

243
2 cop.

VACUNA ANTIRRABICA FUENZALIDA - PALACIOS
ADMINISTRADA INTRADERMICAMENTE.
ESTUDIO EXPERIMENTAL EN CONEJOS

TESIS

Presentada al Programa de Estudios para Graduados Universidad
Nacional - Instituto Colombiano Agropecuario.

Por

HILDA TERESA VIVEROS ASTUDILLO

Como requisito parcial para optar ^{al} el grado de

MAGISTER SCIENTIAE

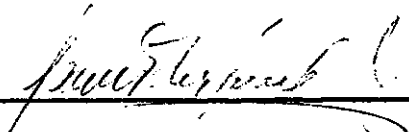
BOGOTA - COLOMBIA

1974

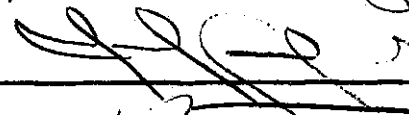
TESIS APROBADA POR

COMITE CONSEJERO :


Dr. JAIME ESTUPIÑAN ARIAS.



Dr. MIGUEL GUZMAN URREGO.



Dr. ALFONSO RUIZ



El Presidente de tesis y el consejo examinador de grado, no serán responsables de las ideas emitidas por el candidato. (Artículo 217 de los Estatutos de la Universidad Nacional)

A mis queridos padres y hermanos

AGRADECIMIENTOS

A los Miembros del Comité Consejero: Al Dr. Jaime Estupifian por su orientación; al Dr. Miguel Guzmán U. por la magnífica acogida al trabajo realizado y su decisiva colaboración y estímulo constante; y al Dr. Alfonso Ruiz.

Al Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional que me permitió realizar este estudio.

Al Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), de manera especial a la Escuela de Graduados por contarme entre sus estudiantes y al Laboratorio de Investigación Médica Veterinaria (LIMV) por su decisivo apoyo sin cuya cooperación este estudio no hubiera sido posible.

Al Instituto Nacional para Programas Especiales de Salud (INPES), por la ayuda técnica prestada a esta Investigación al Dr. Enrique Arciniegas Quijano, y al señor Rafael Ortiz Meza de la Sección de Programación y Supervisión, por su valiosa colaboración en el análisis estadístico de este estudio. A los doctores: Guillermo Mendoza, de la Sección de Vacuna Antirrábica y Gabriel Toro de la Sección de Patología, por sus consejos.

CONTENIDO

	Página
1. INTRODUCCION.....	1
1.1. Naturaleza del Problema.....	1
1.2. Objetivos Generales.....	4
2. REVISION DE LITERATURA.....	5
2.1. Vacuna Antirrábica.....	5
2.1.1. Generalidades.....	5
2.1.2. Vacunas preparadas en tejido cerebral...	8
2.1.3. Vacuna en tejido nervioso de animales in- maduros.....	10
2.1.4. Vacunas preparadas en tejido no nervioso	11
2.2. Esquema de inmunización en el Hombre.....	14
2.2.1. Inmunización Profiláctica.....	14
2.2.2. Tratamiento Post - Exposición.....	14
2.3. Reacciones adversas Post - Vacunales.....	15
2.3.1. Reacciones a las vacunas de tejido nervio so.....	15
2.3.2. Reacciones a la vacuna de ratón lactante.	17

	Página
2.3.3. Reacciones a la vacuna de embrión de pato..	19
2.4. Naturaleza de las reacciones Post - Vacunales.....	19
2.5. Patogenesis.....	21
2.5.1. Vía de infección y diseminación del virus..	21
2.6. Respuesta del Huésped.....	23
2.6.1. Defensa Humoral.....	23
2.6.2. Defensa Celular.....	24
2.6.3. Interferón.....	24
3. MATERIALES Y METODOS.....	26
3.1. Materiales.....	26
3.2. Diseño Experimental.....	31
3.3. Métodos.....	37
3.3.1. Seroneutralización.....	37
3.3.2. Electroforesis.....	42
3.3.3. Proteinemia.....	44
4. RESULTADOS.....	45
4.1. Titulación de Antígenos.....	45
4.2. Reacción a la Vacuna.....	45

	Página
4.3. Determinación de Anticuerpos Neutralizantes	46
4.4. Estudio de la Fracción Gamma Globulina del suero..	60
5. DISCUSION	67
6. CONCLUSIONES	71
7. RESUMEN	72
8. SUMMARY	74
9. LISTA DE ABREVIATURAS	76
BIBLIOGRAFIA	78

LISTA DE TABLAS

Número		Página
1	Muestras de sangre tomadas en diferentes períodos de los Grupos A.B.C. y D. Inmunizados con vacuna antirrábica Fuenzalida - Palacios, Bogotá, 1.973	33
2	Cronograma de Inmunización a grupos de conejos, con diferentes esquemas; según vía de inoculación y cantidad de vacuna antirrábica Fuenzalida - Palacios, Bogotá, 1.973	38
3.1.	Título recíproco de anticuerpos neutralizantes en suero de conejos del Grupo A, por días de sangría. Estudio Experimental. Inmunización con vacuna antirrábica Fuenzalida - Palacios , vía subcutánea, Bogotá 1.973.....	47
3.2.	Título recíproco de anticuerpos neutralizantes en suero de conejos del Grupo B, por día de sangría. Estudio Experimental. Inmunización con vacuna antirrábica tipo Fuenzalida - Palacios - vía intradérmica, Bogotá, 1.973	49
3.3.	Título recíproco de anticuerpos neutralizantes en suero de conejos del Grupo C, según día de sangría. Estudio Experimental. Inmunización - con vacuna antirrábica tipo Fuenzalida - Palacios, vía intradérmica, Bogotá 1973	50
3.4.	Título recíproco de anticuerpos neutralizantes en suero de conejos del Grupo D, según día de sangría. Estudio Experimental. Inmunización con vacuna antirrábica Fuenzalida - Palacios, vía intradérmica, Bogotá, 1.973	51

4	Resultados de las pruebas de seroneutralización con conejos de los Grupos A.B.C. y D. y diferentes períodos de tiempo. Estudio Experimental. Inmunización con vacuna Fuenzalida - Palacios, Bogotá, 1.973	53
5	Concentración en Grs de Gamma Globulina en los conejos de los Grupos A y B. Según día de sangría. Estudio Experimental. Inmunización con vacuna antirrábica tipo Fuenzalida - Palacios, Bogotá, 1973	61

LISTA DE GRAFICAS

NUMERO		PAGINA
1	Título promedio de anticuerpos neutralizantes de los Grupos A, C, y D. según días de sangría, Bogotá 1973	55
2	Interpretación estadística de las diferencias de producción de anticuerpos de los Grupos A y C., en valores de t , $\alpha = 5\%$ y $\nu = 14$	58
3	Interpretación estadística de las diferencias de producción de anticuerpos de los Grupos A y D, en valores de t , $\alpha = 5\%$ y $\nu = 14$	58
4	Interpretación estadística de las diferencias de producción de anticuerpos de los Grupos C y D, en valores de t , $\alpha = 5\%$ y $\nu = 14$	59
5	Concentración media en gramos de Gamma Globulina en los Grupos A y B., según día de sangría, Bogotá. 1.973	62
6	Recta de regresión correspondiente a la concentración media de Gamma Globulina en los Grupos A y B., según día de sangría, Bogotá. 1973.	63
7	Interpretación estadística de las diferencias de producción de Gamma Globulina de los Grupos A y B, en valores de t , $\alpha = 5\%$ y $\nu = 14$	65
8	Interpretación estadística de las diferencias de producción de Gamma Globulina de los Grupos A y B, en valores de t , $\alpha = 5\%$ y $\nu = 12$	65
9	Interpretación estadística de las diferencias de producción de Gamma Globulina de los Grupos A y B, en valores de t , $\alpha = 5\%$ y $\nu = 13$	66

1. INTRODUCCION

1.1. NATURALEZA DEL PROBLEMA

Desde las investigaciones de Pasteur, la inmunoprofilaxis antirrábica humana posterior a la exposición, se ha basado en el doloroso y prolongado tratamiento con una serie de inyecciones diarias de vacuna con virus atenuado o inactivado. Este esquema en algunos pacientes, después de un cierto número de dosis, puede desarrollar reacciones que varían, desde locales benignas, hasta graves con daños neurológicos irreversibles e inclusive pueden causar la muerte. Estas complicaciones neurológicas se atribuyen a fenómenos de hipersensibilidad demorada similar a las operantes en la encefalomiелitis alérgica experimental.

Estudios recientes en simios han determinado que el factor encefalitogénico es una proteína mielínica y más específicamente un polipéptido que contiene triptófano, aminoácido esencial, para sensibilizar las células linfocitarias, Kabat (25). Este factor está presente en el sistema nervioso central a partir de los cuales se prepara la vacuna, Bell (6). La frecuencia de reacciones post - vacunales ocurre entre 1:527 y 1:8.500 según ha sido informado por Abdussalam y Bögel (1).

En general, las investigaciones sobre prevención de la Rabia se han encaminado a mejorar la eficacia de la profilaxis en el hombre y a la búsqueda de métodos que reduzcan la gravedad de las reacciones de tipo neuromuscular.

Existe información que apoya la opinión de que después de la introducción de virus rábico la replicación y diseminación al Sistema Nervioso Central (S.N.C.) ocurre sólo a través de tejido neural, Baer(4). Hay también, quienes como Krause (29), sugieren que el virus es transportado desde el punto de la mordedura por vía sanguínea y linfática al Sistema Retículo Endotelial (S.R.E.), donde se produce una adaptación multiplicación y eliminación extraneural.

El modo como opera la protección post - exposición no está completamente claro aún, según Turner (62), no parece ser por interferencia o producción de interferón, sino más bien, siguiendo las normas inmunológicas convencionales de anticuerpos neutralizantes.

La respuesta humoral específica a un estímulo antigénico depende en parte de la composición química del antígeno, de su estado físico, de la ruta de inoculación y del tiempo de administración; Uhr (63), ha relacionado la importancia de la presencia del antígeno con la clase de in

munoglobulinas sintetizadas durante la respuesta inmunológica, de -
mostrando que una segunda inyección de antígeno, justamente antes
de la disminución de la producción de Inmunoglobulina M y el comien-
zo en la producción de la Inmunoglobulina G resulta de una prolonga-
da respuesta de Ig M con bloqueo temporal en la producción de Ig G;
interpretando estos hallazgos como una indicación de que el antígeno
debe persistir para la síntesis continuada de Ig M y que la disminu-
ción de antígeno puede terminar con dicha síntesis.

En los estudios de la respuesta inmunológica en la profilaxis
contra la Rabia, Rubin (52), demostró un nivel alto y persistente de
Ig M en personas que recibieron una serie de 14 dosis, debido a la -
prolongada permanencia del antígeno en el cuerpo, como resultado de
la inyección diaria y repetida de vacuna.

Lo importante en la profilaxis antirrábica debe ser la síntesis
de Ig G, ya que los anticuerpos de la clase Ig M por sus característi-
cas no abandonan la circulación y no llegan a los tejidos donde su pre-
sencia es esencial, Nisonoff (40).

Estos estudios son de importancia, y sugieren que se debería in-
vestigar una nueva ruta y nuevos esquemas de inmunización, que a la vez
que disminuya la posibilidad de reacción alérgica, permitan una rápida

aparición de altos niveles de anticuerpos de la clase Ig G.

1.2. OBJETIVOS GENERALES.

Estudiar en animales de experimentación inoculados por vía intradérmica con vacuna antirrábica Fuenzalida - Palacios, en pequeñas dosis y siguiendo diferentes esquemas de inmunización, los siguientes aspectos :

El momento de aparición de los anticuerpos neutralizantes.

Nivel de anticuerpos alcanzados en diferentes períodos.

Respuesta en la fracción gamma globulina del suero.

Establecer datos que sirvan para posteriores estudios en este campo.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1. VACUNA ANTIRRABICA

2.1.1. Generalidades

La mayoría de las cepas de virus rábico que se usan en la producción de vacuna, provienen de virus que han sufrido una larga serie de modificaciones por inoculaciones sucesivas en animales de experimentación, estas cepas son llamadas " fijas ", se caracterizan por un período de incubación limitado a un número mínimo de 5 a 8 días, siguen siendo neurotrópicas, tienden a ser menos infectivas cuando se las inocula por vía periférica, se multiplican hasta alcanzar títulos más altos que la mayoría de las cepas de virus " calle " y tienen gran actividad inmunogénica, Burrows (8).

La cepa original del virus fijo obtenida por Pasteur, junto con sus subcepas se conservan y son constantemente estudiadas para probar inocuidad y actividad inmunogénica en el hombre.

A partir de estas se preparan las vacunas empleadas en la actualidad y comprenden :

.1.1.1. Cepas Pasteur (Paris)

Este virus fue aislado por Pasteur en 1.882 de un perro rabioso, mantenido en conejos y usado por primera vez para inmunización humana en 1.885 después de 90 pasajes.

.1.1.2. Ceba Pasteur PV - 11 (Virus Pasteur)

Sub - cepa seleccionada de la cepa original; se conoce también con el nombre de Pitman - Moore (PM), se mantiene en conejos.

.1.1.3. Ceba Flury

En 1.939 Johnson (31), aisló esta cepa de un caso humano, se fijó en ratón y se atenúa por pasaje intracerebral en embrión de pollo y luego por inoculación en saco vitalino de huevos embrionados. Derivada de esta, existen las sub - cepas Flury LEP (Low egg passage) con 227 a 230 pasajes en embrión de pollo. Existe además la cepa CVS (Standar Challenge Virus) que se mantiene en cerebro de ratón y es suministrada periódicamente por la Organización Mundial de la Salud (Ginebra - Suiza) a los laboratorios de producción de vacuna.

Las vacunas para uso humano, pueden dividirse en dos grandes grupos : Las obtenidas en tejido nervioso de mamíferos adultos o recién nacidos y las obtenidas en otros tejidos distintos del nervioso.

.2.1.2. Vacunas preparadas en tejido cerebral.

La vacuna antirrábica Pasteur (44), la primera usada en el hombre, fue preparada a partir de una suspensión de médula espinal de conejos infectados, desecada en hidróxido de potasio durante 5 a 6 días, las médulas tratadas durante un período más breve contenían virus viables en cantidades proporcionales a la duración del período de desecación.

Las numerosas modificaciones introducidas al sistema de la médula infectada utilizada por Pasteur condujeron a la aparición de la vacuna Fermi en 1908, Semple en 1911 y Hempt en 1925, según cita de Turner (61). Todavía se siguen empleando las vacunas Fermi y Semple que tuvieron su origen en la época de Pasteur.

.1.2.1. Vacuna Fermi

Aún cuando esta vacuna es usualmente clasificada como vacuna inactivada, contiene una cantidad de virus activo combinado con virus inactivado. Con este tipo de vacuna se produjo el mayor accidente

post - vacunal ocurrido en Ceará, Brasil, en el que murieron 18 personas, de 60 que recibieron la vacuna, según informe de Para (43). La vacuna consiste en una suspensión acuosa de 5% de tejido cerebral de oveja inoculada con virus cepa Pasteur. La temperatura de sólo 22°C y la concentración del virus residual es de alrededor de $10^{2.7}$ DL50/0.03 en ratón. El uso de Fenol al 0.5% como agente inactivante en esta vacuna ha sido reemplazado gradualmente por Beta - propiolactona, tal como se ha venido preparando en el Instituto Pasteur de Paris, según Lepine (33) desde 1.967.

.1.2.2. Vacuna Semple

Es la vacuna que se prepara probablemente con más regularidad y la que se emplea más para el tratamiento post - exposición. Se utiliza el cerebro de conejo adulto como sustrato y la cepa Virus Pasteur (P.V.). Los títulos víricos de la suspensión cerebral al 5% deben exceder de 10^6 DL50/0.03 ml. en ratón. La completa inactividad del virus se obtiene con Fenol 0.25% a 0.5% a una temperatura de 37°C y además lleva como agente preservativo Tiomerosal a una concentración de 1: 10.000, Seligman (53).

2.1.3. Vacuna en tejido nervioso de animales inmaduros.

.1.3.1. Vacuna en cerebro de ratón lactante (CRL) Fuenzalida y Palacios (13), informaron en 1955 sobre el desarrollo de una vacuna antirrábica preparada en cerebro de ratones lactantes menores de cinco días inoculados con tres cepas de virus rábico; dos cepas chilenas autóctonas Nos. 51 y 91 aisladas de un caso de rabia en un cerebro de perro y de un humano respectivamente y la cepa CVS. Se consideran títulos víricos aceptables entre $10^{6.3}$ y $10^{7.3}$. La vacuna es una suspensión de cerebro al 1% e inactivada por luz ultravioleta. Una de las ventajas que se le anota a esta vacuna es la rápida multiplicación del virus a un título elevado, además presenta menos riesgo de producir reacciones neurológicas por ausencia casi total de sustancias encefalitogénicas que se encuentran en los elementos mielínicos de animales recién nacidos, según lo han demostrado Thomas (57) y Kabat (24). Se utiliza esta vacuna tanto en tratamiento post - exposición como en inmunización profiláctica.

En Brasil se utiliza la vacuna tipo Fuenzalida "modificada" llamada así porque emplea Beta - propiolactona para la inactivación del virus; Silva y Col. (55).

Sikes y Larghi (54), partiendo de una vacuna tipo Fuenzalida prepararon una vacuna antirrábica purificada (PRV) por cromatografía en columna de Ecteola - celulosa e inactivada con Beta - propiolactona. Ellos obtuvieron un producto de alta capacidad antigénica, pero de elevado costo de producción.

.1.3.2. Vacuna en cerebro de rata lactante.

La vacuna preparada en rata lactante, con una concentración de virus 10^6 a 10^7 , es una suspensión cerebral al 10% e inactivada con Fenol al 1% por 14 días a 22° C. Se emplean ratas de 4 a 8 días inoculadas intracerebralmente con la cepa Pasteur del pasaje 3.249 según Karakujumca (26).

.1.3.3. Vacuna en cerebro de conejo lactante.

Es una suspensión acuosa al 5% de cerebro de conejo no mayor de 24 horas inoculado con cepa Pasteur e inactivada por luz ultravioleta. Se emplea en profilaxis y tratamiento post - exposición.

2.1.4. Vacunas preparadas en tejido no nervioso.

.1.4.1. Vacuna preparada en tejido aviar

En la actualidad la vacuna antirrábica preparada en em -
brión de pato infectado, es la de elección en Estados Uni -
dos tanto para tratamiento post - exposición como en pro -
filaxis de personas con alto riesgo. Esta vacuna esta -
casi desprovista de factor encefalitogénico, se prepara
mediante la inoculación de la cepa Pitman - Moore (P.M.)
en embriones de pato de siete días, antes de que ocurra la
mielinización, los embriones son colectados, sus cabezas y
- patas descartadas y la suspensión es inactivada con Beta -
propiolactona, Hoskins (21).

.1.4.2. Vacuna en cultivo celular

La capacidad del virus rábico de crecer en cultivo de teji -
dos ha dado como resultado la posibilidad de disponer de un
producto que por su elevada capacidad inmunogénica permita
vacunar al hombre con dosis reducidas. Se han obtenido re -
sultados prometedores en Checoslovaquia con el uso profi -
láctico y terapéutico de vacuna Vnokovo - 32, utilizando -
cultivos primarios renales de hamster como sustrato, según
informe de expertos en rabia (41). Lavender (30), ha obte -

nido resultados alentadores en primates inoculados con vacuna preparada en cultivo de células de embrión de pato, infectadas con virus fijo CVS, inactivada con Beta - propiolactona, purificada por centrifugación zonal y adyuvante de AlPO₄. La vacuna es notable por la rápida inducción y sostenido nivel de anticuerpos producidos.

Koprowski en 1968 (9), dió a conocer los resultados preliminares sobre vacunas antirrábicas utilizando cultivo de células diploides humanas WI - 38 (Wistar Institut) inoculadas con virus Pitman - Moore para las vacunas inactivadas y con la cepa Flury HEP para preparación de vacuna de virus vivo. Estas vacunas comparadas con otras han inducido una pronta aparición de anticuerpos y conferido mayor resistencia en monos Rhesus a la confrontación masiva de 10.000.000 de dosis infecciosas para el hombre. La vacuna preparada con cepa P.M. ha sido purificada por diferentes métodos por Wiktor y Col. (66), obteniéndose mayor potencia cuando se utiliza precipitación con sulfato de amonio e inactivación con Beta - propiolactona. Este tipo de vacuna la aplicó Wiktor (68), a humanos voluntarios utilizando una posología de tres inyecciones, obteniendo una respuesta de anticuerpos superior a la lograda con 14 inyecciones de vacuna preparada en embrión de pato.

2.2. ESQUEMA DE INMUNIZACION EN EL HOMBRE.

Existen dos esquemas de inmunización humana; según informe de los expertos en rabia (41) :

2.2.1. Inmunización Profiláctica.

Está recomendada para las personas que tienen un alto riesgo de infección, como los que trabajan con virus rábico en los laboratorios, los veterinarios, los perreros, los naturalistas, etc. Estos individuos deben estar protegidos mediante una inmunización preventiva consistente en tres inyecciones de una vacuna antirrábica de suficiente actividad antigénica y, de ser posible, exenta de actividad paralitógena. Las inyecciones se administran a intervalos de 5 a 7 días; al cabo de un mes de administrada la última dosis, se inyectará una dosis de refuerzo.

2.2.2. Tratamiento post - exposición.

En muchos países se utiliza un esquema de 14 a 21 inyecciones, pero en otros se han adaptado pautas reducidas de 7 a 10 inyecciones y refuerzos a los 10, 20 y 90 días después de la última inyección de la serie original, dependiendo del tipo de actividad de la vacuna.

2.3. REACCIONES ADVERSAS POST - VACUNALES.

La inmunización antirrábica continúa siendo un procedimiento de riesgo por el tipo de vacunas actualmente disponibles, que son un producto biológico en el cual la mayor parte del material antigénico no es vírico sino celular, lo cual puede producir serias y a veces fatales reacciones durante o después de la vacunación.

2.3.1. Reacciones a las vacunas de tejido nervioso.

.1.1. Reacciones locales.

Con el prolongado curso de 14 a 21 inyecciones recomendadas y de uso todavía frecuente, se producen fenómenos locales como dolor, enrojecimiento, induración, urticaria transitoria y en algunos casos prurito generalizado. Paterson (46).

.1.2. Reacciones neurológicas.

Los signos clínicos neurológicos más frecuentes aparecen entre los 4 y 15 días después de la primera inyección. - Trebula (60), observó en Corea, varios casos de complicaciones neurológicas severas, aquí los signos y síntomas fueron manifestados entre los días décimo y decimoquinto

después de la primera inoculación. El curso fue más benigno en niños que en adultos.

El cuadro clínico neurológico usualmente consiste en varios signos y síntomas, unos relacionados con inflamación de las meninges (cefalea, raquialgia, rigidez nucal) otros corresponden a lesión de los nervios periféricos y médula espinal (parálisis de una ó más extremidades, cambios en los reflejos osteo - tendinosos y por último los que implican graves complicaciones cerebrales (letargia, confusión, excitación y hasta coma y muerte).

Sobre 11 casos reportados por Rohmer en Francia (50), - se observaron 8 meningoencefalitis y tres de parálisis periférica con un caso grave de parálisis del tronco y las extremidades.

Pampuns (42), resume las principales formas clínicas como sigue:

- Parálisis de tipo Landry (siendo una polineuritis ascendente o una mielitis ascendente).
- Mielitis (generalmente la forma dorso - lumbar)
- Mono o polineuritis.
- Meningo encefalitis.

Existe evidencia de que estas diferentes formas de reacciones hiperérgicas son esencialmente encéfalo, mielo o radiculopatías.

La mortalidad asociada a las reacciones adversas a nivel del S.N.C., es sumamente alta y no menor del 20% en las de tipo polineuroradiculopatías.

Sobre 46 casos informados por Appel (2), el Departamento de Salud de la ciudad de New York desde 1928 la incidencia de encefalo - mielitis fue de 1: 2025 personas tratadas; la incidencia fue cinco veces más alta en aquellos que recibieron 14 inyecciones que entre quienes recibieron 7 ó menos.

2.3.3. Reacciones a la vacuna de ratón lactante (CRL).

La preparación de vacuna de ratón lactante contiene únicamente 1% de tejido cerebral y la cantidad total que recibe un paciente en un esquema completo post - exposición, es solamente de 0.3 grs. comparado con 1.4 grs., según Abdussalam (1), en la vacuna Semple y Fermi.

Se han registrado en 8 países americanos entre 1964 y 1969 treinta y dos casos de reacciones neuoparalíticas, siete

a nivel del S.N.C. y el resto del sistema nervioso periférico. Una gran parte de los accidentes que siguieron a la vacunación fueron identificados por Held y López - Adaros (20), como síndrome de Guillain - Barré, los días transcurridos entre la inyección de la primera dosis de vacuna y el comienzo de los síntomas varió entre 4 y 25 días. Después de la administración de 50.000 tratamiento de 14 dosis, se produjo un caso fatal post - vacunal caracterizado por parálisis progresiva y se comprobó desmielinización, particularmente a nivel de la médula cervical o dorsal, Rangel (48).

En Latinoamérica se han vacunado con vacuna de cerebro de ratón lactante (CRL) aproximadamente unos dos millones de personas entre 1960 y 1969 y se han informado un centenar de complicaciones, la mayor parte de la forma polirradiculopatía tipo Guillain - Barré, Rangel (48).

En Colombia se han informado varios casos de complicaciones neuromusculares desde 1964, especialmente desde 1967 cuando se empezó a usar vacuna tipo Fuenzalida para humanos. En 1970, Toro, Cadena y Rey (58), consignan los datos de cuatro casos fatales de reacciones post - vacunales, observando formas encefalopáticas, mielopáticas y neuropáticas (crónicas y

y agudas) cifra que hasta la fecha practicamente se ha triplicado llegando a 11 casos fatales de un grupo de 18 pacientes muy graves estudiados en Bogotá por Toro y Vergara (59).

2.3.3. Reacciones a la vacuna de embrión de pato.

Desde la introducción de esta vacuna en 1958 las complicaciones neurológicas han sido muy raras; las reacciones comunes incluyen sensibilidad, eritema, induración local, Robbins (51). Se han presentado reacciones anafilácticas en personas con hipersensibilidad a las proteínas del huevo. También se han informado casos de mielopatías con este tipo de vacuna, Mozar (39).

2.4. NATURALEZA DE LAS REACCIONES POST - VACUNALES.

La encefalitis autoinmune del hombre fue descrita primeramente como consecuencia de inmunización antirrábica con vacuna Pasteur preparada en médula espinal de conejo. Estas observaciones motivaron estudios experimentales inoculando tejido cerebral con adyuvante completo de Freund, reproduciendo la enfermedad en animales de experimentación; Paterson (40), en estudios en ratas demostró que esta enfermedad se podía transferir mediante linfocitos pero no logró repro

ducirla por acción del suero. Estudios inmunológicos recientes realizados por Mozar (39), demostraron que se han encontrado pacientes con mielopatías post - vacunales con marcada estimulación de linfocitos por la proteína cerebral con producción de citotoxinas y factor inhibidor de macrófagos, lo cual indica hipersensibilidad de tipo demorado.

Si bien se ha puesto de manifiesto la presencia de anticuerpos citotóxicos anticerebrales, su papel no es claro, igual sucede con anticuerpos fijadores de complemento, aunque presumiblemente pueden estar involucrados en el daño tisular.

Según Poser (47) y de acuerdo con Toro (59) los cambios histopatológicos consecutivos a la reacción hipérgica despertada por la vacuna antirrábica converge esencialmente alrededor de la lesión de la unidad vaso - mielina. Consisten esas alteraciones en edema, mielinoclasia, infiltrado celular inflamatorio de franco predominio perivascular a base de linfocitos preferiblemente, en ocasiones con cambios isquémicos y en otros con extravasación de eritrocitos al espacio perivascular en un caso dado pueden existir varias o todas estas alteraciones en el mismo paciente.

Weiner (64), describe que el antígeno responsable de esta reacción de hipersensibilidad es la mielina, y más específicamente la proteína básica de la mielina que corresponde al 30% de su parte protéica

total. La proteína básica de la mielina se halla ampliamente distribuida en varias especies, siendo además un antígeno órgano - específico, y cuando se inocular con adyuvante de Freund en animales de experimentación reproduce la enfermedad desmielinizante conocida como encefalomiелitis alérgica experimental (EAE).

Se han sugerido factores predisponentes a la aparición de complicaciones neurológicas a la vacuna antirrábica. López (34) menciona la fatiga física, mental y exceso alcohólico dentro de tales factores; Lepine (32), refiere que ocurren estas reacciones en poblaciones super alimentadas, siendo casi desconocidas en la India.

2.5.PATOGENESIS

.5.1. Vía de infección y diseminación del virus

La infección rábica en el hombre y los animales usualmente ocurre a través de una herida en la piel causada por mordedura producida por animal rabioso; Kinkler (27), estudió la posibilidad de transmisión por aerosoles, pero esta forma de diseminación ha sido observada en la naturaleza sólo en una cueva (Cueva Frio de Texas) habitada por una gran cantidad de murciélagos rabiosos. Hasta el momento, no hay evidencia de que el virus rábico pueda ser infeccioso por ingestión, Cambell (9).

Desde el sitio de la inoculación el virus se propaga en forma centripeta utilizando los nervios periféricos como fue demostrado en forma concluyente por Dean (11). Hay evidencia de que ni las estructuras perineurales ni las células de Schwan están involucradas en la migración centripeta del virus, más probablemente asciende pasivamente a través de los espacios perineurales; Johnson (23), describió en humanos la presencia de virus rábico en células de ganglio de Gasser y dentro de los axones. El neurotropismo ha sido demostrado también experimentalmente por microscopía electrónica en ratones inoculados en virus rábico, García (16). La presencia del virus en el axoplasma contribuye a clarificar su propagación por raíces nerviosas. Aunque hay amplia evidencia de que el virus rábico no es transmitido por vía sanguínea, Cambell (9), existen informes de casos de viremia como consecuencia de infección rábica experimental.

Johnson (23), describe que la microscopía fluorescente ha revelado que el virus después de penetrar en el sistema nervioso, se multiplica casi exclusivamente en las neuronas. El virus es selectivo con respecto a su capacidad de multiplicarse en distintas neuronas, no se sabe por qué solo ciertos grupos morfológicos definidos de células nerviosas son susceptibles a la infección rábica mientras que otras no. La maduración del virus

rábico en las membranas del retículo endoplásmico de células de Purkinje en humanos y similares hallazgos en animales, García (16) sugiere la posibilidad de que el virus se transporta por los vasos sanguíneos y linfáticos al sistema retículo endotelial.

2.6. RESPUESTA DEL HUESPED.

.6.1. Defensa humoral

El mecanismo de defensa humoral dependiente de los anticuerpos y el complemento, juega probablemente un papel fundamental en la inmunización antirrábica. Hasta que Koprowski (28) informó los resultados que había logrado con el efecto preventivo de suero antirrábico administrada pasivamente durante las primeras 72 horas después de la infección experimental en cobayos el papel de los anticuerpos humorales en el mecanismo de la inmunidad contra la rabia era casi ignorado. Desde entonces han aparecido numerosos trabajos probando la importancia de los anticuerpos específicos en la infección del hombre y los animales, Johnson (23).

Wiktor en 1968 (65), puso de manifiesto, mediante prueba de anticuerpos fluorescentes, la presencia de anticuerpos citolíticos

los cuales coloreaban la superficie de las células infectadas con el virus rábico, y en presencia del complemento se observó una coloración intracitoplasmática indicando la penetración de los anticuerpos a través de la membrana celular. Tanto los anticuerpos citolíticos como los neutralizantes se han encontrado en fracción 7 S de las inmunoglobulinas. En el hombre y en los animales infectados con el virus de la calle, e inoculados con vacuna antirrábica, Johnson (23) encontró en el suero anticuerpos neutralizantes, líticos e inhibidores de la hemaglutinación.

.6.2. Defensa celular

La inmunidad celular es una de las respuestas mayores del huésped en varias infecciones virales, Bellanti (7); sin embargo, su contribución a la protección dada por la vacuna antirrábica ha recibido poca atención. Turner (62), en estudios comparativos entra la vacuna antirrábica y la vacuna anti - variolosa, administradas a ratones, encontró que los linfocitos de ratones inmunizados contra la rabia, no contribuyen a la protección en la forma como ocurre en la viruela; sugiere que la efectividad de la vacuna antirrábica está relacionada únicamente con anticuerpos humorales.

.6.3. Interferón

La profilaxis antirrábica con vacuna sugiere que la elaboración de

Un adecuado anticuerpo humoral, es un importante mecanismo protector, pero también indica que otras respuestas pueden estar actuando. El virus rábico induce y es susceptible al interferón. La resistencia a la infección mediada por interferón, ha sido inducida en cultivo de células; Fernández y Koprowski (12), Stewart y Sulkin según referencia de Matsumoto (36), utilizando un sistema *in vitro*, aislaron interferón inducido en hamster inoculados intramuscularmente con grandes dosis de CVS, ellos encontraron en el cerebro la mayor cantidad de interferón; Wiktor (67), estudió la producción de interferón con vacuna antirrábica viva e inactivada preparada en cultivo celular, y encontró que la administración de estas vacunas en un período relativamente corto antes o después de la infección con virus de la calle protegía a la mayoría de los hamster contra la muerte. Todas ellas estimularon la síntesis de interferón circulante, pero la vacuna a virus vivo produjo mayor cantidad de interferón que la inactivada; Janis y Habel (22), estudiaron este estímulo en la producción de interferón mediante la inoculación intramuscular del ácido poliribonucleico - poliribocitidílico (Poli I.C.) en conejos y ratones infectados experimentalmente con virus rábico de la calle, estos animales fueron protegidos hasta por 67 horas; la vía intramuscular de administración resultó más efectiva en la producción de interferón que la vía intraperitoneal.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. MATERIALES

.1.1. Vacuna antirrábica

Para todas las inmunizaciones del presente trabajo se utilizó la vacuna antirrábica producida en Colombia por el INPES que corresponde a una dilución al 1% de cerebro de ratón lactante infectado con virus rábico e inactivada con luz ultravioleta según técnica de Fuenzalida y Palacios (13). El valor antigénico de la vacuna de acuerdo con la prueba de potencia NIH fue de 2.4, se usó únicamente el lote 68 de vacuna y fue mantenido a 4°C por el tiempo que duró el estudio.

.1.2. Virus Rábico

Para las pruebas de neutralización se utilizó la cepa de virus fijo, virus Standard de Confrontación (CVS), suministrado por el laboratorio de producción por la OMS, consiste en una suspensión al 20% de cerebro de ratón en agua destilada más 2% de suero equino inactivado. Suministrada en ampollas de 0.5 ml. del producto liofilizado o congelado.

.1.3. Suero immune.

Para la prueba de seroneutralización se utilizó suero control positivo; en el presente trabajo se usó suero equino antirrábico concentrado con una potencia de 100 U.I. Este suero immune ha sido previamente comparado y estandarizado con un suero de referencia. Se conservó a 4°C.

.1.4. Suero normal.

El suero control negativo para seroneutralización fue suero normal bovino inactivado a 56°C por 30 minutos, este suero demostró ausencia de anticuerpos antirrábicos en pruebas previas de seroneutralización en ratón contra 7 DL50/0.03 ml. Para su conservación se almacenó a -20°C en volúmenes de 2 ml.

.1.5. Equipo para electroforesis.

Para el estudio de las diferentes proteínas del suero de los conejos sometidos a inmunización, se utilizó un equipo de electroforesis Beckman - Microzona. Este sistema comprende los siguientes elementos :

- .5.1 Celda de electroforesis para Microzone modelo R - 101
 - .5.2 Densitómetro para Microzone modelo R - 110
 - .5.3 Fuente de energía para Microzone Duostat modelo RD-2
 - .5.4 Conjunto de accesorios para Microzone.
-
- .1.6 Reactivos de uso corriente.

Tanto para la prueba de seroneutralización, como para electroforesis y determinación de proteínas se prepararon y usaron los siguientes reactivos :

.6.1. Solución buffer fosfato.

Esta compuesta por : 11.2 gms de Na_2HPO_4 ; 5.5 gms de KH_2PO_4 ; 8.2 de NaCl más 7.5 de albúmina bovina en 1.000 ml. de agua destilada y un pH final de 7.2. Además por cada ml. se adicionó 200 unidades de penicilina y 400 microgramos de estreptomina. Este buffer se almacenó en volúmenes de 5 ml. a temperatura de $- 20^\circ\text{C}$.

- .6.2 Solución buffer barbital pH 8.6 y fuerza iónica de 0.075.
Disolver el contenido de una papeleta de buffer Beckman B - 2 en 1.000 ml de agua destilada caliente.

.6.3. Disolver 30 ml. de Fixative - Dye Beckman en 250 ml. de agua destilada. Este colorante está compuesto de 3.0 gms% de ácido tricloroacético; 3.0 gms% de ácido sulfo - salicílico; 0.3 gms% de Ponceau - S en 100 ml. de agua destilada.

.6.4. Solución lavadora para electroforesis.

Esta solución está compuesta por una proporción de 5% en volumen de ácido acético concentrado en agua destilada.

.6.5. Solución aclarante.

Es una solución de ciclohexanona purificada al 30% en alcohol etílico absoluto.

.6.6. Solución salina fisiológica.

Para esta solución se pesan 8.5 gms de NaCl y se disuelven en 1.000 ml. de agua destilada.

.6.7. Reactivo de Biuret.

En un balón aforado de 1.000 ml. se colocan : 1.5 gms de sulfato de cobre finamente pulverizado; 6.0 gms de tartrato de sodio y potasio. Añadir suficiente agua destilada para disolver. Añadir lentamente y con agitación del balón 300 ml. de so

lución de hidróxido de sodio 2.5 normal. Agregar 1 gm de yoduro de potasio y agitar hasta disolver. Este reactivo para su conservación se mantuvo en frasco de vidrio color ambar a 4°C de temperatura.

.3.7. Animales de experimentación.

.7.1. Conejos.

Los animales empleados para la inmunización con vacuna antirrábica fueron conejos de raza Nueva Zelanda blancos de 15 a 17 semanas de edad, animales adultos de un peso promedio de 2.kg. Estos animales fueron suministrados por el bioterio del LIMV.

.7.2. Ratones.

Para la prueba de seroneutralización y para obtener suficiente virus de trabajo, se utilizaron ratones blancos cepa Charles - River de 21 a 25 días de edad y un peso promedio de 14 a 16 gms. Estos ratones fueron suministrados por los bioterios del LIMV y del INPES.

3.2. DISEÑO EXPERIMENTAL.

.2.1. Manejo de animales de experimentación.

Para estudiar la respuesta inmunológica inducida por la vacuna antirrábica administrada por vía intradérmica, se diseñaron cuatro esquemas diferentes de inmunización, empleando 8 conejos para cada grupo, designados como Grupos A.B.C.y D. Estos conejos se marcaron con láminas metálicas en las orejas identificándolos por un número y manteniéndolos en jaulas individuales, marcadas con el mismo número de la placa de la oreja. Estos animales fueron mantenidos por espacio no menor de 30 (treinta) días, al término de este tiempo, por no disponerse de suficiente número de jaulas con capacidad para cuatro conejos, y allí permanecieron hasta los 80 (ochenta) días, plazo límite para finalizar el experimento.

Teniendo en cuenta las limitaciones del bioterio para el suministro de conejos y de jaulas, y además, por facilidad en el proceso de inmunización y sangría se trabajó por grupos, cada 30 días se inició un nuevo esquema de inmunización con un nuevo grupo diferente de conejos hasta completar el total de cuatro.

Estos animales durante el tiempo de estudio fueron mantenidos en óptimas condiciones.

.2.2. Período de sangría.

Antes de iniciar la vacunación, a cada grupo de conejos se tomó muestra de sangre, la cual se recolectó y almacenó en forma individual, esta muestra además de la marca correspondiente al número de cada animal se la designó con el número 0 (cero), esta recolección se hizo con el propósito de determinar ausencia de anticuerpos antirrábicos, dado que el experimento estaba encaminado a su determinación después de la administración de vacuna; se determinó además proteinemia total y se estudiaron las proteínas del suero por electroforesis. Se tomaron nuevas muestras de sangre a partir del primer día de iniciada la vacunación, las cuales se marcaron y almacenaron individualmente seguidas por el número 1 - 2 - 3 - 4 - 5 - 6 - 7 y 8, que en su orden corresponden a los días : 4 - 7 - 11 - 14 - 18 - 27 - 47 y 80 como puede verse en la Tabla No. 1. El objetivo de este muestreo fue el determinar el curso de formación de anticuerpos neutralizantes en los diferentes esquemas de inoculación.

TABLA No. 1 MUESTRAS DE SANGRE TOMADAS EN DIFERENTES PERIODOS A CONEJOS DE GRUPOS A,B,C y D, INMUNIZADOS CON VACUNA ANTIRRABICA FUEN ZALIDA - PALACIOS, BOGOTA 1.973

DIAS DE SAN - GRIA.	ESQUEMA DE INMUNIZACION			
	A	B	C	D
0	-	-	-	-
4	-	-	-	-
8	-	-	-	-
11	-	-	-	-
15	-	-	-	-
18	-	-	-	-
27	-	-	-	-
47	-	-	-	-
80	-	-	-	-

.2.3. Recolección del suero.

Las muestras de sangre se tomaron de las venas de la oreja del conejo. Después de depilar la región de la vena central, se desinfectaba con buena cantidad de alcohol, se pasaba por la piel una torunda de algodón impregnada con xilol, lo cual produce vasodilatación inmediata; se punsionaba la vena con aguja No.19 y la sangre se recolectaba en tubos estériles sin anticoagulantes. En caso de falla en esta punción se procedía a hacer una incisión delicada con bisturí estéril en la vena marginal, siguiendo el mismo procedimiento que en el caso de la vena central. Se recolectaba por este sistema de 10 a 12 ml. de sangre en cada toma identificándola convenientemente. La muestra se mantenía a temperatura ambiente por espacio de 4 horas y luego a 4°C toda la noche.

Después de la retracción total del coágulo, el suero obtenido por centrifugación a 5.000 r.p.m. durante 10 minutos, se envasó en forma aseptica en volúmenes de 1 ml. en tubos estériles debidamente rotulados. Esta separación se hizo con el fin de trabajar siempre una alícuota de la muestra evitando

así la congelación y descongelación de la muestra total. Estos sueros se conservaron a $- 20^{\circ}\text{C}$.

.2.4. Esquemas de inmunización.

Este estudio se llevó a cabo con un total de 32 conejos, agrupados en cuatro lotes de 8 conejos cada uno y designados como Grupo A, Grupo B, Grupo C y Grupo D, e inmunizados con diferentes series de inoculaciones de vacuna antirrábica y por diferentes rutas así :

.4.1. Grupo A.

Este grupo fue inoculado con 14 dosis diarias de 1 ml de vacuna antirrábica por vía subcutánea más dos refuerzos a los 10 y 20 días después de la última inoculación de la serie. Este grupo sirvió de control por el hecho de que tanto el número de dosis como la ruta de inoculación corresponden al esquema de inmunización post - exposición recomendado hasta hace poco por la OMS.

La administración de vacuna por esta vía se realizó de la siguiente manera : en diferentes áreas de la piel del dorso del animal debidamente depiladas y desinfectadas con alcohol, se inyectó por debajo de la piel, dosis diarias de 1 ml de vacuna antirrábica con jeringa de 2ml. y aguja calibre 24, durante 14 días, seguidos de dos refuerzos a los 10 y 20 días después de la última inoculación de la serie.

.4.2. Grupo B.

Este grupo fue inoculado con una dosis única de 0.2 ml. de vacuna antirrábica por vía intradérmica.

La administración intradérmica se hizo de la siguiente manera :
En diferentes lugares de la piel depilada y desinfectada con alcohol, haciendo un pliegue con la piel del animal, entre los dedos pulgar e índice de la mano izquierda para presentar soporte a este tipo de inoculación con jeringa de vidrio de 0.25 ml. de volumen y aguja calibre 27 corta, levantando la epidermis con la punta de aguja e introduciendo suavemente, se inoculó dosis de 0.2 ml. de vacuna formándose como consecuencia de esta inyección una pápula de aproximadamente 0.7 mm de diámetro. Esta misma técnica se utilizó con los grupos C y D.

.4.3. Grupo C.

Este grupo fue inoculado por vía intradérmica aplicada cada 48 horas con tres dosis de 0.2 ml. cada una más dos refuerzos de igual cantidad y por la misma ruta 10 y 20 días después de la última inoculación.

.4.4. Grupo D.

Este grupo fue inoculado con tres dosis de 0.2 ml. de vacuna antirrábica vía intradérmica aplicada cada 96 horas más dos refuerzos a los 30 y 60 días después de finalizada la serie, por la misma ruta. Ver Tabla No.2.

3.3. METODOS

3.3.1. Seroneutralización.

La prueba de seroneutralización consiste en enfrentar una cantidad constante de virus previamente titulado, con diferentes diluciones de suero. Fue seleccionada para determinar los anticuerpos neutralizantes, la técnica descrita por Atanasiu (3), que se realiza de la siguiente manera:

.1.1. Preparación del antígeno:

Para la preparación de suficiente cantidad de antígeno necesario en las pruebas de seroneutralización durante todo el experimento, se procedió de la siguiente forma: El contenido de la ampolla del virus CVS proporcionado por el INPES fue reconstituido en iguales cantidades con PBS, de esta preparación se hicieron diluciones logarítmicas en base 10 hasta 10^{-3} de esta dilución se inocularon 40 (cuarenta) ratones de 21 días de edad con 0.03 ml. vía intracerebral. Estos animales se colocaron 10 por caja y se aislaron. Se observaron diariamente y se recogieron y congelaron los cerebros de aquellos que presentaban parálisis después de 6 días de inoculación. Se pesaron las pulpas y se pulverizaron en un mortero de porcelana y el triturado se suspendió en PBS en proporción de una parte (gramos de peso) de material cerebral por cua-

TABLA No.2. CRONOGRAMA DE INMUNIZACION A GRUPOS DE CONEJOS, CON DIFERENTES ESQUEMAS; SEGUN VIA DE INOCULACION Y CANTIDAD DE VACUNA ANTIRRABICA TIPO FUENZALIDA - PALACIOS. BOGOTA 1.973.

DIAS DE INOCULACION.	ESQUEMA DE INMUNIZACION				
	GRUPOS	A	B	C	D
	CANTIDAD	1.0 ml.	0.2 ml.	0.2 ml.	0.2 ml.
	VIA	SC	ID	ID	ID
1	-	-	-	-	
2	-	-	-	-	
3	-	-	-	-	
4	-	-	-	-	
5	-	-	-	-	
6	-	-	-	-	
7	-	-	-	-	
8	-	-	-	-	
9	-	-	-	-	
10	-	-	-	-	
11	-	-	-	-	
12	-	-	-	-	
13	-	-	-	-	
14	-	-	-	-	
19	-	-	-	-	
24	-	-	-	-	
29	-	-	-	-	
34	-	-	-	-	
39	-	-	-	-	
69	-	-	-	-	
Total de vacuna		16.0 ml.	0.2 ml.	1.4 ml.	1.0 ml.

tro partes (volumen en ml.) de diluyente, quedando una suspensión al 20%. Sin tamizar ni centrifugar, se distribuyeron en frasquitos en volumen de 0.5 ml. y se almacenaron a -70°C . Las pruebas de esterilidad se realizaron sembrando en agar - sangre, agar - nutritivo, caldo nutritivo y medio de tioglicolato, e incubando estos cultivos a 37°C , y examinándolos a las 24 - 48 y 72 horas con excepción del tioglicolato que se observó hasta por 12 días.

.1.2. Titulación del antígeno.

Antes de usar este antígeno como virus de trabajo se determinó su título. Para esto se hicieron diluciones logarítmicas en base 10 del virus de 2×10^{-2} a 2×10^{-8} usando como diluyentes PBS. En una serie de tubos de hemólisis se colocaron 0.5 ml. de cada dilución y se agregó igual cantidad de suero bovino con el fin de quitar el factor 2 a las diluciones, obteniéndose entonces el virus diluido así : 10^{-2} , 10^{-3} 10^{-4} , etc. Se incubó esta mezcla a 37°C por 90 minutos y luego se inocularon con 0.03 ml. por vía intracerebral cinco (5) ratones por cada dilución. Los ratones se observaron diariamente anotando su estado en una planilla apropiada. Se registró el número de ratones muertos comprendidos entre los días 6 y 15. Los ratones muertos en las primeras 24 horas no se tuvieron en cuenta para el cálculo de l DL50 por cuanto se consideró su muerte debida a la técnica de inoculación. El título del virus se calculó por el método de Reed y Muench (49).

.1.3. Seroneutralización.

Todos los sueros de conejos obtenidos en el presente estudio, un total de 288 muestras, se procesaron para determinar anticuerpos neutralizantes en forma cualitativa, es decir, el suero sin diluir. Se consideraron positivas todas aquellas muestras que inoculadas dieron protección a tres (3) o más de los cinco (5) ratones que se utilizaron por muestra. Para la prueba cuantitativa se seleccionaron únicamente los sueros que correspondían a las muestras tomadas en el día 11 por el hecho de que en tres de los cuatro esquemas de inmunización estudiados, la presencia de anticuerpos no se detectó antes de ese día; a los 18 días pensando en la concentración de anticuerpos en el caso de un período de incubación corto de la enfermedad; a los 47 días por tratarse de una etapa intermedia en el experimento y a los 80 días por ser la fecha límite del estudio, el suero para estas pruebas se inactivó a 56°C por 30 minutos. La seroneutralización cuantitativa se realizó con diluciones seriadas en PBS al 1:5, 1:10, 1:20 y 1:80. De cada una de estas diluciones se transfirió a tubos de serología 0.3 ml. y se agregó 0.3 ml. de la dilución del virus a la cual se ha calculado 100 DL50 por 0.03 ml. Esta prueba lleva un control positivo formado por sueros equino hiperimmune y otro negativo de suero normal bovino, de cada uno de ellos se transfirió 0.3 ml. a tubos de serología y se agregó igual cantidad de la dilución del virus empleada para los sueros problema.

Después de un período de incubación en baño de agua a 37°C por 90 minutos, se inoculó por vía intracerebral con 0.03 ml. a ratones de 21 días, cinco (5) ratones por cada dilución con jeringa de 0.25 ml. y aguja corta calibre 26. Los diferentes grupos de ratones se colocaron en cajas metálicas cuidadosamente rotuladas y se aislaron. Los ratones se observaron diariamente anotándose el número de muertos comprendidos entre los días 6 y 16 después de la inoculación. Los títulos del suero se determinaron por el método de Reed y Muench(49).

.1.4. Título del virus control.

Al mismo tiempo que se adelantaba la prueba de seroneutralización, se tituló el antígeno empleado en dicha prueba; para lo cual se hicieron diluciones seriadas logarítmicas en base 10 del antígeno, se pasó 0.3 ml. de cada dilución a una serie de tubos y se agregó igual cantidad de suero normal bovino inactivado. Esta titulación se hizo con el propósito de controlar el virus que se está empleando y determinar así exactamente las DL50 empleadas. Los pasos siguientes se hicieron igual que para la titulación del antígeno.

3.3.2. Electroforesis.

Paralelo con la prueba de seroneutralización, se hizo un estudio de las proteínas del suero de los conejos en experimentación mediante electroforesis. Se estudiaron todos los sueros recolectados de los Grupos A y B de inmunización, con el propósito de estudiar la fracción gamma globulina, como consecuencia del estímulo antigénico de la vacuna antirrábica y principalmente para conocer el estado nutricional de los animales a lo largo del estudio evitando así incorrectas interpretaciones de la respuesta inmunológica.

Para los estudios electroforéticos de los sueros de los animales en experimentación, se utilizó el sistema Beckman - Microzone, empleando como medio de soporte membrana de acetato de celulosa biológicamente inerte de 130 micras de espesor y poros uniformes de 2 micras de diámetro siguiendo la técnica descrita en el manual de Instrucciones Beckman RM - IM - 3 (37).

Una pequeña gota de suero se deposita sobre papel parafinado, se llena la microcelda con solución buffer barbital pH 8.6 - hasta la marca indicada, se preparan además cinco (5) cubetas de polipropilén con las siguientes soluciones así : 1a.) Solución buffer barbital pH 8.6; 2a) Solución de rojo Ponceau;

3a.) Solución lavadora de ácido acético al 5%; 4a) Etanol absoluto y 5a.) Solución aclarante de ciclohexanona al 30%

Se impregna la membrana en solución buffer, se retira el exceso de solución por absorción con papel filtro, se coloca esta membrana sobre el puente de la celda donde queda muy bien extendida teniendo cuidado de que los extremos de la membrana queden sumergidos entre el buffer sin tocar las paredes de la microcelda.

En estas condiciones se procede a sembrar la muestra de suero lo cual se hace mediante un aplicador mecánico que recoge exactamente la cantidad requerida. Hecho esto se conecta la microcelda a la fuente de energía, accionando el switch selector se escoge el voltaje constante entre 0 - 300 v. En estas condiciones se enciende el Duostat y se lleva a 250v. por 16 minutos.

Enseguida viene el proceso de fijación y coloración de la membrana con rojo - ponceau, lavar ácido acético, luego otro baño de alcohol etílico y por último una solución aclarante de ciclohexana. En este estado se recoge la membrana sobre una lámina de vidrio y se lleva a secar en calor seco por 15 minutos a 100°C de temperatura.

En estas condiciones la membrana queda lista para su lectura en el densitómetro de Microzone. Para hallar el valor numérico del trazo completo; los picos individuales se separan por líneas verticales representan el área que cubija la curva. El trazo completo de la electroforésis representa el 100% y cada curva un porcentaje.

Con los datos de porcentaje y con el valor de la proteína en gramos se calculó la concentración de cada fracción en gramos o en miligramos.

3.3.3. Proteinemia.

La determinación de proteína total se hizo por medio de la técnica colorimétrica de Biuret (5).

4. RESULTADOS

4.1. TITULACION DE ANTIGENO.

El antígeno preparado para este estudio presentó una variación de título de un logaritmo de diferencia, desde un mínimo de 10^{-6} hasta un máximo de 10^{-7} , variación que se considera aceptable en esta cepa de virus rábico según Atanasiu (3). Este tipo de diferencia determinó que la dosis descargada en las diferentes pruebas de seroneutralización fueran de 11 a 500 DL50.

4.2. REACCION A LA VACUNA.

En los diferentes sitios en que se hizo la inoculación subcutánea para el esquema de Inmunización del Grupo A, no se observó reacción local de ninguna clase; mientras que en los lugares donde se procedió a la inoculación intradérmica para los Grupos B.C. y D, se presentó en algunos casos una moderada zona eritematosa medible de 8 a 12 mm. de diámetro, la cual desapareció al cabo de 48 horas. No se observó otro tipo de reacción local o sistémica en ninguno de los casos.

4.3. DETERMINACION DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES.

Para este estudio se determinaron los títulos obtenidos por cada animal a lo largo del experimento en los diferentes períodos de tiempo ya fijados; luego se procedió en cada intervalo, a sacar el promedio aritmético de los títulos obtenidos por los 8 conejos que formaban parte de cada grupo de Inmunización.

El título neutralizante del suero, calculado por el método de Reed y Muench (49), se expresó como el recíproco de la dilución, la cual protegió el 50% de los ratones inoculados. Los sueros probados fueron considerados positivos si el 50% de los ratones eran protegidos a diluciones iguales o mayores de 1: 5 contra 10 a 100DL50 del virus Standard.

Como se puede ver en la tabla No. 3.1, los animales correspondientes al Grupo A, no presentaron evidencia de anticuerpos antitirrábicos en la muestra del suero de prevacunación, igual para los días 4 y 7 después de iniciada la Inmunización. A partir del día 11 se demostró la presencia de anticuerpos circulantes, con títulos que variaban de 28 a 80 y media igual a 50. A los 18 días después de la primera inoculación del título neutralizante de 80 reveló un ascenso en la tasa de anticuerpos; a los 47 días se mantenía el nivel de anticuerpos en 80, con una variación de 40 a 145. A los 80 días después de iniciada la Inmunización, este nivel descendió a 50 con una variación de 30 a 91.

TABLA No. 3.1. TITULO RECIPROCO DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES EN SUERO DE CONEJOS DEL GRUPO A, POR DIAS DE SANGRIA. ESTUDIO EXPERIMENTAL. INMUNIZACION ANTIRRABICA - FUENZALIDA - PALACIOS, VIA SUBCUTANEA. BOGOTA, - 1.973.

IDENTIFICACION.	DIAS DE SANGRIA.								
	0	4	7	11	15	18	* 27	47	80
276	- 2	- 2	- 2	72	+ 2	80	+ 2	124	91
277	- 2	- 2	- 2	80	+ 2	80	+ 2	80	60
281	- 2	- 2	- 2	40	+ 2	80	+ 2	145	58
282	- 2	- 2	- 2	46	+ 2	80	+ 2	80	60
339	- 2	- 2	- 2	40	+ 2	80	+ 2	44	30
340	- 2	- 2	- 2	28	+ 2	80	+ 2	40	44
342	- 2	- 2	- 2	36	+ 2	80	+ 2	80	52
343	- 2	- 2	- 2	54	+ 2	80	+ 2	48	26

* Sin titulación cuantitativa.

La tabla 3.2 permite observar los resultados obtenidos con el Grupo B., en este grupo no se demostraron anticuerpos neutralizantes en las muestras del suero sin diluir correspondientes a los días : 0, 4, 7, 11, 15, 18, 27 y 47 después de iniciada la vacunación. Se tomó en este Grupo, el día 47 como límite de tiempo razonable para determinar la presencia de anticuerpos antirrábicos ocasionados por el estímulo antigénico producido por la dosis recibida.

Los sueros de los conejos correspondientes al Grupo C., no tenían anticuerpos antes de iniciada la vacunación, ni en los días 4 y 7 posteriores a ésta, pero el día 11 presentaron anticuerpos neutralizantes, con títulos que varían entre 10 y 80 y promedio de 27; a los 18 días se nota un aumento de título se mantenía en 50, para descender ligeramente hasta 37 al cabo de 80 días después de iniciada la vacunación, como se puede ver en la tabla No. 3.3.

Igual que en el caso anterior, el Grupo D., no mostró anticuerpos antes de la primera dosis de vacuna, ni a los 4 y 7 días después de ella, a los 11 días se registró un título promedio de 15 con variación entre 10 y 23. En el día 18 se presentó un leve descenso de 15 a 13, el cual se prolongó hasta los 47 días con título de 12 y una variación de 10 a 16; en el día 80, límite del experimento, se observó un aumento considerable a 20, y un rango de 5 a 40 (Ver tabla No. 3.4)

TABLA No. 3.3. TITULO RECIPROCO DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES EN SUERO DE CONEJOS DEL GRUPO C, SEGUN DIAS DE SANGRIA. ESTUDIO EXPERIMENTAL. INMUNIZACION CON VACUNA ANTIRRABICA TIPO FUENZALIDA - PALACIOS VIA INTRADERMICA. BOGOTA, 1973.

IDENTIFICACION.	D I A S D E S A N G R I A.								
	0	4	7	11	* 15	18	* 27	47	80
34	- 2	-2	- 2	13	+ 2	80	+ 2	80	30
48	- 2	-2	- 2	10	+ 2	22	+ 2	35	30
278	- 2	-2	- 2	18	+ 2	18	+ 2	35	14
338	- 2	-2	- 2	14	+ 2	40	+ 2	57	64
341	- 2	-2	- 2	45	+ 2	26	+ 2	30	25
345	- 2	-2	- 2	20	+ 2	80	+ 2	60	80
348	- 2	-2	- 2	17	+ 2	80	+ 2	80	20
384	- 2	-2	- 2	80	+ 2	60	+ 2	30	35

* Sin titulación cuantitativa.

TABLA No. 3.4. TITULO RECIPROCO DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES EN SUERO DE CONEJOS DEL GRUPO D, SEGUN DIAS DE SANGRIA. ESTUDIO EXPERIMENTAL INMUNIZACION CON VACUNA ANTIRRABICA TIPO - FUENZALIDA - PALACIOS, VIA INTRADERMICA. BOGOTA, 1.973

IDENTIFICACION.	D I A S D E S A N G R I A .								
	0	4	7	11	* 15	18	* 27	47	80
1	- 2	- 2	- 2	19	+ 2	10	+ 2	10	13
32	- 2	- 2	- 2	13	+ 2	10	+ 2	12	35
208	- 2	- 2	- 2	13	+ 2	10	+ 2	10	5
210	- 2	- 2	- 2	15	+ 2	20	+ 2	10	10
214	- 2	- 2	- 2	10	+ 2	10	+ 2	11	10
215	- 2	- 2	- 2	10	+ 2	10	+ 2	10	30
217	- 2	- 2	- 2	23	+ 2	26	+ 2	15	40
219	- 2	- 2	- 2	18	+ 2	12	+ 2	16	16

* Sin titulación cuantitativa.

La tabla No.4 resume los resultados del experimento, por grupos de vacunación. Cabe anotar que a partir del día 11 y para los Grupos de Inmunización A, C y D., se registró por primera vez presencia de anticuerpos, además se notó una relación entre la cantidad de vacuna inoculada y el título de anticuerpos así :

4.3.1. Día 11 : El Grupo A., tenía 11 dosis de inoculación correspondiente a 11 ml. de vacuna, todos los animales inoculados respondieron con producción de anticuerpos y un título promedio de 50. El Grupo B., había sido inoculado con una dosis de 0.2 ml. de vacuna y no se presentó respuesta de anticuerpos en ninguno de los miembros de este Grupo; y el Grupo C., tenía inoculado 5 dosis de vacuna correspondientes a un total de 1 ml. y hubo respuesta de anticuerpos en un 100% y un título promedio de 27. El Grupo D., tenía 3 dosis inoculadas correspondientes a 0.6 ml. de vacuna y respondió todo el Grupo con un promedio de 15.

4.3.2. Día 18 : El Grupo A., había completado la serie principal de inoculaciones correspondientes a 14 ml. de vacuna, la respuesta de todos los integrantes del Grupo fue con título promedio de 80. El Grupo B., con la serie completa de 1 dosis continuaba sin respuesta de anticuerpos neutralizantes. El Grupo C., con la serie de 5 dosis correspondientes a 1 ml. presentó respuesta de 100% y promedio de 50. El Grupo D., con 3 inoculaciones correspondientes a 0.6 ml. de vacuna antirrábica, una respuesta total y un promedio de 13.

TABLA No. 4 RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE SERONEUTRALIZACION EN CONEJOS DE LOS GRUPOS A, B, C, D., Y DIFERENTES PERIODOS DE TIEMPO ESTUDIO EXPERIMENTAL. INMUNIZACION CON VACUNA FUENZALIDA - PALACIOS. BOGOTA, 1.973

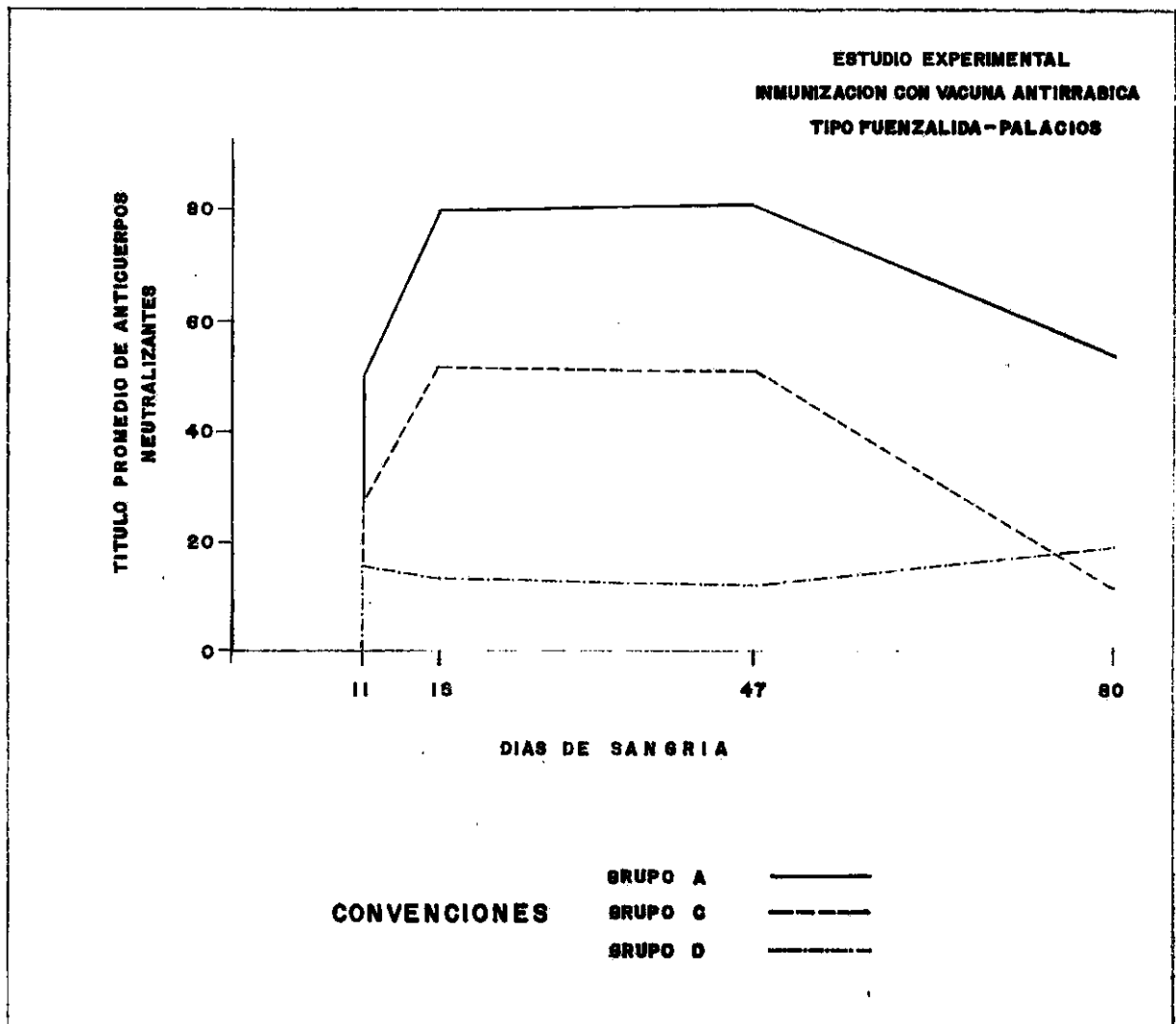
DIAS POST- INOCULAC.	GRUPOS	No. DOSIS	CANTIDAD Ml.	% DE ANIMA LES CON RES PUESTA.	TITULOS RECIPROCOS	
					LIMITES VARIACION.	PROMEDIO
11	A	11	11.0	100.0	28-80	49.50
	B	1	0.2	0	-	-
	C	5	1.0	100.0	10-80	27.13
	D	3	0.6	100.0	10-23	15.13
18	A	14	14.0	100.0	80	80.00
	B	1	0.2	0	-	-
	C	5	1.0	100.0	18-80	50.75
	D	3	0.6	100.0	10-26	13.50
47	A	16	16.0	100.0	40-124	80.13
	B	1	0.2	0	-	-
	C	7	1.4	100.0	30-80	50.88
	D	4	0.8	100.0	10-16	11.75
80	A	16	16.0	100.0	30-91	52.67
	C	7	1.4	100.0	14-80	37.25
	D	5	1.0	100.0	5-40	19.89

4.3.3. Día 47 : El Grupo A., completa ya su esquema de Inmunización de 16 dosis de 1 ml. cada uno correspondientes a 16 ml. de vacuna, respuesta total de 100% y un promedio de títulos de anticuerpos de 80. El Grupo B., con una dosis de 0.2 ml. no produjo respuesta de anticuerpos y fue descartado por considerarse un tiempo suficiente para determinar respuesta serológica. El Grupo C., con el esquema de Inmunización completo de 7 dosis correspondientes a 1.4 ml. de vacuna, una respuesta del 100% y promedio de anticuerpos de 50. El Grupo D., con 4 dosis de inoculación correspondiente a 0.8 ml. un porcentaje del 100% de respuesta y un título de 12.

4.3.4. Día 80 : Límite del experimento; el Grupo A., con el esquema completo de Inmunización correspondiente a 16 ml. un 100% de respuesta y un promedio de anticuerpos de 50. El Grupo C., con el esquema de Inmunización completo correspondiente a 1.4 ml. de vacuna, un porcentaje de respuesta del 100% y título promedio de 37. El Grupo D., ya con su esquema de Inmunización completo de 1 ml. de vacuna una respuesta del 100% y título promedio de 20.

La Gráfica No. 1 muestra el comportamiento de la producción de anticuerpos para los Grupos A. C. y D. Como se puede apreciar en la figura únicamente a partir del día 11, después de la primera inoculación, fue posible detectar títulos de anticuerpos en cada uno de los grupos los cuales persistían aún en el día 80. Para los Grupos A y C., la pro

GRAFICO No. 1 - TITULO PROMEDIO DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES DE LOS GRUPOS A, C y D. SEGUN DIA DE SANGRIA. BOGOTA 1973



ducción media de anticuerpos tiene tendencia similar; del día 11 en que comienza la producción, hasta el día 18 se incrementa bruscamente, del día 18 al 47 el nivel es constante para ambos Grupos y de ahí en adelante hasta el día 80 en que se hizo la última titulación se observa un descenso marcado. Es de anotar que el mayor nivel inicial alcanzado así como la mayor disminución tardía en la producción de anticuerpos corresponde al Grupo A.

El Grupo D., por el contrario, a partir de un ligero ascenso inicial, presente una tendencia constante de producción de anticuerpos hasta los días 47 en que se evidencia nuevamente una discreta tendencia al aumento hasta el día 80.

4.3.5. Análisis Estadístico.

Para el estudio estadístico de los datos obtenidos en el presente trabajo, se adoptó la distribución de "t" (Student) como la más adecuada para medir la significancia de las diferencias encontradas en los grupos experimentales.

Para este análisis se tomaron en consideración los Grupos A, C y D, en los días 11, 18, 47 y 80; se precindió del Grupo B y de los días 4 y 7 por tener una producción de anticuerpos menor de 2, igualmente de los días 15 y 27 por carencia de datos de titulación.

.3.5.1. Comparación estadística de los Grupos A - C.

Para los niveles de anticuerpos alcanzados en los Grupos A y C., las diferencias encontradas no son estadísticamente significativas, con excepción de la prueba realizada el día 18, es decir, que la producción de anticuerpos obtenida en A., con 16 ml. de vacuna antirrábica y vía subcutánea es similar a la obtenida en el Grupo C., con 1.4 ml. y vía intradérmica (Gráfica No.2)

.3.5.2. Comparación de los Grupos A y D.

Estadísticamente las diferencias encontradas en los Grupos A y D son significativas, es decir que si se disminuye la cantidad inoculada por vía intradérmica la respuesta de anticuerpos disminuye realmente. Existe sin embargo en este caso un factor de sesgo que corresponde al esquema diferente de inoculación que fue utilizado en el Grupo D (cada 96 horas) comparativamente con el Grupo C (cada 48 horas) Gráfico No.3

.3.5.3. Comparación de los Grupos C y D.

Las diferencias encontradas en los días 11 y 47 son producidas por el azar mientras que las correspondientes a 18 y 27 días - son estadísticamente significativas; este fenómeno evidencia que las inoculaciones por vía intradérmica producen una mayor respuesta de anticuerpos cuando el tiempo que media entre ellas es menor aunque los niveles iniciales y finales son similares para los dos Grupos (Gráfico No.4).

GRAFICO No. 2 INTERPRETACION ESTADISTICA DE LAS DIFERENCIAS DE PRODUCCION DE ANTICUERPOS DE LOS GRUPOS A y C, EN VALORES DE t , $\alpha = 5\%$

$$Y \nu = 14$$

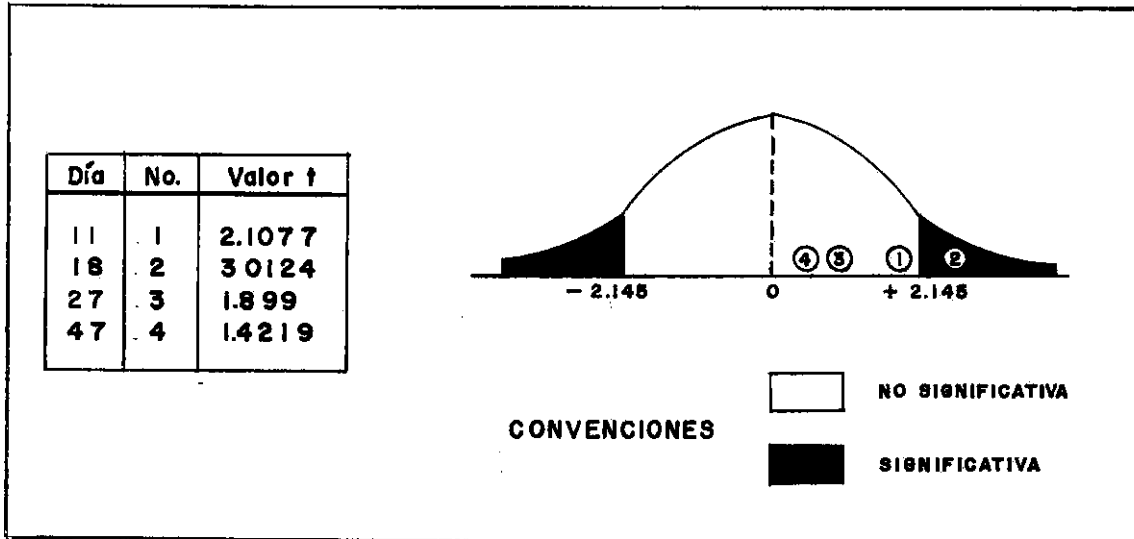


GRAFICO No. 3 INTERPRETACION ESTADISTICA DE LAS DIFERENCIAS DE PRODUCCION DE ANTICUERPOS DE LOS GRUPOS A y D, EN VALORES DE t , $\alpha = 5\%$

$$Y \nu = 14$$

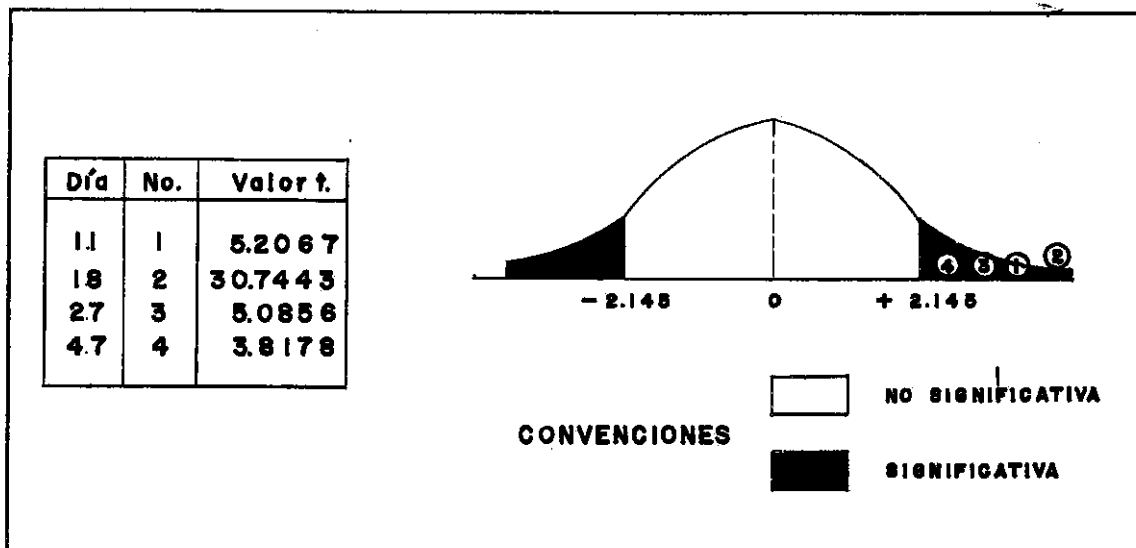
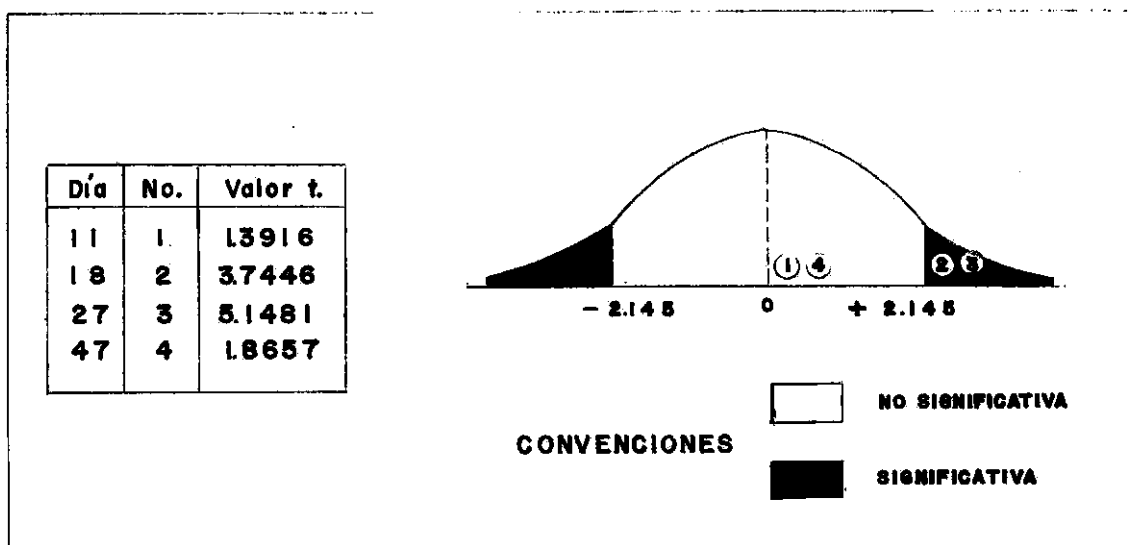


GRAFICO No. 4 - INTERPRETACION ESTADISTICA DE LAS DIFERENCIAS DE PRODUCCION DE ANTICUERPOS DE LOS GRUPOS C y D, EN VALORES DE $t.$, $\alpha = 5\%$ y $\nu = 14$



4.4. Estudio de la Fracción Gamma Globulina del Suero.

La segunda parte de la investigación correspondió al estudio de fracción gamma - globulina del suero de los conejos correspondientes al Grupo A., por haber recibido mayor cantidad de antígeno y producido los más altos niveles de anticuerpos, contra el Grupo B., el cual recibió la mínima cantidad de vacuna (0.2 ml.) y no produjo anticuerpos en el intervalo de 47 días.

Para cada uno de los sueros de los miembros integrantes de los Grupos A y B., se hizo un estudio completo de electroforesis del suero en los días : 0, 4, 7, 11, 15, 18, 27, y 47. Se determinó para cada suero su concentración en gms de albúmina y Globulinas : α , β y δ . Se debe anotar que en el día 7 existen dos muestras que no se pudieron procesar por hemólisis igual caso sucedió en el día 11 en una de las muestras del Grupo A., por lo cual no aparecen los resultados de dichas muestras en la Tabla No. 5 la cual presenta la producción en Gms de la fracción Gamma Globulina para los Grupos A y B., durante los días 0, 4, 7, 11, 15, 18, 27 y 47.

La Gráfica No.5 muestra la tendencia promedio de la producción de Gamma Globulina de los Grupos Inmunizados con los esquemas A y B., en diferentes períodos de tiempo y la Gráfica No.6 representa las rectas de regresión correspondientes a estos resultados.

TABLA No.5 CONCENTRACION EN GRAMOS DE GAMMA GLOBULINA EN LOS CONEJOS DE LOS GRUPOS A y B SEGUN DIA DE SANGRIA. ESTUDIO EXPERIMENTAL INMUNIZACION CON VACUNA ANTIRRABICA TIPO FUENZALIDA-PALACIOS BOGOTA 1.973.

IDENTIFI- CACION.		D I A D E S A N G R I A							
		0	4	7	11	15	18	27	47
GRUPO A.	276	0.45	0.53	0.69	0.40	0.29	0.31	0.37	0.32
	277	0.55	0.58	0.51	0.55	0.92	0.84	0.83	0.95
	281	0.95	0.73	0.96	0.64	0.84	0.92	0.92	0.58
	282	0.53	0.59	0.44	0.53	0.28	0.43	0.37	0.36
	339	0.62	0.47	0.57	0.61	0.48	0.50	0.47	0.45
	340	0.60	0.37	-	0.31	0.45	0.48	0.45	0.51
	342	0.30	0.45	-	-	0.45	0.48	0.45	0.51
	343	0.50	0.56	0.52	0.58	0.53	0.59	0.58	0.47
GRUPO B.	27	0.58	0.54	0.69	0.72	0.88	0.99	0.91	0.90
	37	0.31	0.49	0.68	0.46	0.60	0.57	0.46	0.76
	32	0.56	0.81	0.82	0.37	0.62	0.56	0.59	0.50
	321	0.78	0.31	0.71	0.46	0.52	0.46	0.62	0.62
	329	0.54	0.66	0.45	0.20	0.47	0.56	0.49	0.66
	330	0.78	0.53	0.38	0.67	0.63	0.60	0.53	0.52
	331	0.74	0.50	0.93	0.63	0.67	0.56	0.40	0.58
	332	0.60	0.51	0.85	0.47	0.54	0.37	0.74	0.58

GRAFICO No. 5 - CONCENTRACION MEDIA EN GRAMOS DE GAMMA GLOBULINA EN LOS GRUPOS A y B, SEGUN DIA DE SANGRIA. BOGOTA 1973

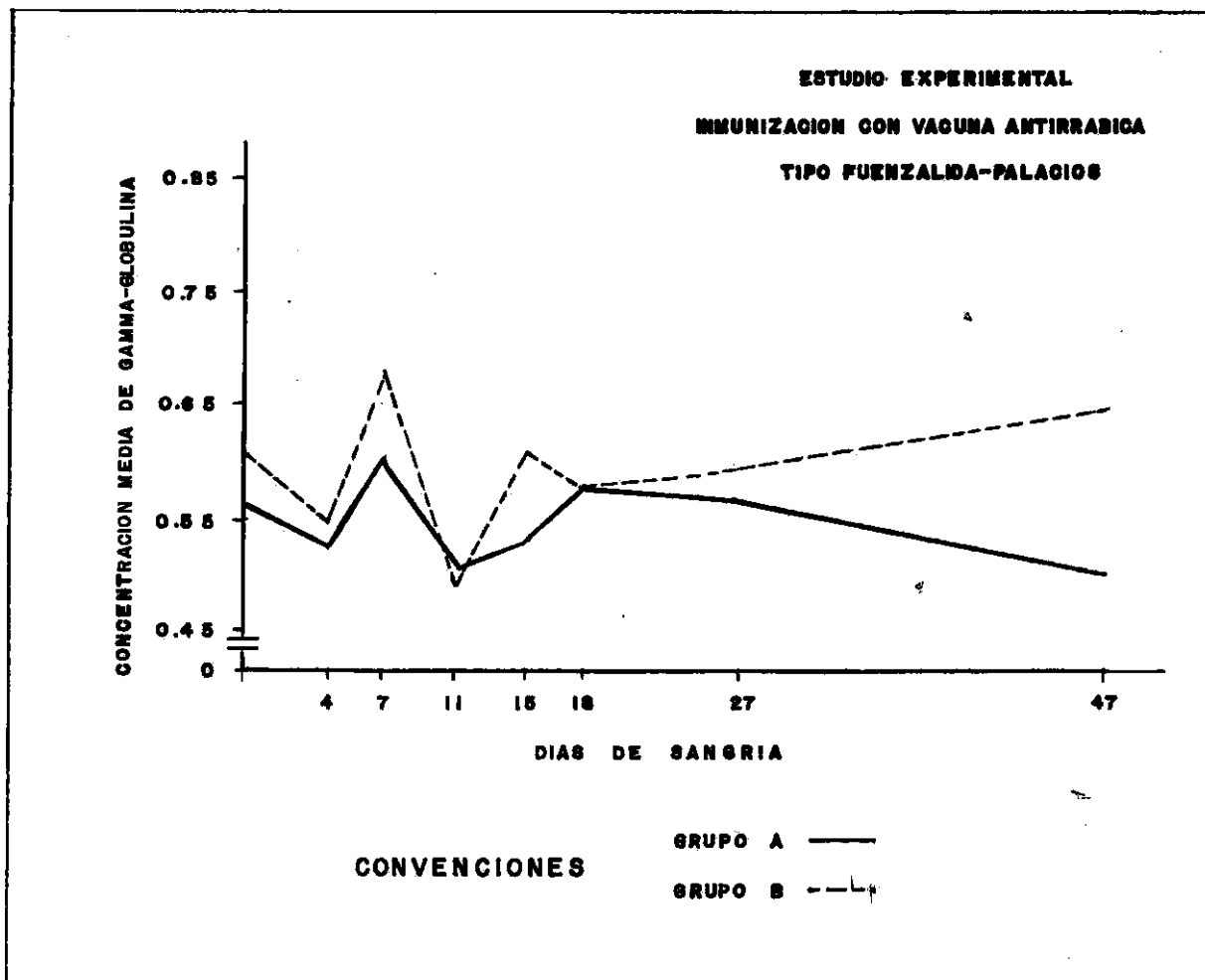
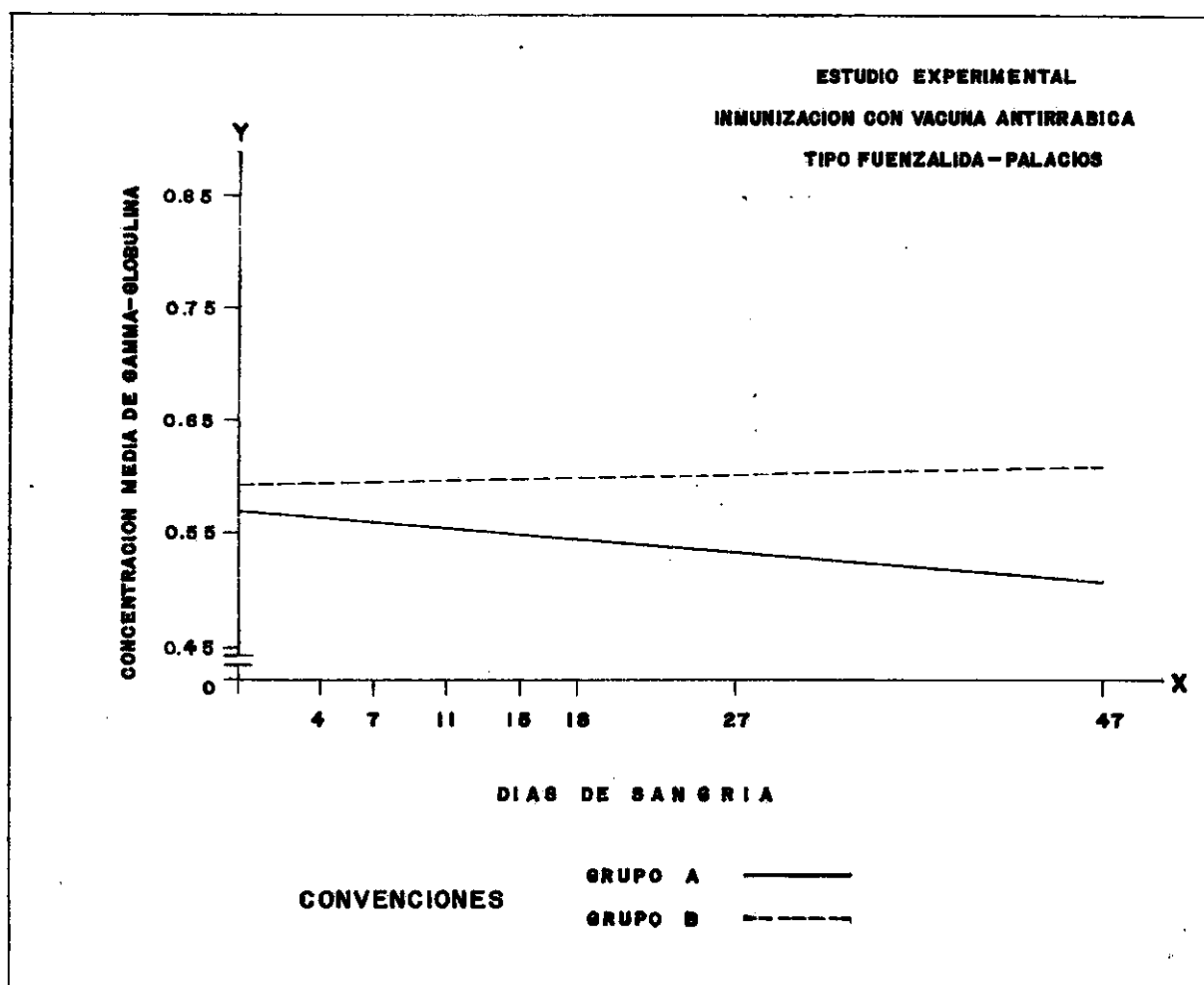


GRAFICO No. 6 - RECTA DE REGRESION CORRESPONDIENTE A LA CONCENTRACION MEDIA DE GAMMA GLOBULINA EN LOS GRUPOS A Y B, SEGUN DIA DE SANGRIA. BOGOTA, 1.973.



4.4.1. Análisis Estadístico.

Las pruebas estadísticas realizadas con los Grupos A y B permiten establecer que no existen diferencias significativas en la concentración de Gamma Globulinserica, para el Grupo A., inoculado subcutaneamente y que produjo los más altos niveles de anticuerpos y el Grupo B., cuya inoculación fue intradérmica y que no evidenció producción de anticuerpos. (Gráficas Nos. 7, 8 y 9).

GRAFICO No. 7 INTERPRETACION ESTADISTICA DE LAS DIFERENCIAS DE PRODUCCION
DE GAMMA GLOBULINA DE LOS GRUPOS A y B, EN VALORES DE t,

$$\alpha = 5\% \quad \text{Y} \quad \nu = 14$$

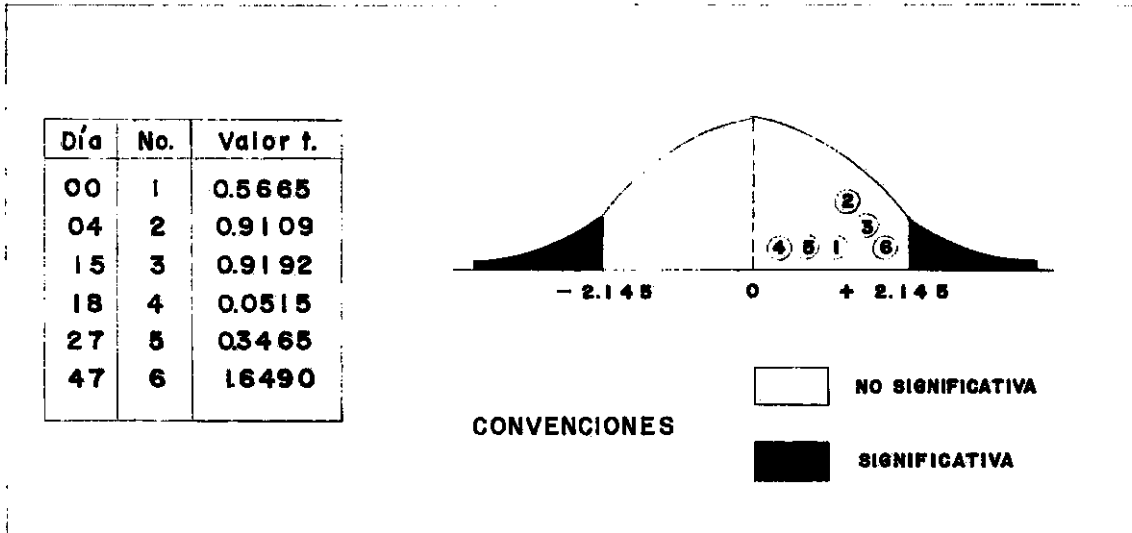


GRAFICO No. 8 INTERPRETACION ESTADISTICA DE LAS DIFERENCIAS DE PRODUCCION
DE GAMMA GLOBULINA DE LOS GRUPOS A Y B, EN VALORES DE t,

$$\alpha = 5\% \quad \text{Y} \quad \nu = 14$$

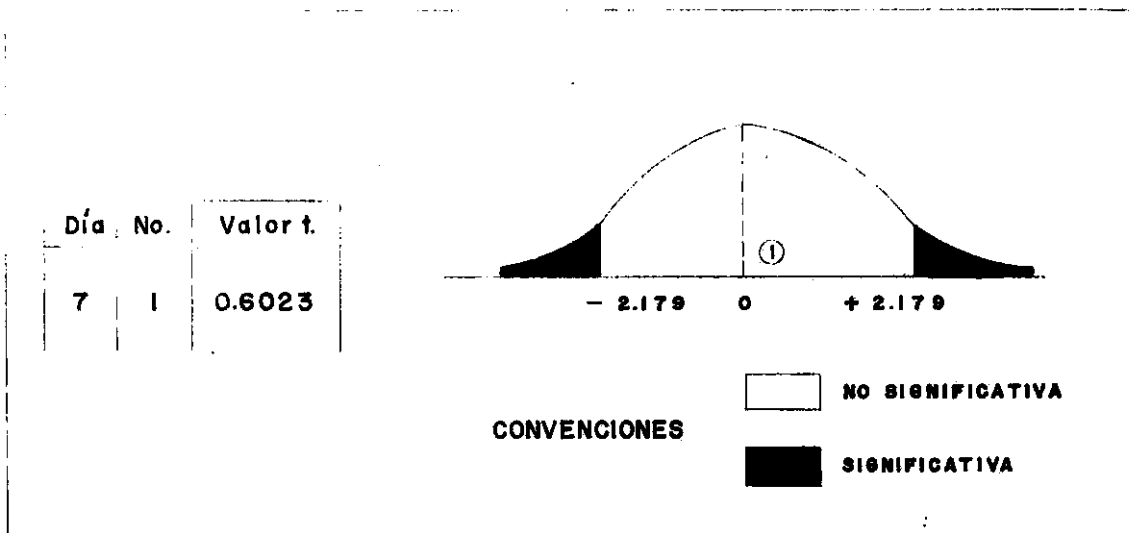
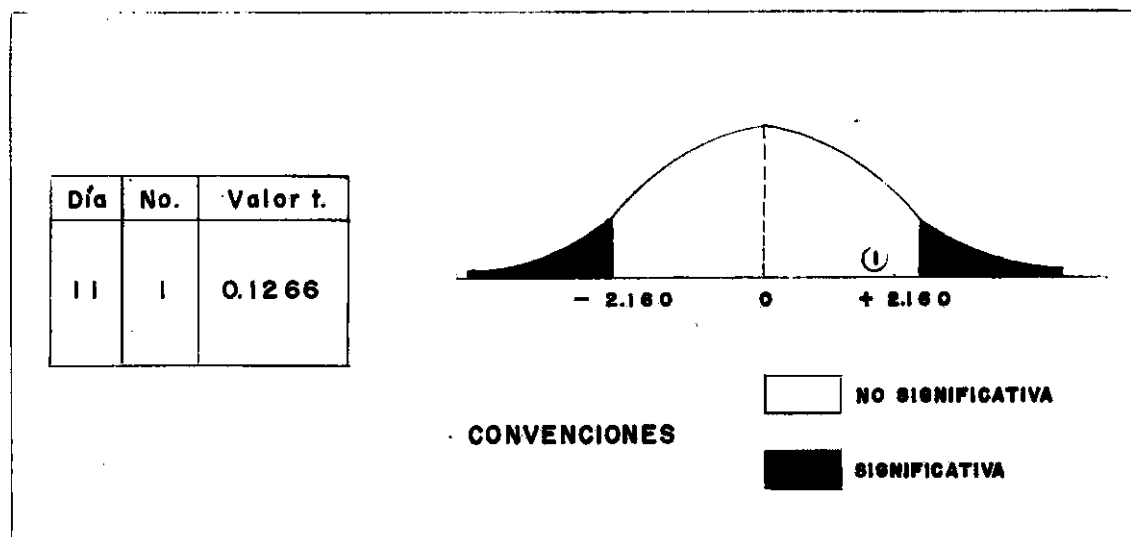


GRAFICO No. 9 INTERPRETACION ESTADISTICA DE LAS DIFERENCIAS DE PRODUCCION
DE GAMMA GLOBULINA DE LOS GRUPOS A Y B, EN VALORES DE t,

$$\alpha = 5\% \text{ Y } \gamma = 13$$



5. DISCUSION

Los datos experimentales concernientes a la eficacia de la vacuna antirrábica en la prevención de esta enfermedad en el hombre después de la exposición y bajo condiciones naturales de campo son muy difíciles de obtener.

En primer lugar es imposible disponer de un grupo control sin tratamiento, en segundo lugar, la incidencia de esta enfermedad es muy baja en muchas áreas geográficas.

Por estas razones, dos tipos de evidencia para determinar la eficacia de una nueva vacuna, son solicitados usualmente, antes de instituir la de uso rutinario en Salud Pública.

5.1. Confiabilidad y alto nivel de protección en animales de experimentación.

5.2. Seguridad y habilidad de producir adecuada respuesta de anticuerpos neutralizantes en humanos.

La vacuna antirrábica tipo Fuenzalida - Palacios, base de este experimento, preparada en cerebro de ratón lactante en una emulsión de tejidos al 1% ha demostrado llenar estos requisitos, según informe de Fuenzalida y Palacios (14).

Estas vacunas parecen ser más inmunógenas que usadas anteriormente y por ellos se han estudiado diferentes esquemas para humanos, reduciendo el total de dosis administradas y utilizando siempre la vía subcutánea como vía de inmunización. Entre los trabajos publicados al respecto podemos mencionar : Held (20), Moreira (38), Godoy (17) y Markus (35).

Puesto que la finalidad de este experimento fue el estudio de la vía intradérmica como ruta de inmunización, con vacuna antirrábica Fuenzalida - Palacios, los resultados se evaluaron por la presencia de anticuerpos neutralizantes del virus rábico en el suero de los conejos, produciendo por estímulo de los esquemas de inmunización experimental comparados con un Grupo cuyo esquema de inmunización correspondía a 14 dosis por vía subcutánea. Se encontró que el momento de aparición de los anticuerpos neutralizantes coincidía con los encontrados, en la mayoría de los procedimientos de vacunación antirrábica, en un término entre 10 y 14 días. Posiblemente a partir de este momento el nivel de anticuerpos neutralizantes ejerce una protección efectiva a lo largo de los nervios periféricos por donde se disemina el virus desde el lugar de la infección hasta el Sistema Nervioso Central.

Uno de los resultados más satisfactorios de este estudio es el hallazgo de que a los 11 días, el 100% de los animales vacunados, correspondientes a los Grupos C y D., respondieron a un mínimo de dosis de vacuna (1 ml. y 0.6 ml respectivamente) administrada en dosis de (0.2 ml.) y por vía intradérmica.

La respuesta de anticuerpos obtenida con una dosis total de 1.4 ml. por vía intradérmica es similar a la que se obtuvo por vía subcutánea y 16 ml. con una seguridad estadística del 95%. Al disminuir la cantidad de dosis hasta 1 ml. (Grupo D), se obtiene una menor respuesta de anticuerpos, siendo las diferencias encontradas con el Grupo A significativas.

La respuesta bastante similar entre los Grupos A y C., indica la necesidad de estudios suplementarios dirigidos a la búsqueda de un esquema con mínima cantidad de vacuna aplicada por vía intradérmica; igualmente la búsqueda de diferentes intervalos entre dosis para valorar el esquema más adecuado de inoculación; como lo sugieren los resultados estadísticos obtenidos con los Grupos C y D.

Los anticuerpos circulantes persisten durante muchos años y su concentración se puede aumentar fácilmente con dosis vacunales de refuerzo según informe de Fox (15). Esto se comprobó en parte en nuestro estudio al observar que hasta el día 80, después de iniciada la vacunación, permanecían apreciables títulos de anticuerpos.

La verdadera importancia de la altura de títulos de anticuerpos neutralizantes es discutible, Koprowski (9), informó que en primates un título de 80 o superior iba acompañado de protección contra una confrontación masiva de 10.000.000 dosis infecciosas de virus para el hombre,

administradas en el músculo del cuello de los animales vacunados; el mismo autor (28), reportó que relativamente pequeña cantidad de anti suero potente suministraba protección significativa en curies contra virus infecciosos; en tanto que Carneiro (10) y Gómez (18), fallaron en demostrar completa correlación en título de anticuerpos y resisten cia a la confrontación en ganado.

Debido a que los anticuerpos son proteínas correspondientes a la fracción Gamma Globulina del suero, se analizó esta fracción para los Grupos A y B., a lo largo del experimento. Las pruebas estadísticas realizadas con estos dos Grupos, permitieron establecer que no existía di ferencia significativa en la producción de Gamma Globulina es decir que su comportamiento fue similar; de lo cual se deduce que la concentración de anticuerpos no esta relacionada con la concentración en Grms de Gamma Globulina sino con la actividad biológica de ésta.

Estos esquemas de Inmunización por vía intradérmica, deberían recibir - una aplicación para estudios posteriores en humanos como esquemas profi- lácticos, debido a que estimula en un 100% la producción de apreciables títulos de anticuerpos con mínima dosis de vacuna (1.4 ml. y 1 ml.) lo cual hace que tiendan a minimizar los riesgos de encefalitis alérgica post -va cunal.

6. CONCLUSIONES

Bajo las condiciones de este estudio sobre " Vacuna Antirrábica Fuenzalida - Palacios administrada intradérmicamente. Estudio Experimental en conejos" se pueden sacar las siguientes conclusiones :

6.1. Si se utiliza la vía intradérmica para Inmunización con vacuna antirrábica se obtiene una respuesta similar en el título de anticuerpos con una cantidad mínima de vacuna, (1.4 ml.) con relación a la respuesta a la inoculación por vía subcutánea que recibe 16 ml. de vacunas.

6.2. Si se amplía el tiempo de inoculación intradérmica a 96 horas entre dosis y dosis de 0.2 ml. se observa una disminución en el título de anticuerpos.

6.3. Se logró un estímulo mayor en la producción de anticuerpos con la dosis de resfuerzo aplicada a mayor distancia de la dosis inicial de vacunación (69 días). A conclusiones similares se llegó en inmunización antirrábica con vacuna preparada en Embrión de Pato aplicada por vía intradérmica, Shurrenberger (56).

6.4. No existe diferencia significativa en los niveles circulantes de Gamma Globulina entre el Grupo A., Inmunizado con 16 ml. de vacuna que produjo el mayor título de anticuerpos neutralizantes y el Grupo B., inoculado con una cantidad de 0.2 ml. y carencia total de anticuerpos neutralizantes.

7. RESUMEN

Con el objeto de estudiar la vía intradérmica para inmunización anti-rábica, utilizando vacuna Fuenzalida - Palacios^{*} Se realizó un estudio comparativo de los títulos de anticuerpos neutralizantes en cuatro Grupos de conejos inoculados con diferentes esquemas de vacunación e identificados como : Grupos A.B.C. y D. El Grupo A., recibió dosis diarias de 1 ml. de vacuna vía subcutánea durante un período de 14 días más dos refuerzos de igual cantidad a los 10 y 20 días después de suministrada la última dosis de la serie inicial. El Grupo B., recibió una dosis de 0.2 ml. por vía intradérmica. El Grupo C., fue inoculado con 5 dosis de 0.2 ml. por vía intradérmica cada 48 horas más dos refuerzos a los 10 y 20 días después de la última dosis de la serie; y al Grupo D., se le inoculó con tres dosis de 0.2 ml. por vía intradérmica cada 96 horas más dos refuerzos de igual cantidad a los 30 y 60 días después de la última dosis de la serie principal.

Los grupos A.C. y D., presentaron respuesta de anticuerpos y fue negativo para el Grupo B. Para los niveles de anticuerpos alcanzados en los Grupos A y C., las diferencias encontradas no son estadísticamente significantes. El Grupo D., mostró diferencia estadística con el Grupo A. (P 0.05).

Evaluando los resultados obtenidos en este estudio se puede concluir que :

1. Si se utiliza la vía intradérmica para Inmunización, se obtiene una - respuesta similar en el título de anticuerpos con una cantidad mínima de vacuna, con relación a la respuesta a la inoculación por vía subcutánea.

2. No existe diferencia en los niveles de Gamma Globulina circulante entre el grupo que recibió mayor estímulo antigénico y aquel que fue inoculado con una dosis mínima de antígeno. 3. La vía intradérmica es una excelente ruta de inmunización que responde con mínimas dosis a la protección, lo cual posiblemente disminuya el riesgo de reacciones alérgicas post - vacunales. 4. No se presenta reacción local en el sitio de la inoculación. 5. Sería recomendable intensificar estudios en este campo con miras a una aplicación en humanos.

8. SUMMARY

The purpose of this work was to study the intradermic route for antirabies Immunization using Fuenzalida - Palacios Type vaccine.

Neutralizing antibodies titers were compared among four group of rabbits (A.B.C. and D) inoculated according with different schedules. Group A. (control group) received daily doses of 1.0 ml. of vaccine via subcutaneous during fourteen days plus 2 boosters of 1.0 ml. each, 10 and 20 days after the last inoculation. Group B received 0.2 ml. of vaccine, via intradermic; Group C received five dosis of 0.2 ml. via intradermic 48 hours apart each other, plus two boosters 10 and 20 days following the last inoculation. Group D received 3 inoculations of vaccine of 0.2 ml. each via intradermic every 96 hours plus two boosters of same amount 30 and 60 days after the last inoculation.

Group A.C. and D., developed neutralizing antibodies. Group B do not. The highest level of antibodies were detected for Group A and C; showing no statistical difference between them, Group D do show Statistical difference with Group A ($P < 0.05$).

Gamma Globulin levels sin Group A compared with levels in Group B showed no statistical difference ($P < 0.05$).

Conclusions: 1. Using intradermic route for antirabies immunization (under our experimental conditions) we have seen similar antibodytiters compared with control group. 2. There was not difference in circulating levels of gamma globulins between the control group and the one receiving minimal amount of antigen (Group B). The intradermic route was an excellent one for rabies immunization developing good antibody response with minimal amount of antigen, reducing the risk of post - vaccinal reaction. 4. No local reaction were observed. 5. Our results suggest a continued research on this field to dilucidate the possibility of using this route and schedule on human being immunization.

9. LISTA DE ABREVIATURAS.

1. CRL..... Cerebro de ratón lactante.
2. CVS Virus Standard de Confrontación (Standard Challenge Virus).
3. DL50/0.03 ml. ratón Dosis Letal 50 por - 0.03 ml. en ratón.
4. EAE Encefalitis alérgica experimental.
5. HEP Alto número de pasajes en embrión de pollo. (High egg passage).
6. Ig G Inmunoglobulina G.
7. Ig M Inmunoglobulina M.
8. INPES Instituto Nacional para Programas Especiales de Salud.
9. LEP Bajo número de pasajes en embrión de pollo (Low egg passage).
10. LIMV Laboratorio de Investigación Médica Veterinaria.

11. MICLD50 Dosis Letal 50 en ración vía intracerebral (Mouse Intra cerebral Lethal Death 50).
12. NIH Instituto Nacional de Salud (National Institute of Health.)
13. OMS Organización Mundial de la Salud.
14. PBS Solución buffer fosfato
15. PRV Vacuna antirrábica purificada (Purified Rabies Vaccine).
16. P.M. Pitman - Moore.
17. P.V. Virus Pasteur.
18. SNC Sistema Nervioso Central
19. SRE Sistema Retículo Endotelial.
20. WI Instituto Wistar.

BIBLIOGRAFIA

1. ABDUSSALAM, M. and K. BOGEL. 1971. The problem of antirabies vaccination. International conference on the application of vaccines against viral, rickettsial and bacterial diseases of man. Washington, OPS/OMS. pp. 54 - 59 (Scientific publication, 226).
2. APPEL, B. 1955. Neurological complication following antirabies vaccination. Jour. Amer. Med. Assoc. (EE.UU) 151: 188 - 191.
3. ATANASIU, P. 1966. Quantitative assay and potency test antirabies serum. Laboratory techniques in rabies. 3th. Ed. Ginebra, OMS. pp. 167 - 172. (Serie de monografias, 23).
4. BAER, G. M.; T.P. SHANTHA and G.H. BOURNE. 1968. The pathogenesis of street rabies virus in rats. Bull. Wld. Hlth. Org. (EE.UU) 38: 119 - 125.
5. BAUSCH, and LOMB. 1966 Métodos y calibraciones para uso con el colorímetro Spectronic 20 de Bausch y Lomb. New York, p. 238.
6. BELL, J. F.; J. T. WRIGHT and K. HABEL. 1949. Rabies vaccine free of the factor causing allergic encephalitis. Proc. Soc. Exp. Biol. (EE.UU.) 70: 457 - 461.

7. BELLANTI, J. 1971. Immunology. Philadelphia, W.B. Saunders.
p. 416.
8. BURROWS, W. 1969. Tratado de microbiología. Trad. de la 19 ed.
inglesa por A. Folch. México, Interamericana. pp. 882 - 885.
9. CAMPELL, J.B. et. al. 1968. Present and future in rabies research.
Bull. Wld. Hlth. Org. (EE.UU) 38: 373 - 381
10. CARNEIRO, V.; J. BLACK and H. KOPROWSKI. 1955. Rabies in cattle.
Immunization of cattle in Brazil against exposure to street virus
of vampire bat origin. Jour. Amer. Vet. Ass. (EE.UU.) 127: 366-
369.
11. BEAN, D. J.; M. W. EVANS and R. MCCLURE. 1963. Pathogenesis of
rabies. Bull, Wld. Hlth. Org. (EE.UU.) 29: 803 - 811.
12. FERNANDEZ, M.; T. WIKTOR and H. KOPROWSKI. 1964. Endosymbiotic
relationship between animals viruses and host cells. A study of
rabies virus in tissue culture. Jour. Exp. Med. (EE.UU.) 120:
1099 - 1116.
13. FUENZALIDA, E. y R. PALACIOS. 1955. Un método mejorado en la
preparación de la vacuna antirrábica. Bol. Inst. Bact. Chile
8: 3 - 10.

14. FUENZALIDA, E; R. PALACIOS y J.M. BORGONO. 1964. Antirabies antibody response in man to vaccine made from infected suchinmouse brains. Bull. Wld. Org. (EE.UU) 30: 431 - 436
15. FOX, J.P. et. al. 1957. Study of antirabies immunization of man observation with HEP flury and other vaccines, with and without hyperimmune serum, in primary and recall Immunization. Bull Wld. Hlth. Org. (EE.UU) 17: 869 - 904
16. GARCIA, J.; A. AVILA and E. ANZOLA. 1972. Rabies virus neuronitis in humans. Arch. Path. (EE.UU) 94: 11 - 15
17. GODOY, A. M. 1967. Estudios de anticuerpos antirrábicos formados en personas inmunizadas con vacuna de cerebro de ratón lactante. Esquema de vacunación con número reducido de dosis con o sin inmunización de refuerzo. Arg. Esc. Vet. (Brasil) 19: 122 - 128.
18. GOMEZ. C.; J. BLACK and H. KOPROWSKI. 1955. Rabies in cattle. Comparative studies on vaccination of cattle in Colombia with Flury virus and Chloroform - inactivate vaccine. Jour. Amer. Vet. Med. Ass. (EE.UU.) 127: 360 - 363
19. HELD, J.R. y H. LOPEZ - ADAROS. 1971. Complicaciones neurológicas posteriores a la administración de vacuna antirrábica de cerebro de ratón lactante. Bol. Of. Sanit. Panamer. (Argentina) 71: 50 - 59.

20. HELD, J.R. et. al. 1972. Inmunización humana con vacuna antirrábica de cerebro de ratón lactante. Bol. Office. Sanit. Panamer. (Argentina) 72: 565 - 575
21. HOSKINS, J.M. 1973. Laboratory techniques in rabies. 3th. ed. Ginebra, OMS. p. 213 (Serie de monografías, 23).
22. JANIS, B. and K. HABEL. 1972. Rabies in rabbits and mice; protective effect of polyriboinosinic - polyribocytidylic acid. Jour. Infect. Infect. Dis. (EE.UU.) 125: 345 - 352.
23. JOHSON, R.T. 1965. Studies of cellular vulnerability and pathogenesis using fluorescent antibody staining. Neuropath. Exp. Neurol. (EE.UU.) 24: 662 - 674.
24. KABAT, E.A.; A. WOLF and A.E. BEZER. 1947. The rapid production of acute disseminated encephalomyelitis in rhesus monkey by injection of heterologous and homologous brain tissue with adjuvants. Jour. Exp. Med. (EE.UU) 85: 117 - 130
25. _____. 1968. Chemical modifical antigenes. Structural concepts in Immunology and Immunochemistry. Toronto. Holt and Winston, inc. pp. 19 - 25.

26. KARAKUJUMCA, M.K.; B. M. FRITZ and V.D. SOLOVEV. 1973. Laboratory techniques in rabies. 3 th. ed. Ginebra, OMS. p. 213
(Serie de monografias, 23).
27. KINKLER, W.; E. BAKER and J. HOPKINS. 1972. An outbreak of nonbite trasmitted rabies in a laboratory animal colony. Amer. Jour. Epidemiol. (EE.UU.) 95: 267 - 277
28. KOPROWSKI, H. et. al. 1950. Use of hyperimmune antirabies serum concentrates in experimental rabies. Amer. Jour. Med. (EE.UU.) 3: 412 - 420
29. KRAUSE, W.W. et. al. 1966. Human rabies. International Symposium on rabies, Tolloires, France. New York, Basel and Kragel. pp. 153 167.
30. LAVENDER, F. J. 1973. Immune response in primates vaccinated with duck embryo cell culture rabies vaccine. Appl. Microbiol. (EE.UU.) 25: 327 - 331.
31. LEACH, C.N. and N. JOHNSON. 1940. Human rabies, with special reference to virus distribution and titer. Amer. Jour. Trop. Med. (EE.UU.) 20: 335 - 340.

32. LEPINE, P. 1964. La rage. Encyclopedie Medicochirurgicale maladies infectieuses. Paris, L'Expansion Editeur. p. 10.
33. LEPINE, P. 1973. Laboratory techniques in rabies. 3th. ed. Ginebra, OMS. p. 199 (Serie de monografias, 23).
34. LOPEZ, J. H. 1970. Avances sobre investigación de rabia. Segundo Seminario Nacional sobre Rabia, Manizales. Bogotá, INPES. pp. 49 - 59.
35. MARKUS, H.L. et. al. 1971. Vacina antirrábica tipo Fuenzalida modificada. Rev. Ins. Med. Trop. (Brasil) 13: 114 - 120.
36. MATSUMOTO SEIICHI. 1970. Rabies virus. Advances in Virus Research. (EE. UU.) 16: 257 - 297.
37. METHOD MANUAL MODEL R - 100 MICROZONE ELECTROFORESIS SYSTEM. 1968. Beckman Instrumens. California, Spinco División. 80 p.
38. MOREIRA, E.C. et. al. 1972. Immunización preventiva contra la rabia humana. Bol. Office. Sanit. Panamer. (Argentina) 73: 110 - 115.
39. MOZAR, N. et. al. 1973. Myelopathy after duck embryo rabies vaccine. Jour. Americ. Med. Ass. (EE. UU.) 224: 1605 - 1607.

40. NISONOFF, A. 1973. Molecules of Immunity. Immunobiology. New York, Good Robert and Fisher David. pp. 65 - 74.
41. ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. 1973. Sexto Informe. Ginebra, Comité de Expertos de la OMS en Rabia. pp. 29 - 35.
42. PAMPUS, I. y A. WAHLE. 1964. Complicaciones neurológicas consecutivas a la vacunación antirrábica. Vortschriter der Neurologie, Psychiatrie und ihrer grenzbiete. (Checoslovaquia) 32: 165 - 188.
43. PARA, M.; V. PASSOS y F. BEZERRA. 1964. Raiva de Laboratory accidente pos - vaccinal ocurrido en Fortaleza, Brasil. Bol. Office. Sanit. Panamer. (Argentina) 56: 550 - 563.
44. PASTEUR, L. 1885. Method poru prevenir la rage apres morsure. C.R. Acad. Sci. (Paris) 101: 765 - 772.
45. PATERSON, P. Y. 1960. Transfer of allergic encephalomyelitis in rats by means of lymph node cells. Jour. Exper. Med. (EE.UU.) 111: 119 - 136.
46. PATERSON, P. Y. 1965. The demyelinating diseases. Immunological diseases. Boston, Brown and Company. pp. 788 - 803.

47. POSER, CH. M. 1969. Disseminated vasculomyelinopathy. Act. Neurol Scand. (Suecia) 45: 1 - 44.
48. RANGEL, S.F. 1969. Respuesta serológica de personas vacunadas contra la rabia con vacuna tipo Fuenzalida. Rev. Inv. Sal. Publ. (México) 29: 157 - 168
49. REED, L.J. and H. MUENCH. 1938. Simple method of estimating 50 per cent endpoints. Amer. Jour. Hyg. (EE.UU.) 27: 495 - 497
50. ROHMER, F. L. et. al. 1971. Les complications neurologiques au cours des vaccinations antirabiques preventive ou therapeutiques. Rev. Neurol (Francia) 124: 33 - 53.
51. ROBBINS, S. 1968. Enfermedades desmielinizantes. Tratado de patologia. Traducido de la edición original inglesa por Homero Vela. México, Interamericana, pp. 231 - 232.
52. RUBIN, R.H. et. al. 1971. Immunoglobulin response to rabies vaccine in man. Lancet. (Inglaterra) 2: 625 - 628.
53. SELIGMAN, B. Jr. 1973. Laboratory techniques in rabies 3th. ed. Ginebra, OMS. p. 192 (Serie de monografias, 23).
54. SIKES, R. and O.P. Larghi. 1967. Purified rabies vaccine development and comparison of potency and safety with two human rabies vaccines, Jour. Immunol. (EE.UU.) 99: 545 - 554.

55. SILVA, N.N. et. al. 1967. Vacuna tipo Fuenzalida modificada. Bol. Ofice. Sanit. Panamer. (Argentina) 53 : 223 - 226.
56. SHURRENBERGER, p. et. al. 1965. Avian Embryo rabies immunization. Optical site and timing of intradermal inoculations in pre-exposure regimens. Amer. Jour. Of. Egy. (EE.UU.) 81: 146-149.
57. TOMAS, L. et. al. 1950. Acute disseminate encephalomyelitis - following immunization with homologous brain extracts. Jour. Exp. Med. (EE.UU.) 92 : 133 - 152.
58. TORO, G.; D. CADENA y E. REY. 1970. Estudio de 4 casos de reacción fatal post - tratamiento antirrábico. Segundo Seminario de Rabia, Manizales. Bogotá, INPES. pp. 82 - 83.
59. TORO, G. e I. VERGARA. 1974. Comunicación personal.
60. TREBULA, I. 1959. Complicaciones neurológicas después de vacunación antirrábica Lek - OBZ (Checoeslovaquia) 8 : 474 - 478.
61. TURNER, G. S. 1973. Vacunas antirrábicas. Bol. Of. Sanit. Panamer. (Argentina) 74 : 511 - 523.
62. _____. 1973. Humoral and celular immune responses of mice to rabies and smallpox vaccine. Nature New Biology (Inglaterra) 241 : 90 - 92.

63. UHR, J.W. 1964. The heterogeneity of the Immune Response. Science (EE.UU.) 145: 457 - 464.
64. WEINER, L.; R. JOHSON and R. HERODIN. 1973. Viral infections and demyelinating diseases. New Engl. Jour. Med. (EE.UU.) 288: 1103 - 1110.
65. WIKTOR, T.; E. KUWERT and H. KOPROWSKI. 1968. Immune Lysis of rabies virus - infected cell. Jour. Immunol. (EE.UU.) 101: 1271 - 1281.
66. _____. and H.G. AASLESTAD. 1972. Recovery of protective activity in rabies virus vaccines concentrated and purified by four different methods. Appl. Microbiol. (EE.UU.) 24: 37 - 43.
67. _____. et. al. 1972. Role of interferon induction in the protective activity of rabies vaccines. Jour. Infec. Dis. (EE.UU.) 126: 408 - 417.
68. _____. S. PLOTKIN, and D. GRELLA. 1973. Human cell culture rabies vaccine. Jour. Amer. Med. Assoc. (EE.UU.) 224: 1170 - 1172.