

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

ANABEL MELCAREJO B.¹
ELISEO HERNÁNDEZ B.²
OCTAVIO HERNÁNDEZ B.¹
MARÍA R. DE GORDÓN¹

La vacuna antirrábica V-319/Acatlán 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 infectado. Después de 4 pases en células embrionarias de vampiro se obtuvo un título máximo de $10^{2.6}$ DL50 para ratón lactante. Dado que estos títulos eran muy bajos y debido al hecho de que el virus de la rabia se multiplicaba en la línea celular BHK-21, la cepa V-319/Acatlán 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 (Bol. sobre rabia paralítica, 1976).

Esta clona V-319/cl-476 alcanzó entonces un título de $10^{9.0}$ UFP/ml estabilizándose en este título. A partir de esto se le hicieron una serie de pruebas. En la actualidad se sabe que confiere una protección de 3 años (Bol. sobre rabia paralítica, 1976).

Recibido para su publicación el día 8 de octubre de 1982.

¹ Departamento de Investigación en Producción, Instituto Nacional de Investigaciones Fecundarias, SARH. Km. 15.5 Carretera México Toluca, Delegación Cuajimalpa C.P. 05110.

² Profesor de Virología, ENEP-Cuautitlán, Izcalli, Edo. de México, Apdo. Núm. 25.

Es de todos conocido el hecho de que, aun cuando el producto sea bueno, su efectividad depende en gran parte del manejo que se le dé en el campo o al momento de su aplicación (Morales y Flores, 1975).

Se ha recomendado no emplear la vacuna antirrábica una hora después de reconstituida (Morales y Flores, 1975), pero desconocemos el tiempo en que ésta pierde su viabilidad. Se sabe 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 existe la pregunta qué 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 en gran escala en un rancho, en donde la sujeción de los animales por 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 24 horas.

El objetivo de este trabajo es 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.

I. Tratamiento de la vacuna.

Se reconstituyeron 8 frascos de vacuna antirrábica de la cepa V-319/Acatlán de una dosis cada uno con 2 ml para cada frasco del diluyente, recomendado por el productor, posteriormente fueron vertidos en frascos estériles con el fin de hacer una mezcla homogénea. Dicha mezcla fue conservada a 4C. De la misma forma se hizo otra mezcla que se mantuvo a 28C, a partir de éstas fueron tomadas a diferentes tiempos alícuotas de 0.5 ml para realizar diluciones décuples, utilizando como diluyente medio de 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 Departamento de Investigación en Producción de Biológicos del Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias y con un título oficial $10^{6.5}$.

El motivo por el cual las mezclas son mantenidas a 4C y 28C 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 4C como a 28C. Para este fin se utilizaron camadas de ratones lactantes, seleccionando hembras con no menos de 5 ratones; a las que tenían más de siete se les quitaron para ser donados a las hembras que tenían 5 o 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 periodo de adaptación al cuarto de ratones de 24 horas, que sumadas a su edad, produjeron camadas de 1 a 3 días.

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

Las camadas fueron divididas en dos lotes, A y B, y a su vez cada uno de ellos constó de 7 sublotes 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 y tomando en cuenta el título oficial se esperaba que éste bajara. Por lo tanto se utilizaron 7 camadas para cada uno de los tiempos ya mencionados, y una camada para cada dilución decimal. Cada una de las camadas inoculadas fue perfectamente identificada con la hora, la fecha y la dilución correspondiente.

Los animales fueron observados diariamente durante un periodo 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 fue calculado por el método de Reed y Muench (Kaplan y Koprowsky, 1973), sacándose la DL50 y el título de 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 (1950).

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 decidió extender el experimento a un periodo 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 mínimos cuadrados Alder y Sossler (1964).

La titulación de las diferentes alícuotas de la vacuna, tratadas como se indicó en material y métodos, arrojó 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. (No se realizó la prueba de anticuerpos fluorescentes en los ratones muertos). Estos resultados se vaciaron en el cuadro 1 a fin de poder emplear estos resultados con las reservas del caso.

En el cuadro 2 se anotaron los títulos de virus obtenidos con los límites de con-

fianza, calculados según el método de Pizzi (1950).

La gráfica 1 muestra la cinética de inactivación del virus rábico a 4C, en donde puede apreciarse 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 fue calculada con la técnica de mínimos cuadrados (Alder y Rossler, 1964), 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 2 ilustra, de manera similar, la cinética de inactivación viral a 28C y el tiempo crítico en este caso ocurre a las 4 horas con 24 minutos.

Como puede observarse en las gráficas 1 y 2, 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 aun con las grandes variaciones obtenidas en muestras cercanas, en las

CUADRO 1

Datos de mortalidad que resultaron ser un tanto extraños

DILUCIONES						Tiempo de inoculación	Temperatura
10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷		
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 ..	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	5/5	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

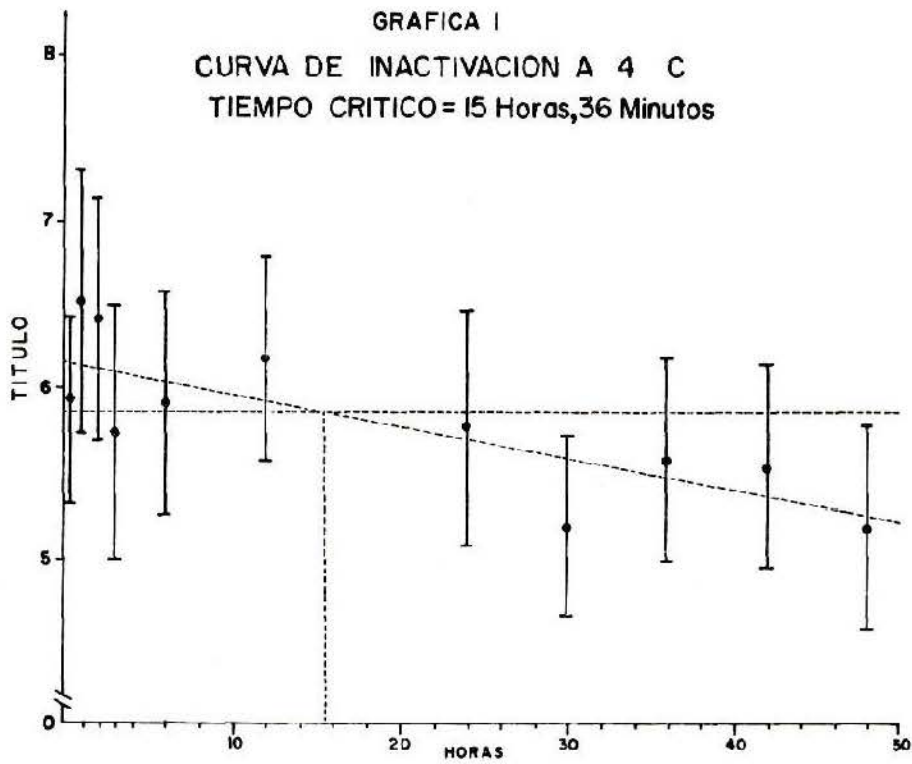
* Estos datos ocurrieron en la segunda parte del experimento, los demás corresponden a la primera parte del mismo.

CUADRO 2

Resultados de titulación y límites de confianza de los diferentes tiempos y temperaturas

Tiempo de Inoculación	4 C		23 C	
	Título	L C al 90 % (Piazé)	Título	L C al 90 % (Piazé)
Inmediatamente*	10.5.87	± 0.56	10.5.52	± 0.62
1 Hora	10.6.52	± 0.78	10.6.09	± 0.92
2 Horas	10.6.41	± 0.72	10.6.08	± 0.01
3 Horas*	10.5.75	± 0.75	10.5.29	± 0.59
6 Horas	10.5.91	± 0.66	10.5.77	± 0.66
12 Horas	10.6.18	± 0.61	10.6.34	± 0.74
24 Horas*	10.5.77	± 0.7	10.5.98	± 0.84
30 Horas	10.5.18	± 0.53	10.4.82	± 0.09
36 Horas	10.5.57	± 0.61	10.4.24	± 0.72
42 Horas	10.5.53	± 0.61	10.4.27	± 0.72
48 Horas	10.5.16	± 0.61		

* Estos resultados son el valor promedio de dos titulaciones.

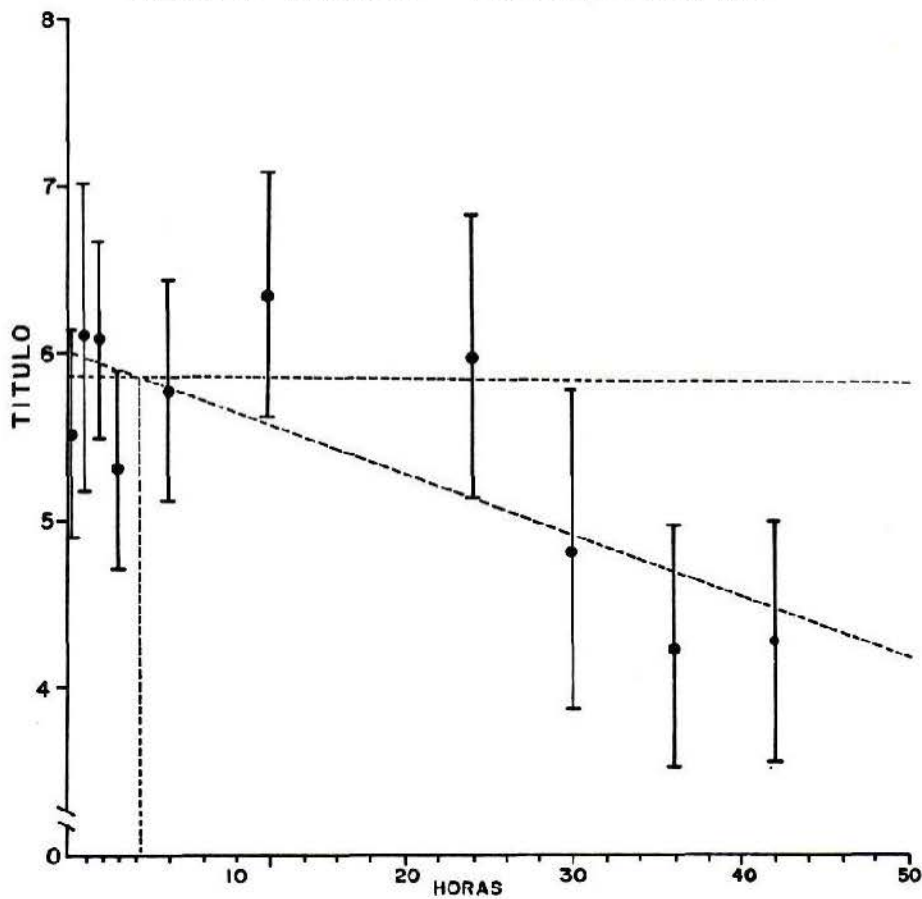


que no se esperan grandes variaciones en el título, todavía caen dentro de los límites de confianza. La prueba en ratones lactantes muestra estas características (cuadro 1) en su empleo, de ahí que sea necesario aplicar métodos estadísticos para reducir las variaciones al mínimo.

Como se puede ver, los títulos arrojados

por las diferentes alícuotas tomadas de la mezcla mantenida a 4C no muestra diferencias significativas, más aún cuando les son aplicados los límites de confianza al 90%, debido a esto se utilizó la técnica de mínimos cuadrados para establecer una pendiente, y con ello lograr precisar en qué tiempo dicha pendiente cruza la línea del

GRAFICA 2
CURVA DE INACTIVACION A 28 C
TIEMPO CRITICO = 4 Horas, 24 Minutos



título mínimo de protección, que es de $10^{-6.55}$. En el caso de 4C resultó ser a las 15 horas y 36 minutos.

De los títulos obtenidos de las alícuotas, tomadas de la mezcla que fue mantenida a 28C, se puede observar que a partir de las 30 horas los títulos muestran una clara disminución, aun cuando se les aplicaron los límites de confianza al 90%, por eso se optó por no tomar la alícuota correspondiente a las 48 horas al considerarlo innecesario. 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, y es importante considerar el título mínimo inmunizante de la vacuna. Quizá por esto los tiempos de viabilidad de la vacuna sean tan cortos; es de esperarse que con vacunas de título inicial más alto, estos tiempos cambien.

Summary

A study was conducted on the batch 79-2-B of the V319/Acatlan antirabies

vaccine produced at the research and production department, in order to determine the duration of virus titer after rehydration of the product and kept at 4C and 28C.

Two batches of vaccine were reconstituted and pooled, one batch was kept at 4C and the other at 28C. From each batch 0.5 ml alicuots were withdrawn at various times for suckling mice titration. From each alicuot ten-fold dilutions were made and a litter of 3 day old suckling mice strain CD-1 were intracerebrally inoculated.

Calculation of virus titers were made by the Reed and Muench method.

Confidence limits to the 90% level were calculated according to the Pizzi method.

The maximum time of useful vaccine after reconstitution was graphically estimated by drawing a line whose slope represents the rate of virus titer loss. The cross point of the virus inactivation line to minimum acceptable titer of the vaccine was taken to represent the time of duration of the vaccine after reconstitution.

Our results show that the vaccine held at 4C after reconstitution lasts 15.5 hours while the vaccine held at 28C lasts 4.5 hours.

Literatura citada

ALDER, H.L. and T.B. ROSSLER, 1964, Introduction to probability and Statistics, 3 Ed. W.H. Freeman & Co., San Francisco, USA.

Boletín sobre rabia parálitica, 1976, vacuna antirrábica de origen murciélago-vampiro, cepa V-319/Acatlán para proteger al ganado bovino contra la rabia parásitante, en México, Proyecto Internacional Rabia Parálitica en México, Proyecto Internacional Rabia Parálitica, Insti-

tuto Nacional de Investigaciones Pecuarias, SAG, México, D.F.

KAPLAN, M.M. and H. KOPROWSKY, 1973, Laboratory Techniques in rabies, third ed., World Health organization, monograph, Series N° 23.

MORALES, R. y R. FLORES, 1975, prevención de la rabia parálitica bovina, control de la enfermedad, *Téc. Pec. Méx.*, 29: 81-86.