
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



DETERMINACION DE LA ESTABILIDAD Y VIABILIDAD DE UNA VACUNA
ANTIRRABICA DE VIRUS VIVO, SOMETIDO A TEMPERATURA
AMBIENTE Y 37 CENTIGRADOS

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

MEDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

P R E S E N T A

LETICIA AVILA FIGUEROA

MARIA MILAGROS OROZCO DELGADO

DIRECTOR DE TESIS: M.V.Z. DAVID AVILA FIGUEROA

GUADALAJARA, JALISCO.

DICIEMBRE 1991

A LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA Y A
LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y
Y ZOOTECNIA POR LA FORMACION QUE ME
OTORGARON.

A LOS MAESTROS POR SU APOYO
EN IMPARTIRME SUS CONOCIMIENTOS

Y A TODAS AQUELLAS PERSONAS
QUE ME AUXILIARON PARA MI FORMACION
Y REALIZAR EL PRESENTE TRABAJO.

CONTENIDO

	PAGS.
RESUMEN.....	1.
INTRODUCCION.....	2.
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	9.
JUSTIFICACION.....	10.
HIPOTESIS.....	11.
OBJETIVOS.....	12.
MATERIAL Y METODO.....	13.
RESULTADOS.....	15.
DISCUSION.....	18.
CONCLUSIONES.....	19.
BIBLIOGRAFIA.....	20.
ANEXOS.....	22.

RESUMEN

El propósito del presente trabajo fue determinar el grado de estabilidad que puede tener una vacuna de virus rabico atenuado y liofilizado al ser expuesto a temperatura ambiente y temperatura de 37 C, sin haber sido reconstituida. Se utilizo vacuna contra rabia cepa Roxane de virus atenuado a la cual se le hicieron pruebas de titulación en ratones de 21 días de edad, por inoculación intracerebral con una dosis de 0.03 ml. Se formaron tres grupos de vacuna del mismo lote; uno se mantuvo a 4 C, otro se coloco a 37 C y otro mas a temperatura ambiente; la prueba de titulación para el grupo que estaba a temperatura ambiente se realizo cada dos meses, hasta completar doce meses y para el grupo que se encontraba a 37 C fue cada mes hasta completar seis meses, en cada prueba se titulo simultáneamente el grupo de vacunas que se mantuvo a temperatura de 4 C. Los ratones inoculados fueron observados por un periodo de 21 días y el titulo fue calculado con el método de Reed and Muench. La vacuna colocada a 37 C tuvo un titulo de $10^{4.7}$ en el primer mes, hasta llegar a 10^2 en el sexto mes, con un promedio de $10^{3.1}$. Mientras que el grupo de vacunas que estaba a temperatura ambiente tuvo los primeros dos meses un titulo de $10^{3.5}$ y al final de los doce meses bajo hasta 10^2 con un promedio de $10^{1.8}$ la vacuna testigo a 4 C tuvo titulos de $10^{5.08}$ en los cero días y de $10^{3.7}$ a los doce meses con un promedio de $10^{4.2}$; Lo anterior indica que el virus vacunal liofilizado tienen un buen grado de estabilidad durante el primer mes de ser expuesto a una temperatura superior a los 4 C aun cuando se encuentre a temperatura de 37 C; y que pierde su viabilidad marcadamente, a partir de los 2 meses, para de ahí disminuir paulatinamente hasta una minima expresión.

INTRODUCCION

Desde el año 2000 a. c. las civilizaciones que se desarrollaron a los márgenes de los ríos Nilo, Eufrates e Indo ya tenían conocimiento de la Rabia y la consideraban como de origen divino. Para el año 550 a.c. Demócrito describió la enfermedad en perros y animales domésticos. Posteriormente Aristóteles en el año 332 a. c. señala que la transmisión de la Rabia es a través de la saliva de un perro enfermo; fue entonces cuando Celso (año 100 a. c.) describe la enfermedad y establece la relación de la Rabia entre el humano y los perros (5, 6, 15).

La Rabia a través de los años se ha identificado como una enfermedad de los perros y este continua siendo uno de los vectores principales en la transmisión de la enfermedad.

En países de Asia, Africa y América del Sur se consideran a otros animales a parte del perro como vectores de la enfermedad, debido a los problemas de salud publica y a los pocos avances que se han logrado en algunos países como en México se hace necesario que se establezcan programas de prevención y control que permitan reducir el riesgo de contagio para el hombre (5, 6, 15).

En el Valle de México, en el año de 1709 se tiene referencia de la primera epizootia de Rabia en perros vagabundos. Posteriormente en el año de 1870 se registro otro caso de Rabia en el Cabo de San Lucas Baja California Sur, pero en esta ocasión en un zorrillo manchado. En los años subsiguientes se presentaron varios casos aislados y de tipo epizootico tanto en animales como en humanos, lo cual hizo necesario que se tomaran algunas medidas contra la enfermedad (6, 18).

Para el año de 1888 el Dr. Eduardo Licéaga recibió del Químico Luis Pasteur la cepa del virus para desarrollo de la vacuna, así es como se produce y se aplica a personas agredidas y a perros en el Instituto Antirrábico de la Ciudad de México (18).

La Rabia se ha considerado a través de los años como un problema de Salud Pública, ya que es una enfermedad infecciosa aguda y mortal, que afecta principalmente al sistema nervioso central y por lo general el virus entra al organismo por la mordedura de un animal rabioso (5, 7, 10, 17).

El virus de la rabia por sus propiedades morfológicas y bioquímicas se clasifica dentro del grupo de los Rabdovirus.

Pertenece al género Lyssavirus, los cuales tienen por características ser cilíndricos con un extremo redondo y el otro aplanado, su configuración es similar a la de una bala, están envueltos y presentan un genoma de RNA de una sola tira (7, 9, 10, 15). Tienen propiedades antigénicas que durante el curso de la enfermedad producen anticuerpos, que también se pueden producir después de la vacunación (9, 15).

Se reconocen cinco tipos de virus que comparten el genero Lyssavirus: 1.- Duvenhage, 2.- Kotonkan, 3.-Lagos bat, 4.- Mokola y 5.- Obodhiang. Por mucho tiempo se considero que el virus rabico era monotipico, hasta que se hicieron pruebas de reduccion de placa en donde los anticuerpos producidos tenían ligera diferencia en los títulos de seroneutralización, esto propicio que se hicieran pruebas mas específicas. Posteriormente con la utilización de anticuerpos monoclonales fue posible considerar subserogrupos en los diferentes aislamientos del virus rábico, sobre todo cuando son cepas epizoóticas de diferentes especies animales y de diferentes puntos geográficos (1, 9).

El virus es lábil y se inactiva fácilmente con la ebullición o con la aplicación de desinfectantes como el cloruro de mercurio y el formaldehído entre otros. En tejidos autolisados mantiene su viabilidad hasta por 72 hrs. y aun mas cuando se conserva en glicerina (2, 15).

Entre los virus rábicos clásicos, se conocen dos tipos: "virus de calle" y "virus fijo" el primero de ellos se refiere al que se aisló de animales infectados en forma natural, este no ha sufrido modificaciones en el laboratorio; el segundo se refiere a cepas especialmente adaptadas a los animales de laboratorio (1, 8, 15).

El período de incubación del virus es muy variable, depende de la cantidad de partículas virales inoculadas y del sitio donde se haya realizado la inoculación.

En el caso del perro la incubación promedio es de 3 a 8 semanas, sin embargo este periodo puede ser muy corto o muy largo con un rango de 10 días a 6 meses (5, 6, 7, 8, 15).

El virus al ser inoculado se propaga a los nervios periféricos que lo llevan a los ganglios espinales donde se replica para posteriormente invadir el Sistema Nervioso Central (virus neurotrópico), la infección se generaliza y se puede diseminar a otros órganos como las glándulas salivales, en este momento se presentan también los signos clínicos y posteriormente sobreviene la muerte.

El "virus de calle" por su mayor período de incubación produce una infección generalizada, por lo que llega a invadir las glándulas salivales hasta en un 75% de los casos (4, 7, 8).

En los animales que mueren de rabia, a la necropsia se llegan a observar las siguientes alteraciones : Emaciación, deshidratación, traumatismos, fracturas y meninges congestionadas, además otro hallazgo frecuente es encontrar cuerpos extraños en el interior del estómago como piedras, madera y material fecal entre otras.

En el estudio histopatológico las lesiones mas frecuentes son: Infiltración linfocitaria perivascular, gliosis focal, degeneración neuronal, presencia de cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos eosinofílicos alrededor del núcleo de las neuronas (corpúsculos de Negri) preferentemente en el hipocampo, pero también en corteza cerebral y cerebelo. En ocasiones es posible encontrar procesos degenerativos en el epitelio de las glándulas salivales, específicamente cuando la infección es por " virus de calle " (4, 6, 7, 8).

Clinicamente se reconocen tres fases de la enfermedad:

- a) Prodrómica
- b) Excitativa
- c) Paralítica

La fase prodrómica dura de dos a tres días, pero hay ocasiones que no se aprecia, hay cambios en el temperamento del animal, ligero aumento de la temperatura, dilatación pupilar y reflejo corneal lento entre otros.

La fase excitativa tiene una duración de uno a siete días, esta etapa puede ser corta y sus signos típicos son de agresividad, el perro esta irritable, inquieto y nervioso, busca lugares oscuros, es evidente la excitabilidad y presenta fotofobia e hiperestesia. En este período aumenta la inquietud y comienza a desplazarse y a vagar.

El animal se vuelve peligroso, tiene tendencia a morder todo lo que encuentre; en la mayoría de los casos hay cambios del ladrido causado por la parálisis de los músculos de la faringe, prosigue con parálisis en los músculos de la deglución provocando salida de saliva por el hocico. Si el animal no muere, aparece la fase paralítica, en la cual hay incoordinación muscular, parálisis progresiva, coma y muerte.

En todo el proceso pueden pasar 10 días, incluyendo la fase prodrómica, pero es raro un período mayor (1, 5, 6, 7, 8).

La sintomatología de la rabia es tan característica, que el examen clínico puede ser suficiente, pero dada la importancia de esta enfermedad y la posibilidad de contaminación al humano y a otros animales, es mas razonable confirmar el diagnóstico con pruebas de laboratorio como podrían ser: Inmunofluorescencia directa (anticuerpos fluorescentes), pruebas histológicas (Tinción hematoxilina y eosina, tinción de Sellers y otras.), Pruebas serológicas (electroforesis), Prueba de ELISA y Pruebas biológicas (1, 6, 7, 10, 13, 14, 15).

La eficacia de las pruebas de diagnóstico depende de los técnicos que las realizan y de la calidad de los reactivos, sin embargo una de las pruebas que resulta rápida y muy sensible es la inmunofluorescencia directa, pero los expertos de la Organización Mundial de la Salud recomiendan la utilización alterna de inoculación intracerebral a ratones lactantes con el material infectado, sobre todo de animales que hayan agredido a humanos, además la Inmunofluorescencia permite realizar las pruebas en etapas tempranas de la enfermedad cuando el animal rabioso aun esta con vida. Para tal fin se utilizan improntas de cornea, raspados de mucosa lingual, tejido bulbar de folículos pilosos y cortes cutáneos congelados (1, 4, 7, 10).

En países en desarrollo la técnica de diagnóstico mas utilizada, es la que se basa en el uso del microscopio para la detección de los corpúsculos de Negri, esta prueba es económica y de procedimiento simple, aunque sea un método poco sensible. Las técnicas de tinción mas comunes son: Sellers, May-Grunwald, Manin. Con estas técnicas la probabilidad de diagnosticar falsos positivos es prácticamente nula, pero el inconveniente consiste en que si no se observan los corpúsculos no se puede excluir la posibilidad de infección. Además es importante no solo realizar dichos exámenes en tejido cerebral sino también investigar en glándulas salivales.

Las pruebas serológicas son utilizadas por lo general, para conocer la capacidad de respuesta inmune humoral posterior a la inoculación del virus. Además existen otras pruebas que miden anticuerpos neutralizantes que son útiles para reconocer el grado de resistencia contra la infección, aunque en un animal sospechoso de padecer la rabia es útil conocer los niveles de anticuerpos ya que durante la enfermedad estos se elevan considerablemente.

El control de la Rabia a nivel mundial a sido manejado de diversas formas desde la antigüedad, antes de que existieran las vacunas antirrábicas la eliminación de animales rabiosos y la cuarentena de las personas y animales que hubieran tenido contacto era la única medida existente. No fue sino hasta 1884 cuando Pasteur logró elaborar una vacuna inmunogénica para perros y humanos.

A través de los años otros investigadores lograron perfeccionar dichas vacunas. Actualmente existen tres tipos de vacunas de acuerdo al modo de preparación:

- a) En tejido nervioso
- b) Vacunas avianizadas (en embrión de pato o pollo)
- c) En cultivos celulares

Las vacunas obtenidas de tejido nervioso solo se encuentran en forma inactivada, y el resto pueden ser : de virus vivo modificado y de virus inactivado (8).

Entre las vacunas de virus inactivado están las elaboradas con virus fijo en tejido nervioso y las elaboradas en cultivo celular.

Entre las vacunas de virus vivo se encuentran las preparadas en embrión de pollo y pato, una de ellas es la cepa FLURY, la cual puede tener pocos pases llamada LEP (Low Egg Passage) o muchos pases llamada HEP (High Egg Passage), esta última en México no ha demostrado protección satisfactoria en los animales inoculados. Otras vacunas de virus vivo son las elaboradas en cultivos celulares como la cepa ERA que se produce en riñón de cerdo, también conocida como SAD (Street Alabama Dufferin) y se recomienda para su aplicación a todos los animales domésticos ya que con una sola dosis es capaz de producir inmunidad hasta por tres años en perros (1, 5, 7, 10, 15).

Otra cepa cultivada en células de riñón de cerdo utilizada en México es la Roxane, esta cepa tiene su derivación de la SAD la cual se ha modificado a través de los años, de esta se recomienda la revacunación anualmente. Se puede aplicar a Bovinos, Perros y Gatos (3).

En el caso de vacunas inactivadas siempre se han utilizado virus fijo desde la creada por L. Pasteur, originalmente se cultivaban en cerebros de ovinos y posteriormente otros investigadores utilizaron otros tejidos para su replicación.

Los métodos de inactivación del virus han variado a través del tiempo desde la desecación hasta la utilización de fenol, éter, beta-propiolactona y formol, algunos otros utilizan luz ultravioleta. (5, 7, 10).

Este tipo de vacunas ha presentado el inconveniente ya que ocasiones provocan reacciones alérgicas (encefalitis autoinmune) en animales (7, 10, 15).

Las vacunas empleadas en América Latina son obtenidas en cerebro de ratón lactante (CRL) que comúnmente se aplican a perros y gatos, pero principalmente a humanos. El uso en perros ha demostrado conferir una protección hasta de tres años, pero esto depende de la cepa empleada y el fabricante (1, 5, 7, 15).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha realizado estudios comparativos entre las vacunas de virus vivo modificado obtenidas en cultivo celular y las obtenidas en embrión de pollo como la FLURY LEP la cuales demostraron que pueden proporcionar una inmunidad hasta por tres años. Sin embargo, la vacuna inactivada que se obtiene en CRL se observó que protege al 100% por un año y al 80% por tres años, aun así quedó comprobado que estas vacunas son eficaces (1, 5).

Dada la importancia de la enfermedad y los problemas con los que se enfrenta la población humana y animal, la OMS a establecido que todo lote de vacuna que se fabrique sea sometido a pruebas de inocuidad y actividad (Pruebas de Potencia) (1).

Una prueba de inocuidad es aquella en la que el producto (vacuna) se somete a exámenes para evidenciar la ausencia de contaminantes (bacterias, virus infeccioso y/o toxinas) (12).

Las pruebas de potencia sirven para evidenciar el grado de capacidad inmunizante, y aún en estos tiempos muchos laboratorios no realizan en forma sistemática estas pruebas, algunos factores que se deben de tomar en cuenta son:

1). Método de prueba para evaluar realmente de forma cuantitativa las propiedades de la vacuna que pueda determinar su eficiencia en la profilaxis tanto para el humano como para los animales. Esto será solo en los casos en que se pueda verificar el grado de respuesta mediante pruebas de desafío.

2). En este punto se refiere a la normatividad que se debe establecer para la técnica de ensayo, ya que son importantes dos aspectos; los animales de prueba y el virus de exposición. En el caso de los animales es importante resaltar que deben tener buen estado de salud y que todos los ratones pertenezcan a una colonia cerrada.

En cuanto al virus de exposición, se obtiene a partir del virus fijo (CVS) procedente de la cepa original de Pasteur que es un virus de desafío normalizado (12).

Existen diversas pruebas de potencia, las tres mas importantes se realizan en ratones y son aplicadas para las vacunas de virus inactivado.

La Habel modificada se utiliza para saber si las vacunas son activas. Pero si se requiere una prueba para cuantificar la potencia y así controlar la eficacia en la fabricación se puede utilizar la Habel original o la prueba NIH, la primera es de tipo de "rotura de la inmunidad" en la que todos los animales reciben la misma dosis mientras se varia la dosis del desafío; en la prueba NIH es de tipo "extinción del antígeno" se emplean cantidades variables de vacuna y todos los ratones reciben igual dosis del virus.

Para las vacunas con virus vivo modificado las pruebas tienen un carácter no cuantitativo de selección y se hacen en cobayo.

Un aspecto importante de las pruebas de potencia de todas las vacunas de virus vivo atenuado es la titulación del virus infeccioso para tener la seguridad mínima necesaria (12).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La Rabia es una enfermedad infecciosa aguda y mortal, que en México representa un grave problema de Salud Pública.

Para poder llevar a cabo un programa de control y erradicación de la Rabia urbana en la que el perro es el principal vector, es importante considerar varios aspectos, entre los que se destacan: la utilización de vacunas, la sistematización de campañas y la concientización de la población. En cuanto a la calidad de las vacunas, aunque los laboratorios productores realizan pruebas de potencia es importante que se lleven a cabo monitoreos sobre su capacidad de protección.

La Organización Mundial de la Salud recomienda que la Rabia se controle mediante el uso extensivo de vacunas de alta calidad.

Sin embargo en el uso y manejo de vacunas hay ocasiones que se pasan por alto algunos puntos importantes como son:

a) Existen casos en los que el animal que se vacuna, ha sido mordido y sin embargo, este puede estar en la etapa de incubación.

b) El control de calidad es indispensable, ya que en lotes de vacuna diferentes se puede dar el caso de que uno de ellos no confiera protección, como en los casos suscitados en Nigeria y México (14).

c) Fallas vacunales por el manejo inadecuado del biológico (rompimiento de la cadena fría).

d) En ocasiones el uso de desinfectantes de aplicación cutánea al momento de administrar la vacuna puede inactivarla sobre todo cuando se trate de virus vivo.

Por todo esto es importante que se lleven a cabo algunas pruebas de capacidad inmunizante de los biológicos bajo condiciones experimentales que en cierto modo ayudarán a tener un mejor control sobre la calidad de las vacunas.

JUSTIFICACION

Por la serie de situaciones que se pueden presentar en el manejo de las vacunas es importante resaltar que es deber del Médico Veterinario conocer la capacidad de viabilidad y resistencia de las vacunas que generalmente maneja. Esto es apoyado por los organismos oficiales como la SARH que en su departamento de control de productos biológicos y farmacéuticos, alimenticios y equipos para animales, establece los requerimientos mínimos de calidad que deben llevar los productos biológicos para uso Veterinario (16). Los requisitos que establece la normatividad de la SARH los debe cumplir el laboratorio y aunque generalmente son cubiertos, es importante realizar pruebas extras del producto circulante ya que en ocasiones hay accidentes en el manejo y puede romperse la cadena fría, por lo que el presente trabajo va encaminado a tratar de establecer hasta que punto el producto es efectivo, además se debe de tomar en cuenta que si la mayoría de las vacunas producidas fueran vigiladas de esta manera, el control de las enfermedades y en particular de la rabia sería mas efectivo.

HIPOTESIS

Algunas de las vacunas antirrábicas que se utilizan en México, son de virus vivo atenuado, si estas vacunas se exponen a temperatura por arriba de los 6 C el virus se inactiva reduciéndose así su capacidad inmunogénica. En el caso de que una vacuna sea expuesta a temperatura ambiente (20 -25 C) ó a 37 C, es posible que la inactivación del virus se lleve a cabo mas rápido cuando este a 37 C que a temperatura ambiente.

OBJETIVO GENERAL

1.- Valorar la estabilidad de la vacuna antirrábica liofilizada cepa Roxane, al ser expuesta a temperatura ambiente y a 37 C.

OBJETIVO PARTICULAR

1.- Determinar el título del virus vacunal cepa Roxane después de someterlo a temperatura ambiente y a 37 C durante un período máximo de 12 meses.

MATERIAL Y METODOS

En el presente trabajo se utilizó una vacuna antirrábica comercial elaborada con cepa Roxane de virus activo y liofilizado.

Para la realización del estudio se solicitó al laboratorio productor un total de 100 frascos de vacuna con su respectivo diluyente, todos ellos eran del mismo lote y presentación comercial.

Los frascos de vacuna y diluyente se transportaron en cajas térmicas de Unicel, las cuales contenían bolsas de refrigerante suficiente para conservar el interior de la caja entre 4 y 6 C.

Las pruebas de la vacuna se llevaron a cabo en el laboratorio de epizootiología del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP), Palo Alto México D.F. al recibir la caja con la vacuna, se confirmó que la temperatura en el interior de la caja no excediera los 6 C. Posteriormente se agruparon de la siguiente manera:

Grupo N° I	vacuna a 37 C
Grupo N° II	vacuna a temperatura ambiente (20 -25 C)
Grupo N° III	vacuna testigo (refrigeración 4 - 6 C)

Cada grupo se integró con 24 frascos de vacuna y su respectivo diluyente, el programa de pruebas se estableció como sigue:

	TIEMPO DE INOCULACION EN MESES								
	1	2	3	4	5	6	8	10	12
Grupo N° I	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Grupo N° II	*	*	*	*	*	*			
Grupo N° III		*		*		*	*	*	*

El grupo N°I se inoculó el día cero para verificar el título original de la vacuna al iniciar la prueba.

En cuanto a los otros tres grupos de vacuna se organizaron de manera similar, solo que estos se conservaron como reserva en caso de que la prueba con los ratones fallara por causas circunstanciales.

Para llevar a cabo las pruebas, primeramente se prepararon dos frascos de vacuna de cada grupo, se reconstituyeron las pastillas liofilizadas con el diluyente respectivo, mezclándose ambos frascos y posteriormente se llevaron a cabo diluciones logarítmicas hasta la dilución 10^{-7} (la vacuna reconstituida de acuerdo como lo recomienda el fabricante, fue considerada como dilución 10^0). Para lograr las diluciones se colocaron 7 tubos de ensayo en una gradilla y se les agregó a cada uno 4.5 ml. de BAP's (solución de albúmina amortiguada con fosfatos) al primer tubo se le adicionaron y mezclaron 0.5 ml de la vacuna reconstituida, obteniéndose una dilución 1:10, (10^{-1}), de este tubo se obtuvieron 0.5 ml. y se depositaron en el siguiente tubo con lo que se obtuvo una dilución de 1:100 (10^{-2}). Este procedimiento se siguió hasta llegar a la dilución 10^{-7} .

Por cada una de las diluciones se inocularon 6 ratones albinos suizos cepa CDI, con 21 días de edad, la dosis inoculada fué de 0.03 ml. por vía intracerebral, para ello se utilizaron jeringas de 1 ml. y agujas de 25 X 16 mm.

Los ratones fueron observados durante los 21 días posteriores a la inoculación y las muertes se registraron diariamente en hojas tabulares diseñadas exprofeso (Anexo 1).

El título viral de las vacunas en cada prueba, se calculó con el método de Reed and Muench, descrito en el Manual de Técnicas de la Rabia editado por la OMS (Anexo 2) (12).

Con los datos obtenidos se elaboraron cuadros y gráficas. Además se hizo un análisis estadístico en el que se aplicaron medidas de tendencia central y dispersión.

RESULTADOS

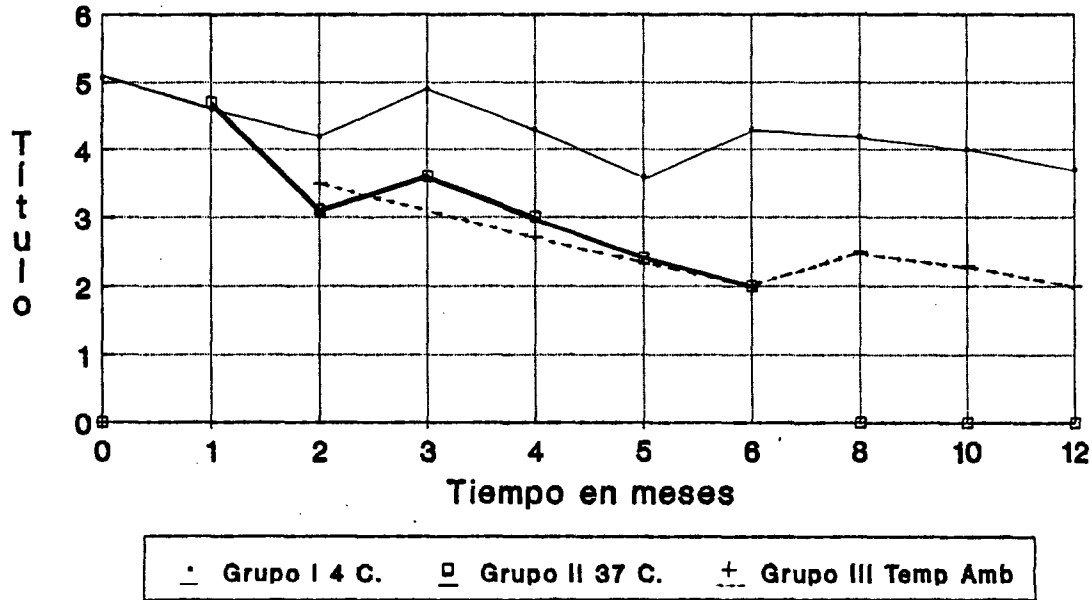
En el presente estudio se obtuvo que el grupo N° II de vacuna antirrabica el cual fué expuesto a 37 C, después de un mes solo bajo 0.38 logaritmos de su titulo original y que al sexto mes bajo 3.08 logaritmos, con lo que llego a un titulo mínimo de 10^{-2} . En cuanto al grupo N° III el cual fue expuesto a temperatura ambiente se observo que en los primeros dos meses tuvo una baja en su titulo de 1.58 logaritmos, a los cuatro meses 2.38 y a los doce meses 3.08 logaritmos, con lo que llego a su titulo mínimo de 10^{-2} . El grupo N° I que estuvo a 4 C, en el primer mes registro una baja de 0.48 logaritmos en su titulo original y al doceavo mes se observo un titulo de $10^{-3.7}$ (Cuadro N°1, Gráfica N°1).

En cuanto a los valores promedio y de desviación estándar de los títulos obtenidos se observo que en el grupo N° I el valor fue de 4.288 el promedio y 0.449105 la desviación estándar. Mientras que en el grupo N°II fue de 3.133333 el promedio y 0.867307 de desviación estándar y el en grupo N° III el promedio fue de 1.875 y la desviación estándar de 1.369375.

CUADRO N° 1

TITULOS OBTENIDOS DE LAS PRUEBAS DE VIABILIDAD PARA LA VACUNA ANTIRRABICA EXPUESTA A TEMPERATURA AMBIENTE Y TEMPERATURA DE 37 C.				
	TIEMPO MESES	GRUPO I VAC.4 C	GRUPO II VAC.37 C	GRUPO III VAC.TEMP. AMBIENTE
	0	5.08	---	---
	1	4.6	4.7	---
	2	4.2	3.1	3.5
	3	4.9	3.6	---
	4	4.3	3.0	2.7
	5	3.6	2.4	---
	6	4.3	2.0	2.0
	8	4.2	---	2.5
	10	4.0	---	2.3
	12	3.7	---	2.0
PROMEDIO		4.288	3.133333	1.875
DESV. ESTANDAR		0.449105	0.867307	1.170202
VARIANZA		0.201696	0.752222	1.369375
SUMATORIA		42.88	18.8	15

Títulos obtenidos de las pruebas de viabilidad de la vacuna expuesta a temperatura ambiente y a 37 C.



DISCUSION

En el presente trabajo el grupo I de vacunas que se mantuvo a una temperatura de 4 C y que se considero como testigo tuvo un titulo viral inicial de $10^{5.5}$ el cual de acuerdo a las normas internacionales para vacunas de virus vivo, es de buena calidad. Sin embargo, este grupo a pesar de que se mantuvo a 4 C, en los siguientes meses presentó variaciones drásticas en sus títulos las cuales llegan a manifestar en el quinto mes un titulo mínimo de $10^{3.6}$ que aunque se sigue considerando como aceptable esta en el limite que marcan las normas internacionales para vacunas vivas (12, 16). Por otro lado el grupo II que se expuso a una temperatura de 37 C , se observa que sus títulos virales bajaron mas o menos de manera regular hasta llegar a un mínimo de 10^{-2} en el sexto mes, aunque en el segundo mes el titulo fue mas bajo de lo esperado. En el grupo III el cual fue expuesto a una temperatura ambiente se observa que los títulos virales bajaron drásticamente en los primeros seis meses, sin embargo en los meses octavo y décimo se presenta un aumento en los mismos lo cual no resulta lógico ya que se esperaba que estos fueran menores.

En términos generales se observa que los títulos virales de los tres grupos de vacunas tienen variaciones irregulares en cuanto a su cronología, es probable que estas variaciones se deban a factores biológicos no controlados en los animales de prueba, ya que durante el período del experimento se presentaron algunas irregularidades ambientales en el bioterio que aunque se corrigieron oportunamente es posible que si hayan influido en los resultados.

CONCLUSIONES

- 1.- El virus rábico vacunal cepa Roxane mantiene su estabilidad hasta por un mes después de ser expuesto a temperatura ambiente y 37 C.
- 2.- La pérdida de viabilidad de la cepa Roxane es mayor cuando es expuesta a temperatura ambiente que a 37 C.
- 3.- La vacuna antirrábica cepa Roxane llegó a su título mínimo aceptable a los 3 meses después de ser expuesta a temperaturas superiores a los 6 C.

RECOMENDACIONES

- 1.- Llevar a cabo pruebas de viabilidad y caducidad en un mayor número de vacunas de virus atenuado y liofilizado.
- 2.- Incluir en las pruebas de titulación del virus, las pruebas de potencia de HABEL y/o NIH.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- ACHA, N.P., SZYFRES, B.: Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Organización Panamericana de la Salud. Segunda Edición. 502- 522. (1988).
- 2.- AGUILA, N. G., CORTEZ, A. E. y MARTELL, D.M.: Evaluación de conservadores de encéfalos para el diagnóstico de rabia. Reunión Nacional de Investigación Pecuaria en México. S.A.R.H. 68-71. (1982).
- 3.- ANCHOR: Boletín Técnico para el registro de la vacuna contra derriengue cepa Roxane, Anchor. México. (1985).
- 4.- AVILA, F.D.: Estudio de la Patogénia de la Rabia en perros afectados naturalmente. Tesis de Licenciatura. Fac. Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad de Guadalajara. Guadalajara, Jal. (1982).
- 5.- BAER, G. M.; Y COL: Historia natural de la Rabia. La Prensa Médica Mexicana, S.A. 1-30, 32-46, 195-206. (1982).
- 6.- BATALLA, C. D.; NOGUEZ, C. D.: Rabia. Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos/ Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias. 5-17. Sexta reimpresión. (1990).
- 7.- CORREA, G. P.: La Rabia, Manifestaciones clínicas, Transmisión, Prevención y Tratamiento. Ciencia Veterinaria. MORENO, CH. R. UNAM. Volumen 3. 104-138.(1981).
- 8.- HERNANDEZ, B. E.: Patogenia de la Rabia. MORENO, CH. R. UNAM. Ciencia Veterinaria. Volumen 2. 72-100. (1978).
- 9.- HERNANDEZ, B. E.: Propiedades físico-químicas y serotipos del virus rábico. Simposio. La atención médica de personas involucradas en accidentes de rabia. Memorias del 17 al 19 de Noviembre de 1987. México. 44-48. (1987).
- 10.- HOWARD, G. J.; TIMONEY, F. J.: Enfermedades infecciosas de los animales domésticos. La prensa Médica Mexicana. 728-742. (1983).

- 11.- JUBB, K. V. F.; KENNEDY, P. C.; PALMER, N.: Pathology of Domestic Animals. Volumen 1. Third Edition. 293-297. (1985).
- 12.- KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H.: La Rabia. Técnicas de Laboratorio. Organización Mundial de la Salud. (1976).
- 13.- LOPEZ, L. H.: Las pruebas ordinarias. Simposio. La atención médica de personas involucradas en accidentes de rabia. Modulo: Apoyo del Laboratorio para el diagnóstico. Memorias del 17 al 19 de Noviembre de 1987. 287-296. (1987).
- 14.- MARTINEZ, M. A.: Vacunación contra la Rabia. Avances en Medicina Veterinaria. EDITORIAL AGROTECNICA, S. A. Año III, Vol. IV, Num. 2. 104-109. (Feb.1988).
- 15.- MOHANTY, S. B.; DUTTA, S.K.: Virología Veterinaria. Editorial Interamericana. Primera Edición. 238-244. (1983).
- 16.- SECRETARIA DE AGRICULTURA Y RECURSOS HIDRAULICOS, S.A.R.H.: Manual de Normatividad de los requerimientos mínimos de calidad para los productos biológicos para uso Veterinario. (1977).
- 17.- VARGAS, G.R.: Mecanismos de exposición e infección rábica en el ciclo urbano. Simposio. La atención médica de personas involucradas en accidentes de rabia. Memorias del 17 al 19 de Noviembre de 1987. 84-92. (1987).
- 18.- VARGAS, P. F.: Situación actual de la Rabia en México. Simposio. La atención médica de personas involucradas en accidentes de rabia. Memorias del 17 al 19 de Noviembre de 1987. 17-21. (1987).

ANEXO 2

METODO DE REED Y MUENCH

En el metodo de Reed y Muench, el punto de partida para el calculo de las diluciones finales del 50 % (títulos DL_{50}) es la dilución que produce una mortalidad inmediatamente inferior al 50% (dilución de partida). Para determinar la diferencia entre el logaritmo de la dilución de partida y el logaritmo de la dilución final del 50% (diferencia de logaritmos) se utiliza la formula que se da con el ejemplo siguiente. Si la mortalidad disminuye cuando la dilución aumenta (como sucede en las titulaciones de suspensiones viricas), la dilución final del 50% será inferior a la dilución de partida. En consecuencia, la diferencia de logaritmos ha de substraerse del logaritmo del recíproco de la dilución de partida. Por el contrario, la diferencia de logaritmos tiene que sumarse si la mortalidad se incrementa con el aumento de las diluciones. Esa diferencia, debe de tenerse en cuenta al efectuar los cálculos.

La diferencia de logaritmos se calcula con la formula:

$$50\% - (\text{mortalidad inmediatamente inferior al } 50\%) \cdot \frac{\text{X logaritmo del factor de (mortalidad inmediatamente superior dilución. al } 50\% - \text{mortalidad inmediatamente inferior al } 50\%)}$$