BAC
MODULO DIGITAL

Corpoica
El documento fuente se encuentra en
La Biblioteca Agropecuaria de Colombia

ELEMENTOS BIBLIOGRAFICOS

AUTOR (ES): Sironi, A.; Laserna Z, B.; Canessa, E.
TITULO: Comparación en bovinos del poder inmunógeno de cuatro vacunas antirrábicas inactivadas y adicionadas de adyuvantes de la inmunidad
FUENTE: Instituto Zooprofil ctico Colombiano, Bogotá (Colombia). 6. Congreso Nacional de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Bogotá (Colombia), 28-31 Ago 1967. Trabajos presentados. Bogotá (Colombia), Instituto Zooprofil ctico Colombiano, 1967. p. 78-89

COMPARACION EN BOVINOS DEL PODER INMUNOGENO DE CUATRO VACUNAS ANTIRRABICAS INACTIVADAS Y ADICIONADAS DE ADYUVANTES DE LA INMUNIDAD.

Instituto Zooprofiláctico Colombiano

A. Sironi

B. Laserna Z.

Instituto Nacional de Salud

E. Canessa.

En una nota preliminar sobre el mismo tema (1), hemos acentuado el hecho notoriamente comprobado en Sudamérica de las numerosas y repetidas fallas de las vacunas antirrábicas con virus vivo modificado en la profilaxis de la rabia paresiante de los bovinos (2). También se llamó la atención sobre el creciente interés que ha despertado la "vacuna Fuenzalida" a base de virus de cerebro de ratón lactante, en los últimos años (3,4).

En la mencionada nota preliminar se consignaron los resultados parciales relativos a los valores seroneutralizantes encontrados en bovinos vacunados con diferentes vacunas inactivadas, después de 1 año de vacunación.

En el presente trabajo se consignan, en forma detallada, los resultados obtenidos en el curso de la investigación, junto con el diferente comportamiento en el tiempo de cada vacuna y de cada dosis, las diferencias entre los diversos tipos de vacuna y entre las diferentes dosis de cada vacuna, la representación gráfica del comportamiento serológico de los distintos antígenos empleados y el análisis estadístico de los valores logrados.

Estos datos se refieren a 4 diferentes vacunas antirrábicas preparadas con virus de origen ratón lactante o ternero, inactivado con U.V. y adicionado de adyuvantes clásicos (hidróxido de aluminio y saponina) o modernos (Arlacel-Bayol).

MATERIALES Y METODOS

Se alistaron 2 suspensiones al 5% en agua destilada, de cerebro de ratón lactante (7-9 días) y de ternero (12 días); los animales fueron previamente infectados por vía intracerebral con 10^2 y $10^{8.5}$ DL_{50} respectivamente de virus fijo ratón, cepa New York. Las suspensiones, de título infectante de $10^{-7.2}$ y $10^{-6.2}$ $DL_{50}/0.03$ cc.r. respectivamente, después de la inactivación con U.V. según la técnica descrita por Fuenzalida (5), presentaron un índice de eficacia antigénica calculado con el test de Habel (6) superior a $1{,}6 \times 10^6$ e igual a $6{,}3 \times 10^5$ DL_{50} respectivamente.

Con estos 2 antígenos, controlados por inocuidad y esterilidad, se alistaron 4 diferentes vacunas, cuya composición cuali-cuantitativa se muestra en la siguiente Tabla No.1.

TABLA No.1 - COMPOSICION CUALI-CUANTITATIVA DE 4 VACUNAS ANTIRRABICAS

COMPONENTE	V.C.R. (.)	V.C.T. (..)	Arlacel-Bayol (:)	$Al(OH)_3$ (')	Saponina (")
CANTIDAD	50%	50%	50%	50%	0.1%
No.VACUNA					
1	+	-	+	-	-
2	+	-	-	+	-
3	+	-	-	+	+
4	-	+	+	-	-

(.) = Virus cerebro ratón.
(..) = Virus cerebro ternero.
(:) = Arlacel "A" (1 parte) y Bayol "F" (9 partes) homogenizados con - Polytrón P.T. 45/60 y esterilizados a 120°C. x 30' *.
(') = Hidróxido de aluminio de tipo concentrado (7), estéril, pH 8, residuo seco 2% Al_2O_3.
(") = Saponina B.D.H., de tipo ácido, estéril, pH 8 con tampón glicocola; concentración final de 0.1%.

Para la fabricación de las vacunas mencionadas se - emplearon las mismas técnicas descritas en investigaciones similares con el virus aftoso (8). Las vacunas oleosas recién fabricadas presentan una viscosidad equivalente a una "velocidad de flujo" de 90 segundos por 0,1 cc. de - emulsión.

Las vacunas fueron inoculadas a bovinos de $1\frac{1}{2}$-2 años de edad, vacunados contra fiebre aftosa, nunca vacunados contra rabia. Antes de la vacunación todos los bovinos fueron sangrados y los sueros individuales se guardaron en congelación previa inactivación a 56°C., para las necesarias pruebas de seroneutralización de control.

Para cada dosis vacunal de cada vacuna se emplearon 6 bovinos. Para las vacunas oleosas se usaron 3 dosis (2,5 y 10 cc.), mientras que para las 2 restantes se emplearon únicamente 2 dosis (5 y 10 cc.).

Después de 1, 4, 8 y 12 meses de vacunados, los bovinos fueron sangrados para recolectar muestras individuales cuyos respectivos sueros, inactivados a 56°C., se guardaron en congelación, en espera de - la titulación del contenido de anticuerpos seroneutralizantes, que se efectuó en ratones de 21 días según la técnica y las modalidades descritas por - Atanasiu (9) y recomendadas por la O.M.S. Para estas pruebas se empleó la cepa C.V.S. de virus rábico.

* Estos productos fueron obsequiados por el Plum Island Animal Disease Laboratory, Greenport, U.S.A.

RESULTADOS

En el curso de la experimentación, un total de 12 bovinos no se pudo identificar con ocasión de las diferentes sangrías. Infortunadamente 5 de éstos pertenecían al grupo correspondiente a la dosis de 10 cc. de la vacuna No.1 y por lo tanto no fué posible determinar el efecto inmunógeno de esta dosis vacunal.

Los bovinos, inoculados por vía subcutánea en la tabla del cuello, no presentaron otra reacción local que la formación de un granuloma vacunal normal, más persistente en los tratados con las vacunas oleosas, especialmente con las dosis elevadas. No se notó marcada diferencia en la intensidad de la reacción postvacunal entre las vacunas oleosas y las restantes. Ninguna reacción general siguió a la inoculación de las diferentes vacunas.

Los resultados individuales obtenidos se expresan como la dilución sérica más elevada en la cual se presenta una actividad seroneutralizante que protege al 50% de los ratones inyectados con las mezclas de suero-virus (cepa C.V.S.).

Todos los sueros de los bovinos empleados en esta investigación dieron valores seroneutralizantes específicos negativos antes de la vacunación.

Para una más fácil lectura de los resultados, estos se expresan como la recíproca de la dilución límite seroneutralizante de cada suero. Además, los datos se anotan como la media aritmética de los valores individuales para cada dosis y cada vacuna. En el Cuadro No.1 se aprecian las medias aritméticas observadas y las correspondientes resultantes del análisis estadístico (medias esperadas).

En la Gráfica No.1 y en el Diagrama No.1 se presentan la intensidad, la evolución y la duración de la respuesta inmunitaria vacunal en el curso de la experiencia.

CUADRO No.1 - PROMEDIO DE LOS VALORES DE SERONEUTRALIZACION DE LOS BOVINOS VACUNADOS.

No. VACUNA	DOSIS cc.	I	II	III	IV
1	2	268.80 (266.95)	160.00 (159.74)	98.00 (106.14)	80.00 (73.98)
1	5	154.20 (152.36)	109.20 (111.05)	85.60 (90.40)	82.80 (78.00)
1	10	275.50 (------)	138.00 (------)	.....	.....
2	5	71.00 (68.57)	38.33 (41.20)	21.00 (27.66)	26.67 (19.47)
2	10	262.67 (252.03)	96.00 (114.50)	24.00 (45.73)	38.00 (4.47)
3	5	154.67 (148.93)	52.50 (69.81)	42.00 (30.23)	6.00 (6.51)
3	10	170.28 (161.65)	65.71 (84.10)	42.57 (45.32)	34.57 (22.06)
4	2	86.40 (87.95)	64.00 (59.48)	48.67 (45.25)	31.33 (36.70)
4	5	292.80 (310.96)	264.80 (221.49)	170.40 (176.75)	126.50 (149.91)
4	10	233.50 (241.62)	205.50 (198.13)	205.50 (176.39)	135.00 (163.34)

I = Valores a 1 mes de la vacunación.
II = Valores a 4 meses de la vacunación.
III = Valores a 8 meses de la vacunación.
IV = Valores a 12 meses de la vacunación.

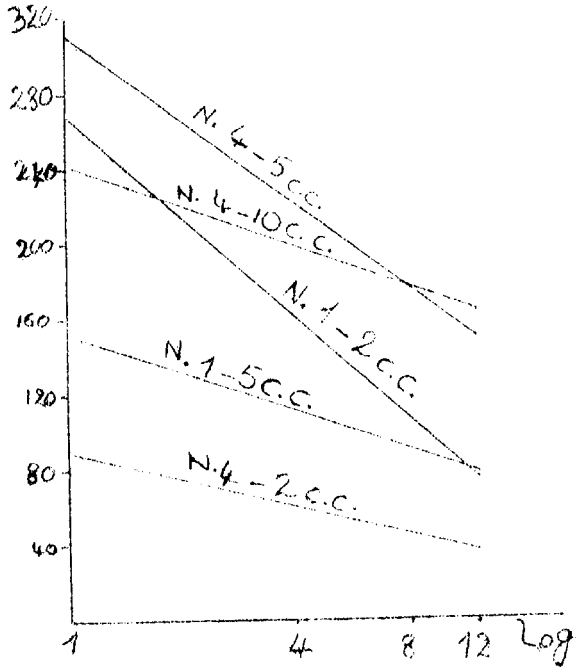
Entre paréntesis figuran los valores de las medias esperadas.

VACUNA No.1 - La respuesta inmunitaria al mes es elevada tanto con la dosis de 2 cc. como con la de 10 cc. La dosis intermedia - (5 cc.) sorpresivamente es inferior en un 43%. A los 4 meses todos los animales presentan una baja de los niveles seroneutralizantes, más evidente en las dosis mínima y máxima. Al año de la vacunación los valores iniciales presentan una reducción del 72% y del 49% con la dosis de 2 y de 5 cc. respectivamente. (La dosis máxima no pudo ser calculada por las razones antes mencionadas). La dosis mínima (2 cc.) de la vacuna No.1 es la más efectiva por la intensidad y la duración de la respuesta inmunitaria.

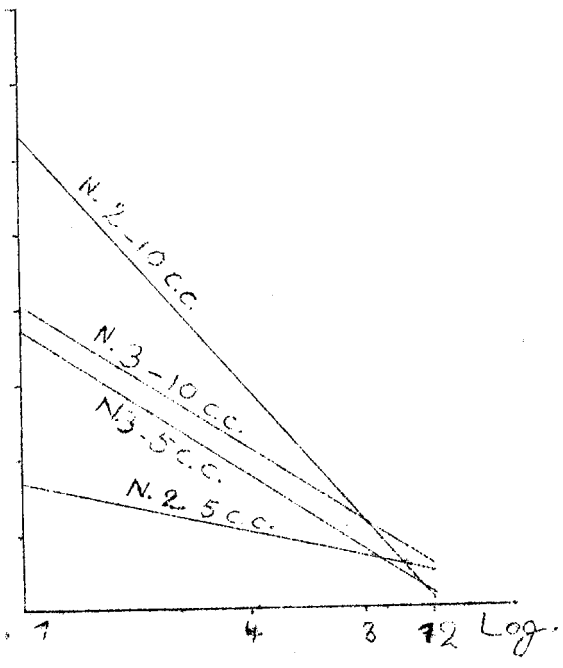
VACUNA No.2 - En la dosis de 5 cc. los títulos de - seroneutralización presentan niveles no muy altos, que al año muestran una - reducción del 72% respecto a los valores iniciales. En la dosis de 10 cc. hay una elevada respuesta al mes de la vacunación, la cual sufre una marcada reducción ya al cuarto mes y prácticamente se anula al cumplirse el año (98% de baja del título). De los datos presentados en la Gráfica No.1 y Diagrama No.1 se desprende que la dosis de 10 cc. ofrece una mejor protección durante los primeros 8 meses, sin embargo a los 12 meses ambos niveles son muy próximos.

GRAFICA No.1

VACUNAS OLEOSAS Nos. 1 y 4



VACUNAS Nos. 2 y 3



El análisis de la varianza, que implica una regresión entre los valores de inmunización y el logaritmo del número de los meses de duración del experimento, ha demostrado, en todos los tipos de vacuna, que la regresión es lineal. La varianza debida a los términos no lineales (cuadrático y cúbico) ha sido siempre insignificante ($F < 1$), por lo que las rectas han podido ser calculadas según la ecuación $y = a + bx$.
Se presentan aquí los valores de b, junto con las respectivas desviaciones standard y los valores de F correspondientes a la regresión lineal.

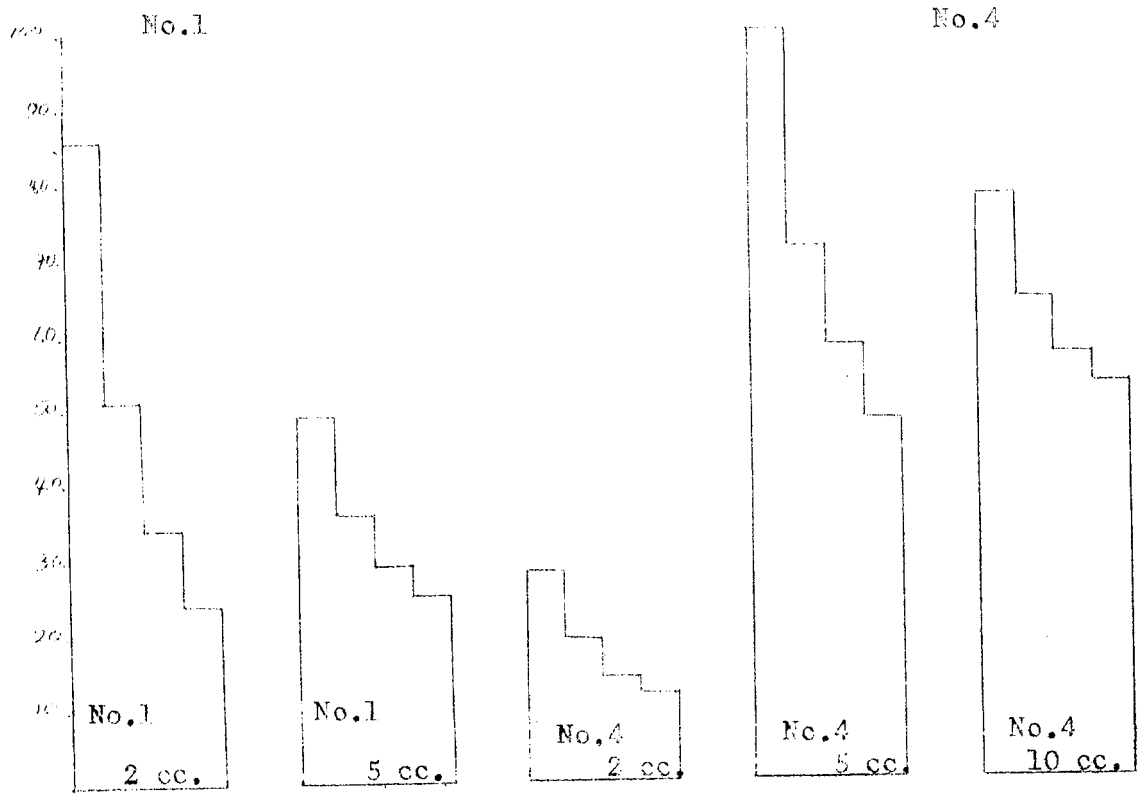
Vacuna No.1-2 cc.:	$b = 178,68$	$s_b = \pm 34,22$	$F = 27,26$	$F_{0.01} = 8,53$
" " "-5 cc.:	$b = 68,85$	$s_b = \pm 22,00$	$F = 3,37$	$F_{0.05} = 3,24$
Vacuna No.2-5 cc.:	$b = 45,46$	$s_b = \pm 11,48$	$F = 5,66$	$F_{0.01} = 4,94$
" " "10 cc.:	$b = 229,22$	$s_b = \pm 67,22$	$F = 11,62$	$F_{0.05} = 5,99$
Vacuna No.3-5 cc.:	$b = 131,87$	$s_b = \pm 49,39$	$F = 7,10$	$F_{0.05} = 4,49$
" " "10 cc.:	$b = 128,25$	$s_b = \pm 29,18$	$F = 19,58$	$F_{0.01} = 7,82$
Vacuna No.4-2 cc.:	$b = 47,45$	$s_b = \pm 20,81$	$F = 5,19$	$F_{0.05} = 4,96$
" " "-5 cc.:	$b = 149,12$	$s_b = \pm 70,00$	$F = 4,52$	$F_{0.05} = 4,54$
" " "10 cc.:	$b = 72,48$		$F = 2,93$	$F_{0.05} = 4,75$

No se ha calculado la desviación standard de b de la vacuna No.4 a 10 cc., - por ser no significativo el valor de F para la regresión, debido al error experimental demasiado grande. Sin embargo, se ha considerado útil, por razones prácticas de comparación, trazar la recta respectiva, teniendo presente que el valor F de la regresión corresponde a una "confianza" inferior al 95%.

Valores de $F_{0.01}$ y $F_{0.05}$ según Fischer y Yates (12).

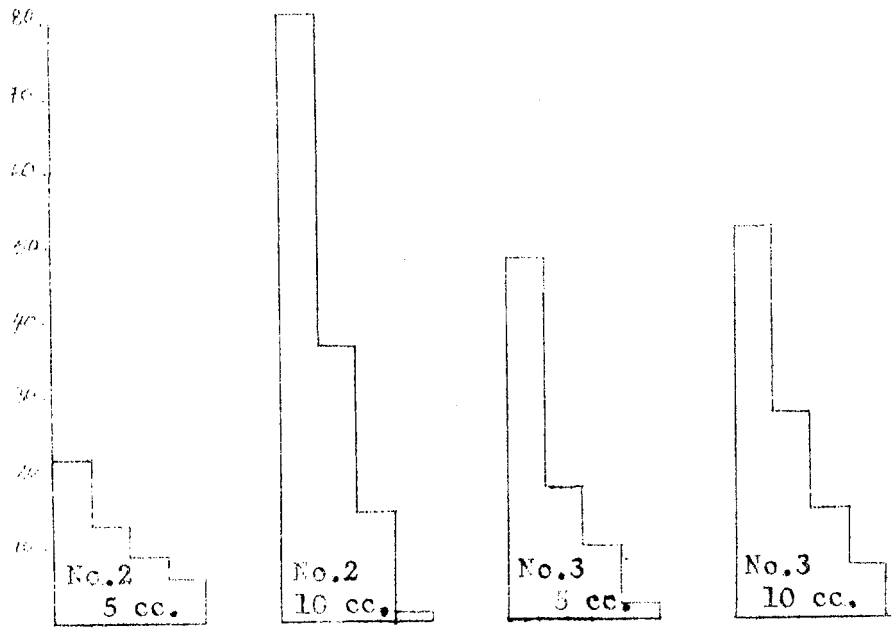
DIAGRAMA No.1

VACUNAS CLECSAS



VACUNA No.2

VACUNA No.3



VACUNA No.3- En ambas dosis (5 y 10 cc.) se obtuvieron títulos muy semejantes en todo el período de prueba, con una reducción de aproximadamente un 50% en las determinaciones sucesivas, hasta una pérdida global del 96% y del 86% respectivamente para la dosis de 5 y de 10 cc.

VACUNA No.4 - Con la dosis mínima (2 cc.) los valores son menos altos en relación con la dosis de 5 y 10 cc., pero se mantienen bastante en el tiempo, con una reducción final de un 38%. Con la dosis de 5 cc. se obtuvieron valores extraordinariamente altos, que a pesar de la reducción que sufren (52%) al cumplirse el año de la vacunación, permanecen todavía a niveles muy altos. Con la dosis máxima (10 cc.) se obtuvieron también valores muy elevados, pero inferiores a los de la dosis de 5 cc. hasta los 8 meses; sin embargo los títulos de seroneutralización han sufrido una pérdida del 33% solamente.

CUADRO No.2 - PORCENTAJES DE REDUCCION DEL TITULO DE ANTICUERPOS DE LOS SUEROS EN LA ULTIMA DETERMINACION (12 MESES) RESPECTO A LA PRIMERA (1 MES).

VACUNA	No. 1		No.2		No.3		No. 4		
DOSIS	2 cc.	5 cc.	5 cc.	10 cc.	5 cc.	10 cc.	2 cc.	5 cc.	10 cc.
Porcentajes de reducción del título	72.29	48.81	71.61	98.23	95.63	86.35	58.57	51.79	32.40

DISCUSION

Los valores seroneutralizantes iniciales que varían entre la mínima dilución sérica de 1/68 y la máxima de 1/310 obligan a la conclusión de que las 4 vacunas antirrábicas preparadas, a pesar de las notables diferencias de su composición han logrado estimular siempre respuestas inmunitarias muy buenas, independientemente de la dosis empleada. Pero la observación de los valores seroneutralizantes finales, después de un año de la vacunación, permiten evidenciar una marcada diferencia entre las vacunas oleosas, con títulos entre 1/73 y 1/163, y las otras cuyos títulos oscilan entre 1/4 y 1/22.

Es evidente la superioridad de las vacunas oleosas y merece destacar como títulos seroneutralizantes tan elevados y duraderos han sido obtenidos con una única y primera vacunación en animales nunca antes sensibilizados al antígeno rábico y de desarrollo físico ya superior al de la máxima respuesta frente a este antígeno (10).

De acuerdo con la indicación de Freund (1.948) (11) sobre la posibilidad de aumentar la intensidad de la respuesta inmunitaria antirrábica con el empleo de antígeno emulsionado en aceite, el efecto positivo del adyuvante incompleto de Freund sobre el virus vivo de la rabia en la producción de títulos elevados seroneutralizantes fué ampliamente demostrado por Fuenzalida y Palacios (13) en el proceso de hiperinmunización rápida antirrábica de los caballos seroproductores. Nuestras investigaciones confirman en bovinos la utilidad de emplear el antígeno rábico emulsionado con los modernos adyuvantes aceitosos y demuestran la utilidad y la conveniencia de emplear en la fabricación de la vacuna antirrábica bovina, antígenos inactivados.

Las vacunas con hidróxido de aluminio o hidroxisaponinadas, preparadas únicamente con virus cerebro-ratón lactante, en nuestras experiencias, a pesar de que presentan una actividad antigénica notablemente inferior a las oleosas y de especial manera en lo que se refiere a la duración de la respuesta inmunitaria, logran niveles protectores notablemente elevados en el primer semestre de la prueba, superando los resultados logrados en anteriores y similares investigaciones (10) y reconfirmando la utilidad del hidróxido de aluminio como adyuvante.

En nuestras pruebas no hay evidencia de la utilidad de usar la saponina como adyuvante de refuerzo, quedando la posibilidad, de que esta sustancia pueda actuar ventajosamente por sí sola o con dosificaciones más elevadas de la empleada.

Los elevados y duraderos títulos seroneutralizantes logrados con las vacunas oleosas, con dosis reducida de material cerebral (50 mg. de cerebro ratón y 125 mg. de cerebro ternero por bovino) demuestran que el resultado en los bovinos no es directamente proporcional a la dosis de antígeno empleado (10), siendo más bien el adyuvante el factor determinante de la intensidad y duración de la respuesta. Es conveniente, a este propósito, recordar cómo en ambas vacunas oleosas los valores protectores más altos no se obtuvieron con las dosis más elevadas sino más bien con la dosis mínima (Vacuna No.1) y media (Vacuna No.4), dando la impresión de que, el empleo de cantidades antigénicas altas (250 mg.) en unión con altas cantidades de adyuvante oleoso (5 cc.) no representen una condición antigénica óptima, cuya determinación merecería ser estudiada en función de los adyuvantes a usar.

La constatación de que es posible proteger un bovino, por lo menos durante un año, con el virus procedente de la cuarta parte de un cerebro de ratón lactante, aumenta sensiblemente las posibilidades ya grandes de la vacuna Fuenzalida en la profilaxis de la rabia bovina.

Por lo que se refiere a las características físicas de nuestras vacunas oleosas se debe recordar cómo ambas presentaron una viscosidad equivalente a una velocidad de flujo de 0.1 cc. de emulsión igual a 90 segundos, es decir una viscosidad superior a la óptima. A pesar de ésto, los resultados han sido más que satisfactorios y nó se encontró dificultad alguna en las operaciones vacunales y ninguna reacción especial de orden clínico, local o general fué posible observar en los animales vacunados.

El virus de cerebro ternero, antigénicamente inferior al de cerebro ratón en el test de Habel, una vez adicionado de adyuvante oleoso ha ofrecido una respuesta inmunitaria excelente y superior a cualquier previsión.

La comparación entre la eficacia del antígeno - cerebro ratón lactante y la del antígeno cerebro ternero, efectuada con las vacunas oleosas, rectifica la superioridad del antígeno ratón cuando - se emplean dosis mínimas (50 mg.) y la del antígeno ternero, pero empleando una cantidad superior de dos veces y media (125 mg.).

Si se considera que los niveles seroneutralizantes logrados con 50 mg. de virus cerebro ratón lactante siguen elevados - al cumplirse el año de vacunación, hay que concluir que el empleo de cantidades mínimas de este tipo de antígeno debe ser recomendado, también por evidentes e importantes consideraciones de naturaleza económica de fundamental importancia en la preparación de productos inmunizantes destinados a las campañas profilácticas. A nadie escapa, de todas maneras, el significado de los niveles protectivos logrados con 125 mg. de virus cerebro ternero y que se sitúan, al cumplirse el año de vacunación, en títulos seroneutralizantes de 1/170 aproximadamente, indicando en forma muy clara la posibilidad de obtener, con mucha probabilidad, una protección durante dos o más años con una única y primera inyección de vacuna.

Lógicamente, con el empleo del antígeno bovino, - queda abierto el problema de las complicaciones por encefalomielitis desmielinizantes de tipo alérgico, especialmente en consideración del empleo de los adyuvantes aceitosos de notorio efecto alergizante en este sentido.

El empleo de vacunas oleosas de tipo inactivado - permite la utilización en la fabricación de la vacuna de los mismos virus responsables de la enfermedad rábica al campo. Esta indicación es de sensible importancia por lo que se refiere a la rabia paresiante de los bovinos y es respaldada por las recientes e interesantes observaciones de Fabrega, 1.964 (1°), sobre una cepa de virus de la rabia paresiante bovina, seroneutralizada en grado inferior con respecto a otras cepas virales vacunales - cuando era enfrentada a un suero antirrábico standard. Además, las notorias fallas de las diferentes vacunas antirrábicas empleadas para controlar la rabia paresiante bovina llaman la atención sobre la oportunidad y la urgencia de fabricar vacunas de elevado poder antígenico (vacunas aceitosas) a partir de cepas virales directamente responsables (virus paresiante bovino) reproducidas en forma fácil y económica, en ausencia del factor mielínico - alergizante, como se puede realizar en el cerebro de ratón lactante.

Queda finalmente por investigar el eventual efecto alergizante del tejido nervioso del ratón lactante que se sabe no es factor de problema en la vacuna de Fuenzalida, pero que podría serlo en las vacunas aceitosas con el aumento de actividad también de los antígenos inespecíficos, que en la actualidad siguen acompañando al virus. De todas maneras, este eventual defecto tendría que ser muy limitado, debido a las tan reducidas cantidades de material cerebral que se emplean y que con toda probabilidad, se pueden ulteriormente reducir sin modificar la respuesta inmunitaria.

CONCLUSIONES

Las investigaciones comparativas de tipo inmunitario efectuadas en bovinos protegidos con una única y primera aplicación de distintas dosis de vacunas preparadas con diferentes antígenos, adicionados de adyuvantes inmunitarios clásicos (hidróxido, saponina) o modernos (Arlacel-Bayol), permiten llegar a las siguientes conclusiones:

1) En la fabricación de las vacunas antirrábicas es de enorme importancia, conveniencia y utilidad emplear los adyuvantes oleosos del tipo Arlacel-Bayol, que permiten reducir grandemente la cantidad de material viral cerebral que entra en la composición de la vacuna;

2) Los títulos seroneutralizantes obtenidos con las vacunas aceitosas son extraordinariamente altos y duraderos;

3) Los óptimos resultados logrados con 50 mg. de virus cerebro ratón lactante y la falta del factor alergizante en este tipo de antígeno, recoriendan su empleo en la fabricación de la vacuna antirrábica.

4) Se indican la posibilidad, la conveniencia y la utilidad de usar virus inactivados en la fabricación de la vacuna antirrábica. Estos antígenos podrían reemplazar totalmente a los virus vivos - modificados. Además se acentúa que el empleo de antígenos inactivados es el único método que permite fabricar vacunas antirrábicas a partir de las mismas cepas responsables de la enfermedad en el campo. A nadie escaba el enorme significado de esta posibilidad en la lucha vacunal, la única verdaderamente lógica, posible y fácilmente accesible, contra la rabia paresiante de los bovinos.

RESUMEN

Se comparan en bovinos los efectos inmunizantes de 4 vacunas antirrábicas preparadas con diferentes antígenos (virus New York de cerebro de ratón lactante y de cerebro de ternero), inactivados con U.V. y adicionados con adyuvantes clásicos (hidróxido de aluminio, saponina) y modernos del tipo Freund (Arlacel-Bayol). Los resultados indican la superioridad de las vacunas oleosas, que permiten lograr títulos seroneutralizantes extraordinariamente altos y duraderos (1 año), aún con el empleo de dosis - muy reducidas de antígeno (50 mg.) cuando se usó el virus cerebro ratón.

Se indica la oportunidad de reemplazar en la profilaxis vacunal de la rabia paresiante de los bovinos los virus vivos modificados con antígenos inactivados, obtenidos a partir de las mismas cepas del virus rábico responsable de la enfermedad en el campo.

SUMMARY

It is compared the immunizing effects of four anti-rabies vaccines in cattle with differents antigens (New York virus from brain of suckling mouse and of calf's brain), inactivated with U.V. and added with the classical adjuvants (aluminum hydroxide, saponin) and with the news like the Freund type (Arlacel-Bayol). The results shows the superiority of the oily vaccines, which get the highest sero-neutralizing titles and durables (1 year, even with the employ of a very reduced antigen dosis (50 mg.) when it was used with virus of mouse's brain.

It is shown the opportunity of replace in the vaccinal prophilaxis of bovine paralitic rabies, the live modificated virus - responsible of the disease obtaiend the field.

RÉSUMÉ

On a comparé chez des bovins les effets immunisants de 4 vaccins antirabiques préparés avec différents antigenes (virus New York de cerveau de sauriceau lactant et de cerveau de veau), inactivés avec U.V. et additionnés d'adjuvants classiques (hydroxide d' alumine, saponine) et - modernes du type Freund (Arlacel-Bayol). Les résultats indiquent la supériorité des vaccins huileux, qui permettent d'obtenir des titres séroneutralisants - extraordinairement hauts et durables, (1 an), meme en employant des doses tres réduites d' antigene (50 mg.) quand on a employé le virus du cerveau de souriceau.

On indique la opportunité de remplacer dans la profilaxie vaccinale de la rage des bovins les virus vivants modifiés, avec des - antigenes inactivés, obtenus á partir des memes souches de virus rabique responsable de la maladie dans le champ.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la doctora Ada Zanardi de - Sironi, quien tuvo a cargo la elaboración estadística de los resultados y a las bacteriólogas del Instituto Nacional de Salud, señora Margot Ovalle de - Rodríguez y señoritas Clara Inés Llaña y Blanca Marina Rodríguez, por la eficaz colaboración en los exámenes serológicos.

BIBLIOGRAFIA

1) SIRONI A., CANESSA E., LASERNA E.: Primer Seminario Nacional sobre Rabia, Julio 26-29, 1.967, Medellín, Colombia.

2) O.M.S.: Informe Técnico No. 321, 1.966.

3) FUENZALIDA E., PALACIOS R.: Bol. Inst. Bact. Chile, 8, 3, 1.965.

4) FUENZALIDA E., PALACIOS R., BORGOÑO J.M.: Bull. O.M.S., 30, 431, 1.964.

5) FUENZALIDA E.: O.P.S., O.M.S., Curso Teórico-Práctico sobre Laboratorio y Epidemiología de la Rabia, Buenos Aires, 10-21 de Mayo, 1.965.

6) HABEL K.: W.H.O., Laboratory Techniques in Rabies, Monografh Series No.23, Genéve, 2nd Ed., 1.966.

7) SIRONI A. y Col.: Vet. Col., 2, 121, 1.967.

8) SIRONI A.: en curso de publicación.

9) ATANASIU P.: Laboratory Techniques in Rabies, W.H.O., Monograph Series No.23, 2nd Ed., Genéve, 1.966.

10) FABREGA F.G.: Tesis de Grado, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de Chile, Santiago, 1.965.

11) FREUND J., LIPTON M.M., PISANI M.T.: Proc. Soc. Exp. Biol. N.Y. 68, - 609, 1.948.

12) FISCHER R.A., YATES F.: Statistical Tables for Biological, Agricultural and Medical Research, Oliver & Coyd, Londres, 5a Ed., 1.957.

13) FUENZALIDA E., PALACIOS R.: Bull. Wld. Hlth. Org., 30, 437, 1.964.