

VIABILIDAD DEL VIRUS FLURY ALTO PASAJE A DIFERENTES TEMPERATURAS UTILIZANDO DOS CONSERVADORES

M.V.Z. DIÓDORO BATALLA C.¹

Resumen

Se ensayó la viabilidad de vacunas antirrábicas cepa Flury (HEP) elaboradas con dos conservadores, almacenadas a las temperaturas de 2, 20 y 30°C. y reconstituidas a 1, 10, 20, 30, 60, 90 y 120 días de su preparación. La viabilidad de la vacuna se determinó calculando la dosis letal 50% por el método de Reed y Muench, en ratones lactantes. Las vacunas conservadas a 37°C. disminuyeron considerablemente en su potencia. Dos de los seis lotes conservados a 20°C. tuvieron un título aceptable a los 20 días, disminuyendo su potencia a los 30 días. Las vacunas conservadas a 2°C. fueron las únicas que mantuvieron su potencia hasta los 120 días. No hubo diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) entre los conservadores utilizados.

Desde que Koprowski (1954, 1955) demostró que la vacuna antirrábica cepa Flury alto pasaje (168-172 pases) protege al ganado bovino contra la rabia paralítica, es la que más se ha utilizado en México. El valor antigénico de esta vacuna, en el momento de ser aplicada, depende en parte de la forma en que sea conservada, particularmente de la temperatura de su almacenamiento. Por lo tanto, sería de gran interés el conocer las modificaciones que sufre cuando se mantiene a distintas temperaturas y con diferentes conservadores o estabilizadores para tener una idea de cuál sería su efectividad antigénica (Flores, 1965).

El estudio de la potencia y antigenicidad de la vacuna puede efectuarse mediante varias pruebas: protección otorgada a cuyes (Koprowski, 1967), pruebas de antigenicidad en cuyes u otros animales (Gómez *et al.*, 1955; Carneiro *et al.*, 1955); determinación de la viabilidad, a través de la dilución mínima de la vacuna capaz de producir la muerte en el 50% de ratones inoculados; y protección proporcionada en ratones vacunados por vía intramuscular y posteriormente expuestos con virus rábico (Dean, 1960; U.S.N.I.H., 1953).

Se ha observado que existe una correlación entre el título de viabilidad en ratones y las pruebas de antigenicidad en cuyes, tanto con vacuna Flury de bajo pasaje (Phillips, 1964) como con la de alto pasaje (Valdés O., 1965), por lo tanto, en este estudio, se utilizó la prueba de viabilidad en ratones (OMS,

1966) para conocer la potencia de las vacunas.

En la preparación de la vacuna antirrábica cepa Flury, tanto de alto como de bajo pasaje, las suspensiones del tejido embrionario infectado son adicionadas con estabilizadores que protegen su viabilidad. Se considera que la acción de estos estabilizadores varía de acuerdo con la fórmula. En el Laboratorio de Producción de vacunas del Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias se ha venido utilizando desde hace varios años una fórmula, y para probar una nueva, se consideró necesario hacer un estudio comparativo entre ambas, para determinar cuál de los dos conservadores preservaba mejor la viabilidad de la vacuna a diversas temperaturas.

Material y métodos

Se utilizaron cinco lotes de vacuna antirrábica de alto pasaje (HEP), avianizada y liofilizada, elaborada de acuerdo con la técnica descrita por la Organización Mundial de la Salud (1966). Cada uno de estos lotes fue preparado por duplicado utilizando dos conservadores elaborados de la siguiente manera:

C-1) A cada 1,000 ml. de suspensión embrionaria al 33.3% se adicionaron 10 g. de glucosa q.p. y 20 g. de glicina.

C-2) A cada 1,000 ml. de suspensión embrionaria al 33.3% se adicionaron 0.9 g. de fosfato ácido de potasio, 6.66 g. de peptona y 33.3% g. de lactosa.

Una vez liofilizada la vacuna, se tomaron al azar 21 frascos, los cuales fueron conservados en grupos de 7 c/u, a las temperaturas de 2°, 20° y 37° C., que representan aproximadamente la temperatura ideal de conserva-

Recibido para su publicación: Marzo 5, 1969.

¹ Departamento de Microbiología Experimental, Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias, S. A. G., Carr. México-Toluca, Km. 15½. México, D. F.

ción; la de clima templado y la de clima cálido, respectivamente. Los frascos fueron protegidos de la luz solar e identificados por lote y conservador utilizado. De cada grupo se reconstituyeron las vacunas a los 1, 10, 20, 30, 60, 90 y 120 días de conservación a las temperaturas indicadas y se inocularon por vía intracerebral con 0.03 ml. de diluciones decimales de 10^{-1} a 10^{-6} carnadas de ratones lactantes albino suizo de 5-6 días de edad, debido a que la cepa de alto pasaje únicamente mata ratones de esa edad. Los ratones inoculados se observaron durante 21 días, anotándose la mortalidad para calcular la dosis letal 50% (DL 50) según el método de Reed y Muench (1938).

Resultados

Los resultados obtenidos se expresan en los cuadros Núms. 1, 2 y 3, y en la gráfica. Los títulos obtenidos se expresan convencionalmente como logaritmos positivos.

Las titulaciones iniciales variaron entre $10^{3.6}$ y $10^{5.4}$. La principal disminución se observó en las muestras conservadas a 37°C. (Cuadro 1), observando que en este grupo, a los 10 días, sólo cuatro lotes tenían un título mayor a $10^{3.3}$ y a los 20 días sólo un lote lo sobrepasaba. El título de $10^{3.3}$ es el mínimo necesario para considerar una vacuna efectiva de acuerdo con el comité de expertos de la OMS (1966).

CUADRO 1
Titulación de vacunas conservadas a 37°C.

Lote	DIAS				
	1er.	10	20	30	60
12 C1	4.647	2.834	1.569	1.667	0
12 C2	5.000	3.556	2.488	1.237	0.500
14 C1	5.426	2.567	0	0.918	0
14 C2	5.091	3.625	1.130	0.745	0
15 C1	5.194	3.143	0	0	0
15 C2	3.647	2.600	0.625	1.863	0
16 C1	5.000	1.500	3.000	0	0
16 C2	5.127	3.823	0	2.398	0
17 C1	5.334	3.357	2.000	0.767	0
17 C2	4.200	1.834	3.375	1.627	0
Promedio C1	5.120	2.479	1.313	0.666	0
Promedio C2	4.613	3.087	1.613	1.574	0.100

En las muestras conservadas a 20°C. (Cuadro 2) se observó que a los 10 días todas tuvieron una titulación mayor a $10^{3.3}$, a los 20 días sólo dos lotes sobrepasaron este límite.

CUADRO 2
Titulación de vacunas conservadas a 20°C.

Lote	DIAS						
	1er	10	20	30	60	90	120
12 C1	4.647	5.432	4.062	4.205	3.426	4.432	2.286
12 C2	5.000	3.659	2.834	3.218	3.412	3.500	2.500
14 C1	5.426	4.167	4.127	4.123	4.689	3.124	2.458
14 C2	5.091	4.556	4.695	3.799	2.658	2.604	2.375
15 C1	5.194	4.500	2.500	3.597	0.864	3.500	2.500
15 C2	3.647	4.334	3.296	3.375	2.639	3.249	2.334
16 C1	5.000	3.834	3.790	4.000	3.123	1.569	0
16 C2	5.127	3.728	3.625	4.500	3.500	2.500	0.715
17 C1	5.334	4.148	3.834	4.500	3.500	1.582	0
17 C2	4.200	4.416	3.795	1.700	3.500	3.123	0
Promedio C1	5.120	4.414	3.362	4.045	2.522	2.626	1.448
Promedio C2	4.613	4.138	3.649	3.318	3.141	2.995	1.585

CUADRO 3
Titulación de vacunas conservadas a 2°C.

Lote	DIAS						
	1er.	10	20	30	60	90	120
12 C1	4.647	5.426	4.625	5.500	4.500	4.296	4.426
12 C2	5.000	2.794	4.747	4.500	3.863	4.420	3.834
14 C1	5.426	4.138	4.609	5.123	3.582	3.691	4.642
14 C2	5.091	5.258	4.834	5.167	4.675	3.730	4.500
15 C1	5.194	5.000	3.584	5.000	4.500	3.747	4.000
15 C2	3.647	5.473	4.385	4.747	3.863	4.297	4.919
16 C1	5.000	4.000	4.334	4.794	4.500	3.592	4.678
16 C2	5.127	4.457	5.943	4.597	3.398	5.375	4.707
17 C1	5.334	4.500	4.747	5.000	4.296	4.715	3.695
17 C2	4.200	4.291	3.546	4.426	5.000	4.747	4.596
Promedio C1	5.120	4.612	4.353	5.083	4.275	4.006	4.288
Promedio C2	4.613	4.454	4.551	4.687	4.139	4.513	4.511

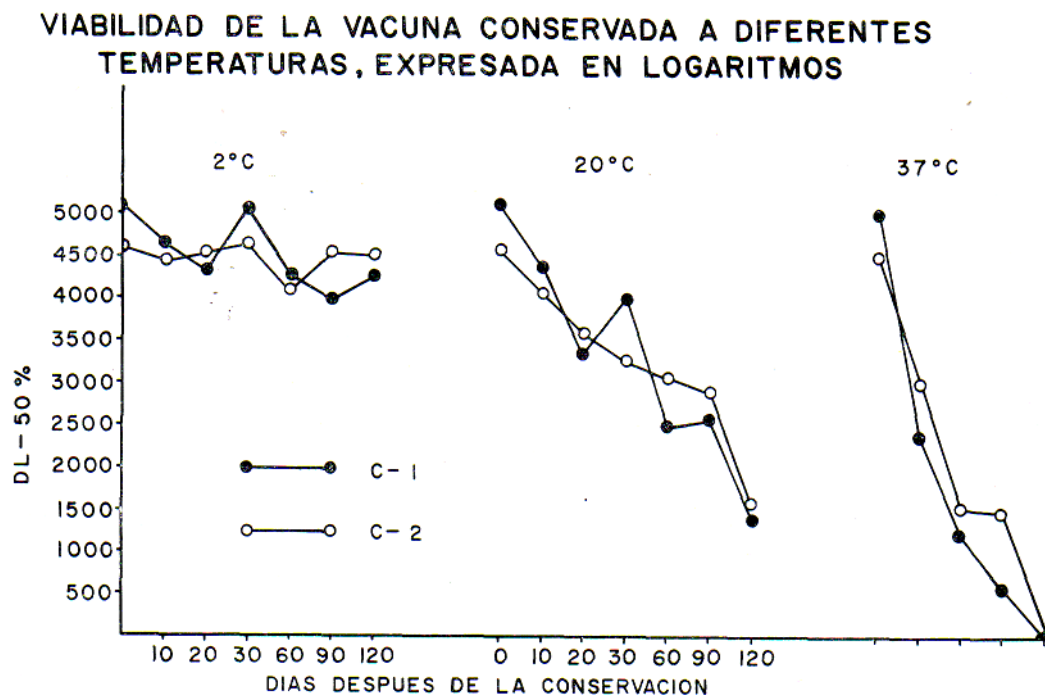
te, ya que poco a poco el título fue disminuyendo, observándose que entre los 30 y 60 días ya no se alcanzó el límite mínimo establecido.

En las muestras conservadas a 2°C. (Cuadro 3), se encontró que al cabo de los 120 días, seguían teniendo una titulación muy por encima de la mínima establecida por la OMS.

La gráfica se elaboró con la media aritmética de las titulaciones de los diferentes lotes, e ilustra objetivamente los resultados obtenidos.

Discusión y conclusiones

No se encontró diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) entre los conservadores utilizados en este estudio.



El hecho de observar que las vacunas conservadas a 20°C. y 37°C., bajan considerablemente su potencia después de cierto tiempo, demuestra la importancia de mantener bajo estricta refrigeración (2°C.) a las vacunas antirrábicas, cepa Flury HEP, desde el momento en que se producen hasta que son aplicadas al animal (ver gráfica).

Summary

Viability tests were done with antirrabid Flury (HEP) strain vaccines, made with two different kinds of preservative mixtures, stored at 2°, 20° and 30°C and reconstituted

at 1, 10, 20, 30, 60, 90 and 120 days after preparation.

The viability of the vaccines were determined, estimating the lethal dose 50% by the Reed and Muench methods, using suckling mice.

The vaccines stored at 37°C reduced considerably its potency. Two out of six lots maintained at 20° C had an acceptable titer after 20 days, decreasing its potency at 30 days.

The vaccine lots maintained at 2°C, were the only ones that maintained its potency after 120 days.

There was no statistically significant difference ($P < 0.05$) between the two preservative mixtures utilized.

Literatura citada

- CARNEIRO V., J. BLACK, H. KOPROWSKI, 1955. Rabies in cattle immunization of cattle in Brazil and after exposed with virus itatiba of bats. *J. A. V. M. A.*
- CARNEIRO V., 1954. Transmission of rabies by bats in Latin American. *Bull. Wold. Hlth. Org.* X.
- DEAN D. S., 1960. Testing and marketings, rabies vaccine modified live virus chick embryo origin. *J.A.V.M.A.* CXXXVI.
- FLORES S. A., 1965. Influencia que ejerce la temperatura sobre la viabilidad de la vacuna antirrábica liofilizada. Tesis. U.N.A.M., México.
- GÓMEZ C., J. BLACK y H. KOPROWSKI, 1955. Rabies in cattle III. Comparativo studies on vaccination of cattle in Colombia, with flury virus and cloroformy in activated vaccine. Pearl River, N.Y. *J.A.V.M.A.* CXXXVIII, 360-363.
- KOPROWSKI H., 1954. Biological modification of rabies virus as a result of its adaptation to chick embryos. *Bull. Wold. Hlth. Org.* X. 709-724.
- KOPROWSKI H., 1955. Rabies in cattle review of immunization of hervoborous animals agains rabies. *J.A.V.M.A.* 357-360."
- KOPROWSKI H., 1967. Epreuve sur le cobaye du vaccine prepare sur embryon de poulet. *O.M.S. Bull.* 158-162.
- PHILLIPS C. E., 1964. Evaluation of rabies vaccine of chicken embryo origin, *J.A.V.M.A.* 144 (3) 280-776.
- REED L. J. y H. A. MUENCH, 1938. A simple method of stimating fifty percent end points. *Am. J. Hyg.* 27: 493-497.
- Técnicas de laboratorio aplicadas a la rabia por varios autores, 1969. *Organización Mundial de la Salud.* XXIII O.S.P. Oficina Regional de la O. M. S. Washington D. C. 6, E.U.A. 79-133.
- United States National Institutes of Health, 1953. Standard requirement of rabies vaccine modified live virus chick embryo vaccine dried. Minimum requeriment rabies vaccine.
- VALDÉS ORNELAS O., M. ROLDÁN, 1965. Estudio comparativo de las pruebas de viabilidad y antigenicidad en la titulación de vacunas antirrábicas cepa Flury. Trabajo elaborado para el Congreso Nacional de Epizootias.