental 2a. Ed. Compañía Editorial - Continental, S.A. México (1981).

15.- Hudson, S.: The fluorescent antibody technique as applied to tissue culture monolayers. In Animal tissue culture. Advances in Technique-Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs N.J. 165-178 (1978).

16.- Lorenz R.J. and Bogel K.: Infectivity titration based on plaque counts. Laboratory Techniques in rabies Edited by: WHO 3th edition 332--335 U.S.A. (1973).

17.- Melgarejo, B.A.: Duración de la viabilidad de la vacuna antirrábica Cepa V-319/Acatlán, después de reconstituída. Tesis de Licenciatura Fac. Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México, México, - D.F. (1981).

18.- Paul, J.: Cell and Tissue Culture. 5th Edition. Churchil Livingstone. Great Britain (1979).

19.- Rovozzo, C.G. and Burke, N.C.: A manual of Basic Virological -- Techniques, Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs, N.J. (1973).

20.- Wiktor, J.T.: Laboratory Techniques in rabies Edited by: World-Health Organization 3th edition Geneva (1973).