

ESTABILIDAD DE LA VACUNA LIOFILIZADA CONTRA *Brucella abortus* CEPA RB51

J. Salazar*, Yolanda M. Sánchez-Castilleja*, J.L. Bojórquez** y Eva Díaz**

*Departamento de Producción Agrícola y Animal. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Xochimilco. Calzada del Hueso N°1100. Colonia Villa Quietud, C. P. 04960. México, D.F. Correo electrónico: feryaya1@hotmail.com; **Dirección de Producción. Productora Nacional de Biológicos Veterinarios. Zaragoza N°75. Colonia Lomas Altas. C.P. México, D.F.

RESUMEN: Con el objetivo de evaluar la estabilidad de la vacuna RB51 de *Brucella abortus*, se realizaron evaluaciones a 4°, 25° y 37°C en intervalos de 7 días durante 28 días. El indicador evaluado fue la variación de las unidades formadoras de colonias (UFC) durante el tiempo de estudio. Se encontró una disminución de las UFC a 37°C y 25°C, a 4° no se observó modificación. Se definió además que la vacuna RB51 "dosis vaca", es estable a 4°C durante 2 años 6 meses.

(Palabras clave: RB51; vacuna; brucelosis; estabilidad)

STABILITY OF THE LYOPHILIZED VACCINE AGAINST *Brucella abortus* STRAIN RB51

ABSTRACT: With the objective of evaluating the stability of the *Brucella abortus* RB51 vaccine, evaluation were carried out at 4°, 25° and 37°C in 7 day- intervals for 28 days. CFU variation was the indicator evaluated during the study time. There was a reduction of CFU at 37°C and 25°C; and at 4° there was not modification observed. It was also defined that the cows' RB51 vaccine is stable during 2 years and 6 months.

(Key words: RB51; vaccine; brucellosis; stability)

INTRODUCCIÓN

La vacuna RB51 se ha utilizado durante los últimos 10 años para proteger al ganado bovino contra la exposición a la cepa virulenta 2308 de *Brucella*. Esta vacuna ha probado tener múltiples ventajas, como la carencia o expresión de pequeñas cantidades del antígeno "O" del LPS que es encontrado en la cepa 19 y de campo, con lo que previene la formación de anticuerpos que den resultados positivos a las pruebas serológicas (17, 6). Además, se ha comprobado su eficacia aún en vacas gestantes, sin riesgo a sufrir aborto (15). No se ha aislado de leche, exudados vaginales, tejidos fetales o membranas placentarias de bovinos, bisontes e incluso de perras (2, 8); aplicada a toros no produce lesiones histológicas y no es secretada en semen (16). Tras la aparición de la cepa RB51 con las grandes ventajas que esta ofrecía, la Secretaría de Agricultura, Gana-

dería, Pesca y Alimentación de México, autorizó su aplicación de manera masiva; modificándose las normas: NOM 041-ZOO-1995 y la NOM 053-ZOO-1995 (12,13) para las especificaciones que deben cumplir las vacunas elaboradas con esta cepa.

Estados Unidos por el avance de su campaña solo autorizó el uso de la presentación "Becerras", para animales no gestantes menores de 12 meses de edad con vacunas cuyo contenido es de 1 a 3 x 10¹⁰ UFC por dosis. En México la autorización se amplió a la presentación "Vacas" para animales adultos mayores de 12 meses de edad, incluyendo gestantes, con un contenido de 1 a 3 x 10⁹ UFC por dosis. Esto último obedece al tipo de explotación en el país, donde la movilización del ganado adulto, principalmente reemplazos, ingresa a zonas con condiciones de incidencia variable, por lo que resulta necesario inmunizar las vacas gestantes y no gestantes antes de movilizarlas.

La vacuna RB51 como otras vacunas vivas pierden un número considerable de bacterias a través del tiempo, por lo que se debe constatar, de acuerdo a la norma NOM-053-ZOO-1995 (13), su calidad mediante pruebas de estabilidad, de tal manera que se conozcan las características de viabilidad en diferentes condiciones de almacenamiento y se asegure la calidad a nivel de mercado hasta tres meses después de la fecha de expiración indicada en las etiquetas de los biológicos. De esta manera, PRONABIVE-LITTON de México lo sometieron inicialmente a la vacuna RB51 en su presentación «Vacas», a temperaturas elevadas de 37°C durante 15 días. Sin variaciones en los valores de cuenta viable, PRONABIVE-UAM-X elaboraron el presente estudio con el objetivo de determinar la estabilidad de la vacuna RB51, en presentación «Vacas» sometiéndola a diferentes temperaturas y períodos de almacenamiento.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material biológico

Se utilizó una vacuna liofilizada de *Brucella abortus* RB51 lote número 221124, así como frascos de diluyente con 20mL lote 2330549.

Cuenta viable

Se reconstituyeron dos frascos del producto terminado, vacuna RB51, con 20 mL de diluyente cada uno, se agitaron enérgicamente hasta obtener una suspensión uniforme, y se mezclaron en partes iguales. Posteriormente se realizaron diluciones decimales seriadas de 10^{-1} a 10^{-8} utilizando solución salina peptonada (SSP). (1)

Las últimas tres diluciones se sembraron en cuatro cajas de petri con agar soya tripticaseína por dilución, depositando 0.1 mL de la dilución correspondiente. Estas se incubaron a 37° C durante 72 hrs. Al término de este lapso se realizó la cuenta de colonias de *Brucella* y se seleccionaron las cajas que conte-

nían entre 30 y 300 UFC, de manera similar a los métodos descritos previamente para vacunas liofilizadas. Este procedimiento se repitió a los 7, 14, 21 y 28 días para los tres grupos de temperaturas (4°C, 25°C y 37°C).

Análisis Estadístico

El cálculo de las UFC/mL se obtuvo mediante el promedio de las colonias por mL de cada dilución y sumando los promedios correspondientes a cada dilución.

Considerando que el requisito mínimo establecido como satisfactorio es de 1×10^9 UFC / dosis, se realizó el cálculo aproximado del tiempo en el cual se alcanzaría este valor al someter el producto a las mismas condiciones de temperatura, para lo cual se realizó el despeje de la variable del tiempo de la ecuación correspondiente de primer orden.

$$K = \ln Co - \ln Ct / t$$

Co = cuenta viable inicial

Ct = cuenta viable deseada

t = tiempo

RESULTADOS y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos de las cuentas viables al inicio y al final de los 28 días que duró la prueba, por la exposición de los frascos a 37°, 25° y 4°C se presentan en la Tabla 1, se puede apreciar que la vacuna mantenida durante 28 días a 4°C no presentó modificación en la cuenta viable al final de la prueba, no así a 37°C, en donde hubo una pérdida cuantiosa en las UFC/dosis que asciende a 2.47.

Aplicando la ecuación de Arrhenius Tabla 2, fue posible estimar que la vacuna RB51, dosis reducida (vacas) es estable a 4°C, durante 2 años, seis meses, en cambio a las temperaturas de 25°C y 37°C, la cuenta viable se reduce considerablemente a través

TABLA 1. Cuentas viables obtenidas a diferentes temperaturas y tiempos./ *Viable countings obtained at different temperatures and times*

Días	vacuna a 4°C UFC/dosis	Vacuna a 25°C UFC/dosis	Vacuna a 37°C UFC/dosis
0	2.7×10^9	2.70×10^9	2.70×10^9
7	2.13×10^9	0.41×10^9	0.55×10^9
14	1.50×10^9	0.94×10^9	0.20×10^9
21	2.20×10^9	0.48×10^9	0.19×10^9
28	2.70×10^9	0.36×10^9	0.23×10^9

TABLA 2. Cálculo aproximado del tiempo para alcanzar 1×10^9 UFC/dosis, a las tres diferentes temperaturas de prueba./ *Approximate time calculation to reach 1×10^9 UFC/dose at the three different test temperatures*

Temperatura	In Co	In Ct	K	t (días)
4°C	21.716	20.723	0.00102857	965.418
25°C	21.716	20.723	-0.55314286	17.951
37°C	21.716	20.723	-0.08555714	11.606

del tiempo, siendo estos únicamente por 17 y 11 días respectivamente.

La temperatura recomendada por el fabricante para almacenar la vacuna en el anaquel es de 4°C con un período de vigencia de 2 años. Por los resultados obtenidos se observa que se tuvo un lapso de seguridad de 6 meses que corresponde al doble de lo que marca la NOM-053-ZOO-1995 (13) en su punto 5.4.2.5 e inclusive la Organización Mundial de Salud –WHO-2002 en la revisión técnica para la implementación del monitoreo de viales de vacunas (7). Queda pendiente verificar que la cuenta viable de este lote permanezca dentro de los límites que marca la NOM-053-ZOO-1995 (13), durante el lapso estimado a través del resultado obtenido aplicando la ecuación de Arrhenius a 4°C, con lo que se demostrará la eficacia del método para medir la estabilidad de la vacuna RB51 dosis adulta.

Este método ha funcionado en biológicos semejantes a la vacuna elaborada con la cepa RB51, como quedó demostrado con el trabajo realizado por Reyes (14), sobre la estabilidad de la vacuna liofilizada de *Salmonella gallinarum* Cepa 9 R a tres diferentes temperaturas, cuyo período de vigencia fue calculado a 1 año 2 meses donde fue posible demostrar que la vacuna mantiene el resultado de la UFC / dosis estimadas. La cuenta viable se repitió en el mismo lote al año y 2 meses de estar almacenada a 4°C, obteniendo un resultado similar al estimado por el método de Arrhenius. Monath (11), por su parte, menciona que las vacunas deben utilizar algún tipo de aditivo para incrementar la estabilidad de la vacuna, con lo que se asegura su viabilidad en almacenamiento a 4°C por un período igual o mayor a 2 años. Sin embargo, en el caso de la vacuna contra la fiebre amarilla, investigada por él, observó que al liofilizarse es muy inestable al reconstituirse. Aunque se trata de una vacuna viva atenuada igual a la cepa RB51, su comportamiento es diferente, quizás porque es un virus y no una bacteria.

Más recientemente estudios realizados (4) evidencian que la vacuna liofilizada contra *Brucella abortus* debe almacenarse a una temperatura máxi-

ma de 4°C por 13 meses. Basado en los resultados del estudio, se espera que los cálculos efectuados para estimar la estabilidad de la vacuna elaborada con la cepa RB51, dosis adulto sean confiables y que la vigencia de la vacuna que se indica en la etiqueta sea real y asegure la eficacia del producto.

No obstante, los resultados obtenidos, la predicción de una fecha de caducidad con base a este tipo de pruebas, debe ser confirmada mediante la repetición de las mismas al término de la vigencia estimada para el lote del producto en estudio.

Las pruebas de estabilidad deben ser realizadas durante el tiempo que permita observar cambios en la cuenta viable del producto a por lo menos tres temperaturas. Así mismo la evaluación de la cuenta viable debe ser realizada de preferencia por un solo técnico para disminuir las variaciones y mantener el mínimo de variables en la realización del producto.

Es recomendable realizar estudios de estabilidad al periodo de vigencia indicado por el fabricante, repitiendo los estudios de cuenta viable de lotes de vacuna conocidos.

REFERENCIAS

1. Alton, G.G.; Jones, L.M.; Angus, R.D. y Verger, J.M. (1988): Techniques for the brucellosis laboratory. *Inst. Nat. Rech. Agro.* Paris.
2. Bagnat, E.; Manetti, J.C. (2000): Proof of efficacy of the RB51 and 19 antibrucellosis vaccines in cattle. *Revista de Medicina Veterinaria (Buenos Aires)*. 81(6): 428-429.
3. Bojorquez, N.L. (1998): Control de calidad en los biológicos usados en la Campaña Nacional: *Memorias del III Foro Nacional Brucelosis*. México. 98-107.
4. Capsel, R.L.; Olsen, S.C.; Cheville, N.F. y Thoen, C.O. (2000): Survival of *B. abortus* strain RB51 lyophilized and as a liquid vaccine under

- different storage conditions. *Biologicals*. 28: 209-215.
5. González, P.M. (1992): Producción y control de vacunas. *Vacunas Ciencia y Salud*. 55-68.
 6. Halling, S.M.; Koster, N.A. (2001): Use of detergent extracts of *Brucella abortus* RB51 to detect serologic responses in RB51 vaccinated cattle 13(5): 408-412.
 7. <http://www.who.int/vaccines-acces/vacman/technet21/tc>
 8. Hur-Jin; Park, Y.M.; Baek, B. (2001): Experimental inoculation of *B. abortus* strain RB51 in pregnant dogs. *Korean J. Vet. Public. Health*. 25(3): 185-192.
 9. López, M.A. (1998): La brucelosis como una zoonosis de interés en México. : *Memorias del III Foro Nacional de Brucelosis. México*. 53-62.
 10. Martin, N.A. (1985): Physical pharmacy principles in the pharmaceutical sciences. *LEA FEBIGER. Philadelphia*. 295-305.
 11. Monath, T.P. (1996): Stability of yellow fever vaccine. *Dev. Biol. Stand*. 87: 219-225.
 12. Norma Oficial Mexicana NOM-041-ZOO-1995. Campaña nacional contra la brucelosis en los animales. <http://www.sagarpa.gob.mx/Normas-oficiales>.
 13. Norma Oficial Mexicana NOM-053-ZOO-1995. Requisitos mínimos para las vacunas, antígenos y reactivos empleados en la prevención y control de la brucelosis en los animales. <http://www.sagarpa.gob.mx/Normas-oficiales>.
 14. Reyes, S.J.A. (1989): Evaluación de la estabilidad de una vacuna liofilizada de *Salmonella gallinarum* cepa 9R a tres diferentes temperaturas. *Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México*.
 15. Uzal, F.A.; Samartino, L.; Shuring, G.; Carrasco, A.; Nieves, K.; Cabrera, R.F. and Tadeo, H.R. (2000): Effect of vaccination with *Brucella abortus* strain RB51 on heifers and pregnant cattle. *Vet. Res. Communications*. 24: 143-151.
 16. Vargas, F.S.; Rivera, G.; Pool, Vale-Echeta; Montiel, M. and Shuring, G. (2001): Histopathology and bacteriology of test, epididymus and lymphonodules in bulls, RB51 strain *B. abortus* vaccine. *Revista científica Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad de Zulia*. 11(5): 423-430.
 17. Velmulapalli, R.; He, Y.; Boyle, M.S.; Srirangathan, N. and Shuring, G. (2000): *Brucella abortus* RB51 as a vector for heterologous protein expression and induction of specific Th1 type immune responses. *Infect. Immun*. 68(6): 3290-3296.

(Recibido 2-7-2006; Aceptado 2-3-2007)