

119
2Ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

DURACION DE LA ESTABILIDAD DE LA VACUNA ANTIRRABICA CANINA CEPA V-319/ACATLAN A DIFERENTES TEMPERATURAS

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
Médico Veterinario Zootecnista
por

FRANCISCO JOSE LILJEHULT FUENTES

Asesores: M.V.Z. Aurora Velázquez Echegaray
Biólogo Baltasar Briseño García

México, D. F., 1987



Universidad Nacional
Autónoma de México

UNAM



Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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.

C O N T E N I D O

	<u>PAGINA</u>
RESUMEN:	1
INTRODUCCION:	2
MATERIAL Y METODOS:	5
RESULTADOS:	7
DISCUSION:	8
LITERATURA CITADA:	9
FIGURAS:	13
CUADROS:	15

RESUMEN

LILJEHULT FUENTES FRANCISCO JOSE.- Duración de la estabilidad de la Vacuna Antirábica Canina Cepa V-319/Acatlán a diferentes temperaturas (bajo la dirección de: Aurora Velázquez y Baltasar Briseño García).

Se determinó la duración de la estabilidad de la Vacuna Antirábica Canina V-319/Acatlán del lote 18-2-86 elaborado en la Productora Nacional de Biológicos Veterinarios, mediante la prueba biológica en ratón (MUS MUSCULUS C.F. W.) por el método de Spearman Karber.

Dicha vacuna fué sometida a 4 y 24° C durante 3 meses y a 37° C durante 72 horas, el título original de la vacuna fué de $10^{6.05}/\text{ml}$. Los resultados en cifras logarítmicas obtenidas a los 3 meses en el caso de la vacuna mantenida a 4° C fueron de $10^{4.58}/\text{ml}$ en la expuesta a 24° C fueron de $10^{4.55}/\text{ml}$ y para la sometida a 37° C la titulación final fué de $10^{4.8}/\text{ml}$ esto nos indica que de acuerdo al mínimo establecido por la Organización Mundial de la Salud ($10^{4.5}/\text{ml}$) la vacuna expuesta a 4 y 24° C tiene una estabilidad mínima de 90 días y a 37° C se mantiene por lo menos hasta las 72 horas.

I. INTRODUCCION

La rabia es una enfermedad infecciosa, aguda y mortal, que afecta al sistema nervioso central (14, 15, 18). Es causada por un virus de la familia *Rabdoviridae* de la especie *Lyssavirus* (11, 18, 21). Por lo general la transmisión es en forma directa por medio de mordeduras de animales que padecen rabia (15, 18).

Los animales susceptibles a la rabia pertenecen a las especies de sangre caliente, entre los que figuran los animales domésticos, como el perro, reservorio principal en la zona urbana (14).

Los primeros intentos para prevenir la rabia fueron llevados a cabo por Galtier, en 1880, quién inoculó por vía intravenosa, saliva y masa encefálica de animales enfermos de rabia (18). La primera vacuna efectiva la elaboró Pasteur en 1881 (23).

Hoy en día las investigaciones de los métodos para el cultivo de tejidos han contribuido grandemente al progreso de la virología en general, y en la preparación de nuevas vacunas antirábicas (1, 2). Estas vacunas tienen la ventaja de ser inocuas, es decir que no causan complicaciones posvacunales en el sistema nervioso central (8, 25).

En el Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias, en colaboración con la F.A.O., se obtuvo una vacuna a partir de virus rábico aislado de un vampiro macho capturado en San Vicente, Municipio de Acatlán Figueroa, Oaxaca (5, 6, 7). Esta cepa fue adaptada a cultivos celulares, mediante 4 pases en tejidos de embrión de vampiro, luego se le dieron 9 pases en células B.H.K.-21 (Células de

Riñón de Hamster lactante) adquiriendo la capacidad de formar placas en suspensión de agarosa, por lo que se procedió a purificar el virus por clonación, seleccionando una caja de Petri con una sola placa, esta clona V-319 CL 476 alcanzó entonces un título de 10^9 V.F.P. (unidades formadoras de placa por ml), después de 3 pases se estabilizó el título. Con esta cepa se preparó el lote de semilla maestra a partir del cual se elaboran los lotes de trabajo (16). Dicha vacuna ha demostrado ser muy eficaz, ya que puede obtener altos títulos de anticuerpos. Es de fácil producción en grandes cantidades y además confiere una inmunidad de más de 3 años (17). En 1976 se determinó su inocuidad en perros de diferentes edades, así como la edad mínima de vacunación, siendo de dos meses de edad, sin que interfiera la respuesta inmunológica con la proporcionada por la madre (13). En otro estudio fue comprobada la antigenicidad e inocuidad (12), y la adecuada protección antirrábica durante un año (24).

La Productora Nacional de Biológicos Veterinarios produce la vacuna V-319/Acatlán, a la cual, en el Departamento de Control de Calidad se le realizan las pruebas de: esterilidad, inocuidad, titulación, pureza, humedad y estabilidad. La prueba de estabilidad en la vacuna, es una prueba de degradación acelerada, que se practica a la vacuna durante 1 semana a 37° C, posteriormente se titula (9, 22). Con base en los resultados obtenidos el producto puede ser liberado, asignándole la fecha de caducidad correspondiente (20). Posteriormente se almacena en refrigeración. El principal factor que influye en la viabilidad de la vacuna es la temperatura, incluyendo la refrigeración (4° C) y cuando es manejada a temperatura ambiental (24° C).

El objetivo del trabajo fue conocer la estabilidad de la mencionada vacuna cuando es expuesta a diferentes temperaturas y tiempo.

II. MATERIAL Y METODOS

Para la realización de éste trabajo se utilizó un lote (18-2-86) de vacuna de rabia canina V-319/Acatlán, elaborada en el Departamento de Virología de la Productora Nacional de Biológicos Veterinarios, de acuerdo al protocolo de producción de vacuna V-319/Acatlán, registrada y aceptada ante el Departamento de Control de Productos Biológicos, Farmacéuticos y Alimenticios para Animales de la Dirección General de Sanidad Animal de la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH).

El estabilizador usado consistió de fosfato de potasio monobásico 2.7 g, - peptona de caseína 20 g, sacarosa 100 g, agua deionizada 1,000 ml, ajustando al pH 7.6 con hidróxido de sodio al 3 normal, esterilizado por filtración (filtros Millipore 0.22 micras), el título que se obtuvo originalmente en el lote usado fué de $10^{6.05}$ /ml DLRA 50%, el requisito mínimo establecido en la Productora Nacional de Biológicos Veterinarios es de $10^{4.5}$ /ml DLRA 50%.

Se utilizaron 38 frascos de la vacuna, se expusieron a 3 temperaturas diferentes distribuyendose de la siguiente manera: 14 frascos en refrigeración a 4° C, 12 frascos en medio ambiente de 24° C y 12 frascos a 37° C en un cuarto estufa.

En un gabinete vertical de flujo laminar, se realizó la prueba de titulación cada 15 días a 4 y 24° C, durante 90 días, a 37° C se llevó a cabo la prueba - acelerada de 3, 6, 12, 24 horas. Dos frascos del lote de la vacuna se reconstituyeron con 5 ml de diluyente (agua destilada estéril), se extrajo media dosis de cada frasco para completar una dosis. En un matraz Erlen Meyer de 50 ml se puso - 1 ml de suero equino almacenado a -70° C y 50 ml de agua destilada estéril que

dando al 2 %; posteriormente se agregaron 4.5 ml de esta mezcla a cada uno de 6 tubos de ensaye estériles, colocados en una gradilla dentro de una palangana - con hielo identificadas. Con una pipeta serológica estéril de 1 ml, al primer tubo se le agregó 0.5 ml de la vacuna reconstituida para formar así la dilución 10^{-1} , de éste se transfirió 0.5 ml al segundo tubo, resultando así 10^{-2} y así sucesivamente hasta llegar a 10^{-6} .

Se formaron 5 grupos de 10 ratones blancos cepa C.F.W. de 11-15 g de peso (3 semanas de edad), a cada grupo se la identificó con el número del lote, - además con el número de las diluciones 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} . A cada ratón se le inculó 0.03 ml de la correspondiente dilución, por vía intracerebral con una - jeringa de vidrio de 0.25 ml con aguja del 27 corta (25).

Los ratones inculados se observaron diariamente durante 14 días consecutivos, haciendose anotaciones de la mortalidad de los ratones de cada una de las - diluciones, después se calculó la dosis letal 50% siguiendo el método de Spearman Karber (10).

III. RESULTADOS

La titulación de la vacuna disminuyó en forma semejante en las sometidas a las temperaturas de 4 y 24° C, alcanzando el límite mínimo aceptado por la Organización Mundial de la Salud a los 3 meses, estos resultados se muestran en el cuadro 1 figura 1 (páginas 13 y 15).

En el cuadro 2 figura 2 (páginas 14 y 16) se observaron los títulos de la vacuna expuesta a 37° C durante 72 horas. A las 3, 6 y 12 horas el título fué declinando, aunque al llegar a las 24 y 48 horas sufrió un aumento, para finalmente, a las 72 horas, mostrar un título ligeramente superior al mínimo establecido.

IV. DISCUSION

Conforme a los resultados ya obtenidos se determinó que la duración de la estabilidad fué de 3 meses en las vacunas sometidas a 4 y 24° C.

La vacuna se mantuvo estable a las 72 horas, cuando se expuso a 37° C. Sin embargo, esta duración de la estabilidad es baja comparada con otras vacunas (12, 24).

La declinación tan marcada del título viral observada en las muestras mantenidas en refrigeración (4° C), solo pueden ser debida al estabilizador usado, ya que esta temperatura se considera la ideal para mantener la vacuna estable por lo menos durante un año (24).

La disminución en los títulos vacunales ocurrida en la sometida a 24 y 37° C es más baja en proporción a la anterior. De cualquier forma se asemeja a los observados en otras investigaciones (4 y 12).

Con base en los resultados, parece ser que el estabilizador utilizado en este lote vacunal, producido por la Productora Nacional de Biológicos Veterinarios, no mantiene la estabilidad necesaria, y que es importante realizar pruebas con otros estabilizadores que permitan la seguridad en el manejo del producto.

V. LITERATURA CITADA

- 1.- Abelset, M.K.: An attenuated rabies vaccine for domestic animals - produced in tissue culture, Canad. Vet. J., 5: 279-280 (1964).
- 2.- Abelset, M.K.: Propagation of rabies virus in pigkidney cell culture, Canad. Vet. J., 5: 4-7 (1964).
- 3.- Ayres Gilbert H.: Análisis químico cuantitativo. Harla S.A. de C.V. México, D. F. (1970).
- 4.- Batalla Campero Diodoro: Viabilidad del virus Flury alto pasaje a diferentes temperaturas, utilizando dos conservadores, Técnicas Pecuarias - en México No. 12 - 13: 33-36 (1969).
- 5.- Bijlenga, G., Hernández, B.; Mar, R.: Vacunación experimental en ganado con una cepa de rabia origen murciélago vampiro, elaborado - en cultivos celulares. VIII Reunión Anual INIP (SAG), México, D. F. P.P. 26-29 (1971).
- 6.- Bijlenga, G. y Hernández, E.: Adaptation, attenuation and plaque purification of a rabies isolate (V-319 From a Vampire Bat. (Desmodus - Rotundus), Amer. J. Vet. Research in the press (1979).
- 7.- Bijlenga, G. y Hernández, E.: Testing of vaccine potencial of the - plaque purified rabies virus strain V-319, derived from vampire bat - (Desmodus Rotundus) in Mexico. Amer. J. Vet. Research in the press (1979).

- 8.- Bolefín Epizootiológico sobre rabia paralítica PIRP-INIP (SAG) Vol. 1, No. 2 segundo trimestre (1975).
- 9.- Comité de expertos de O.M.S. en patrones biológicos. 31 Informe, Serie de Informes Técnicos, O.M.S. Ginebra (1981).
- 10.- Cunningham Charles, H.: Virología práctica. 6ª Ed. Acribia, España (1971).
- 11.- Fenner, F. And White, D.: Virología Médica. La Prensa Médica Mexicana, S. A. México, D. F., (1981).
- 12.- Gomez Hernández, H.J.: Inocuidad y respuesta antigénica de la vacuna antirrábica V-319/Acatlán en perros. Tesis de Licenciatura. Fac. - Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. (1977).
- 13.- González Salazar, V.D.: Respuesta serológica a la vacunación antirrábica en cachorros Beagle de diferentes edades procedentes de madres - vacunadas y no vacunadas. Tesis de Licenciatura. Fac. Med. Vet. y - Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. (1976).
- 14.- Hernández Baumgarte, E.M.: La rabia parejante bovina: Definición del problema y metodología de control. Ciencia Veterinaria, 1: 104-126 - UNAM (1976).
- 15.- Hernández Baumgarten E.M.: Patogenia de la rabia. Ciencia Veterinaria, 2: 72-100 UNAM (1978).

- 16.- Hernández, B.E.: Boletín sobre rabia paralítica, PIRP-INIP (SAG) -- (1976).
- 17.- Hernández, E., Campos, J.M., Sagandía, J., Pérez, H., González, D., Fernández, M., Sánchez, A. y Ramsden, R.: Resúmenes de la XIII Reunión Anual INIP, (SAG), México, D. F., (1976).
- 18.- Hutyra, Marek y Manninger: Patología y terapéutica especial de los animales domésticos. Tomo 1, 2a. Ed. Labor, S.A., México, D.F., - (1968).
- 19.- Johnson Robert. : Estadística elemental. Trillas S.A., México, D. F., (1976).
- 20.- Kaplan, M. Martin y Koprowsky Hilary: La rabia, Técnicas de Laboratorio, 3a. Ed. Organización Mundial de la Salud, Genova (1974).
- 21.- Mohanty Duha: Virología Veterinaria. Ed. Interamericana, México, D. F. (1983).
- 22.- Peetermans, J., Colinet, G., Boulet, A., D'Hondt, E., And Stephenne, J.: Stability of live, freeze-dried virus vaccine. International symposium on freeze-Drying of Biological Products, Washington, D. C. 1976 Develop. Biol. Standard, 36: 291-296 (1977).
- 23.- Quiroga, S., Acosta, J., Rotgardt, A., Masselm, R.: Observaciones y estudios experimentales del mal de cadera de la vacuna del norte de

la provincia de corrientes, su identidad con la rabia. Rev. Med. Vet.,
13: 5-7 (1931).

- 24.- Sagardia Ruíz A.J.: Duración de la inmunidad conferida por la vacuna V-319/Acatlán contra la rabia en perros con desafío a un año de la - vacuna. Tesis de Licenciatura. Fac. Med. Vet. y Zoot. Universidad - Nacional Autónoma de México. México, D. F. (1977).
- 25.- Wiktor, J.T.: Laboratory techniques in rabies 3th edition, World-Health Organization, Genova (1973).

FIGURA 1. TITULOS DE LA VACUNA A 4° C y 24° C

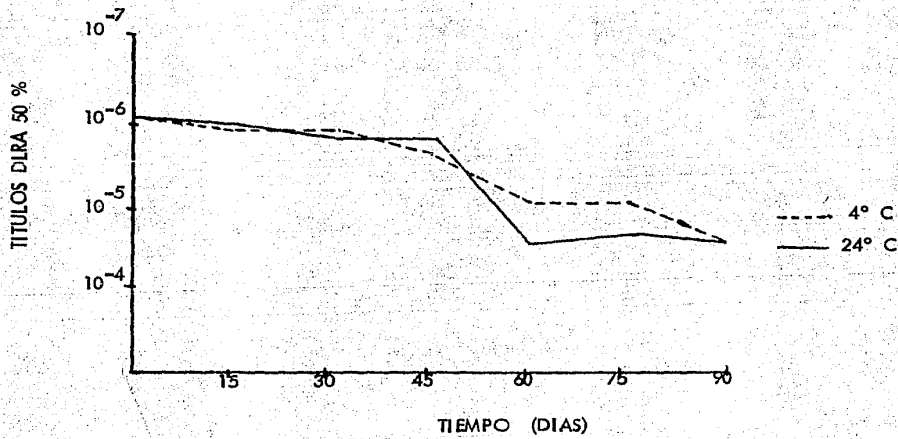
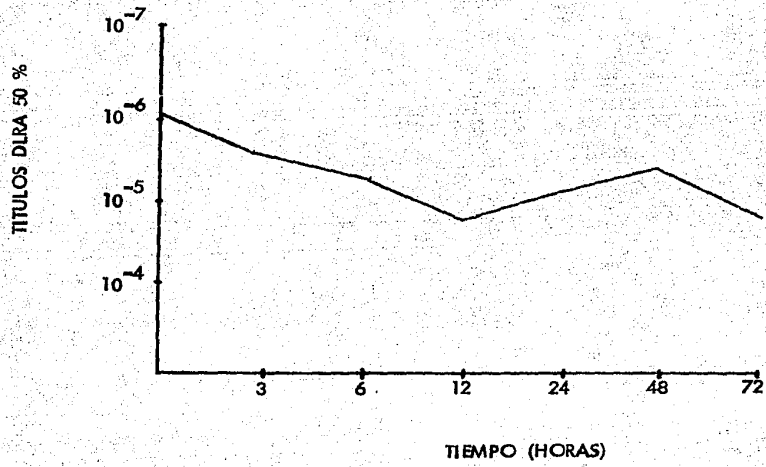


FIGURA 2. TITULOS DE LA VACUNA A 37° C



CUADRO 1
TITULOS OBTENIDOS DE LA VACUNA

	4° C	24° C
días	título de la vacuna ml	título de la vacuna ml
0	$10^{-6.05}$	$10^{-6.05}$
15	$10^{-5.9}$	$10^{-6.0}$
30	$10^{-5.9}$	$10^{-5.89}$
45	$10^{-5.6}$	$10^{-5.8}$
60	$10^{-5.02}$	$10^{-4.51}$
75	$10^{-5.02}$	$10^{-4.62}$
90	$10^{-4.58}$	$10^{-4.55}$

16

CUADRO 2
TITULOS OBTENIDOS DE LA VACUNA

	37° C
horas	título de la vacuna ml
0	$10^{-6.05}$
3	$10^{-5.52}$
6	$10^{-5.3}$
12	$10^{-4.8}$
24	$10^{-5.1}$
48	$10^{-5.4}$
72	$10^{-4.8}$