

## Tesis de Posgrado

# Estudio de las cepas de virus rábico utilizadas en la preparación de vacuna de cerebro de ratón lactante (tipo Fuenzalida - Palacios)

Dellepiane, Nora Ida

1984

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Dellepiane, Nora Ida. (1984). Estudio de las cepas de virus rábico utilizadas en la preparación de vacuna de cerebro de ratón lactante (tipo Fuenzalida - Palacios). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1856\\_Dellepiane.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1856_Dellepiane.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Dellepiane, Nora Ida. "Estudio de las cepas de virus rábico utilizadas en la preparación de vacuna de cerebro de ratón lactante (tipo Fuenzalida - Palacios)". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1984.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1856\\_Dellepiane.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1856_Dellepiane.pdf)

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESTUDIO DE LAS CEPAS DE VIRUS RABICO UTILIZADAS EN LA  
PREPARACION DE VACUNA DE CEREBRO DE RATON LACTANTE  
( TIPO FUENZALIDA-PALACIOS )

NORA IDA DELLEPIANE

DIRECTORA DE TESIS: Dra. ANA MARIA O. de DIAZ

CONSEJERA DE ESTUDIOS: Dra. ANA MARIA BRUNENGO

LUGAR DE TRABAJO: CENTRO PANAMERICANO DE ZONOSIS, OPS/OMS  
INSTITUTO NACIONAL DE MICROBIOLOGIA  
"DR. CARLOS G. MALBRAN"

TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

AÑO 1984

- 1856 -  
21 2

Dedicatoria:

A la memoria de mi padre.

A mi madre.

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Ana María Díaz, quien con su gran dedicación docente y permanente guía y apoyo, tanto en el aspecto científico como en el humano, hizo posible la realización de este trabajo.

A las autoridades del Centro Panamericano de Zoonosis, OPS/OMS, que autorizaron la ejecución de este estudio en esa institución y pusieron a disposición las instalaciones y materiales necesarios.

A las autoridades del Instituto Nacional de Microbiología "Carlos G. Malbrán", que otorgaron todas las facilidades, tanto dentro de la institución como de concurrencia al Centro Panamericano de Zoonosis.

A la Dra. Ruth Cetrángolo, jefe del Departamento Contralor del Instituto Nacional de Microbiología, por su constante estímulo, apoyo y lectura crítica del manuscrito.

Al Dr. V.M. Varela-Díaz, quien mediante la lectura del manuscrito y discusión de ideas contribuyera a su enriquecimiento.

A la Dra. A.M. Bunengo, por su guía y valiosas sugerencias.

Al personal del Centro Panamericano de Zoonosis, en particular a los sres: Graciela Perdomo, Oscar Becco, Luis Polizzo, Nelly Bonomini, Carlos Larrañaga, Suzy Albertelli y Susana C.I. de Brazuna.

A mis compañeros del Departamento Contralor, que dieron su apoyo en forma permanente con trabajo y amistad.

A las Licenciadas Silvana Levis, Mónica Tous, y a la Dra. Bethy Ayerra de Holstein, por la provisión de reactivos y asesoramiento en técnicas de titulación de interferón.

A Fernando Rey Tolve, quien con gran amor y dedicación hiciera gran parte de los gráficos y figuras de esta tesis.

Al Sr. Marcos V. Durruty, por la gentileza de imprimir este trabajo.

	Página
1.-	(i)
<b>INDICE</b>	
2.-	(iv)
	<b>ABREVIATURAS</b>
3.-	1
	<b>INTRODUCCION</b>
3.1.-	1
	<b>Historia de la enfermedad</b>
3.2.-	2
	<b>Patogenia</b>
3.3.-	5
	<b>Morfogénesis</b>
3.3.1.-	5
	<b>Aspectos morfogenéticos de la infección en cultivos celulares</b>
3.3.2.-	7
	<b>Aspectos morfogenéticos de la infección <u>in vivo</u></b>
3.4.-	8
	<b>Virión rábico</b>
3.4.1.-	8
	<b>Forma y tamaño</b>
3.4.2.-	9
	<b>Estructura</b>
3.4.2.1.-	9
	<b>Envoltura</b>
3.4.2.2.-	10
	<b>Nucleocápside</b>
3.4.3.-	11
	<b>Síntesis de proteínas virales</b>
3.4.4.-	12
	<b>Composición antigénica</b>
3.4.5.-	14
	<b>Relaciones antigénicas</b>
3.4.6.-	17
	<b>Ubicación taxonómica</b>
3.5.-	17
	<b>La enfermedad en el hombre</b>
3.5.1.-	18
	<b>Respuesta inmune</b>
3.5.2.-	20
	<b>Profilaxis</b>
3.5.2.1.-	21
	<b>Tipos de vacunas</b>
3.5.2.2.-	25
	<b>Mecanismos de protección postexposición</b>
3.5.2.2.1.-	25
	<b>Respuesta humoral</b>
3.5.2.2.2.-	26
	<b>Interferón</b>
3.5.2.2.3.-	27
	<b>Respuesta celular</b>
3.6.-	29
	<b>Situación epidemiológica de la rabia en América</b>
4.-	34
	<b>OBJETIVOS</b>

	Página	
5.-	MATERIALES Y METODOS	35
5.1.-	Animales de laboratorio	35
5.2.-	Cepas de virus rábicos	35
5.2.1.-	Virus fijos	35
5.2.2.-	Virus calle	35
5.3.-	Producción de virus rábicos en ratones	36
5.3.1.-	Producción de virus semilla	36
5.3.2.-	Producción de virus trabajo	36
5.4.-	Elaboración de vacunas antirrábicas	37
5.4.1.-	Vacuna de referencia	37
5.4.2.-	Vacunas de cerebro de ratones lactantes	37
5.4.2.1.-	Vacunas monovalentes	37
5.4.2.2.-	Vacuna trivalente	38
5.5.-	Controles de calidad	39
5.5.1.-	Control de esterilidad	39
5.5.2.-	Control de identidad	39
5.5.3.-	Control de infectividad	39
5.5.4.-	Control de toxicidad	40
5.5.5.-	Control de ausencia de virus vivo residual	40
5.5.6.-	Control de potencia antigénica: prueba NIH	40
5.5.7.-	Estandarización de la vacuna antirrábica de referencia	41
5.6.-	Determinación de anticuerpos	42
5.6.1.-	Técnica de seroneutralización	42
5.6.2.-	Técnica de contrainmunolectroforesis	43
5.7.-	Determinación de interferón por inhibición del efecto citopático. Micrométodo	46
5.8.-	Cálculos estadísticos	49
5.8.1.-	Fórmula de Archetti y Horsfall	49
5.8.2.-	Correspondencia de títulos entre CIE y SN	49

	Página	
6.-	RESULTADOS Y DISCUSION	50
6.1.-	Virus fijos	50
6.1.1.-	Calidad de las vacunas CRL trivalente y monovalentes CVS, 51 y 91	50
6.1.2.-	Pruebas de potencia cruzadas	52
6.1.3.-	Pruebas serológicas	54
6.1.3.1.-	Seroneutralización simple y contraimmunoelectroforesis	54
6.1.3.2.-	Seroneutralización cruzada	59
6.1.4.-	Cinética de formación de anticuerpos	63
6.1.5.-	Pruebas de inmunidad cruzadas	73
6.1.6.-	Tratamientos postexposición	82
6.2.-	Virus calle	85
6.2.1.-	Pruebas de potencia cruzadas	85
6.2.2.-	Pruebas serológicas	86
6.2.2.1.-	Pruebas de seroneutralización cruzadas	86
6.2.3.-	Pruebas de inmunidad cruzadas	87
6.2.4.-	Tratamientos postexposición	92
6.3.-	Capacidad de inducción de interferón	99
7.-	CONCLUSIONES	103
8.-	RESUMEN	106
9.-	REFERENCIAS	107
10.-	ANEXO	118

IF:	Inmunofluorescencia
ME:	Microscopia electrónica
SDS-PAGE:	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio
SNC:	Sistema nervioso central
SNP:	Sistema nervioso periférico
Vacuna CRL:	Vacuna elaborada en cerebro de ratón lactante
Vacuna HDCS:	Vacuna elaborada en células diploides humanas (human diploid cells strain)
PM:	Peso molecular
Vía IP:	Vía intraperitoneal
Vía IC:	Vía intracerebral
Vía IM:	Vía intramuscular
UI:	Unidades Internacionales
poly I:C:	ácido poliriboinosínico-poliribocitidílico
RFFIT:	Prueba de inhibición de campos fluorescentes
CIE:	Contrainmunolectroforesis
SN:	Seroneutralización
VP:	Vacuna problema
VR:	Vacuna de referencia
SEN:	Suero equino normal
DL50%:	Dosis letal 50%
DICT50%:	Dosis infectiva cultivo de tejidos 50%
DE50%:	Dosis efectiva 50%
DP50%:	Dosis de protección 50%
VA:	Valor antigénico
RMP:	Requisito mínimo de potencia
SP:	Suero problema
SR:	Suero de referencia

### 3.1.- Historia de la enfermedad

La rabia es una encefalomiелitis aguda que ataca a los mamíferos y que se conoce desde la más remota antigüedad. Ya los griegos y romanos habían establecido que se transmitía por la saliva de un animal rabioso.

Celso, en el siglo I después de Cristo, hizo una descripción detallada de la enfermedad, y asoció la rabia en los animales con la hidrofobia en el hombre.

Las recopilaciones históricas muestran que esta enfermedad tuvo una amplia distribución desde muy antiguo; sin embargo, las primeras epizootias datan de la Edad Media. Desde entonces, persiste como enzootia en distintas partes del mundo.

En 1768 la enfermedad alcanzó una frecuencia alarmante en los Estados Unidos de América, donde se produjo una importante epizootia que se prolongó hasta el año 1771.

En Sud América, apareció en el Perú en el año 1803 en forma de epizootia extendida de norte a sur, desde Lima hasta la ciudad de Arequipa, y afectó a muchas especies animales, incluyendo équidos, bovinos, perros, cerdos y cabras. La epizootia cedió en el año 1808 persistiendo como enzootia. En la Argentina, la rabia fue introducida en 1806 en la zona del Río de la Plata por perros pertenecientes a oficiales ingleses durante la invasión a Buenos Aires.

Los avances en el conocimiento de la enfermedad fueron sumamente lentos. En el año 1804, Zimke demostró que la rabia se transmitía por la saliva de animales enfermos. Galtier, en 1879 logró transmitir el agente infeccioso y reproducirla en conejos. Sin embargo, fueron Pasteur, Roux y Chamberland quienes entre los años 1881 y 1885 modificaron el curso de la historia de esta enfermedad. Las contribuciones más importantes de este grupo fueron el descubrimiento de que el material proveniente del SNC de animales enfermos es infectivo y de que los períodos de incubación se acortan notablemente cuando se inyecta material infeccioso por vía intracerebral en animales sanos, además del hallazgo de métodos para atenuar e inactivar la virulencia del agente infeccioso. Estos aportes fueron los antecedentes inmediatos y decisivos de la primera vacuna antirrábica.

A pesar de los importantes logros de Pasteur y sus colaboradores, no fueron ellos quienes reconocieron el agente causal. En 1903, Remlinger consiguió reproducir la enfermedad en conejos con material filtrado proveniente de cerebros de perros y conejos rabiosos. Fue entonces cuando se reconoció que el agente causal de la enfermedad era un virus.

Otros aportes dignos de mención son: el hallazgo de Negri, quien en 1903 distinguió los corpúsculos que llevan su nombre y que actualmente tienen significación diagnóstica y la introducción por Webster y Dawson, del método de inoculación de material infeccioso por vía intracerebral en ratones con fines diagnósticos. Fue también Webster, quien usando la prueba en ratones logró estimar por primera vez la potencia de las vacunas. En 1948, Habel diseñó un método para determinar la potencia de las vacunas, que reemplazó al propuesto por Webster y Dawson. Finalmente, Webster y Clow en 1936, lograron propagar el virus en cultivo de tejidos.

Los datos históricos fueron tomados de (1) y (2).

### 3.2.- Patogenia

La infección por virus rábico se produce habitualmente por mordedura de un animal rabioso. Sin embargo, no es ésta la única vía de entrada del virus. En el año 1962 Constantine (3), demostró experimentalmente la infección por vía aerógena, en el curso de sus investigaciones en cuevas de murciélagos en el Estado de Texas, Estados Unidos de América. Además sugirió que este modo de transmisión de la enfermedad podría contribuir a la persistencia de la infección por virus rábico en poblaciones de murciélagos, a la diseminación del virus de murciélagos a animales salvajes que frecuentan sus cuevas, e inclusive podrían en ocasiones, ser la causa de infecciones en humanos. Otro posible mecanismo de transmisión del virus de importancia en la persistencia de la enfermedad en la naturaleza, sería por ingestión de tejidos de animales rabiosos muertos. Esta posibilidad merece consideración si se tiene en cuenta que muchos de los huéspedes naturales del virus rábico son carnívoros. Correa-Giron y col. (4) demostraron infectividad de cuatro cepas de virus rábico por vía oral, de un total de cinco estudiadas; y lograron aislar el virus de una variedad de tejidos (cerebro,

mejilla, lengua, pulmones, estómago, etc.) a distintos intervalos de tiempo después de la infección.

La patogenia de la enfermedad, después de una infección clásica por mordedura, ha sido exhaustivamente estudiada. Se ha demostrado que el virus se aloja durante un período variable de tiempo en la zona de la inoculación. Este hecho se puso en evidencia cuando se observó que la enfermedad en ratones experimentalmente infectados podía prevenirse por amputación del miembro inoculado hasta 18 días después de la infección (5). En ratas inyectadas con virus calle en la almohadilla plantar de la pata trasera izquierda, fue posible prevenir la enfermedad, en algunos animales, por amputación del nervio ciático correspondiente 24 horas después de la infección; mientras que en otros, el tratamiento fue efectivo hasta 96 horas después (6).

En hamsters recién nacidos infectados por vía intramuscular en las patas traseras, se demostró replicación viral en el músculo estriado comprometido. El músculo puede representar un lugar de amplificación de la infección, o bien de secuestro del virus en infecciones con un período de incubación prolongado. El virus pasa luego a SNP a través del huso neuromuscular, segundo sitio de detección de antígeno en estos animales (7). Charlton y Casey (8)(9), utilizando técnicas de IF y ME detectaron antígeno en miocitos de zorrinos intactos o con el nervio plantar seccionado, entre 7 y 28 días después de una infección experimental. Concluyeron que las fibras musculares pueden representar un sitio de replicación; sin embargo, no pudieron afirmar que solamente el alojamiento del virus en miocitos explicara los casos de largo período de incubación.

Una vez alcanzados los nervios periféricos, el tránsito viral es centrípeto y pasivo por vía axoplásmica. Se produce más por difusión que por múltiples ciclos replicativos. Se cree, por analogía con el mecanismo descrito para el virus de la estomatitis vesicular, que está mediado por un complejo ribonucleocapsídico conteniendo transcriptasa. Este complejo podría ser parental o derivado de un número limitado de ciclos replicativos (7). Si bien no se ha logrado aún aislar la transcriptasa del virus rábico, sí pudo demostrarse su actividad (10)(11).

Sobre la base de estudios de microscopía electrónica, pudo demostrarse que la

brotación de virus calle de la membrana plasmática del axón es escasa y que el virus que brota de ella queda atrapado entre éste y la vaina de mielina que lo rodea. Estas observaciones permiten concluir que es muy limitada la cantidad de virus ofrecido como estímulo antigénico en etapas tempranas de la infección (7).

El tránsito del virus se produce entonces muy probablemente por movimiento pasivo del genoma a través del axoplasma (12), entrando a SNC por la raíz dorsal del nervio correspondiente. Puede haber producción accesoria de partículas virales a nivel de los ganglios de la raíz dorsal como mecanismo amplificador de la infección, si bien se cree que no es condición necesaria (7).

Una vez alcanzado el SNC, generalmente a través de la médula espinal, su curso ascendente hacia el cerebro es rápido (13). Estudios de microscopia electrónica muestran que se infectan fundamentalmente las neuronas y sus procesos, aunque en casos de rabia humana también puede detectarse virus en astrocitos (14) y en células de la glia (15).

La infección en el cerebro se produce inicialmente en el sistema límbico, lo que explica ciertos síntomas de la enfermedad tales como estado de alerta, pérdida de la timidez natural, conducta sexual aberrante y agresividad. Más avanzada la infección, todo el cerebro se ve afectado (7).

Una vez producida la invasión del cerebro, el virus inicia su dispersión centrífuga. El tránsito viral centrífugo puede producirse por vía axoplásmica, por el espacio intersticial o bien por infección de neuronas contiguas, después de brotar de la membrana plasmática. Tanto la vía axoplásmica como la infección de neuronas vecinas, le permiten eludir los mecanismos defensivos del huésped. Las tres alternativas le resultan eficientes para alcanzar órganos distantes, localizándose solamente en algunos de los potencialmente disponibles. Como ejemplo caben citarse, la grasa parda, el miocardio, el páncreas, las células cromafines de la glándula adrenal etc. (7).

En las glándulas salivares, la brotación del virus se produce de la membrana plasmática de las células de los acinos que enfrentan el espacio salivar. En cambio, no brota hacia las áreas basales donde se concentran las defensas del huésped. Los acinos resultan pues, un sitio de protección del virus (16)(17).

En periodos terminales de la infección también se pudo observar infección masiva de las terminaciones olfatorias y de las papilas gustativas (7).

Cuando la infección se produce por vía aerógena, la patogenia de la enfermedad difiere de la antes descrita. En cobayos recién nacidos, en ratones y en conejos experimentalmente infectados con virus calle adaptados a células de riñón de perro, se observó que el primer sitio donde puede detectarse el virus es la mucosa nasal seis días postinfección; en el cerebro recién se pudo observar el día después y posteriormente en la médula, en descenso paulatino en sentido antero posterior (18)(19). Estos hallazgos fueron confirmados mediante la infección experimental de ratones lactantes con virus fijo CVS por inhalación. Se observó replicación viral en la mucosa nasal, que precede a la invasión del córtex olfatorio, en particular del bulbo olfatorio. Una vez atacado el cerebro, la infección progresa caudalmente por la médula espinal. La dispersión centrifuga comienza luego a través de los nervios espinales. Se encontró una temprana distribución de antígeno viral en las terminaciones nerviosas de la piel de la cara, lo que evidencia que el nervio trigémino se ve tempranamente involucrado en la infección (20). En otras experiencias realizadas en ratones inoculados por vía intranasal con virus calle, pudo detectarse virus rábico en el nervio trigémino entre seis y ocho días después de la infección (21).

### 3.3.- Morfogénesis

De lo expuesto en el punto 3.2. se deduce que el virus rábico, si bien es fundamentalmente neurotrópico, es capaz de infectar distintos tipos celulares. Resulta de interés conocer cómo se produce esta infección, así como las etapas de la multiplicación viral y sus consecuencias en las células afectadas. Distintos autores han abordado este tema ya sea por estudios efectuados en cultivos celulares o en animales vivos.

#### 3.3.1.- Aspectos morfogénéticos de la infección en cultivos celulares.

Iwasaki y col. (22) estudiaron en 1973 los eventos tempranos de la infección de células BHK-21 con las cepas de virus ERA y HEP. En los primeros treinta minutos después de agregarse el virus al cultivo, se produce su acercamiento a la superficie

celular y su fagocitosis. La fusión de la membrana celular con la viral comienza por el extremo plano del virión. La fase de eclipse se alcanza a la hora de iniciada la infección, momento en el cual el único cambio morfológico observable es un aumento en el número de fagosomas en el citoplasma celular. La presencia de nucleocápsides en el mismo sólo se observa cuatro horas más tarde. A la sexta hora comienza la brotación de partículas virales, la que se produce tanto de la membrana plasmática como en vacuolas citoplasmáticas, habiéndose observado además la aparición de viriones completos libres en el citoplasma.

Hummeler y col. (23)(24) habían observado anteriormente la brotación de partículas virales de la membrana plasmática, y también ocasionalmente la acumulación de partículas virales en el citoplasma como consecuencia de una aparente "síntesis de novo" de los constituyentes de envoltura. En otros trabajos realizados con virus fijos y calle, pudo observarse brotación indiscriminada de todos los sistemas de membrana (25)(26).

Como consecuencia de la infección, se observa en células BHK-21 un efecto citopático progresivo que incluye vacuolación, condensación, destrucción de organelas citoplasmáticas y finalmente lisis celular (27). Otros tipos celulares, en cambio, no manifiestan cambios tan dramáticos. Tal es el caso de las células NIL-2 infectadas con virus PM. En este sistema, se observaron viriones que brotaban de la membrana plasmática, otros ensamblados entre las membranas del retículo endoplasmático sólo liberados por lisis, así como también viriones reunidos en pseudoinclusiones citoplasmáticas sin unión aparente a sistema de membrana alguno, lo que indicaría "síntesis de novo". Las células se recuperan de la infección viral a pesar de la presencia de inclusiones citoplasmáticas típicas. El conjunto del cultivo evoluciona hacia la cronicidad, anulándose la excreción viral hacia los veinte días postinfección (28).

Recientemente se han observado infecciones persistentes por virus rábico en cultivos de células BHK-21/13 S y HEp-2. Se detectó la liberación de partículas defectivas en ambos tipos celulares, y también se vio que las partículas virales producidas en células BHK-21/13 S habían perdido su virulencia en ratones, mientras que las producidas en HEp-2 conservaban su virulencia (29).

### 3.3.2.- Aspectos morfogénéticos de la infección "in vivo".

Rara vez se ha visto la brotación de virus rábico calle de membrana plasmática en el SNC, como tampoco su acumulación en el espacio extracelular. Como característica de la multiplicación de virus calle en el SNC, se observa que, si bien todas las células están infectadas, las partículas por célula son pocas y el daño celular, de moderado a escaso (27). En cambio, sí es común la brotación de membrana celular en glándulas salivares y la acumulación de partículas virales en las secreciones, lo que se asocia con la transmisión de la enfermedad por mordedura (30). En contraste, los virus fijos, causan una importante citopatogenicidad comparable a la observada en cultivos celulares (27).

La infección por virus rábico en el SNC se caracteriza ultraestructuralmente por el desarrollo de matrices intracitoplasmáticas granulares. Miyamoto y Matsumoto en 1965 (31) demostraron en forma concluyente que la matriz viral corresponde a los corpúsculos de Negri que se observan al microscopio óptico. Hummeler y col. (32) encontraron que la matriz consiste de cadenas nucleocapsídicas orientadas al azar, de aproximadamente 15 nm de diámetro y que se encuentra libre en el citoplasma. Las matrices virales en neuronas infectadas con virus fijos son pequeñas y no visibles con el microscopio óptico. La observación de que las neuronas de animales infectados con virus calle presentan corpúsculos de Negri grandes y numerosos, mientras que las inclusiones producidas por los virus fijos son escasas y pequeñas, podría significar de acuerdo a la interpretación de Hummeler y Koprowski (24) una expresión del grado de adaptación de una determinada cepa a un tipo celular dado.

Un sistema interesante es el de algunas cepas de virus aisladas de ciertos murciélagos mexicanos, tales como la estudiada por Baer (33) en ratones, que fuera aislada del murciélago Tadarida brasiliensis mexicana. Este virus muestra en el SNC características intermedias entre un virus fijo y un virus calle, mientras que la aislada del murciélago Desmodus rotundus que se estudió paralelamente, se comporta como virus calle. Así, se detectaron por inmunofluorescencia cantidades masivas de virus (agregados antigénicos), especialmente en el hipocampo, cerebro medio, tálamo y cerebelo. La presencia de agregados de antígeno asemeja su comportamiento al de un virus

calle, mientras que por su alta masa antigénica, su conducta es similar a la de un virus fijo. Por otra parte, se observó que su período de incubación es corto y que produce gran daño neuronal y reacción inflamatoria importante a semejanza de los virus fijos. Este virus además brota de varios sistemas de membrana, tales como la nuclear, la retículoendoplasmática y la plasmática con consecuente acumulación en el espacio extracelular, mientras que la cepa de virus aislada de Desmodus rotundus sólo brota de membranas Intracitoplasmáticas.

Los trabajos mencionados corroboran una vez más las diferencias morfogenéticas y patogénicas en el SNC entre virus fijos y calle, y ponen en evidencia la existencia de cepas virales de comportamiento intermedio entre ambos tipos.

### 3.4.- Virión rábico

#### 3.4.1.- Forma y tamaño

El virus rábico pertenece a una familia de virus que al microscopio electrónico presentan forma de bala, con un extremo cónico y el otro plano.

Numerosos autores han estudiado el tamaño de la partícula. Entre ellos, Hummeler y col. en 1967 (23) y Sokol y col., 1968 (34), citados por Sokol, 1975 (35), establecieron para cuatro cepas de virus fijo un tamaño promedio de 180 por 75 nm. Sin embargo, el tamaño de la partícula puede variar según las cepas y las condiciones de replicación. En poblaciones virales de la cepa Flury HEP (High Egg Passage) y PM (Pitman Moore), propagadas en cultivos celulares de células BHK 21/13 S aparecen frecuentemente partículas más cortas, defectivas, conocidas como partículas T (truncadas (35)).

Trabajos posteriores confirmaron esta heterogeneidad en el tamaño. Se estudió la aparición de partículas defectivas en seis cepas de virus rábico propagadas en células BHK 21, observándose que las cepas CVS, PM y Flury LEP (Low Egg Passage) daban una única población de partículas defectivas, la cepa ERA daba tres poblaciones distintas, cada una con propiedades de sedimentación características, la cepa Flury HEP daba una o dos poblaciones de partículas defectivas, mientras que la cepa Kelev no las producía. Las poblaciones defectivas halladas estaban compuestas por partículas trun-

cadav cuyo largo oscilaba entre 53,8 y 96,8 nm (36).

### 3.4.2.- Estructura

El virión está constituido por una molécula de ARN monocatenario, complementaria de la de ARN mensajero, rodeada por una cápside proteínica. Este complejo nucleocapsídico está a su vez rodeado por una envoltura lipoproteínica compuesta por una bicapa lipídica y por las proteínas de envoltura (37) (fig. 1).

#### 3.4.2.1.- Envoltura

La envoltura puede invaginarse en el extremo plano de la partícula determinando lo que se denomina canal axial. En ocasiones, puede formar un apéndice vesicular en esa misma zona que se explicaría por la avulsión excesiva de la membrana del huésped en el sitio de la brotación.

El virión presenta en su superficie proyecciones espiculares, cuyo grosor oscila entre 6 y 8 nm, que terminan distalmente en forma de botón y que no cubren el extremo plano del virión. Mediante técnicas de tinción negativa se observa que las espículas aparecen distribuidas al azar o bien ordenadas en hilera en forma de panal de abejas, reflejando una simetría subyacente (37).

Se ha considerado tradicionalmente que la envoltura del virus rábico presenta tres proteínas, las que fueron identificadas por corrida electroforética en geles de poliacrilamida. La glicoproteína (G) aparece asociada a las proyecciones espiculares, y es la única proteína superficial. Las otras dos proteínas de envoltura son  $M_1$  y  $M_2$ . Todas ellas han sido exhaustivamente estudiadas y sus pesos moleculares y proporciones relativas determinados por distintos autores. Se asigna a estas proteínas un peso molecular que varía ligeramente según la cepa de virus de que se trate y el método de purificación utilizado, y que oscila para G entre 80 000 y 65 000 D, para  $M_1$  entre 43 000 y 37 000 D y para  $M_2$  entre 25 000 y 20 000 D (38)(39)(40).

Zaidés en 1979 (39) sugiere por primera vez que  $M_1$  es una proteína asociada a la nucleocápside y no a la envoltura y la denominó entonces NS, por analogía con la del virus de la estomatitis vesicular (VSV). Estudios recientes realizados por Cox (41) confirman la teoría de que la proteína  $M_1$  estaría en realidad asociada al complejo nucleocapsídico.

## VIRION RABICO



- ⌋ Glicoproteina de envoltura
- Lipidos.
- NS (proteina asociada a la nucleocapside)
- M (proteina de envoltura)
- Nucleocapside

Figura 1

capsídico y no a la membrana, como se creía. Esto se deduce de estudios efectuados por corrida en SDS-PAGE y por técnicas de inmunoprecipitación, mientras que los esfuerzos por visualizarla en la superficie de las células infectadas, tanto por inmunofluorescencia como por inmunoelectromicroscopia, han sido infructuosos. Se trata de una proteína fosforilada, que se resuelve por corrida en SDS-PAGE en dos especies: una altamente fosforilada y la otra menos, con pesos moleculares de 42 000 y 38 000 D respectivamente.

De acuerdo a estos hallazgos, las proteínas de membrana serían solamente dos: M<sub>2</sub> o simplemente M, y G. Se considera que M podría tener una función durante el proceso de brotación; la de servir de puente entre G y el complejo nucleocapsídico. El análisis tróptico de los péptidos que la componen muestra considerables diferencias dentro de un mismo serotipo (41).

La glicoproteína aislada de virus rábico cultivado en células BHK 21 contiene 2,9% de carbohidratos, que son: manosa, galactosa, N-acetilglucosamina, ácido neurámico y fucosa (42). Presenta tres cadenas de oligosacáridos diferentes de pesos moleculares 3400, 2800 y 2500 D respectivamente. El contenido de ácido siálico en la glicoproteína del virus rábico puede variar de acuerdo a las condiciones de crecimiento, siendo menor en virus que multiplican a 37°C que en los que replican a 33°C pero siempre hay al menos una molécula de ácido siálico en cada cadena poliosídica (43).

La glicoproteína es la proteína espicular, se proyecta fuera de la membrana viral y puede ser importante en el proceso de adsorción en el ciclo infectivo (41).

La envoltura del virus rábico contiene un 24% de lípidos, siendo el colesterol el lípido neutro más abundante; la esfingomielina, fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina son los fosfolípidos más importantes (44)(45). Los ácidos grasos asociados en mayor proporción son el palmítico, esteárico y oleico (46).

#### 3.4.2.2.- Nucleocápside

La nucleocápside está compuesta por una cápside proteínica y el ácido nucleico viral. Presenta aspecto estriado, lo que se debe a que se trata de una cadena ribonucleoproteínica que da unas 30 a 35 vueltas, formando un cilindro de 50 nm de ancho y aproximadamente 165 nm de largo. La periodicidad es de 4,5 nm. Sin embargo, la nu-

cleocápside de ciertas preparaciones de partículas infectivas puede ser más corta y con menor número de vueltas (37).

Se ha detectado por separación en geles de poliacrilamida que la nucleocápside del virus rábico contiene un polipéptido mayor, la proteína N y otro menor, la proteína L. La proteína N es fosforilada, su peso molecular puede oscilar entre 54 000 y 62 000 D según la cepa de virus estudiada y el tratamiento de purificación utilizado (38)(39)(40). Representa del 30 al 34% del total de proteínas virales. Al estudiar esta proteína en distintas cepas de virus rábico por SDS-PAGE no se observaron diferencias significativas. El análisis tríptico de los péptidos también mostró gran similitud entre las cepas que pertenecen al mismo serotipo y aquellas que pertenecen a distinto serotipo (41).

La proteína L fue hallada en 1977 por Madore y England (47). Se encuentra en baja proporción y su peso molecular es de aproximadamente 200 000. Dietzschold y col. demostraron que las cepas de virus HEP y ERA contienen 17 y 37 moléculas por virión, respectivamente; mientras que las cepas CVS y PM contienen 150 y 104 moléculas por virión respectivamente. Se cree que L existe en estrecha asociación con la transcriptasa viral (41).

El genoma viral está compuesto por ácido ribonucleico de cadena simple; su densidad en  $SO_4Cs$  es de  $1,66 \text{ g/cm}^2$ . El ARN es negativo, lo que se evidencia porque no es infeccioso, porque se detecta transcripción primaria en presencia de cicloheximida y porque en el citoplasma de células infectadas aparecen cadenas de ARN cortas, poliadeniladas y complementarias del genoma (11).

Hallazgos recientes evidencian que el ARN viral tiene un coeficiente de sedimentación de 42 S y un peso molecular de  $3,83 \times 10^6$  D (48). En corrida en gel de urea ácida comigra con el ARN del virus de la estomatitis vesicular, cuyo PM fuera establecido en  $3,82 \pm 0,14 \times 10^6$  D (49). Previamente el PM del virus rábico había sido calculado en  $4,6 \times 10^6$  D por sus propiedades de sedimentación en gradientes de sacarosa (50).

#### 3.4.3.- Síntesis de proteínas virales

Flamand y Delagneau en 1978 (51) lograron establecer el orden transcripcional de

los genes que codifican cada una de las proteínas virales. De 3' a 5' el orden es N-M<sub>1</sub>(NS)-M<sub>2</sub>(M)-L. No lograron ubicar los genes que codifican la glicoproteína, pero estimaron que podrían hallarse entre M y L. De ser así, el mapa genético del virus rábico resultaría muy similar al del virus de la estomatitis vesicular.

Holloway y Obijeski (48) sugirieron en 1980 que el ARN del virus rábico era monocistrónico, es decir que se transcribe una molécula de ARN por cada proteína que va a ser sintetizada.

Coslett y col. (52) en el mismo año, confirmaron que se trata de ARN monocistrónico y que en consecuencia las proteínas virales se sintetizan independientemente y no surgen del clivaje de ningún polipéptido precursor.

Wunner en 1980 (53), logró la traducción de proteínas virales en oocitos de Xenopus laevis por microinyección de distintos ARNm obtenidos de células BHK/21/13 S infectadas con virus de la cepa ERA y posteriormente separados en gradientes de sacarosa. Identificó las proteínas obtenidas por inmunoprecipitación con anticuerpos monoclonales antiglicoproteína y antinucleocápside. Se confirmó así una vez más la síntesis independiente de las distintas proteínas a partir de ARN monocistrónico.

Anílonis, Wunner y Curtis (54)(55) determinaron recientemente la secuencia de aminoácidos de la glicoproteína del virus de la cepa ERA por clonado en el plásmido pBR322 en Escherichia coli K 12 (X 1776) de un ADN<sub>c</sub> derivado del ARNm, que la codifica. Obtuvieron un polipéptido de 524 aminoácidos de los cuales los 19 primeros representan probablemente un polipéptido señal. La proteína sintetizada presenta una zona altamente hidrofóbica entre los residuos 440 y 461. Los autores sugieren que la región que abarca desde el residuo 440 hasta el extremo carboxiterminal constituiría el dominio de transmembrana. Pudieron localizar asimismo, cuatro sitios aceptores de carbohidratos, tres de los cuales se localizan hacia el extremo aminoterminal del segmento de transmembrana propuesto. Por otra parte, se han encontrado en la cepa ERA tres cadenas de carbohidratos (43), lo que concuerda con los sitios aceptores propuestos, excepto el que se encuentra en el dominio citoplasmático.

#### 3.4.4.- Composición antigénica

Las partículas de virus rábico presentan dos grupos antigénicos principales.

El primero, asociado a la superficie viral, está constituido por la glicoproteína y el segundo por la nucleoproteína interna.

La glicoproteína, asociada a proyecciones espiculares en la superficie externa del virión, es el antígeno principalmente responsable de la infectividad, la actividad hemaglutinante y la formación de anticuerpos neutralizantes (específicos de serotipo), así como de conferir inmunidad frente a la infección letal por virus rábico (56) (57) (58).

La formación de anticuerpos inmunoprecipitantes e inmunofluorescentes y el 77% de la actividad fijadora de complemento están relacionadas en cambio con el antígeno ribonucleoproteínico (56) (57), el cual es específico de grupo, común a todos los virus rábicos (56).

Dada la importancia de la glicoproteína del virus como antígeno protector, se han hecho numerosos esfuerzos para aislarla y purificarla. Mediante el tratamiento del virus con Triton X-100 Dietzschold, Cox y col. tuvieron éxito en ese intento. La glicoproteína resultante fue antigénica pero perdió su capacidad hemaglutinante (58) (59). Posteriormente, consiguieron intercambiar el Triton X-100 por un detergente no iónico fácilmente eliminable por diálisis, lo cual les permitió recuperar la actividad hemaglutinante y obtener un antígeno de capacidad protectora comparable a la de una vacuna de virus inactivado (60). Sin embargo, la respuesta inmunológica es más lenta que la de las vacunas de viriones completos, lo que podría deberse a la mayor complejidad conformacional de éstos, posiblemente por la asociación de G a los lípidos de membrana (61).

Recientemente, Anilionis y col. (54) (55), utilizando la ingeniería genética, establecieron la secuencia de aminoácidos de la glicoproteína. Gracias a este conocimiento y al desarrollo de la técnica de anticuerpos monoclonales, se están conociendo los determinantes antigénicos de la glicoproteína. Con esta técnica se pueden detectar diferencias antigénicas tan pequeñas como las resultantes del cambio de un único aminoácido en la secuencia total, pudiendo éste afectar drásticamente la infectividad del virus (62).

Estudios recientes por digestión de la glicoproteína con bromuro de cianógeno,

permitieron determinar que tres de los péptidos obtenidos en condiciones reductoras son capaces de inducir la formación de anticuerpos neutralizantes en ratones, lo que indica la presencia de por lo menos tres epitopes a los que se unen los anticuerpos (63).

Lafon y col. (64) estudiaron la capacidad de neutralización de distintas cepas de virus mediante una batería de anticuerpos monoclonales antiglicoproteína. Sobre la base del espectro de neutralización obtenido, diseñaron un mapa funcional de los determinantes antigénicos de la glicoproteína. Establecieron para el virus CVS la existencia de tres sitios antigénicos principales, de los cuales el II y el III estarían muy próximos entre sí y serían de carácter complejo, con tres y dos subregiones antigénicas respectivamente. Un análisis similar realizado por los mismos autores con la cepa ERA, evidenció la existencia de cuatro sitios antigénicos. Estudios preliminares con virus calle sugieren la existencia de variantes antigénicas que se localizan en los sitios I, II y III detectados para CVS; no obstante, es poco lo que hasta ahora se sabe al respecto. Actualmente se está trabajando para esclarecer qué péptido de los obtenidos con bromuro de cianógeno corresponde a cada sitio antigénico hallado.

En sobrenadantes de cultivos infectados con virus rábico, suele encontrarse una glicoproteína soluble ( $G_s$ ) de peso molecular 61 000, por lo que era de interés establecer si constituía un buen inmunógeno. Dietzschold, en 1983 (65) demostró en forma concluyente que su secuencia de aminoácidos es idéntica a la de la glicoproteína, faltándole solamente un fragmento de 58 aminoácidos en el extremo carboxiterminal. Si bien  $G_s$  se une a los anticuerpos monoclonales dirigidos contra los cuatro epitopes de la glicoproteína de la cepa ERA, su actividad protectora frente a infección letal por virus rábico es muy baja. Esta limitada inmunogenicidad muy probablemente se deba a la mayor solubilidad de  $G_s$  con respecto a  $G$  y a su incapacidad de formar agregados. Otra explicación posible sería que el fragmento hidrofóbico ausente en  $G_s$ , ejercería un efecto adyuvante en la respuesta inmunitaria.

#### 3.4.5.- Relaciones antigénicas

Tradicionalmente se consideraba que el virus rábico constituía una única especie

antigénica. Este concepto de unidad antigénica fue revertido por Shope y col. en 1970 (66), quienes demostraron que el virus rábico pertenece a un grupo de virus serológicamente relacionados pero distinguibles entre sí. Este grupo constituye el género Lyssavirus y comprende a los virus rábico, Lagos Bat, Mokola, Duvenhage, Obodhiang y Kotonkan, siendo el rábico la especie tipo (67).

Las relaciones serológicas entre estos virus y el rábico pueden ponerse en evidencia por pruebas tradicionales tales como las de seroneutralización, fijación de complemento, inmunofluorescencia y de protección cruzada. Estas técnicas permitieron determinar que los virus rábico, Mokola, Lagos Bat y Duvenhage están estrechamente relacionados, mientras que la relación serológica existente entre el virus de la rabia y los virus Obodhiang y Kotonkan sólo se detecta mediante reacciones cruzadas de los dos últimos con Mokola y/o Lagos Bat (68).

El virus Lagos Bat fue aislado en 1956 del cerebro de un murciélago frugívoro (Eidolon helvum) en la isla de Lagos en Nigeria (69). No se observaron corpúsculos de Negri en cerebros de perros ni ratones, pero sí en cerebros de monos infectados. Este virus fue patógeno para ratones adultos por vía intracerebral, pero no por vía intraperitoneal. Los perros y monos rhesus infectados por vía intracerebral murieron de una enfermedad similar a la rabia (68).

El virus Mokola fue aislado en 1968 de tejido nervioso de tres musarañas (Crocidura sp.) capturadas cerca de Ibadan en Nigeria. También se pudo aislar de los cerebros de dos niños con una enfermedad del SNC (70)(71). Su patogenicidad en animales es similar a la del virus Lagos Bat. Se hallaron corpúsculos de Negri en cerebros de monos rhesus, pero no en los de perros ni ratones (68). Puede infectar a personas adultas, como lo demostró la infección accidental de un laboratorista en Alemania Occidental (2).

El virus Duvenhage se aisló en 1970 en Sudáfrica del cerebro de un hombre, quien desarrolló una enfermedad similar a la rabia después de haber sido mordido en el labio por un murciélago (2).

El virus Obodhiang fue aislado de mosquitos (Mansonia uniformis) en el Sudán en tres ocasiones diferentes (2). Este virus, al igual que el Kotonkan, presenta la rara característica de infectar a artrópodos. Además se multiplica en monocapas de células

de insectos sin adaptación previa (68). No se ha asociado aún con enfermedad clínica alguna (2).

El virus Kotonkan fue aislado en 1967 de Culicoides, en Ibadan, Nigeria. Podría ser el agente causal de una fiebre de los bovinos en ese país, en donde también se ha detectado actividad neutralizante de este virus en el suero de bovinos, roedores, ovejas y caballos (72).

Pruebas serológicas tales como las de protección cruzada, neutralización viral y estudios comparativos de cinética de neutralización han permitido obtener evidencias de la existencia de diferencias antigénicas entre distintas cepas de virus rábico (73)(74)(75). Por técnicas de contraelectroforesis en experiencias con sueros adsorbidos y no adsorbidos se pudo detectar la existencia de distintos determinantes antigénicos entre las cepas del virus CVS y dos cepas de virus calle: una aislada de mangosta y la otra de un murciélago hematófago capturado en la isla de Apipé. Los autores proponen como alternativa, la existencia de diferencias cuantitativas de los mismos determinantes entre estos virus (76).

Actualmente la técnica de anticuerpos monoclonales permite detectar pequeñas diferencias antigénicas en los distintos epitopes ya sea de la glicoproteína como de la nucleocápside viral. Hasta el advenimiento de esta técnica se creía que la nucleocápside constituía el antígeno común del grupo. Su uso puso en evidencia por ejemplo, diferencias antigénicas a nivel de la nucleocápside entre el virus HEP y otros virus fijos (77).

El uso conjunto de una batería de anticuerpos monoclonales antinucleocápside y antiglicoproteína, permite diferenciar los virus rábicos de los virus relacionados, así como distintas cepas de virus rábicos entre sí. Esta es pues, una técnica de máximo valor diagnóstico (77)(78).

El estudio por la misma técnica, de numerosas cepas de virus rábicos aislados de distintas especies animales y en distintas áreas geográficas sugiere la posibilidad de que las diferencias antigénicas observadas estén relacionadas con el huésped que afectan y el área geográfica particular en la que se aislaron (79)(80). De ser así, la adaptación de una cepa dada a un nuevo huésped podría estimular la aparición de va-

riantes antigénicas (79). Por otro lado, pudo determinarse que los virus de origen africano presentan por lo menos un determinante antigénico mayor común, lo que permitió a Schneider establecer que dos cepas de virus aisladas en el norte de Alemania de murciélagos de origen desconocido, eran en realidad africanas (80).

#### 3.4.6.- Ubicación taxonómica

Familia: Rhabdoviridae

Género: Vesiculovirus

Especie tipo: Virus de la estomatitis vesicular (VSV) serotipo Indiana

Otros miembros: Estomatitis vesicular (subtipos y serotipos)

- Argentina

- Brasil (Alagoas)

- Cocal

- New Jersey

Chandipura

Isfahan

Piry

Género: Lyssavirus

Especie tipo: Virus rábico

Otros miembros: Duvenhage

Lagos Bat

Mokola

Kotonkan

Obodhiang

Existe además un considerable número de virus que muy probablemente pertenecan a esta familia, pero cuyo género no ha sido aún establecido. Cabe citar entre otros al virus de la fiebre efímera bovina, el Kern Canyon, el Navarro y el Sigma (67).

#### 3.5.- La enfermedad en el hombre

La rabia es una enfermedad que se presenta en todos los continentes exceptuando Australia y la región antártica. En muchos países, su epidemiología está correlaciona-

da con la epizootiología en animales domésticos. Al controlarse la enfermedad en éstos, el número de casos humanos se reduce drásticamente, persistiendo sólo una baja proporción causados por mordeduras de animales salvajes.

Toda persona que entra en contacto físico con un ambiente que contiene virus rábico vivo, se considera expuesta. Si este virus es introducido en su organismo, deviene infectada. Como consecuencia de la infección, puede o no desencadenarse la enfermedad, dependiendo de numerosos factores, tanto del animal transmisor como del huésped (81). Una vez declarada la enfermedad en el hombre, es casi siempre fatal. No obstante, se han informado algunos casos de recuperación en humanos (82)(83).

El curso clínico de la enfermedad puede dividirse en cinco etapas: período de incubación, pródromo, fase neurológica aguda, coma y muerte.

El período de incubación oscila entre veinte y noventa días en la mayoría de los casos, aunque los hay excesivamente cortos (nueve días) y también largos (hasta 23 meses) (84)(85). Durante este tiempo no se observan otros síntomas que no sean molestias locales propias de la herida o debidas al tratamiento postexposición.

Los primeros síntomas aparecen durante el pródromo y son bastante inespecíficos, tales como malestar general, anorexia, dolor de cabeza y fiebre. Puede presentarse además dolor o parestesia en el sitio de la exposición. La fase neurológica aguda comienza habitualmente diez días después de los primeros síntomas con claros signos de afección del SN, tales como hiperactividad, desorientación, alucinaciones, trastornos de conducta y parálisis. Aproximadamente el 50% de los casos manifiestan hidrofobia. Gradualmente, la parálisis deviene el síntoma predominante. Esta puede ser difusa y simétrica, o ascendente como en el síndrome de Landry-Guillén-Barré, hasta producirse la parálisis respiratoria.

El paciente finalmente cae en estado de coma, el que puede durar desde horas hasta meses. La muerte se produce habitualmente por paro respiratorio o bien por complicaciones derivadas del coma (81).

### 3.5.1.- Respuesta inmune

La respuesta inmunitaria a la infección por virus rábico en el hombre es poco conocida. El curso lento de la enfermedad debería permitir la puesta en marcha de todos

los mecanismos defensivos del huésped. Sin embargo, el resultado final es casi invariablemente un fracaso.

Dadas las características de la infección por virus rábico, puede pensarse que el desenlace casi siempre fatal se podría deber a una respuesta inmunitaria tardía e ineficaz (7). Por otra parte, experiencias de laboratorio sugieren la posibilidad de que también estén involucrados fenómenos inmunopatológicos (86).

Si se tiene en cuenta la patogenia de la enfermedad, cabe pensar que se produce un ocultamiento eficaz del virus respecto de los mecanismos defensivos del huésped dado que: 1) la brotación a nivel de membranas plasmáticas es muy escasa, 2) el escaso virus liberado es rápidamente removido por la infección de células vecinas, 3) el limitado número de partículas que pueda brotar de la membrana plasmática del axón queda retenido en la vaina de mielina circundante y 4) no hay citopatología evidente que pueda estimular reacción inflamatoria ni en el tejido nervioso ni en tejidos extra-neurales, hasta muy avanzada la infección. Cuando se alcanzan los estadios terminales de la enfermedad, la cantidad de partículas virales liberadas es masiva, coincidiendo con la aparición de altos títulos de anticuerpos. Se han informado títulos de anticuerpos excepcionalmente altos en casos de remisión y recuperación de la enfermedad (82)(83).

Por otra parte, experiencias realizadas por Guillon y Tsiang (86) infectando con virus calle por vía periférica a ratones normales y atímicos, demostraron en este modelo experimental que el porcentaje de mortalidad, el título viral en el SNC y la dispersión de muertes en el tiempo es mayor en animales atímicos. El período de incubación es más largo en ratones atímicos que en los normales, y la sintomatología diferente, observándose caquexia progresiva en vez de una verdadera parálisis. Experiencias realizadas por Smith y col. (87) en ratones normales e inmunosuprimidos con ciclofosfamida, infectados por vía periférica con virus calle, mostraron que si bien la inmunosupresión aumentaba el porcentaje de mortalidad, al mismo tiempo retrasaba la aparición de síntomas y el momento de la muerte. Los animales se paralizaban al restablecerse la respuesta inmunitaria, y la transferencia pasiva del suero hiperinmune precipitaba la muerte. Estos resultados sugieren que la respuesta inmunitaria del hués-

ped a la infección del SNC por virus rábico puede ser un factor importante en el desenlace de esta enfermedad.

Mediante la administración de inmunoglobulina anti-interferón Guillon y Tsiang (86) lograron poner en evidencia la producción de pequeñas cantidades de interferón (no detectables por métodos in vitro) durante la infección parenteral de ratones con virus calle. El tratamiento de los animales con inmunoglobulina anti-interferón aumentó la mortalidad tanto en ratones normales como atímicos y acortó el período de incubación de estos últimos.

Estos mismos autores consideran que además de los fenómenos expuestos precedentemente, el desenlace fatal de la enfermedad debe relacionarse con algún mecanismo de disfunción neuronal todavía no identificado, desencadenado directa o indirectamente por la infección viral y subrayan la necesidad de ahondar más en los posibles mecanismos inmunológicos y moleculares involucrados (88).

### 3.5.2.- Profilaxis

La profilaxis de la rabia en el hombre, contrariamente a lo que ocurre en otras enfermedades, se realiza habitualmente después de la exposición al virus. Esto es posible dado a que el mismo permanece en el sitio de la mordedura o en sus inmediaciones durante un período de tiempo variable y generalmente suficiente (7).

Sólo aquellas personas con alto riesgo de exposición, tales como veterinarios, personal de laboratorio, etc. reciben un tratamiento preventivo consistente en un limitado número de dosis de vacuna.

En caso de mordeduras severas, en zonas tales como las manos, cuello o cara, la sola administración de vacunas puede no asegurar protección. Este hecho fue demostrado en un estudio realizado en Irán en 1953 (89) citado por Wiktor (90), en el cual se comprobó que en personas mordidas en la cara o en la cabeza y tratadas con vacuna, la mortalidad alcanzó un 42%. Comparando estos resultados con la mortalidad observada en personas severamente mordidas y no tratadas, los autores concluyeron que no había diferencias significativas.

El Comité de Expertos en Rabia de la Organización Mundial de la Salud (91) estableció luego de un estudio de campo hecho en Irán en 1954 (92) la importancia incuestionable de administrar suero antirrábico en combinación con la vacuna, para lograr protección después de una exposición severa. El uso de suero hiperinmune de origen heterólogo está siendo reemplazado paulatinamente por inmunoglobulinas específicas de origen homólogo, actualmente disponibles en el comercio.

### 3.5.2.1.- Tipos de vacunas

#### a- Vacunas preparadas en tejido nervioso de animales adultos

La primera vacuna antirrábica fue obtenida por Pasteur, Roux y Chamberland en 1884 (93). El virus, inicialmente aislado del cerebro de una vaca, sufrió noventa pasajes en cerebro de conejos. Esto acortó el período de incubación de la enfermedad, el cual se estabilizó o "fijó" en siete días. Esta cepa de virus adaptada a conejos y con un período de incubación constante se conoció como virus fijo, y se utilizó para la producción de vacuna.

La vacuna se preparaba por desecado de médula espinal de conejos infectados con el virus fijo. Las médulas se dejaban secar al aire hasta la inactivación total del virus en aproximadamente 15 días. El esquema de inmunización empleado por Pasteur y sus colaboradores consistía en la aplicación de una dosis diaria durante 15 días, comenzando por una suspensión de médula desecada durante 15 días, luego 14 y así sucesivamente hasta terminar con la administración de una suspensión de médula no tratada (virus infeccioso). Fue con esta vacuna que se hizo el primer tratamiento antirrábico en el hombre (94) (95).

Posteriormente surgieron otras vacunas también producidas en tejido nervioso de animales adultos, tales como la de Fermi (96), Hempt (97) y Semple (98). La primera de estas preparaciones es una suspensión acuosa al 5% de tejido cerebral de oveja parcialmente inactivada con fenol. Actualmente el uso de vacunas parcialmente inactivadas en el hombre, está contraindicado por la Organización Mundial de la Salud (99). La vacuna tipo Hempt se inactivaba originalmente con éter y por lo común se terminaba

de inactivar con fenol. La vacuna tipo Semple todavía se usa en algunos países para tratamiento postexposición. Originalmente era una suspensión de tejido cerebral de oveja; actualmente también se usan como sustrato otros animales (por ejemplo conejos). El virus se inactiva totalmente con fenol, betapropiolactona o luz ultravioleta.

Las vacunas preparadas en tejido nervioso son inmunógenos eficaces, sin embargo presentan la gran desventaja de ocasionar reacciones posvacunales en un alto número de casos, muchos de los cuales son de máxima gravedad. Esto se debe a la presencia de un factor encefalitogénico asociado a la mielina (94)(100).

#### b- Vacunas preparadas en tejido aviar

Una de las vacunas recomendadas por la Organización Mundial de la Salud para uso humano en tratamientos pre y postexposición, es la producida por inoculación de virus fijo en el saco vitelino de embriones de pato. La suspensión obtenida es inactivada con betapropiolactona (101). Esta vacuna es ampliamente utilizada en los Estados Unidos de Norteamérica por considerarse relativamente exenta de factor encefalitogénico en comparación con aquellas producidas en tejido nervioso. Sin embargo, las estadísticas disponibles revelan alrededor de un 30% de reacciones posvacunales locales y sistémicas de intensidad variable, incluyendo anafilaxia y ocasionalmente trastornos neurológicos graves. En lo que respecta a su potencia antigénica y capacidad inductora de anticuerpos, es inferior a la de las vacunas producidas en tejido nervioso (94)(102).

#### c- Vacunas preparadas en tejido nervioso de animales inmaduros

Basándose en que las sustancias que causan encefalomiелitis alérgica no están presentes en los elementos neurales de embriones o animales inmaduros y en que en ellos se obtiene una rápida multiplicación viral, Fuenzalida y Palacios introdujeron la alternativa de producir vacuna antirrábica en cerebros de ratones lactantes de tres a seis días de edad (103).

Esta vacuna, según su descripción original, debe contener:

- sobrenadante de una suspensión de cerebro al 1%.
- 5 logaritmos de virus rábico fijo inactivado con luz ultravioleta

- agua destilada.
- fenol 1:1000 y tiomersal 1:10 000.

La componen tres cepas de virus rábicos:

- Cepa CVS (Challenge Virus Standard). Deriva de la cepa original de Pasteur y fue adaptada y fijada por sucesivos pasajes en cerebros de ratones.
- Cepa 51. De origen canino, aislada en Chile. El virus fue fijado por 121 pasajes en cerebro de ratones de tres a cuatro semanas de edad.
- Cepa 91. De origen humano, aislada en Chile. El virus fue fijado por 119 pasajes en cerebro de ratones de tres a cuatro semanas de edad.

Esta vacuna presenta notables ventajas respecto de las elaboradas a partir de tejido nervioso de animales adultos: tiene mayor concentración antigénica en una concentración de tejido menor, lo que disminuye marcadamente el riesgo de reacciones posvacunales. Su potencia antigénica, determinada por el método de NIH (104) es alta, y la respuesta serológica inducida en personas vacunadas buena (105)(106). A pesar de que el uso de la vacuna de cerebro de ratón lactante (CRL) ha reducido la incidencia de reacciones en personas inmunizadas contra la rabia, en América Latina se han informado casos de accidentes posvacunales, que involucran especialmente al SNP (107). En el Centro Panamericano de Zoonosis, OPS/OMS, se investigaron las posibles causas de los accidentes, comprobándose que no se debían a la presencia de virus murinos (108). Por otra parte, se aislaron pequeñas cantidades de mielina del tejido nervioso de ratones de nueve días de edad, lo que podría explicar los accidentes observados (109).

A fin de minimizar el riesgo de presencia de mielina en el material cosechado para la producción de vacuna, se introdujo una modificación en el método original descrito por Fuenzalida y Falacios (110) consistente en centrifugar la vacuna durante diez minutos a 17 000 g en lugar de hacerlo a 1900 g.

Dado que el riesgo de reacciones posvacunales se incrementa con el número de dosis administradas, se estudió además la posibilidad de reemplazar el esquema clásico de tratamiento postexposición de catorce dosis más dos refuerzos, por uno reducido de sólo siete dosis más dos refuerzos. Pudo determinarse que las respuestas serológicas inducidas por ambos esquemas son comparables (111)(112).

La vacuna CRL preparada en ratones de tres días de edad, centrifugada a 17 000 g y aplicada de acuerdo al esquema reducido de tratamiento, es de fácil producción, económica, eficaz y segura.

En la Unión Soviética, se prepararon en cerebro de ratas lactantes, vacunas similares a la desarrollada por Fuenzalida y Palacios (113). También se elaboraron otras en cerebro de conejos lactantes en Holanda (114).

d- Vacunas preparadas en cultivos celulares

En vista de que la administración de vacunas producidas en tejido nervioso acarrea un alto riesgo de reacciones adversas y que la vacuna elaborada en embrión de pato es de baja inmunogenicidad, no se escatimaron esfuerzos en desarrollar nuevos tipos de vacunas antirrábicas por propagación del virus en cultivos celulares.

Se logró adaptar distintas cepas del virus a la replicación en cultivos primarios y en células diploides humanas, por ser estos los dos tipos celulares aceptados como sustrato para producción de vacuna de uso humano (115). La obtención de este nuevo sustrato para producción de vacunas constituyó un importante avance en la historia de la lucha contra la rabia.

En la actualidad, se dispone de vacunas producidas en cultivo primario de riñón de perro, en cultivo primario de riñón de hamster sirio y en cultivo primario de riñón de feto bovino, entre otras. La potencia antigénica de estas vacunas, determinada por la prueba de NIH, es comparable a la de las vacunas de tejido nervioso (116) (117) (118).

El desarrollo por Wiktor y colaboradores de una vacuna antirrábica en células diploides humanas introdujo un nuevo avance en la historia de la prevención y el tratamiento de la rabia en el hombre (119) (120) (121).

La vacuna antirrábica obtenida en células diploides humanas (HDCS: Human Diploid Cells Strain) demostró ser altamente inmunogénica y conferir protección frente a virus calle en pruebas realizadas en monos (122) (123). Estudios preliminares hechos en seres humanos en distintos países, indicaron que la vacuna es bien tolerada y que tres dosis apropiadamente espaciadas inducen altos niveles de anticuerpos (124).

Actualmente, esta vacuna es elaborada por tres importantes laboratorios comer-

ciales de Francia, Alemania y Estados Unidos, en células WI-38 o MRC-5 y ha sido administrada a numerosos individuos en éstos y otros países. Los estudios realizados en personas vacunadas demuestran que induce una buena respuesta serológica (125)(126)(127)(128)(129), una inmunidad de duración prolongada y que la incidencia de reacciones posvacunales es baja (125)(127)(128). Hasta el presente se ha denunciado un sólo caso de síndrome de Guillén-Barré asociado a la inmunización con vacuna HDCS sobre un gran número de personas vacunadas (130).

Si bien son evidentes las ventajas de este tipo de vacuna respecto de las tradicionales, debe tenerse en cuenta que la infraestructura requerida para su producción es compleja y su costo es elevado.

### 3.5.2.2.- Mecanismos de protección postexposición

#### 3.5.2.2.1.- Respuesta humoral

Como se mencionara en el punto 3.5.2, el Comité de Expertos en Rabia de la Organización Mundial de la Salud recomienda el uso de suero o inmunoglobulina antirrábica como complemento de la vacuna después de una exposición severa al virus rábico. A pesar de la eficacia empírica del tratamiento combinado, no se conoce claramente el papel de los anticuerpos en la protección después de la exposición.

Baer y Cleary (5) estudiaron el efecto protector logrado por la inmunización pasiva de ratones 24 horas después de una infección periférica con virus calle. Observaron que, si bien los períodos de incubación se prolongaban marcadamente, los porcentajes de protección alcanzados no diferían significativamente de los obtenidos en los animales testigo. Otros trabajos en cambio, ponen en evidencia cierto grado de protección por la inmunización pasiva de ratones con suero heterólogo (131) y con inmunoglobulina G de alto título neutralizante, mientras que no se observó protección cuando se administró inmunoglobulina M de alto título neutralizante (132)(133).

El esclarecimiento de los mecanismos involucrados en la protección después de una exposición al virus rábico, comenzó con la aparición de una vacuna de gran potencia antigénica elaborada en células BHK(134). Sikes y col. en 1971 (123) demostraron la capacidad protectora de esta vacuna en monos infectados con virus calle. Encontraron que su administración simultánea con suero, no aumentaba significativamente los

niveles de protección alcanzados con una dosis única de vacuna. La administración de suero solamente, prolongaba el período de incubación sin disminuir los niveles de mortalidad. Por otro lado, no pudieron establecer correlación entre el tiempo transcurrido hasta la aparición de anticuerpos neutralizantes, el título alcanzado y la protección conferida.

Baer y Cleary (5) demostraron la eficacia de esta vacuna para proteger ratones infectados con virus calle por vía periférica. Posteriormente, los mismos autores, compararon la eficacia protectora de esta vacuna con la de otra preparada en células diploides humanas. Encontraron que sólo la vacuna producida en células BHK era capaz de proteger a los ratones, aun cuando los niveles de anticuerpos inducidos por ambas eran similares (131).

De todo lo antedicho, cabe pensar que otros mecanismos defensivos, además de los anticuerpos, pueden estar involucrados en la protección como respuesta a la vacunación después de una infección por virus rábico.

#### 3.5.2.2.2.- Interferón

La protección conferida a ratones y monos por la vacuna preparada en células BHK cuando se administró después de infectar a los animales con virus calle, estuvo relacionada con su capacidad de inducir una respuesta de interferón. Otras vacunas igualmente inmunogénicas (igual valor antigénico) producidas en células diploides humanas que no indujeron interferón resultaron ineficaces (5)(131)(135).

A partir de estos hallazgos, se efectuaron muchas experiencias tendientes a establecer la relación existente entre inducción de interferón y protección.

Wiktor y col. (136), trabajando con hamsters, encontraron que tanto la vacuna antirrábica preparada en células BHK como dos vacunas no antirrábicas (Kern Canyon e Influenza B), todas ellas capaces de inducir respuesta de interferón, protegieron a los animales cuando se las administró entre 24 horas antes y dos horas después del desafío con virus calle. En cambio, cuando se las administró siete días antes del desafío, sólo la vacuna antirrábica confirió protección a los animales, ya que fue la única que indujo la formación de anticuerpos neutralizantes. Estos resultados concuerdan con el hecho de que el interferón inducido por vacunas administradas cercanamente al

momento de la exposición, puede desempeñar un papel decisivo en la protección. Estos conocimientos, despertaron interés por investigar la capacidad de distintos tipos de vacunas antirrábicas de inducir una respuesta de interferón (137)(138). Los resultados parecen indicar que la mayoría de las vacunas antirrábicas no son buenas inductoras de interferón.

La eficacia de una vacuna administrada después de la exposición al virus rábico parece depender entonces de por lo menos dos factores:

- 1) la temprana aparición (en las primeras diez horas) de una respuesta inespecífica por interferón.
- 2) la aparición cuatro a cinco días después de una respuesta específica por anticuerpos.

Hasta el presente, sólo en la vacuna elaborada en células BHK, se pudo demostrar en forma concluyente e inequívoca la capacidad de inducir la producción de interferón. Dado que se trata de células heteroploides, el uso de esta vacuna en seres humanos está contraindicado. Se pensó entonces que el tratamiento combinado de interferón o inductores del mismo y vacunas de uso corriente podría resultar efectivo. Distintos estudios realizados en este sentido en diferentes modelos animales y condiciones de trabajo muestran que invariablemente la protección conferida por la administración de interferón exógeno y vacuna o de inductores de interferón -tales como el ácido poliriboinosínico-policitidílico- y vacuna, es mayor que la conferida por vacuna sólo y levemente superior en el segundo caso (139)(140)(141).

#### 3.5.2.2.3.- Respuesta celular

Como se mencionara precedentemente, la protección después de una exposición a virus rábico parece no poder asegurarse sólo por la presencia de anticuerpos neutralizantes, puesto que también es importante una respuesta de interferón. Por otra parte, distintos autores han estudiado la posibilidad de que se produzca una respuesta inmunitaria de tipo celular como consecuencia de la vacunación y el papel que ésta desempeñaría en la protección contra la enfermedad.

Así, Kaplan y col. (142) demostraron que cepas de virus atenuadas que en animales normales producen una infección inaparente, se volvían virulentas en ratones atímicos o experimentalmente inmunosuprimidos. Posteriormente, Wiktor y col. (143) informaron

que una fuerte respuesta citotóxica mediada por células (CMC) se genera en ratones inyectados con virus atenuado o con una vacuna inactivada. Esta reacción, que se demuestra por una prueba in vitro, está mediada por linfocitos T y se ve severamente deprimida si los animales reciben previamente suero antirrábico. Encontraron además que la respuesta de CMC detectada en el bazo de ratones infectados con cepas virulentas, era muy pobre.

Estudios posteriores del mismo grupo de investigadores, demostraron que la aparición de una respuesta citotóxica mediada por células después de una infección con virus atenuado o de vacunación, se relaciona en forma directa con la protección. Sin embargo, el momento de administración de la vacuna parece ser de fundamental importancia. Cuando se vacunaba antes o en el momento del desafío con virus calle se lograba protección, mientras que 24 horas de retraso en la vacunación, eran suficientes para que el virus ejerciera su efecto supresor de la respuesta de CMC y produjera consecuentemente una infección letal (144).

Con el fin de estudiar la respuesta de tipo celular que se produce después de la vacunación antirrábica, se aplicaron además otras técnicas como, por ejemplo, la prueba de la almohadilla plantal en ratones (145) o la transformación blástica de linfocitos periféricos de sujetos vacunados y estimulados con antígeno homólogo (146).

Las evidencias disponibles hasta el presente parecen indicar la importancia de la respuesta inmunitaria mediada por células para el éxito de la vacunación después de una exposición a virus rábico (144)(146). La aparición de células "killer" resultaría en la destrucción específica de células infectadas y el virus consecuentemente liberado, sería neutralizado por anticuerpos. Resulta menos clara la función que desempeña la temprana inducción de interferón como respuesta a la vacunación, habiéndose sugerido un posible efecto de regulación positiva de procesos celulares, incluyendo la potenciación de la respuesta de CMC (144).

Si se tienen en cuenta estos posibles mecanismos, algunos fracasos de vacunación en personas mordidas podrían atribuirse a una respuesta de tipo celular deficiente, a pesar de una respuesta humoral normal (146).

### 3.6.- Situación epidemiológica de la rabia en América

La rabia en el hombre y los animales constituye un grave problema mundial. Se presenta en todos los continentes habitados con excepción de Oceanía. Actualmente existen países libres de la infección, entre ellos Japón, en Asia, Gran Bretaña, los países escandinavos, España y Portugal, en Europa. En nuestro continente no se notifican casos en una vasta área del Caribe, Jamaica y Uruguay.

En el gráfico N°1 se observa que los casos de rabia registrados en las Américas permiten dividirla en dos grandes áreas con características muy diferentes: en la primera, que comprende el Canadá y Estados Unidos de América se ha eliminado la rabia en animales domésticos y, como consecuencia, la incidencia de la enfermedad en el hombre es mínima. Subsiste sin embargo, un problema de difícil solución como lo es la rabia en la fauna silvestre: zorrinos, zorros, murciélagos, mapaches, lobos, coyotes, gatos monteses. Estos animales además de constituir un reservorio de la enfermedad podrían transmitirla a las especies domésticas y éstas al hombre.

En la segunda área, formada por el resto de América, se observa un elevado número de casos de rabia humana y canina y un menor registro de casos en la fauna silvestre.

Esta situación persiste en la actualidad (gráfico N° 2) ya que no se ha logrado modificar sustancialmente el impacto de la enfermedad en la salud humana; sin embargo, cabe señalar algunos logros alcanzados en los últimos años:

- Se han desarrollado vacunas de mejor calidad y de producción más sencilla.
- Se han desarrollado métodos de diagnóstico más prácticos y confiables.
- Se han puesto en marcha actividades de lucha antirrábica en algunos países de la Región con éxito evidente. Cabe señalar que no se registraron casos en el hombre en Belice, Canadá, Costa Rica y Grenada desde 1971; en Chile desde 1972, en Panamá desde 1973 y en Cuba desde 1976.

En la tabla 1 se observa la situación epidemiológica de la Argentina entre los años 1972 y 1975. En el año 1976 se produjeron 5594 casos de rabia en animales y 19 casos humanos, situación dramática que motivó a las autoridades nacionales a implementar un Programa Nacional de Control de la Rabia. Las acciones se desarrollarían con

mayor intensidad en la Capital Federal y Gran Buenos Aires porque a estas áreas correspondían el 89% del total de casos notificados en el país.

El gráfico N° 3 muestra el éxito alcanzado con la aplicación intensa y sistemática de acciones prioritarias (vacunación masiva de la población canina, educación sanitaria) y de acciones complementarias (eliminación de animales callejeros, diagnóstico eficiente para la detección de focos rábicos e implementación de un estricto control de calidad de las vacunas utilizadas en las campañas) (147). Conviene destacar que en la Capital Federal no se notifican casos de rabia desde 1981 y en la Provincia de Buenos Aires los casos de rabia en animales disminuyeron de 4986 en 1976 a 20 en 1983.

En el Programa se utiliza fundamentalmente vacuna CRL producida en el país.

Tabla 1

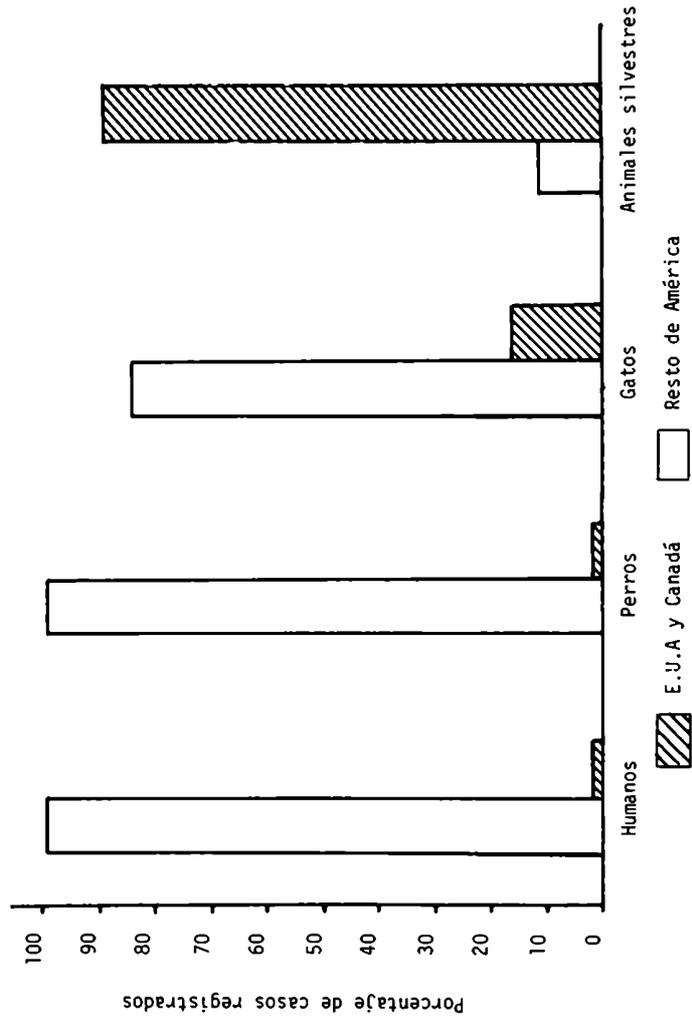
Situación epidemiológica de la rabia en Argentina, 1972-1975

Area	1972			1973			1974			1975		
	Perros	Gatos	Hu- manos									
Metropol. de Bs.As.	264	26	0	923	78	7	901	87	6	1186	110	4
La Plata y alreded.	42	2	0	59	2	0	50	6	0	281	25	0
Mendoza	137	17	1	147	21	0	138	17	1	242	37	0
Resto del país	301	5	2	235	2	5	188	4	0	162	4	1
Total	744	50	3	1364	103	12	1277	114	7	1871	176	5

Datos tomados de: V.E.R.A., Centro Panamericano de Zoonosis, OPS/OMS.

GRAFICO N° 1

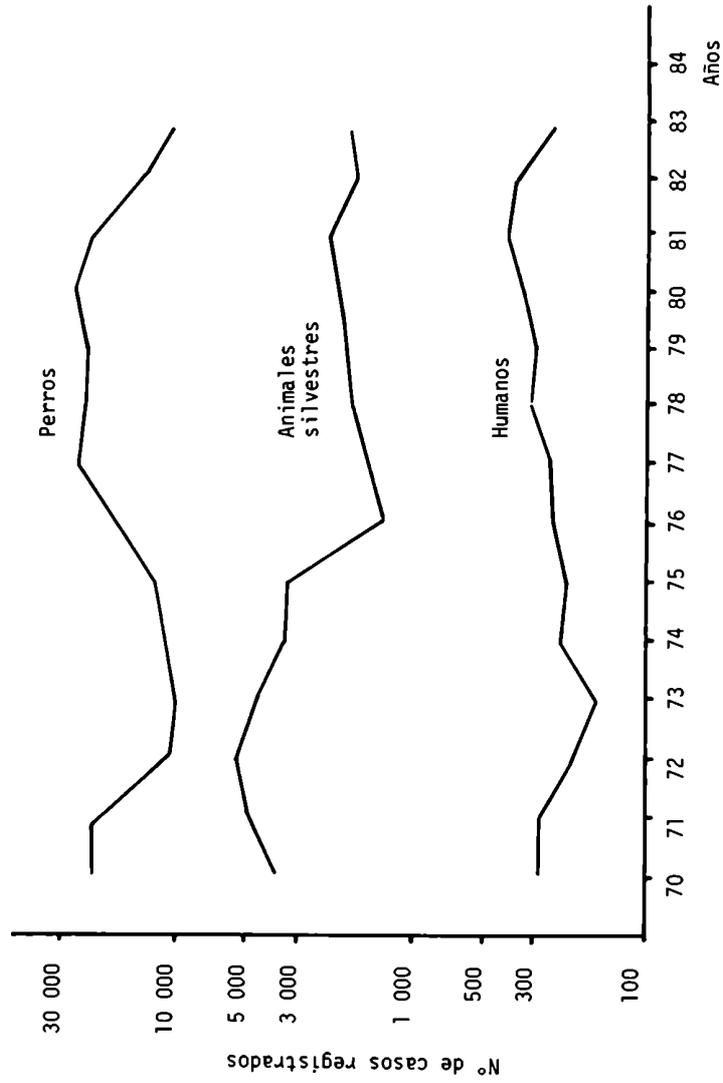
Casos de rabia en el hombre y en animales, por grandes regiones. Las Américas  
1970-1979



FUENTE: V.E.R.A. Suplemento Especial, Vol. XII, Dic. 1980  
Centro Panamericano de Zoonosis

GRAFICO N° 2

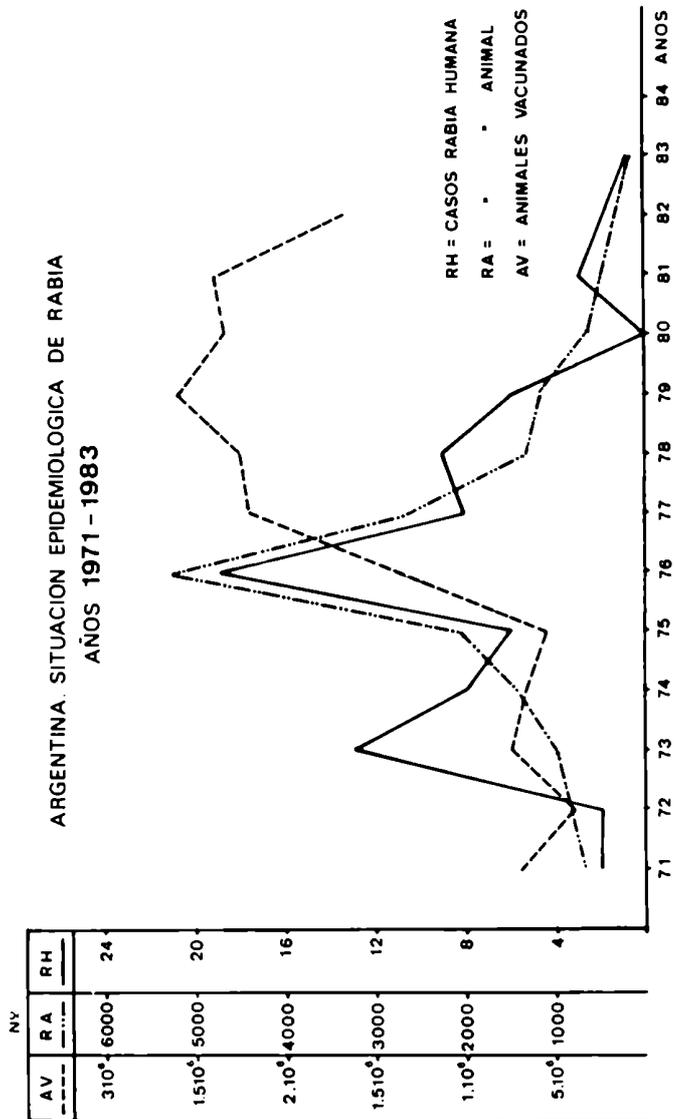
Casos de rabia en el hombre, en perros y animales silvestres. Las Américas. 1970-1984



FUENTE: V.E.R.A. Suplemento Especial. Vol. XII. Dic. 1980  
Centro Panamericano de Zoonosis

1000000

ARGENTINA. SITUACION EPIDEMIOLOGICA DE RABIA  
AÑOS 1971 - 1983



FUENTE: Díaz, Ana M.O., Segre, Liliasa. Vacunas antirrábicas. Situación epidemiológica de la rabia en la Argentina. 1er. Congreso Argentino de Inmunología. XXVII Reunión Científica. 1984.

La vacuna antirrábica tipo Fuenzalida-Palacios, se prepara en encéfalo de ratones lactantes (vacuna CRL) y se compone antigénicamente por una combinación de tres cepas de virus rábicos (CVS, 51 y 91) inactivados con luz ultravioleta. Dado que su producción es relativamente sencilla y su costo bajo, y que demostró ser eficaz en el control de la enfermedad a lo largo del tiempo, esta vacuna es ampliamente utilizada en los países latinoamericanos.

Si se tiene en cuenta que la infraestructura requerida para la elaboración de vacuna antirrábica humana en células diploides supera las posibilidades concretas de la mayoría de los países de Latino América y dados los resultados obtenidos con vacuna CRL en campañas de inmunización coherentemente organizadas, se deduce la importancia de mejorar aún más la calidad de esta vacuna que está disponible y que reúne las condiciones necesarias para lograr el control de la enfermedad en Sud América.

Ya se ha visto como la incidencia de reacciones postvacunales es mínima si se la centrifuga a 17 000 g y si se implementan esquemas reducidos de vacunación. Por otra parte, el Comité de Expertos en Rabia de la Organización Mundial de la Salud(99)(149) recomienda que las vacunas antirrábicas de uso humano sean inactivadas y se preparen con una única cepa de virus. Por ello, resulta de interés estudiar comparativamente la capacidad inmunogénica de los distintos antígenos que intervienen en la composición de la vacuna CRL a fin de esclarecer la contribución de cada uno de ellos a la inmunogenicidad de la vacuna y de determinar si eventualmente alguno puede ser eliminado de la misma.

Este estudio se llevará a cabo en tres partes:

- 1- Comparación de la capacidad inmunogénica de la vacuna CRL trivalente y las monovalentes a virus CVS, 51 y 91 frente a los virus que las componen, mediante una variedad de pruebas.
- 2- Comparación de la capacidad inmunogénica de la vacuna CRL trivalente y las monovalentes a virus CVS, 51, y 91 frente a dos cepas de virus calle aisladas de los huéspedes más comunes en los ciclos de la rabia en Argentina (rabia canina y bovina), haciendo uso de las mismas pruebas.
- 3- Capacidad de cada una de las vacunas en estudio de inducir una respuesta de interferón.

5.1.- Animales de laboratorio

- a) Se utilizaron ratones blancos de la cepa CF1, sanos de ambos sexos, lactantes y adultos; éstos últimos de entre 10 y 18 g de peso aproximadamente.
- b) Se utilizaron conejos neozelandeses lactantes y recién destetados.

5.2.- Cepas de virus rábicos5.2.1.- Virus fijos

- a) Cepa CVS: Es la cepa estándar de desafío, derivada de la original de Pasteur. Fue remitida por los Institutos Nacionales de Salud de los EE.UU. (NIH) con 31 pasajes en cerebro de ratones adultos. Se hicieron dos pasajes adicionales en el mismo huésped: el primero para preparar el virus semilla y el segundo para preparar el virus trabajo.
- b) Cepa 51: De origen canino aislada en Chile. El virus fue fijado por 121 pasajes en cerebro de ratones adultos. El virus semilla utilizado tiene 123 pasajes en cerebro de ratones adultos, se efectuó un pasaje adicional para la producción del virus trabajo.
- c) Cepa 91: De origen humano, aislada en Chile. El virus fue fijado por 119 pasajes en cerebro de ratones adultos. El virus semilla utilizado tiene 122 pasajes en cerebro de ratones adultos, se efectuó un pasaje adicional para la producción del virus trabajo.

5.2.2.- Virus calle

Las dos cepas de virus calle utilizadas en este estudio fueron gentilmente cedidas por el Dr. Oscar Larghi, jefe del Sector Rabia del Centro Panamericano de Zoonosis, OPS/OMS.

1026/80: Cepa aislada de un perro proveniente de la localidad de Merlo, Pcia. de Buenos Aires, Argentina. Fue recibida con un pasaje efectuado en cerebro de ratones adultos (CRA/1).

1426/79: Cepa aislada de un bovino en la localidad de Balcarce, Pcia. de Buenos Aires, Argentina. Fue recibida con un pasaje efectuado en cerebro de ratones adultos (CRA/1).

Ambas cepas sufrieron dos pasajes adicionales en cerebro de ratones adultos. Se preparó una suspensión al 20% de los cerebros cosechados en el segundo pasaje (CRA/2) y una suspensión al 40% con los cerebros cosechados en el tercer pasaje (CRA/3).

Los pasajes de virus se efectuaron de acuerdo al procedimiento indicado en el punto 5.3., el diluyente utilizado en la preparación de las suspensiones se indica en el anexo punto 10.1.

Se controló la esterilidad e infectividad de todas las suspensiones virales tal como se describe en el punto 5.5. La titulación de virus se efectuó tanto por vía intracerebral como intramuscular en ratones adultos. La titulación por vía IM se efectuó por inoculación de los ratones en la pata trasera derecha con una dosis de 0,2 ml. El período de observación de los animales fue de 28 días para los virus calle y de 14 para los fijos. Todas las suspensiones pasaron satisfactoriamente la prueba de esterilidad. Los títulos alcanzados por ambas vías para las suspensiones virales se muestran en la tabla 2, pág. 46.

### 5.3.- Producción de virus rábicos en ratones

#### 5.3.1.- Producción de virus semilla

- Se inocularon 50 ratones de entre 10 y 14 gr. de peso por vía intracerebral, con un volumen de 0,03 ml. conteniendo 100 DL50% de virus original.
- Se cosecharon los cerebros al alcanzar los animales el estado de postración.
- Se preparó una suspensión de cerebro al 20% p/v en diluyente agua-sacarosa-gelatina, descrito en el anexo punto 10.2.
- Se centrifugó 10 minutos a 1000 x g en centrífuga refrigerada.
- Se distribuyó el sobrenadante en ampollas a razón de 0,5 ml. en cada una.
- El producto se liofilizó.
- Se efectuaron controles de esterilidad, identidad e infectividad según se describe en el punto 5.5. Los resultados fueron satisfactorios.

#### 5.3.2.- Producción de virus trabajo

- La suspensión de virus trabajo se preparó a partir de una ampolla de virus semilla liofilizado siguiendo la técnica descrita en el punto 5.3.1.
- El diluyente utilizado en la preparación de la suspensión fue suero equino al 2% en agua destilada, según se detalla en el anexo punto 10.1.
- Las ampollas de virus trabajo se mantuvieron congeladas a -70°C.
- Se efectuaron controles de esterilidad, identidad e infectividad según se describe en el punto 5.5. Los resultados fueron satisfactorios.
- Las suspensiones virales se titularon además por vía IM.

- Los títulos hallados por vía IC e IM figuran en la tabla 2, pág.46.

#### 5.4.- Elaboración de vacunas antirrábicas

##### 5.4.1.- Vacuna de referencia (148)

Se trata de una suspensión al 10% de cerebro de conejo infectado con virus rábico fijo Pasteur (Production Virus: PV), inactivada con luz ultravioleta y liofilizada.

- Se inocularon 20 conejos jóvenes por vía intracerebral con 0,2 ml. de virus PV conteniendo 1000 DL50%.
- Se cosecharon los cerebros al alcanzar los animales el estado de postración.
- Se preparó una suspensión al 20% p/v con agua bidestilada estéril tamponada, pH 7, adicionada de antibióticos. Ver anexo punto 10.3.
- Se centrifugó en centrifuga refrigerada 10 minutos a 500 x g, y se separó el sobrenadante.
- Se tomó muestra para efectuar controles de esterilidad y de infectividad, de acuerdo al procedimiento descrito en el punto 5.5. Ambos controles fueron satisfactorios. El título viral alcanzado fue 6,43.
- Se inactivó la suspensión viral por pasaje a través de un esterilizador de plasma de flujo continuo, a una velocidad de 60 ml/min.
- La suspensión inactivada se diluyó con un volumen igual de agua bidestilada estéril, pH 7 adicionada de sacarosa al 15% y gelatina al 1%.
- Se tomó muestra para controles de esterilidad, toxicidad y ausencia de virus vivo residual descritos en el punto 5.5. Los resultados fueron satisfactorios.
- La vacuna al 10% se distribuyó con jeringa automática en volúmenes de 2 ml. en ampollas de liofilización.
- Se congeló inmediatamente y se liofilizó.

##### 5.4.2.- Vacuna de cerebro de ratones lactantes

###### 5.4.2.1.- Vacunas monovalentes

Se prepararon las siguientes vacunas monovalentes:

- a) Dos lotes de vacuna monovalente al 1% a virus de la cepa CVS.
- b) Dos lotes de vacuna monovalente al 1% a virus de la cepa 51.
- c) Dos lotes de vacuna monovalente al 1% a virus de la cepa 91.

- Se descongelaron suspensiones de virus trabajo de cada una de las cepas requeridas y se diluyeron hasta contener aproximadamente 100 DL50% (dilución del inóculo).
- Se inyectaron ratones lactantes menores de 4 días de edad con 0,01 ml. de inóculo por vía intracerebral.
- Se sacrificaron los animales 96 hs. después de la inoculación. Se extrajeron los cerebros, los que se conservaron congelados a -70°C hasta el momento de producir vacuna.
- Se descongelaron parcialmente los cerebros.
- Se preparó una suspensión de tejido al 10% en agua bidestilada pH 7 fría y estéril, ver anexo punto 10.3.
- Se centrifugó en centrifuga refrigerada 10 minutos a 2000 x g; se separó y midió el sobrenadante completando con agua bidestilada pH 7 al volumen original.
- Se tomaron muestras para efectuar controles de esterilidad y de infectividad, de acuerdo al procedimiento descrito en el punto 5.5.
- Se efectuó una dilución al medio de la suspensión viral con agua bidestilada pH 7, a fin de obtener una concentración del 5%.
- Se inactivó la suspensión viral al 5% por pasaje a través de un esterilizador de plasma de flujo continuo, a una velocidad de 250 ml/min.
- La suspensión inactivada se diluyó cinco veces en agua bidestilada estéril, pH7 adicionada de fenol, merthiolate y glucosa en concentraciones finales de 0,1, 0,01 y 5% respectivamente.
- Se tomó muestra para controles de esterilidad, toxicidad y ausencia de virus vivo residual (punto 5.5.).
- Todas las vacunas se fraccionaron en volúmenes de 50 y 100 ml.
- Se retiró muestra para efectuar el control de potencia de las vacunas producidas. Los resultados obtenidos figuran en el punto 6.1.1.

#### 5.4.2.2.- Vacuna trivalente (149)

Se prepararon dos lotes de vacuna trivalente al 1% con cantidades equivalentes de virus CVS, 51 y 91, siguiendo la técnica descrita en el punto 5.4.2.1. La potencia antigénica promedio de ambos lotes figura en el punto 6.1.1.

## 5.5.- Controles de calidad

### 5.5.1.- Control de esterilidad

#### a) Previo a la inactivación

Se inocularon 5 tubos conteniendo 9 ml. de caldo tioglicolato cada uno, con cada una de las muestras a probar. Se sembró 1 ml. de producto en el primer tubo y se efectuaron a partir de éste 4 diluciones seriadas razón diez en los siguientes. Se incubaron durante 14 días a 37° C. El resultado se consideró satisfactorio al no observarse desarrollo bacteriano más allá de la dilución 10<sup>-2</sup>.

#### b) Posterior a la inactivación

Se inocularon tubos conteniendo 9 ml. de caldo tioglicolato y estrías de agar sabouraud, por duplicado para cada muestra a controlar. Las temperaturas de incubación fueron 37 y 22°C. respectivamente, y el período de observación fue de 14 días. El resultado se consideró satisfactorio al no observarse desarrollo bacteriano o fúngico en ningún tubo.

### 5.5.2.- Control de identidad

Permite descartar en la suspensión viral, la presencia de virus neurotrópicos distintos del rábico.

- Se preparó una dilución 10<sup>-3</sup> de la suspensión viral.
- Se tomaron 0,5 ml. de la misma y se mezclaron con 0,5 ml. de suero antirrábico hiperinmune sin diluir.
- La mezcla se incubó durante 90 min. a 37°C.
- Se inoculó por vía IC, en dosis de 0,01 ml. en cada uno de 8 ratones lactantes y de 0,03 ml. en cada uno de 8 ratones adultos.
- Los animales se observaron durante 30 días. Los resultados se consideraron satisfactorios al no observarse síntoma alguno de enfermedad en los mismos.

### 5.5.3.- Control de infectividad

- Las titulaciones de virus se efectuaron en ratones adultos de entre 14 y 18 grs. de peso.

- Se efectuaron 8 diluciones seriadas razón diez a partir de la suspensión de tejido original (suspensión al 20%) usando como diluyente suero equino al 2%. Ver anexo punto 10.1.
- Las diluciones de virus se mantuvieron en baño de hielo durante todo el procedimiento.
- Grupos de diez ratones por cada dilución se inocularon con dosis de 0,03 ml. por vía IC.
- Los animales se observaron durante 14 días, registrándose diariamente los síntomas y muertes producidos.
- El título viral se calculó aplicando el método de Reed y Muench.

#### 5.5.4.- Control de toxicidad

- Se inocularon 10 ratones adultos por vía IP con 0,5 ml. de cada una de las vacunas a probar.
- Los animales se observaron durante 7 días, las vacunas se consideraron satisfactorias si no se observaban alteraciones, descenso de peso o mortalidad.

#### 5.5.5.- Control de ausencia de virus vivo residual

- Se inocularon grupo de 20 ratones lactantes por vía intracerebral con 0,01 ml. de cada una de las vacunas a probar.
- Se inocularon también grupos de 10 ratones adultos por vía IC con 0,03 ml. de cada una de las vacunas a probar.
- Todos los animales se observaron durante 14 días, las vacunas se consideraron satisfactorias al no observarse muertes o síntomas de rabia.

#### 5.5.6.- Control de potencia antigénica: Prueba NIH (104)

Se efectuaron 4 diluciones seriadas razón 5 (1:5 a 1:625) en solución salina tamponada pH 7,6 (anexo punto 10.4) de cada una de las vacunas a probar y de una vacuna antirrábica de referencia (CPZ lote 19).

- Todas las diluciones se mantuvieron en baño de hielo.
- Se inocularon 0,5 ml de cada dilución de vacuna partiendo de la más diluida, a 16

ratones, por vía IP.

- Se separó un grupo de 40 ratones no vacunados para control del virus de confrontación.
- La inmunización se repitió una semana más tarde.
- Dos semanas después de la primera inmunización todos los ratones vacunados y 10 animales control fueron desafiados por vía IC con una dosis de 0,03 ml. de una dilución de virus CVS conteniendo teóricamente entre 5 y 50 DL50%. Se usó como diluyente suero equino al 2% (anexo punto 10.1.).
- Se prepararon además tres diluciones decimales a partir de la de confrontación, y se inocularon por vía IC, 10 ratones con cada una de ellas, comenzando con la dilución mayor.
- Todas las diluciones de virus se mantuvieron en baño de hielo durante todo el procedimiento.
- Todos los animales se observaron durante 14 días, registrándose diariamente la evolución de los síntomas y las muertes producidas.
- Se determinó mediante el método de Reed y Muench, la dilución de cada vacuna problema y la de la vacuna de referencia que protegió al 50% de los ratones vacunados. Estos valores se denominaron: Dosis efectivas 50% (DE50).
- El valor antigénico (VA) de las vacunas problema (VP) se calculó dividiendo la DE50 de cada una de ellas por la DE50 de la vacuna de referencia (VR). Para considerar que las vacunas a probar pasaban satisfactoriamente la prueba, este valor antigénico debió ser igual o mayor que el requisito mínimo de potencia de la vacuna de referencia (RMP CPZ/19 = 0,3).
- Se determinó además la dosis de virus de desafío utilizada en la prueba mediante el método de Reed y Muench. Para que la prueba se considerara válida, se exigió que la dosis de desafío contuviera entre 5 y 50 DL50%.

#### 5.5.7.- Estandarización de la vacuna antirrábica de referencia (148)

- El control de potencia de la vacuna antirrábica de referencia CPZ/19 se realizó siguiendo la técnica NIH que se describe en el punto 5.5.6, por comparación con una vacuna de referencia internacional NIH lote 171.

- El requisito mínimo de potencia de la vacuna CPZ/19 se calculó por comparación con el requisito mínimo de potencia de la vacuna de referencia internacional, aplicando la siguiente fórmula:

$$R_{(CPZ/19)} = \frac{R_{(NIH)} \times VA_{(NIH)}}{VA_{(CPZ/19)}}$$

siendo el VA (NIH) por definición = 1

- El requisito mínimo de potencia hallado para la vacuna antirrábica de referencia CPZ/19 como promedio de 4 titulaciones fue 0,3.

#### 5.6.- Determinación de anticuerpos

##### 5.6.1.- Técnica de seroneutralización (151)

- Todos los sueros se inactivaron durante 30 minutos a 56°C.

- Los sueros se diluyeron seriadamente (razón 5), usando como diluyente SEN 2% (anexo punto 10.1). Las diluciones iniciales de suero probadas oscilaron entre 1:2,5 y 1:7812,5.

- Se hizo una dilución de virus CVS al 20% en SEN 2% tal que contuviera 60 DL 50% teóricas.

- Esta dilución de virus se distribuyó en volúmenes de 0,2 ml. en cada uno de los tubos que contenían ya 0,2 ml. de cada dilución de suero. De esta manera las diluciones de suero se elevaron al doble (1:2,5 a 1:5) y las dosis de virus bajaron a la mitad (60 a 30).

- Se agregaron 0,2 ml. de la dilución de virus correspondiente a 60 DL50 a un tubo conteniendo 0,2 ml. de diluyente.

- Se prepararon 3 diluciones decimales a partir de la dilución inicial de virus y se agregaron 0,2 ml de las mismas a cada uno de 3 tubos conteniendo 0,2 ml. de diluyente.

- Todos los tubos se agitaron, y se incubaron las mezclas durante 90 minutos a 37°C.

- Finalizada la incubación, los tubos se enfriaron sumergiéndolos en baño de hielo.

- Se inocularon, por vía intracerebral, grupos de 6 ratones de 11 a 14 g. con 0,03 ml. de cada mezcla suero-virus, comenzando por la menor dilución de suero.

- Se inocularon también grupos de 10 ratones con las 4 diluciones de virus, comenzando por la mayor.
- Todos los animales se observaron durante 14 días registrándose diariamente la evolución de los síntomas y las muertes producidas.
- Mediante la fórmula de Reed y Muench se calculó el título del virus control, se restó la dilución empleada para mezclar con las diluciones de suero; obteniéndose un logaritmo cuyo antilogaritmo representó las DL50 empleadas en la reacción.
- Se calculó mediante la misma fórmula, la dilución de suero que, al ser mezclada con el virus, protegió al 50% de los ratones. Ese valor se denominó Dosis de Protección 50% (DP50). El título del suero se expresó como la inversa de la DP 50.

#### 5.6.2.- Técnica por contraimmunoelectroforesis (152)

El antígeno requerido en esta técnica se preparó a partir de una suspensión al 20% de virus CVS adaptado a cerebro de conejos lactantes por dos pasajes sucesivos en estos animales (CVS/SRB/2 Suckling Rabbit Brain 2° pasaje). Este virus tuvo un título de  $10^{7,8}/0,03$  ml. IC en ratones adultos.

##### a) Producción de antígeno

- Se inocularon conejos lactantes con 0,2 ml. de una dilución de virus conteniendo 1000 DL50%/0,03 ml. IC en ratones adultos.
- Se cosecharon los cerebros al alcanzar los animales el estado de postración.
- Se preparó una suspensión de virus al 40% en solución de sacarosa-glicina pH 7,2 (anexo punto 10.7) y se tituló en ratones adultos.
- La suspensión viral se inactivó mezclando volúmenes iguales de la misma y de beta-propiolactona diluida 1:1500 en  $\text{NaCO}_3\text{H}$  0,16% (anexo, punto 10.8). Se obtuvo así una suspensión al 20% de virus inactivado con beta-propiolactona 1:3000.
- Se incubó en un baño de agua a 37°C durante 120 minutos.
- Se mantuvo durante una noche a 4°C.
- Se tomó una muestra para control de ausencia de virus vivo residual, según el método descrito en el punto 5.5.5.
- La suspensión al 20% se centrifugó a 17 000 x g durante 10 minutos.

- Luego se concentró al doble en polietilenglicol PM 20 000 (Carbowax) a fin de obtener una suspensión al 40%.
- El antígeno se inactivó a 56°C durante 30 minutos.
- Se fraccionó en alícuotas de 1 ml. en ampollas de 2 ml. de capacidad y se mantuvo a 4°C.

b) Procedimiento

- Se preparó una suspensión de agarosa (grado para electroforesis) al 0,9% en tampón veronal 0,05 M, pH 8,2 conteniendo merthiolate 1:10 000 (anexo punto 10.9).
- Las láminas usadas fueron de 75 x 50 mm.
- Láminas limpias y desengrasadas se cubrieron con 8 ml. de la suspensión de agarosa, se dejaron solidificar y luego se dejaron a 4°C durante 10 minutos.
- Se perforaron las cavidades de acuerdo al diagrama que se muestra en la figura 2.

c) Titulación de antígeno

- El antígeno se diluyó en solución salina tamponada pH 7,2 (anexo punto 10.10) de la siguiente forma:

Tubo N°	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>4</sub>	T <sub>5</sub>	T <sub>6</sub>	T <sub>7</sub>	T <sub>8</sub>
Ag (ml)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Salina (ml)	0,3	0,5	0,7	0,9	1,1	1,3	1,5	1,7

- Todos los tubos se incubaron durante 60 minutos a 37°C.
- Se quitó la agarosa de las cavidades de 6 mm de dos láminas, y se colocaron las distintas diluciones de antígeno en cada una de ellas.
- Se corrieron electroforéticamente durante 45 minutos aplicando una diferencia de potencial de 8 a 10 voltios entre los extremos de cada lámina.
- Al cabo de 45 minutos se detuvo la corrida, y se retiró la agarosa de las cavidades de 3 mm, las que se llenaron con un suero antirrábico estándar conteniendo 2 Unidades Internacionales por mililitro.
- Se siguió la corrida durante otros 120 minutos a la misma diferencia de potencial.

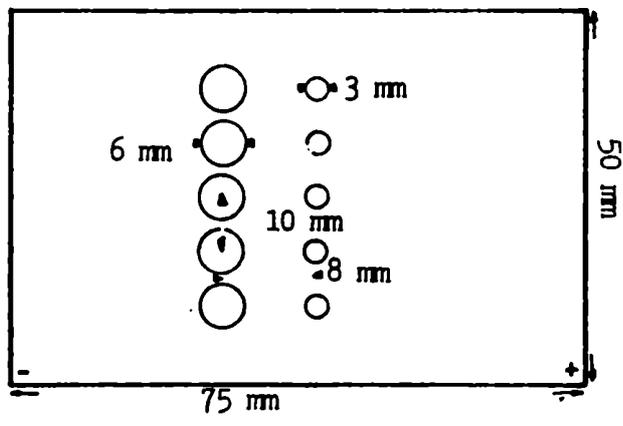


Figura 2

- La lectura de los resultados se hizo inmediatamente después con ayuda de luz incidente.
- Se eligió la óptima dilución de antígeno que produjo banda neta y definida entre ambas cavidades. Esa dilución se tomó como el título del antígeno.
- El antígeno presentó un título de 1:14.

#### d) Titulación de sueros

- Los sueros se calentaron durante 30 minutos a 48-50°C.
- Las diluciones iniciales de suero se prepararon en solución salina tamponada pH 7,2, y fueron las siguientes: sin diluir, 1:2,5, 1:5, 1:10, 1:20 y 1:40.
- Se mezclaron 0,1 ml. de una dilución 1:7 de antígeno con 0,1 ml. de cada dilución de suero.
- Además se mezclaron en otro tubo 0,1 ml. de la dilución 1:7 de antígeno con 0,1 ml. de solución salina pH 7,2, como control.
- De este modo la dilución final de antígeno fue 1:14 y las de suero: 1:2, 1:5, 1:10, 1:20, 1:40 y 1:80.
- Todas las mezclas se incubaron durante 60 minutos a 37°C.
- Se quitó la agarosa de las cavidades de 6 mm y se colocaron las distintas mezclas suero-antígeno, así como el control de antígeno.
- Las láminas se corrieron electroforéticamente durante 45 minutos aplicando una diferencia de potencial de 8 a 10 voltios entre sus extremos.
- Se detuvo la corrida y se retiró la agarosa de las cavidades de 3 mm, las que se llenaron con un suero antirrábico estándar conteniendo 2 UI/ml.
- Se siguió la corrida durante 120 minutos más a la misma diferencia de potencial.
- La lectura de los resultados se hizo inmediatamente después con ayuda de luz incidente.
- Se eligió la última dilución de suero que no produjo banda neta y definida entre ambas cavidades. Esa dilución se tomó como el título del suero.

Tabla 2

Control de virulencia - Títulos\* de virus fijos y calle, realizados por vía intracerebral e intramuscular, en ratones adultos.

Vía	Tipos de virus						
	CVS	51	91	1026/80		1426/79	
	susp. 20%	susp. 20%	susp. 20%	susp. 20%	susp. 40%	susp. 20%	susp. 40%
IC (*)	7,2	7,16	7,0	5,33	5,46	6,4	6,2
IM (**)	3,18	3,16	2,58	2,32	1,6	1,81	2,2

\* Expresados en  $\log_{10}$ .  
 (\*) Dosis 0,03 ml.  
 (\*\*) Dosis 0,2 ml.

5.7.- Determinación de Interferón por inhibición del efecto citopático - Micrométodo

El virus VSV Indiana fue obtenido por gentileza de la Licenciada Silvana Levis, del Instituto Nacional de Estudios sobre Virosis Hemorrágicas, Pergamino, Pcia. de Buenos Aires.

La línea celular L-F1 de ratón y el Interferón ratón de referencia internacional (NIH) fueron gentilmente suministrados por la Licenciada Mónica Tous, del Departamento de Virología del Instituto Nacional de Microbiología.

a) Producción de virus VSV

- Se inoculó una monocapa de 48 hs., confluyente, de células Vero, con 1 ml. de una dilución  $10^{-2}$  de virus VSV-Indiana (M.O.I. 0,00025).
- La suspensión viral se dejó adsorber durante 60 minutos a 37°C.
- Se eliminó el virus no adsorbido, se agregaron 15 ml de medio de mantenimiento (anexo, punto 10.12. y se incubó a 37°C durante 24 horas.
- Las células se tripsinaron (anexo, punto 10.15) y luego se centrifugaron a 2500 rpm durante 15 min. en centrifuga refrigerada.
- El sobrenadante se distribuyó en alícuotas de 0,5 ml. y se congeló a -70°C.

b) Titulación del "stock" de virus VSV producido. (Micrométodo)

- Se sembró una placa Falcon de 96 cavidades de fondo plano con una suspensión de cé-

lulas L-F1 conteniendo aproximadamente 200 000 células/ml. en medio de crecimiento (añexo, punto 10.11) El volumen del inóculo fue de 0,1 ml.

- La placa se selló con una lámina autoadhesiva y se incubó a 37°C durante 24 hs.
- Se retiró la lámina, se descartó el medio por volcado, se lavó con PBS (anexo, punto 10.13) y se reemplazó por medio de crecimiento fresco. La placa se selló nuevamente y se incubó otras 24 hs. a 37°C.
- Se descongeló un vial de virus VSV y se efectuaron diluciones razón 1 log. del mismo (desde  $10^{-1}$  a  $10^{-7}$ ) en medio de mantenimiento en baño de hielo.
- Se retiró la lámina de la placa, se descartó el medio por volcado y se lavó con PBS. Este también se descartó y se inoculó 0,1 ml. de cada dilución de virus (comenzando por la más diluida) en cada una de 8 cavidades.
- Ocho cavidades adicionales se inocularon con 0,1 ml. de medio de mantenimiento, a fin de servir como controles de la monocapa celular.
- Se selló la placa y se incubó durante 24 hs. a 37°C, momento en que se efectuó la lectura del efecto citopático producido.
- El título viral (DICT50%: dosis infectivas cultivo de tejidos 50%) se definió como la inversa de la dilución que produjo efecto citopático en el 50% de las cavidades; y se calculó por el método de Spearman-Kärber.
- El título viral hallado fue  $10^{5,0}$ .

c) Titulación de interferón por inhibición del efecto citopático en una monocapa celular (Micrométodo).

- Se sembraron placas Falcon de 96 cavidades de fondo plano con una suspensión de células L-F1 conteniendo aproximadamente 200 000 células/ml. en medio de crecimiento. El volumen del inóculo por cavidad fue de 0,1 ml.
- Las placas se sellaron con una lámina autoadhesiva y se incubaron a 37°C durante 24 hs.
- Se retiraron las láminas, se descartó el medio por volcado y se lavó con PBS, el que luego se descartó.
- Se sembraron 0,1 ml. de medio de crecimiento en todas las cavidades. El interferón ratón de referencia internacional (NIH) conteniendo 1200 UI/ml. se diluyó 20 veces en

medio de crecimiento, las muestras se diluyeron 5 veces en el mismo medio, y se inoculó en la primera hilera de cavidades 0,1 ml. de las diluciones efectuadas de las muestras a titular y de interferón de referencia. Todos los sueros se titularon por duplicado.

- Se hicieron diluciones seriadas razón 2 de todas las muestras a titular y de la preparación de referencia con pipeta automática de 100 ul.

- Se incluyeron los siguientes controles: toxicidad de cada uno de los sueros a titular, control de la monocapa celular, titulación de virus, y suero normal de ratón de la cepa CF1.

1 Se sellaron las placas y se incubaron durante 24 hs. a 37°C.

- Se quitaron las láminas, se descartó el medio por volcado, se lavó con PBS, el que luego se eliminó también por volcado.

- Las cavidades conteniendo muestras a titular se inocularon con 0,1 ml. de una dilución de virus conteniendo aproximadamente 10 DICT50% ( $10^{-4}$ ).

- Se efectuó paralelamente, por triplicado, una titulación del virus VSV utilizado inoculando en cada cavidad 0,1 ml. de cada una de 6 diluciones razón 1 log. del mismo.

- Las cavidades correspondientes a los controles de la monocapa celular y de toxicidad del suero se sembraron con 0,1 ml. de medio de mantenimiento.

- Las placas se sellaron y se incubaron otras 24 hs. a 37°C, luego se efectuó la lectura del efecto citopático producido.

- El título de la muestra se definió como la inversa de la dilución que presentó efecto citopático en el 50% de la monocapa celular.

- El contenido de interferón de la muestra se expresó en UI/ml de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Título}_M (\text{UI/ml}) = \frac{\text{Tit. (DICT50)}_M \times \text{UI/ml (IFN. Ref.)}}{\text{Tit. (DICT50) IFN. Ref.}}$$

#### d) Caracterización de la actividad interferente

- Se descongelaron tres alícuotas conteniendo 0,1 ml. de cada una de las muestras con probable actividad de interferón y se efectuaron los siguientes controles:

1 - Una alícuota de cada muestra se trató a 56°C durante 1 hora.

2 - Una segunda alícuota de cada muestra se llevó a pH 2 por agregado de 10 ul de

CIH 3 N, se dejó durante una noche a 4°C y luego se llevó a pH 7 por agregado de 10 ul de NaOH 3N. La tercera alícuota se dejó una noche a 4°C sin tratar, a fin de servir como control.

- Todas las muestras tratadas se re congelaron hasta el momento de su titulación.
- Las muestras que resultaron positivas en células L, se titularon además en células Vero, a fin de comprobar la especificidad de especie de la actividad interferente.

## 5.8.- Cálculos estadísticos

### 5.8.1.- Fórmula de Archetti y Horsfall (153)

$$r = \sqrt{r_1 \times r_2}$$
$$r_1 = \frac{\text{título del suero 1 frente a cepa 2}}{\text{título del suero 1 frente a cepa 1}}$$
$$r_2 = \frac{\text{título del suero 2 frente a cepa 1}}{\text{título del suero 2 frente a cepa 2}}$$

El valor de r representa la diferencia antigénica entre dos cepas de virus cuando ambos virus y sus antisueros son comparados en pruebas cruzadas. Un valor de r igual a 1 representa identidad. Cuanto mayor sea r, menos relacionadas antigénicamente estarán las cepas.

### 5.8.2.- Correspondencia de títulos entre CIE y SN

- La ecuación de la recta ajustada se halló por el método de cuadrados mínimos.
- El grado de correspondencia entre los títulos hallados por ambas técnicas se midió por medio del coeficiente de correlación r.

siendo  $r = \frac{n \sum x y - (\sum x)(\sum y)}{\sqrt{n \sum x^2 - (\sum x)^2} \sqrt{n \sum y^2 - (\sum y)^2}}$

donde n = N° de determinaciones

r = ± 1 indica máxima correlación

r = 0 indica que no existe correlación

6.1.- Virus fijos6.1.1.- Calidad de las vacunas CRL trivalentes y monovalentes CVS, 51 y 91.

Las vacunas en estudio se prepararon según la metodología indicada en el punto 5.4.2. e inmediatamente se controló su calidad de acuerdo a los métodos descritos en el punto 5.5.

- 1.- Los resultados de los controles de esterilidad (previa y final) fueron satisfactorios para todos los lotes de vacuna elaborados.
- 2.- Los resultados de las pruebas de toxicidad y de ausencia de virus vivo residual fueron satisfactorios para todos los lotes de vacuna elaborados.
- 3.- Los resultados de los controles de infectividad (títulos virales antes de la inactivación) fueron comparables para los lotes 1 y 2 de cada tipo de vacuna y los valores promedio hallados se muestran en la tabla 3.
- 4.- Los resultados de las pruebas de potencia antigénica fueron comparables para los lotes 1 y 2 de cada tipo de vacuna y los valores promedio de DE50% y VA hallados se muestran en la tabla 4.

Tabla 3

Titulos virales promedio determinados en suspensiones vacunales antes de la inactivación con luz ultravioleta

Trivalente	Tipos de vacuna		
	CVS	51	91
7,3	7,3	7,7	7,0

- 5.- Los títulos virales hallados en las suspensiones inmediatamente antes de la inactivación son aceptables para todas las vacunas elaboradas, por hallarse por encima del título mínimo aceptado para este tipo de vacunas (6,3) (149).
- 6.- La potencia antigénica de las vacunas trivalentes y monovalentes CVS y 51 fue superior al RMP = 0,3 requerido por la vacuna de referencia CPZ/19.

Se considera que para vacunas antirrábicas inactivadas los títulos de las sus-

suspensiones virales previas a la inactivación, son indicativos de la potencia antigénica que alcanzará esa vacuna. Sobre esta base, se ha establecido como aceptable para la vacuna trivalente un título viral superior a 6,3 (149) (150).

Tabla 4

Dosis efectivas 50% y valores antigénicos promedio hallados para las vacunas Trivalente y monovalentes CVS, 51 y 91, determinados por la prueba de potencia de NIH

Vacunas	DE50%	VA
Trivalente	115,25	2,3
CVS	123,15	2,5
51	150,00	3,0
91	3,9	0,08
CPZ/19	49,00	1,00

Los resultados hallados en los controles de potencia antigénica muestran que títulos elevados para las suspensiones virales a virus CVS, 51 y la combinación de los tres virus fijos se corresponden con una potencia antigénica aceptable. Por el contrario, en el caso de la vacuna a virus 91, a pesar de que los títulos hallados en las suspensiones virales antes de inactivar fueron elevados, la potencia antigénica fue baja para los dos lotes de vacuna producidos. Estos resultados confirman los observados por Mendoza y col. (155), quienes determinaron la potencia de vacunas monovalentes a virus 51, 91 y a virus calle 194 por el método de Habel y encontraron una baja potencia antigénica para la vacuna 91, a pesar de que los títulos virales eran elevados.

Dado que la infectividad del virus 91 hallada en el presente trabajo es teóricamente adecuada para estimular al sistema inmunitario del huésped, el VA obtenido podría reflejar tanto una baja inmunogenicidad como una respuesta inmunitaria ineficiente frente al virus CVS (Virus estándar de desafío en la prueba de NIH).

### 6.1.2.- Pruebas de potencia cruzadas

La capacidad inmunizante de las vacunas antirrábicas debe ser controlada por pruebas de laboratorio antes de ser utilizadas en el campo.

En 1954, Hottle (156) describió una prueba de potencia cuantitativa que luego fue estandarizada por los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos y actualmente se conoce como prueba de potencia de NIH (National Institutes of Health). Su reproducibilidad depende de la cepa de ratones y de la calidad y cantidad de virus de desaffo utilizadas.

Habel y Wright (157) lograron, después de un cuidadoso estudio de varias cepas de virus rábico, seleccionar una muy estable que denominaron CVS (Challenge Virus Standard) y que se convirtió en la cepa patrón para el control de potencia de vacunas antirrábicas inactivadas.

El factor de variabilidad introducido por la dosis de virus de desaffo y la cepa de ratones, se reduce al mínimo mediante la inclusión sistemática de una vacuna antirrábica de referencia (156).

Esta experiencia se diseñó para comparar la potencia antigénica de las vacunas trivalente y las monovalentes CVS, 51 y 91 en la prueba de NIH, utilizando como virus de desaffo las cepas homólogas y heterólogas.

Los ratones se inmunizaron e infectaron experimentalmente siguiendo la técnica descrita en el punto 5.5.6.

La capacidad inmunizante de las vacunas se evaluó en términos de DE50% (inversa de la dilución de vacuna que protege al 50% de los ratones vacunados frente a 5-50 de virus de desaffo) y de valor antigénico (relación entre DE50% de la vacuna problema y DE50% de la vacuna de referencia). El valor antigénico (VA) de la vacuna de referencia es igual a 1 por definición. El requisito mínimo de potencia (RMP) de la vacuna de referencia CPZ/19 es igual a 0,3.

Los resultados obtenidos se observan en la tabla 5.

1.- Las DE50% y los VA obtenidos con las vacunas trivalente, CVS, 51 y de referencia frente a los virus CVS y 51 fueron elevados, lo que demuestra su buena capacidad inmunizante. Sin embargo, esto no se observó cuando se usó virus 91 como cepa de desaffo.

2.- Las DE50% y VA hallados para la vacuna 91 fueron bajos frente a las tres cepas de desafío probadas.

3.- La vacuna de referencia CPZ/19 no protegió frente al virus 91, haciendo imposible el cálculo de VA para todas las vacunas probadas.

Tabla 5

Resultados de las pruebas de potencia NIH de las vacunas antirrábicas trivalente, CVS, 51 y 91 frente a las cepas de virus homólogas y heterólogas

Tipos de virus	Tipos de vacuna									
	Trivalente		CVS		51		91		CPZ/19*	
	DE50	VA	DE50	VA	DE50	VA	DE50	VA	DE50	VA
CVS	43	3,3	30	2,3	112	8,6	2,1	0,16	13	1
51	21	1,0	19	0,95	67	3,35	3,6	0,18	20	1
91	5	(*)	< 5	(*)	9,4	(*)	2,7	(*)	< 5	-

\* RMP CPZ/19 = 0,3

(\*) No calculable

Los resultados obtenidos muestran que la respuesta inmunitaria inducida en ratones por las vacunas trivalente, CVS y 51 es eficaz en la protección de animales desafiados con las cepas de virus CVS y 51 y poco eficaz en protegerlos del desafío con virus 91. Esto podría atribuirse a la existencia de diferencias antigénicas entre los virus vacunales CVS y 51 y el virus 91.

Por otra parte, la respuesta inmunitaria inducida en ratones por la vacuna monovalente 91 es poco eficaz en la protección de animales desafiados con cualquiera de los tres virus fijos probados, lo que indicaría que este antígeno tiene una capacidad inmunizante pobre.

### 6.1.3.- Pruebas serológicas

#### 6.1.3.1.- Seroneutralización simple y contraelectroforesis

Una de las características de las vacunas antirrábicas es su capacidad de inducir anticuerpos neutralizantes del virus.

En el año 1960 se instituyó la primera vacuna antirrábica de referencia internacional, cuya potencia y capacidad de inducir anticuerpos neutralizantes se consideran los valores mínimos que deben alcanzar todas las vacunas antirrábicas que se comparen con ella.

Esta experiencia se diseñó para comparar los niveles de anticuerpos obtenidos con cada tipo de vacuna CRL estudiada, en relación con la dosis inmunizante.

Grupos de cinco ratones se inmunizaron con dosis variables de la vacuna trivalente y de las vacunas monovalentes CVS, 51 y 91. Los animales recibieron dos inoculaciones de 0,5 ml. por vía intraperitoneal con una semana de intervalo.

Otros grupos de ratones se inmunizaron en las mismas condiciones con una vacuna antirrábica de referencia (CPZ/19), con fines comparativos.

Todos los animales se sangraron 14 días después de la primera inmunización y los sueros fueron separados y titulados en "pool".

Los sueros se titularon por seroneutralización en ratones según la técnica descrita en el punto 5.6.1 y por contraelectroforesis según la técnica descrita en el punto 5.6.2. Los títulos de los sueros obtenidos en la prueba de seroneutralización se expresan de dos formas:

- a) Como la inversa de la dilución que protege al 50% de los ratones inoculados (DP 50%).
- b) En unidades internacionales por ml. Para ello se incluyó en la prueba, un patrón internacional de suero antirrábico (NIH R2) conteniendo 2 UI/ml. La dilución del mismo que protegió al 50% de los animales inoculados fue 1:712. El cálculo del título de los sueros problema se hizo de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{UI/ml.} = \frac{\text{DP50\% (SP)}}{\text{DP50\% (SR)}} \times 2 \text{ UI/ml.}$$

Los resultados obtenidos figuran en la tabla 6.

- 1.- Los títulos de anticuerpos encontrados con ambas técnicas fueron más elevados en los

sueros de animales que recibieron dosis de vacuna más concentradas.

2.- Los títulos de anticuerpos inducidos por las vacunas trivalente, CVS, 51 y CPZ/19 fueron elevados. Fue posible detectar anticuerpos neutralizantes aún en animales inmunizados con la dilución 1:125 de las mismas. No se pudo detectar anticuerpos por CIE en la dilución 1:125 de la vacuna CPZ/19.

3.- Los títulos de anticuerpos alcanzados en animales inmunizados con la vacuna 91 fueron bajos en comparación con los obtenidos en ratones inoculados con las otras vacunas. Fue posible detectar anticuerpos solamente en los sueros de animales inoculados con vacuna pura o diluida 5 veces.

4.- Los títulos de anticuerpos inducidos por distintas diluciones de la vacuna CPZ/19 fueron más bajos que los obtenidos con las vacunas trivalente, CVS y 51 en iguales condiciones.

Tabla 6

Títulos de anticuerpos en sueros de ratones inmunizados\* con distintas diluciones de cinco tipos de vacunas antirrábicas determinados por seroneutralización (\*) y contraelectroforesis (\*\*)

Dilución de vacuna	Tipos de vacunas									
	Trivalente		CVS		51		91		CPZ/19	
	SN	CIE	SN	CIE	SN	CIE	SN	CIE	SN	CIE
1:1	NE <sup>o</sup>	NE	NE	NE	NE	NE	56 (0,16)	NE	NE	NE
1:5	2089 (5,9)	40	2089 (5,9)	20	3125 (8,8)	20	70 (0,2)	5	625 (1,7)	5
1:25	1741 (4,9)	10	328 (0,92)	5	1409 (3,9)	10	< 5	< 2	328 (0,92)	2
1:125	41 (0,11)	2	11 (0,03)	2	17 (0,05)	2	< 5	< 2	6,4 (0,02)	< 2
1:625	< 5	< 2	< 5	< 2	< 5	< 2	< 5	< 2	< 5	< 2

\* Dos inoculaciones de 0,5 ml., vfa I.P., días 0 y 7, sangría día 14.

(\*) Los títulos se expresan como DP50%: la inversa de la dilución que protege al 50% de los ratones inoculados; y como UI/ml entre paréntesis.

(\*\*) Los títulos se expresan como la última dilución de suero que no produjo banda neta y definida.

o NE: No estudiado

Los resultados obtenidos muestran que la respuesta de anticuerpos en ratones inmunizados con las vacunas antirrábicas en estudio es función de la concentración de antígeno viral presente. Estos resultados corroboran los hallados por Crick y Brown (158), quienes trabajaron con vacunas inactivadas preparadas en células BHK-21, Nil 2 y con vacuna de cerebro de ratón lactante, como también los de Wiktor y col. con vacunas antirrábicas de referencia (159).

Los títulos de anticuerpos obtenidos en animales inmunizados con las vacunas trivalente, CVS y 51 diluidas 5 veces fueron comparables entre sí; sin embargo, cuando las vacunas se diluyeron 25 y 125 veces los títulos de anticuerpos inducidos por la vacuna trivalente fueron mucho más elevados que los inducidos por las monovalentes. Si bien no se conocen experiencias previas que comparen el comportamiento de vacunas monovalentes con el de vacunas conteniendo más de un antígeno, los resultados observados ponen en evidencia una mayor eficiencia de la vacuna elaborada con una combinación de las tres cepas de virus.

Se podría especular que la inclusión de las cepas de virus CVS y 51 (buenas inductoras de anticuerpos) en la vacuna, tenga un efecto potenciador de la inmunogenicidad de la vacuna combinada. En cambio, resulta más difícil explicar cuál sería la contribución de la cepa de virus 91 a ese respecto, ya que la vacuna preparada con esta cepa viral sólo indujo niveles bajos de anticuerpos cuando se administró pura o diluida 5 veces.

La vacuna de referencia utilizada en la prueba es comparable por su origen y estandarización con el 2° patrón internacional de vacuna antirrábica de la Organización Mundial de la Salud (148)(160). Sería de esperar pues, que los niveles de anticuerpos neutralizantes inducidos en ratones inmunizados con ella, fueran semejantes a los inducidos por un patrón internacional; sin embargo, los títulos observados en esta experiencia cuando se expresan en UI/ml fueron inferiores a los encontrados por Wiktor y col. en un estudio de evaluación de distintas vacunas antirrábicas de referencia (159). Cabe destacar que el comportamiento del Patrón Internacional de Suero Antirrábico en la prueba de seroneutralización en ratones, en distintos laboratorios no es totalmente reproducible (161). Así, algunos autores han encontrado que una unidad internacio-

nal se halla alrededor de la dilución 1:50 (161) y 1:25 (162). En este laboratorio, se ha observado a lo largo de 250 pruebas realizadas que la unidad internacional del suero de referencia internacional NIH RZ se halla entre las diluciones 1:164 y 1:700. En esta experiencia se mantuvo este comportamiento ya que la unidad internacional para el mismo estuvo en la dilución 1:356. Por tratarse de una dilución muy elevada, los títulos en unidades internacionales de los sueros estudiados fueron bajos comparados con los hallados por otros autores que estudiaban la respuesta humoral inducida por distintas vacunas (163). Sin olvidar la influencia que tiene el uso de distintas cepas de ratones como sistema indicador en la prueba de seroneutralización, y las dosis infectivas de virus utilizadas (162), es altamente probable que las diferencias observadas se deban más a la variabilidad de título que muestra el suero patrón entre laboratorios, que a una menor capacidad de las vacunas CRL en estudio, de inducir anticuerpos neutralizantes en ratones. Esto se refleja en el análisis de la tabla 7 donde los títulos en unidades internacionales calculados sobre la base teórica de la equivalencia 1 UI = dilución 1:50 fueron comparables con los citados por otros autores para otros tipos de vacunas (159)(163).

En esta experiencia se evidenció asimismo, la eficiencia de la técnica de contrainmunolectroforesis en la detección de anticuerpos en sueros de ratones inmunizados, como ya se hubiera demostrado en sueros de personas vacunadas (152) e hiperinmunes de origen equino (164).

Tabla 7

Títulos reales y teóricos de anticuerpos en sueros de ratones inmunizados con distintas diluciones de cuatro tipos de vacunas antirrábicas, determinados por seroneutralización

Tipos de vacunas	Diluciones de vacuna/Títulos en UI/ml					
	1:5		1.25		1:125	
	R(x)	T(xx)	R	T	R	T
Trivalente	5,9	41,7	4,9	34,8	0,11	0,8
CVS	5,9	41,7	0,92	6,56	0,03	0,22
51	8,8	62,5	3,9	28,2	0,05	0,34
91	0,2	1,4	-	-	-	-

(x) 1 UI = dilución 1:356

(xx) 1 UI = dilución 1:50

De todo lo expuesto se deduce como conclusión de este capítulo que en lo que respecta a la capacidad de inducir anticuerpos neutralizantes en ratones, la vacuna trivalente es superior a cualquiera de las monovalentes y también a la vacuna de referencia utilizada.

### 6.1.3.2.- Seroneutralización cruzada

Tal como se mencionara en el punto 3.4.5 se ha demostrado la existencia de diferencias antigénicas en cepas de virus rábicos de distinto origen. Así, los anticuerpos inducidos por una determinada cepa, no siempre son capaces de interactuar con la glicoproteína de otras, de forma de neutralizar al virus.

Esta experiencia se diseñó para estudiar la capacidad de los anticuerpos inducidos por cada tipo de vacuna CRL estudiada, de neutralizar a las tres cepas de virus rábico utilizadas en su producción.

Grupos de cinco ratones se vacunaron con una dilución 1:5 de la vacuna trivalente, las vacunas monovalentes CVS y 51. Dos grupos de cinco ratones recibieron cada uno vacuna monovalente 91 sin diluir y diluida cinco veces. Todos los animales recibieron dos inoculaciones de 0,5 ml. por vía I.P. con una semana de intervalo.

Un sexto grupo de cinco ratones fue vacunado con una dilución 1:5 de vacuna antirrábica de referencia (CPZ/19).

Todos los animales se sangraron 14 días después de la primera inmunización.

Los sueros se titularon por seroneutralización en ratones siguiendo la técnica descrita en el punto 5.6.1. Se usaron como virus de desafío además de la cepa CVS, la 91 y 51.

Los resultados obtenidos figuran en la tabla 8.

- 1.- Los títulos de anticuerpos neutralizantes inducidos por la vacuna trivalente frente a las cepas 51 y CVS fueron entre 70 y 80 veces más altos que frente al virus 91.
- 2.- Los títulos obtenidos con la vacuna monovalente CVS frente a las cepas 51 y CVS fueron entre 220 y 270 veces más elevados que frente al virus 91.
- 3.- Los títulos obtenidos con la vacuna monovalente 51 frente a las cepas 51 y CVS fueron entre 130 y 150 veces más elevados que frente al virus 91.
- 4.- Los títulos promedio inducidos por la vacuna 91 sin diluir y diluida 1:5 fueron 60 a 70 veces más bajos que los inducidos por las vacunas 51 y CVS respectivamente frente al virus CVS y entre 50 y 60 veces más bajos frente a virus 51.
- 5.- Los títulos promedio inducidos por la vacuna 91 sin diluir y diluida 1:5 fueron entre 4, 5 y 6 veces más altos que los inducidos por las vacunas 51 y CVS respectivamente,

frente al virus 91.

6.- Los títulos inducidos por la vacuna CVS fueron 1,5 y 2 veces más altos que los inducidos por la vacuna trivalente frente a los virus CVS y 51 respectivamente, y aproximadamente igual frente al virus 91.

7.- Los títulos inducidos por la vacuna 51 fueron 1,3 y 2 veces más altos que los inducidos por la vacuna trivalente frente a los virus CVS y 51 respectivamente y aproximadamente igual frente al virus 91.

8.- Los anticuerpos inducidos por la vacuna de referencia alcanzaron niveles intermedios cuando se los comparó con los de las vacunas trivalente, CVS y 51 (5 a 14 veces menos) y vacuna 91 (4 y 9 veces más).

9.- Los títulos de anticuerpos inducidos por la vacuna de referencia frente a las cepas 51 y CVS fueron 60 y 85 veces más altos que frente al virus 91.

Tabla 8

Resultados\* de las pruebas de seroneutralización cruzada obtenidos con sueros de ratones inmunizados (\*) con cinco tipos de vacunas antirrábicas frente a las cepas de virus CVS, 51 y 91

Tipo de virus	Sueros anti-vacunas					
	Trivalente 1:5	CVS 1:5	51 1:5	91 1:1	91 1:5	CPZ/19 1:5
CVS	4672 (13)	7124 (20)	5947 (16,7)	125 (0,35)	76 (0,21)	935 (2,62)
51	3820 (10,7)	8700 (24,4)	6985 (19,6)	187 (0,52)	103 (0,29)	625 (1,7)
91	56 (0,16)	32 (0,09)	45 (0,12)	125 (0,35)	279 (0,78)	11 (0,03)

\* Títulos expresados en DP50%: inversa de la dilución de suero que protege al 50% de los ratones inoculados; y como UI/ml entre paréntesis.

(\*) Dos inoculaciones, 0,5 ml., vía I.P.; sangría día 14.

Los resultados se analizaron además por aplicación de la fórmula de Archetti y Horsfall (punto 5.8.1). Los valores de r hallados se muestran en la tabla 9. Valores de r próximos a 1 son indicativos de identidad antigénica, mientras que valores mayores que 1, indican falta de identidad.

Los resultados obtenidos muestran que la capacidad neutralizante de los anticuerpos inducidos por las vacunas CRL trivalente, CVS y 51 es distinta cuando reaccionan con virus CVS y 51 o con virus 91. Esta diferencia se refleja en los valores de r hallados, que indicaban identidad antigénica entre los virus CVS y 51 y falta de ella entre los virus CVS y 91 como así también entre 51 y 91. Resultados similares fueron obtenidos por Wiktor y colaboradores, quienes en un estudio de neutralización con anticuerpos monoclonales observaron similitud antigénica entre los virus CVS y 51 y diferencias antigénicas para el virus 91 cuando se lo enfrentó con anticuerpos inducidos por las cepas de virus CVS y ERA (79).

Tabla 9

Resultados\* de las pruebas de seroneutralización cruzada y sus respectivos valores r (\*), obtenidos con sueros monovalentes anti las cepas de virus CVS, 51 y 91

Suero anti	Antígeno (virus)	SN (titulos)	r
CVS	51	8700	0,98
	CVS	7124	
51	CVS	5947	21,1
	51	6985	
CVS	91	32	13,6
	CVS	7124	
91	CVS	100,5	13,6
	91	202	
51	91	45	13,6
	51	6985	
91	51	145	13,6
	91	202	

\* Títulos expresados en DP50%: inversa de la dilución de suero que protege al 50% de los ratones inoculados.

(\*) Calculados con la fórmula de Archetti-Horsfall.  $r = 1$  identidad antigénica.  $r > 1$  falta de identidad.

Por otra parte, los resultados hallados difieren de los obtenidos por Díaz y Varela Díaz, quienes no detectaron diferencias antigénicas entre los virus CVS y 91 por las técnicas de seroneutralización y contraelectroforesis. Sin embargo, cabe señalar que estos autores trabajaron con virus y sueros preparados en otro huésped (76).

Los anticuerpos inducidos por la vacuna 91 muestran baja capacidad neutralizante cuando reaccionan con cualquiera de los virus probados.

De los resultados hallados en este capítulo se puede concluir que el virus 91 parece diferir antigénicamente del virus standard de desafío y del 51, los que a su vez serían similares antigénicamente entre sí. Por otra parte, el virus 91 inactivado tiene una baja capacidad de inducir una respuesta de anticuerpos neutralizantes de sí mismo y de los virus heterólogos CVS y 51.

Estos resultados son concordantes y avalan los obtenidos en las pruebas de potencia cruzadas (punto 6.1.2) donde se observaron DE50% bajas para todas las vacunas frente al virus 91.

#### 6.1.4.- Cinética de formación de anticuerpos

La rabia es una enfermedad que puede prevenirse por la inmunización activa de las personas después de la exposición al virus. Esto es posible debido a que el virus permanece cerca o en el sitio de inoculación durante un período variable de tiempo (ver puntos 3.2. y 3.5.2). Es requisito indispensable entonces, que las vacunas antirrábicas estimulen los mecanismos defensivos del huésped en forma rápida y eficiente. La producción temprana de altos niveles de anticuerpos neutralizantes, que persistan durante largos períodos de tiempo, es uno de los parámetros que reflejan la inmunogenicidad de las vacunas.

Esta experiencia se diseñó para comparar la respuesta serológica en ratones inmunizados con las distintas vacunas, por determinación de niveles de anticuerpos inducidos y su duración en el tiempo.

Grupos de 20 ratones se inmunizaron con la vacuna trivalente y las vacunas monovalentes CVS, 51 y 91. Los animales recibieron una inoculación de 0,5 ml. por vía I.P. de cada tipo de vacuna sin diluir. Otro grupo de 20 ratones se inmunizó en las mismas condiciones con la vacuna antirrábica de referencia (CPZ/19), con fines comparativos.

Grupos de cinco ratones por vacuna, se sangraron a los 7, 14, 30 y 70 días después de la vacunación. Los sueros se recolectaron en "pool" y se titularon por seroneutralización en ratones según la técnica descrita en el punto 5.6.1. Los niveles de anticuerpos alcanzados se titularon además por la técnica de CIE (punto 5.6.2.) a fin de corroborar con un número mayor de sueros la tendencia de correlación de títulos entre ambas técnicas, que se manifestara en las pruebas de seroneutralización simple.

En el gráfico N° 4 y la tabla 10 se observa que:

- 1.- El título máximo de anticuerpos inducido por la vacuna trivalente se produjo 7 días después de la inmunización. El valor alcanzado fue superior a los obtenidos con todas las otras vacunas estudiadas. El título disminuyó gradualmente durante los 70 días de la experiencia.
- 2.- Los títulos máximos de anticuerpos inducidos por las vacunas CVS y 51 se alcanzaron 14 días después de la inmunización y fueron menores que el máximo inducido por la

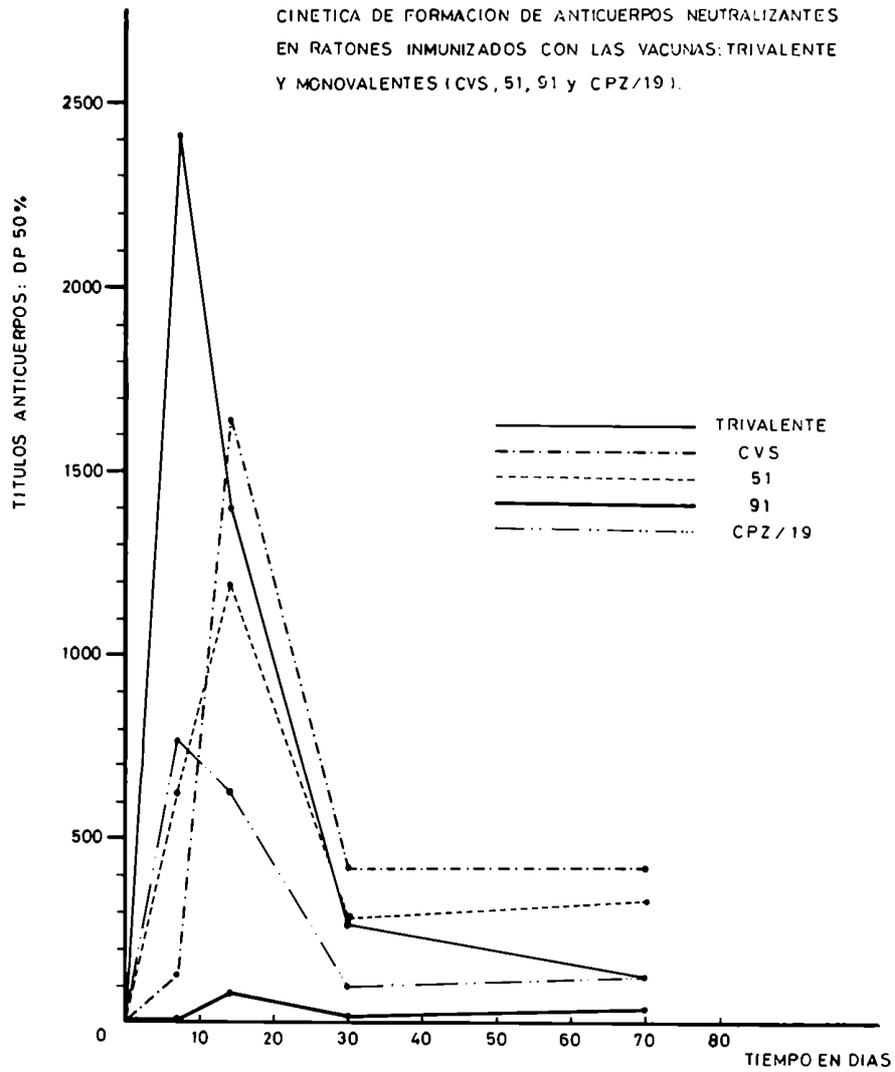


GRAFICO N° 4

trivalente. A partir de ese momento, los títulos alcanzados por ambas vacunas fueron comparables entre sí y con los inducidos por la vacuna trivalente.

3.- Los anticuerpos inducidos por la vacuna 91 se detectaron a partir del día 14 y los niveles alcanzados fueron considerablemente menores que los obtenidos con todas las demás vacunas.

4.- El título máximo de anticuerpos inducido por la vacuna CPZ/19 se observó a los 7 días después de la inmunización. Los valores alcanzados a lo largo de los 70 días de la experiencia fueron intermedios entre los obtenidos con las vacunas trivalente, CVS, 51 y aquéllos obtenidos con la vacuna 91.

Cuando se estudiaron comparativamente por las técnicas de seroneutralización y contraelectroforesis los sueros de los ratones inmunizados, se obtuvieron curvas de cinética de formación de anticuerpos comparables. El análisis estadístico de los resultados que figuran en la tabla 10, demostró que los datos individuales se ajustaban a una regresión lineal. Esta tendencia se había observado previamente cuando se analizaron los títulos de anticuerpos de ratones inmunizados en las pruebas serológicas que se describen en el punto 6.1.3.1. Para estudiar la posible correlación entre ambas técnicas se analizaron estadísticamente el total de datos obtenidos en las experiencias 6.1.3.1. y 6.1.4. Los resultados obtenidos se observan en el gráfico N° 5, que muestra los valores individuales de los títulos de anticuerpos, la recta ajustada correspondiente:  $Y = 1,9 + 0,44 X$  y el coeficiente de correlación hallado ( $r$ ).

La recta permitió estimar los títulos de anticuerpos neutralizantes sobre la base de los resultados de CIE, obteniéndose las curvas de SN teóricas que se muestran en el Gráfico N° 6. Las mismas se comparan con las halladas por SN y CIE.

La vacuna CRL es altamente eficiente en la inducción de una respuesta rápida y de altos títulos de anticuerpos neutralizantes, como lo demuestran experiencias efectuadas en humanos (105)(106), caninos (166) y bovinos (167)(168). En el modelo experimental utilizado en este trabajo, se observa que la respuesta máxima inducida por una única dosis de vacuna trivalente (CRL) se produce a los 7 días después de la inmunización, con títulos de anticuerpos superiores (1:2410) a los observados por Baer y Cleary (5), quienes inmunizando ratones con 1 dosis (0,1 ml.) de vacuna inactivada el-

REGRESION LINEAL PARA TITULOS DE ANTICUERPOS  
HALLADOS EN 30 MUESTRAS DE SUERO DE RATONES,  
POR LAS TECNICAS DE SERONEUTRALIZACION Y DE  
CONTRAINMUNOELECTROFORESIS  $Y=1,9+0,44 X$   
COEFICIENTE DE CORRELACION,  $r=0,65$

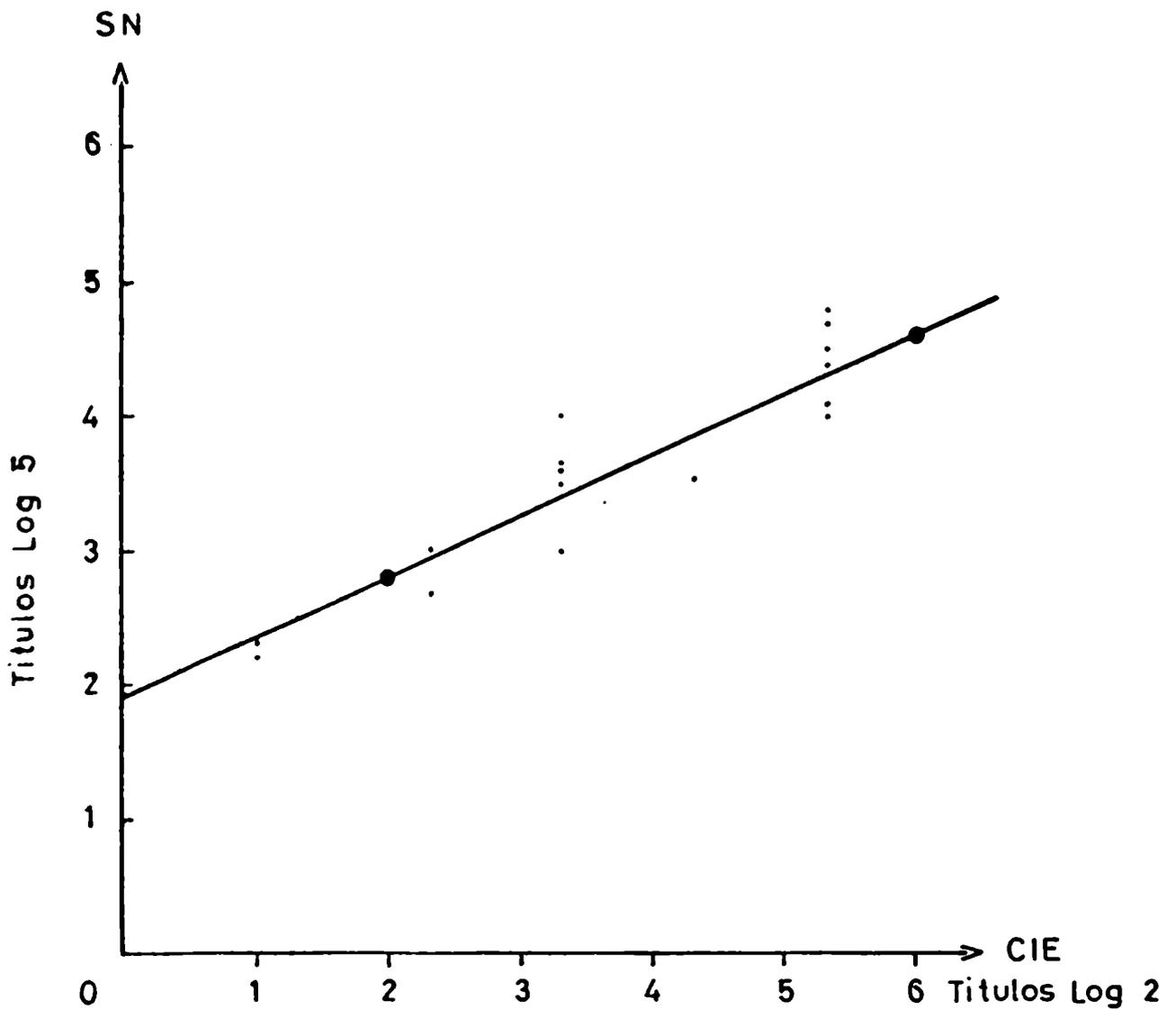


GRAFICO N° 5

COMPARACION DE LAS CURVAS DE ANTICUERPOS OBTENIDAS EN BASE A RESULTADOS DE PRUEBAS DE SERONEUTRALIZACION Y CONTRAINMUNOELECTROFORESIS CON LA CURVA DE SERONEUTRALIZACION TEORICA OBTENIDA A PARTIR DE LA RECTA AJUSTADA  $Y=1,9+0,44X$

Fig. A SUEROS DE RATONES INMUNIZADOS CON VACUNA TRIVALENTE

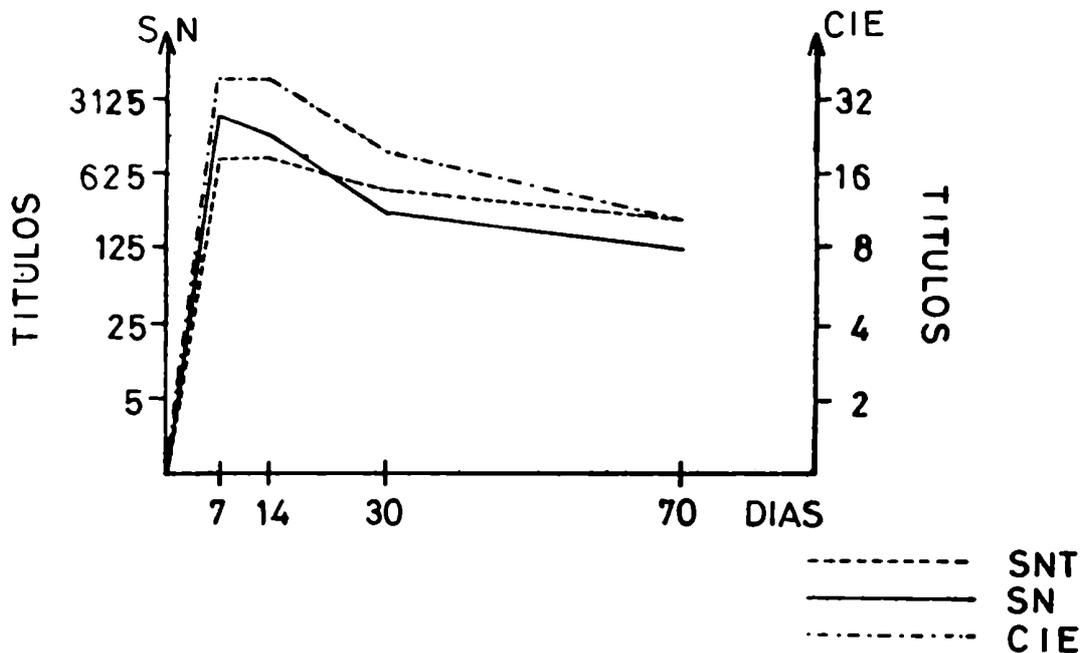


Fig. B SUEROS DE RATONES INMUNIZADOS CON VACUNA CVS

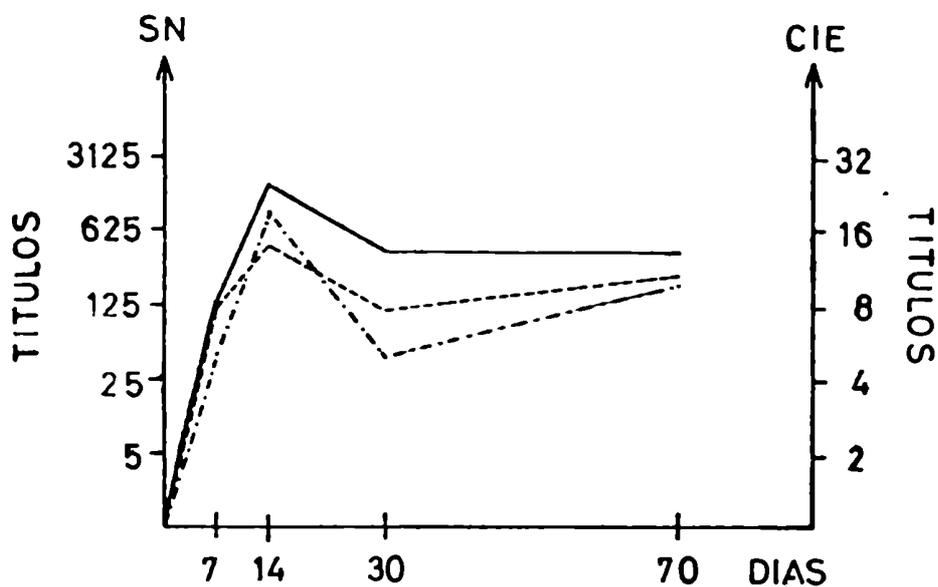


GRAFICO N.º 6

Fig. C SUERO DE RATONES INMUNIZADOS CON VACUNA 51

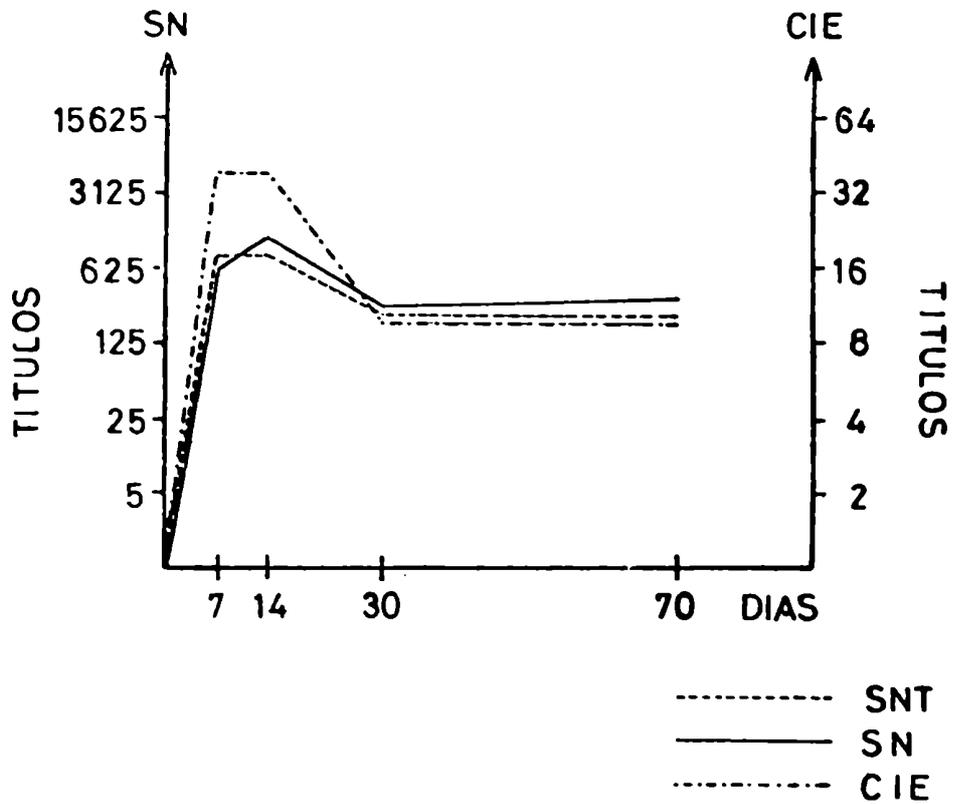


Fig. D SUERO DE RATONES INMUNIZADOS CON VACUNA 91

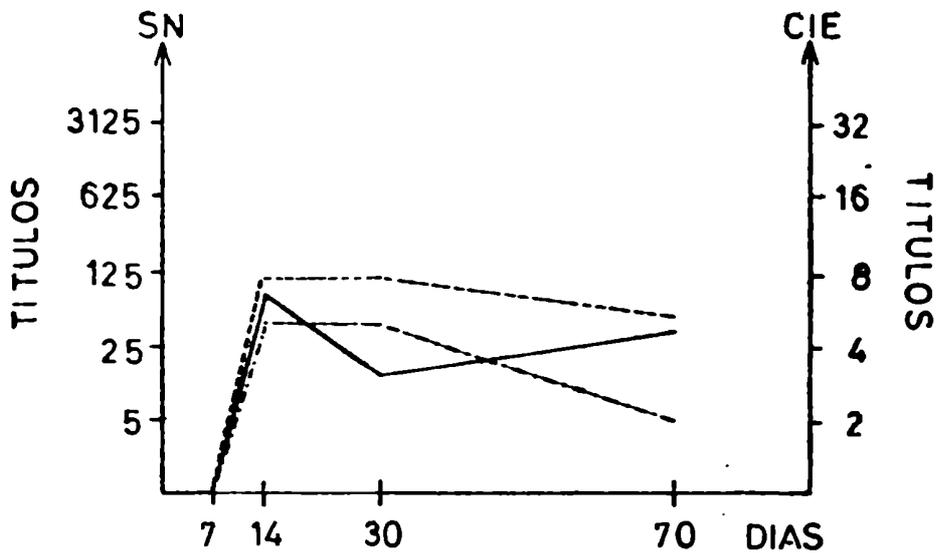
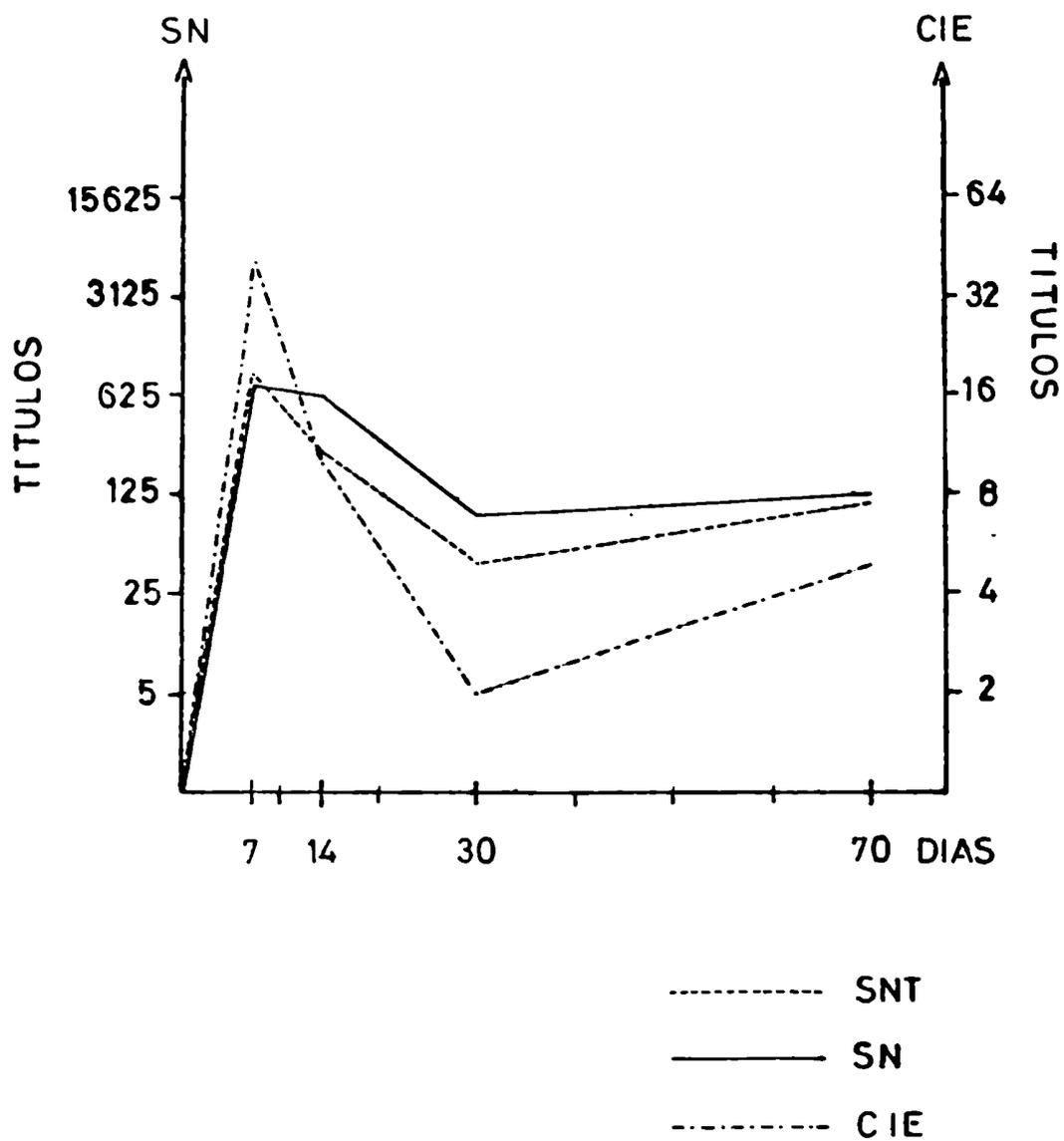


Fig. E SUERO DE RATONES INMUNIZADOS CON VACUNA  
ANTIRRABICA DE REFERENCIA CPZ/19



borada en células BHK obtuvieron un título de 1:400, 8 días después de la inmunización por vía intramuscular. Si bien el volumen de la dosis con que trabajaron fue menor, la vía de inmunización utilizada por ellos se considera más eficiente en la inmunización antirrábica (169).

Los niveles de anticuerpos obtenidos 7 días después de la inmunización con vacuna trivalente también fueron superiores a los observados por Blancou y col. cuando inmunizaron ratones con 1 dosis (0,04 ml.) de una vacuna inactivada, preparada en células de riñón de feto bovino, administrada en la almohadilla plantar de las patas traseras (170).

Asimismo, la vacuna trivalente mostró una mayor eficiencia inmunogénica al compararse su respuesta de anticuerpos 7 días después de la inmunización, con la inducida por múltiples dosis de vacuna de embrión de pato (DEV) (5) y Semple (138).

La producción de anticuerpos por las tres vacunas monovalentes estudiadas fue máxima 14 días después de la inmunización, mostrando un retraso de 7 días respecto del momento en que la vacuna trivalente indujera el nivel más elevado de anticuerpos neutralizantes. Los títulos de anticuerpos inducidos en ratones inmunizados con las vacunas monovalentes elaboradas con los virus CVS y 51 fueron entre 4 y 5 veces más elevados que los observados por Blancou y col. (170) y entre 3 y 4 veces más elevados que los hallados por Baer y col. (5), en cambio fueron significativamente inferiores (25 veces) a los inducidos por una vacuna de alta capacidad inmunogénica preparada en cultivo primario de embrión de pollo (171).

Los niveles de anticuerpos observados para todas las vacunas en estudio, declinaron hacia el día 30 después de la inmunización y se mantuvieron prácticamente constantes hasta el final del período de observación, 70 días. Estos resultados difieren de los observados con la vacuna elaborada en células BHK (5), la que indujo y mantuvo un nivel máximo de anticuerpos entre los 8 y 35 días después de la inmunización.

Las curvas de cinética de formación de anticuerpos halladas en este trabajo también difieren de la observada por Blancou y col. (170), quienes trabajando con una vacuna elaborada en células de riñón de feto bovino encontraron que el máximo nivel de anticuerpos se alcanzaba a los 21 días, y la declinación de los mismos se pro-

ducía rápidamente hacia el día 60. Cabe hacer notar que los títulos de anticuerpos observados con las vacunas CRL a virus CVS y 51 y vacuna trivalente 30 días después de la inmunización, fueron comparables al título máximo hallado por Baer y Cleary (5) con la vacuna preparada en células BHK.

Los títulos de anticuerpos inducidos en ratones inmunizados con la vacuna monovalente a virus 91 fueron bajos, lo que evidencia nuevamente su poca capacidad de inducir una respuesta de anticuerpos neutralizantes.

Las pruebas de Habel y NIH, se han utilizado durante más de veinte años para estimar la potencia antigénica de las vacunas antirrábicas. Sin embargo, muchos investigadores, entre ellos Schneider (172) y Crick (158), cuestionan ambos métodos porque no miden la antigenicidad primaria de las vacunas además de que la vía usada para desafiar a los animales no semeja la infección natural. Como consecuencia de estas objeciones, se han sugerido métodos alternativos para determinar la potencia de las vacunas, entre ellos, la medición de la respuesta de anticuerpos provocada por inmunización primaria de ratones (158). La determinación de anticuerpos en el suero de los animales inmunizados puede efectuarse mediante la técnica estándar de seroneutralización en ratones (151) o por distintas técnicas in vitro cuyos resultados correlacionen con ella. Cabe citar entre otras: la inhibición de campos fluorescentes (RFFIT) (173) (174), la prueba de inhibición por interferencia (175) y la técnica de inmunodifusión radial (176). De todas ellas, la RFFIT, es la que mejor reproduce los resultados obtenidos con la técnica in vivo.

Los títulos de anticuerpos en sueros humanos, determinados comparativamente por las técnicas de CIE y SN; y por CIE y RFFIT han mostrado buena correlación (152) (165). Los resultados hallados en la presente experiencia trabajando con sueros de ratones inmunizados también mostraron correlación, y posibilitan la aplicación de la técnica de CIE (económica, sencilla y rápida) para la estimación de potencia de vacunas antirrábicas en base a su capacidad de inducir una respuesta de anticuerpos en ratones. Cabe hacer notar que esta forma de estimar la potencia antigénica de las vacunas se considera apropiada sólo a nivel de control interno del laboratorio productor y nunca como un valor definitivo de la misma; ya que como se sabe, la respuesta inmunitaria a la vacuna-

ción no está restringida únicamente a la producción de anticuerpos, y una prueba de potencia debe involucrar la respuesta de todos los mecanismos inmunológicos del huésped inmunizado.

Tabla 10

Cinética de formación de anticuerpos en ratones inmunizados (\*) con cinco tipos de vacunas antirrábicas, titulados por las técnicas de seroneutralización (\*\*) y contraelectroforesis (\*\*\*)

Seros anti	Días después de la inmunización							
	7		14		30		70	
	SN	CIE	SN	CIE	SN	CIE	SN	CIE
Trivalente	2410	40	1400	40	266	20	125	10
CVS	125	5	1640	20	418	5	418	10
51	625	40	1189	40	279	10	328	10
91	< 2	< 2	77	5	13	5	33	2
CPZ/19	764	40	625	10	97	2	125	5

(\*) Vacunas sin diluir, 1 dosis de 0,5 ml., vía I.P.; sangrías días 7, 14, 30 y 70.

(\*\*) Títulos expresados como DP50%: la inversa de la dilución de suero que protege al 50% de los ratones inoculados.

(\*\*\*) Títulos expresados como la última dilución de suero que no produjo banda neta y definida.

### 6.1.5.- Pruebas de inmunidad cruzadas

Las vacunas antirrábicas deben ser capaces de poner en marcha todos los mecanismos de defensa del huésped en el menor tiempo posible. Para evaluar la capacidad inmunizante se recurre, entre otras, a pruebas de ruptura de la inmunidad. Para ello se inmunizan animales de experimentación de modo tal que todos alcancen un estado inmunitario comparable, que luego pueda ser puesto a prueba mediante la infección experimental con dosis variables de virus. Se puede comparar la capacidad inmunizante de distintas vacunas en base a la dosis de virus requerida para romper el estado inmunitario inducido por cada una de ellas.

Para comparar la capacidad inmunizante de las vacunas en estudio, se diseñó una primera experiencia en que se determinó la dilución de cada tipo de vacuna capaz de proteger a los ratones inmunizados frente a una infección experimental con una dosis fija (10 000 DL50%) de virus CVS. De esta manera se trató de lograr que la capacidad inmunizante de las vacunas fuera comparable.

Los resultados obtenidos se observan en la tabla 11.

Tabla 11

Máxima dilución de las vacunas trivalente y monovalentes CVS y 51 que protegió a ratones infectados experimentalmente con 10 000 DL50% de virus CVS (\*)

Tipo de vacuna	DL50%
Trivalente	1:20
CVS	1:5
51	1:10

(\*) dosis: 0,03 ml., vfa IC.

El rango de dilución requerido osciló entre 1:5 y 1:20, con excepción de la vacuna 91 que sin diluir sólo protegió a algunos de los animales vacunados frente a 10 000 DL50% de virus CVS.

En base a los resultados obtenidos se diseñó una segunda experiencia en la cual se inmunizaron grupos de 90 ratones por cada una de las vacunas en estudio, con las diluciones determinadas en la experiencia anterior, a fin de estudiar la capacidad inmunizante de cada una de ellas frente, tanto al virus estándar de desafío como a los virus 51 y 91.

Los animales recibieron 2 inoculaciones de 0,5 ml. de vacuna por vía IP con una semana de intervalo. Después de 14 días de la primera vacunación, se separaron en grupos de 10 y cada uno se infectó experimentalmente por vía IC con 1, 10 ó 100 DL100 de las cepas de virus CVS, 51 ó 91. Se eligieron DL100% a fin de aumentar el nivel de exigencia de la prueba.

Paralelamente, se infectaron grupos de ratones control no inmunizados, con las mismas dosis de cada una de las cepas de virus arriba mencionadas.

Todos los animales se observaron durante 14 días, registrándose diariamente la evolución de los síntomas y muertes producidas.

*El criterio adoptado para considerar aceptable la capacidad inmunogénica de las vacunas en estudio fue una mortalidad máxima del 20% en los animales vacunados.*

Los resultados obtenidos figuran en los gráficos 7 A, 8 A, 9 A y 10 .

- 1.- Las mortalidades observadas en animales inmunizados con la vacuna trivalente diluida 1:20 fueron menores al 20% sólo cuando se los infectó con 1 DL100% de virus CVS y 1 ó 10 DL100% de virus 51. Los animales no resultaron protegidos cuando se los infectó con virus 91 (gráfico N° 7 A).
- 2.- Las mortalidades observadas en animales inmunizados con la vacuna CVS diluida 1:5 fueron menores al 20% sólo cuando se los infectó con 1 DL100% de los virus CVS o 51. Cuando los ratones se infectaron con 100 DL100% de virus CVS o 10 DL100% de virus 51, el porcentaje de mortalidad observado fue el máximo aceptable según el criterio de protección establecido. Los animales no resultaron protegidos cuando se los infectó con virus 91 (gráfico N° 8 A).
- 3.- Las mortalidades observadas en animales inmunizados con la vacuna 51 diluida 1:10 fueron inferiores al 20% cuando se infectaron con cualquiera de las 3 dosis probadas de los virus CVS y 51, los animales no resultaron protegidos cuando se los infectó con virus 91 (gráfico N° 9 A).
- 4.- Las mortalidades observadas en animales inmunizados con la vacuna 91 fueron inferiores al 20% cuando se los infectó con 1 DL100% de virus CVS o 51 y con las 3 dosis probadas de virus 91 (gráfico N° 10).
- 5.- Sólo los animales inmunizados con vacuna 91 resultaron protegidos cuando se los in-

PRUEBA DE INMUNIDAD CRUZADA EN RATONES INMUNIZADOS CON LA VACUNA CRL TRIVALENTE FRENTE A LOS VIRUS FIJOS CVS, 51 Y 91

Fig A DILUIDA 20 VECES

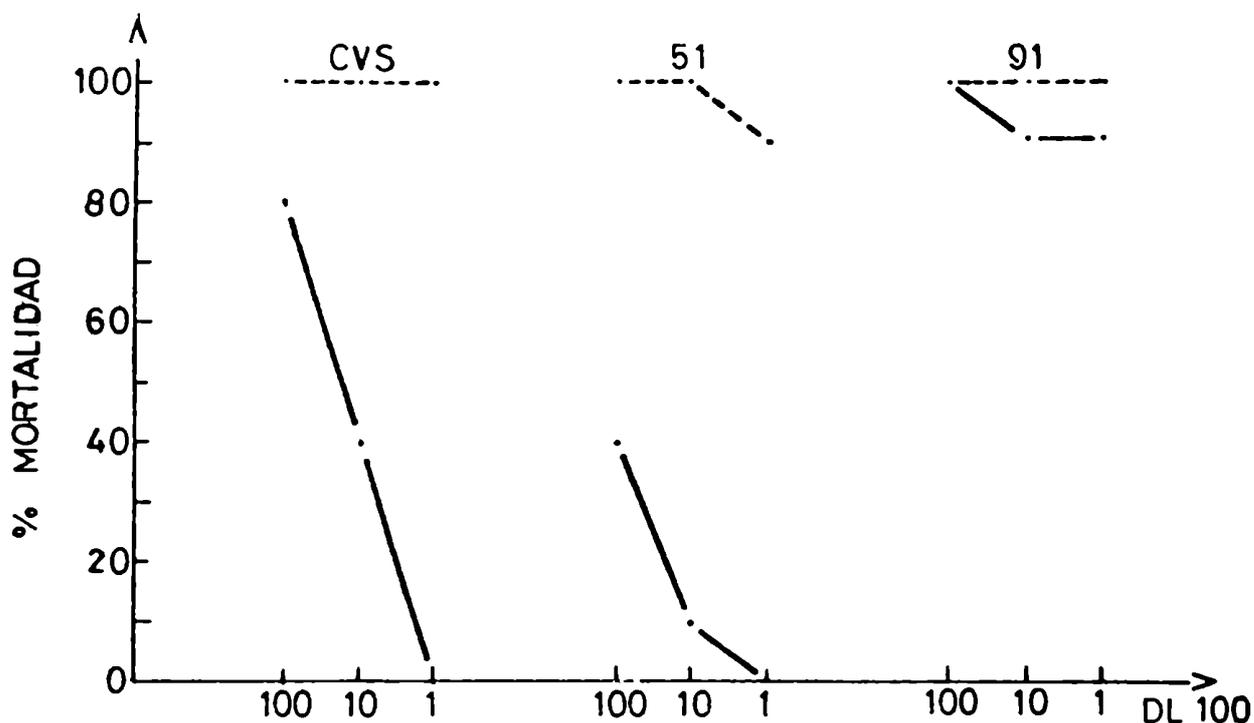


Fig B SIN DILUIR

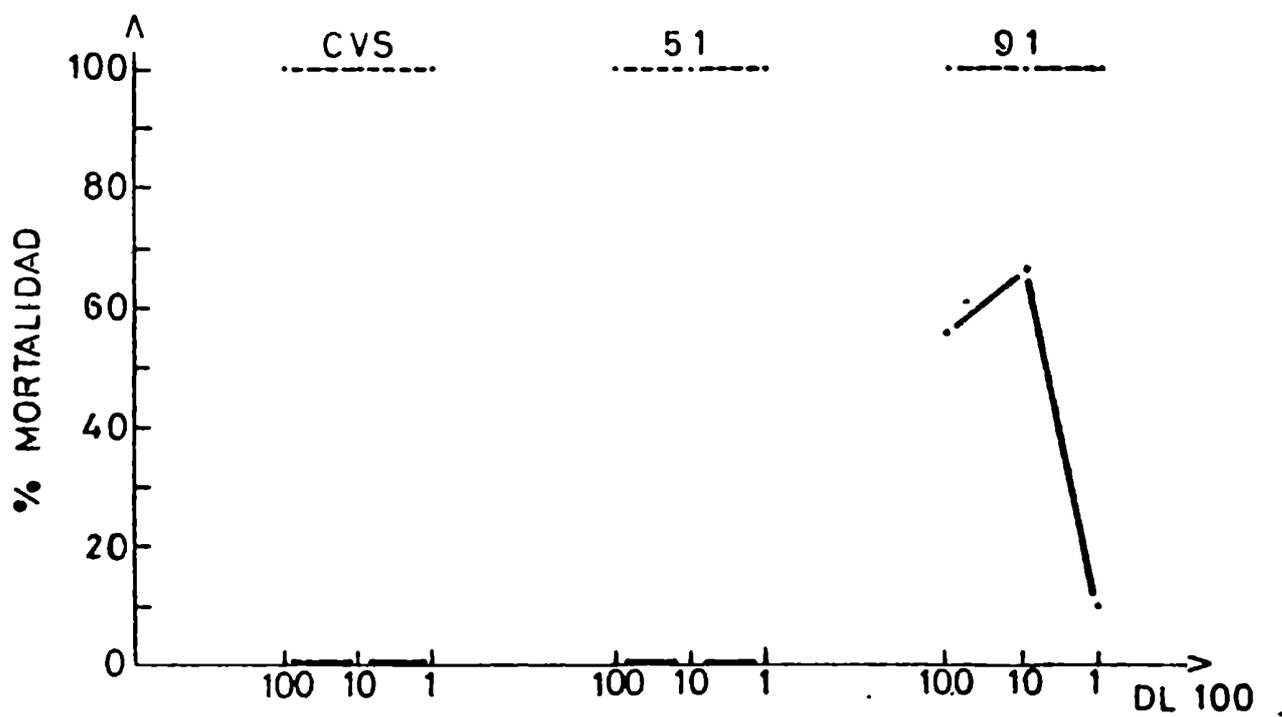


GRAFICO N° 7

PRUEBA DE INMUNIDAD CRUZADA EN RATONES INMUNIZADOS CON LA VACUNA CRL MONOVALENTE A VIRUS CVS FRENTE A LOS VIRUS FIJOS CVS, 51 Y 91

Fig A DILUIDA 5 VECES

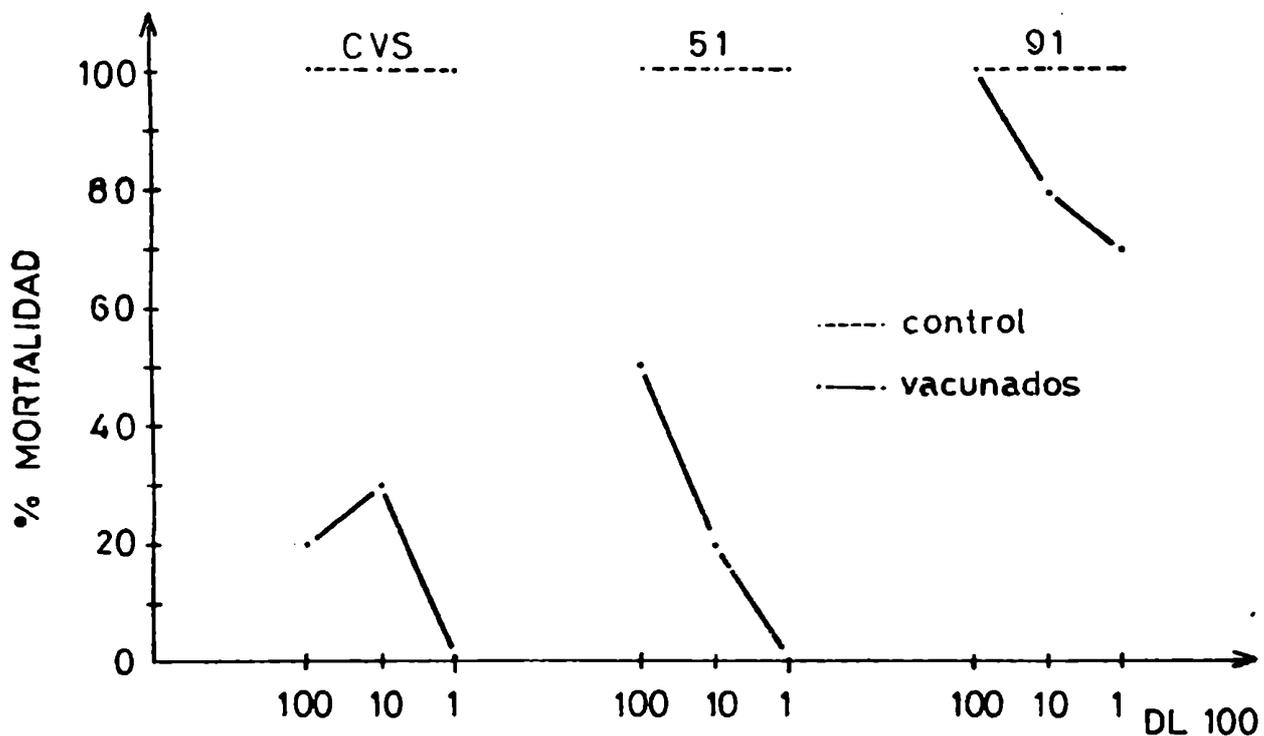


Fig B SIN DILUIR

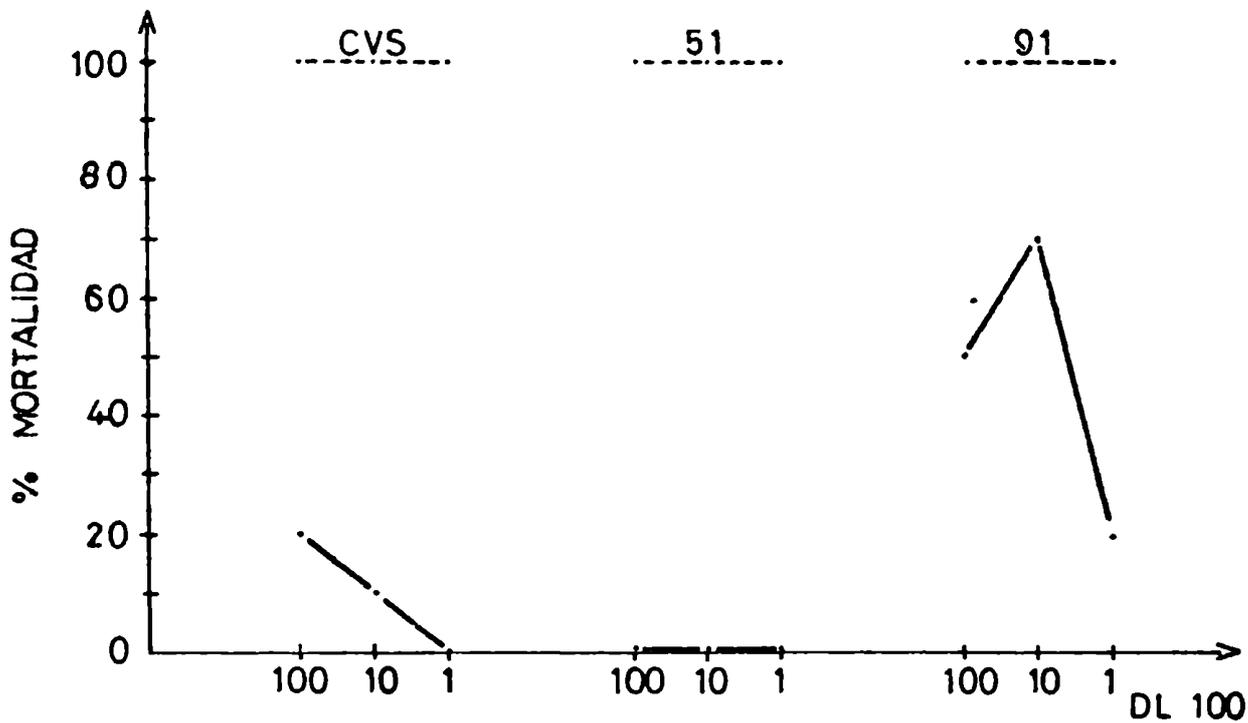


GRAFICO N° 8

PRUEBA DE INMUNIDAD CRUZADA EN RATONES INMUNIZADOS CON LA VACUNA CRL MONOVALENTE A VIRUS 51 FRENTE A LOS VIRUS FIJOS CVS, 51 Y 91

Fig A DILUIDA 10 VECES

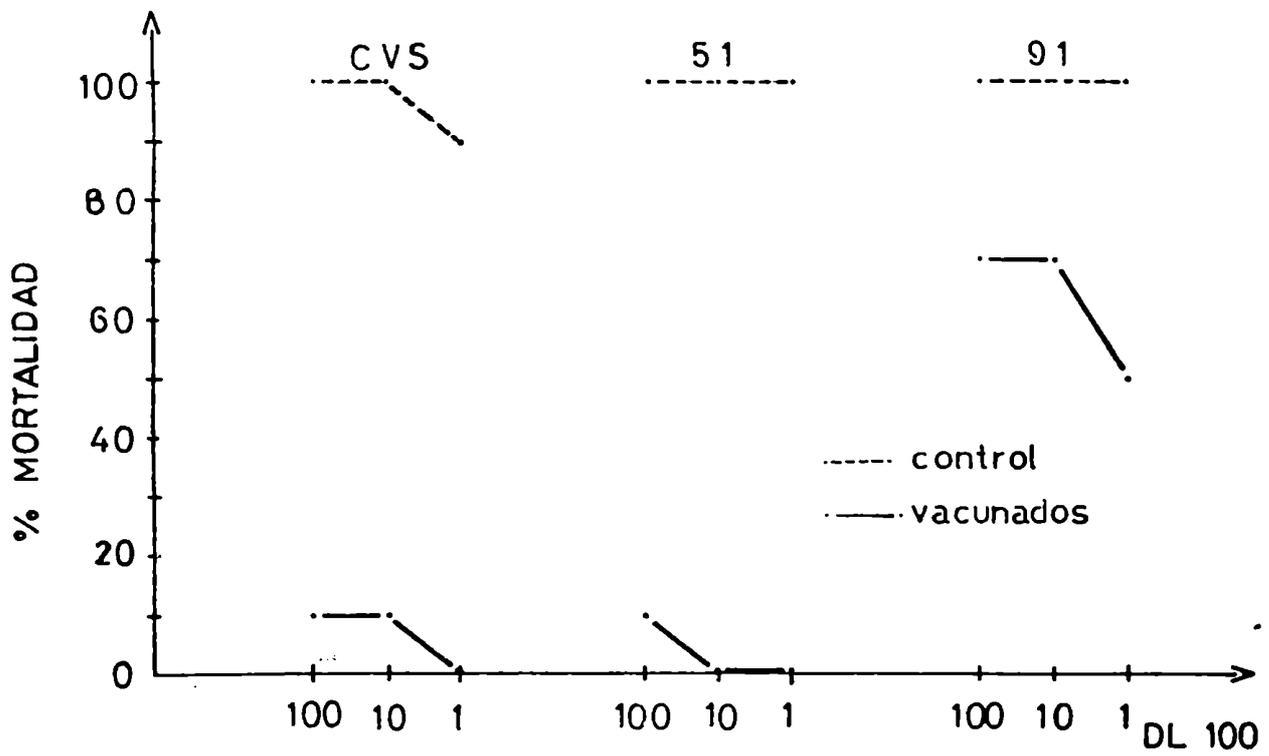


Fig B SIN DILUIR

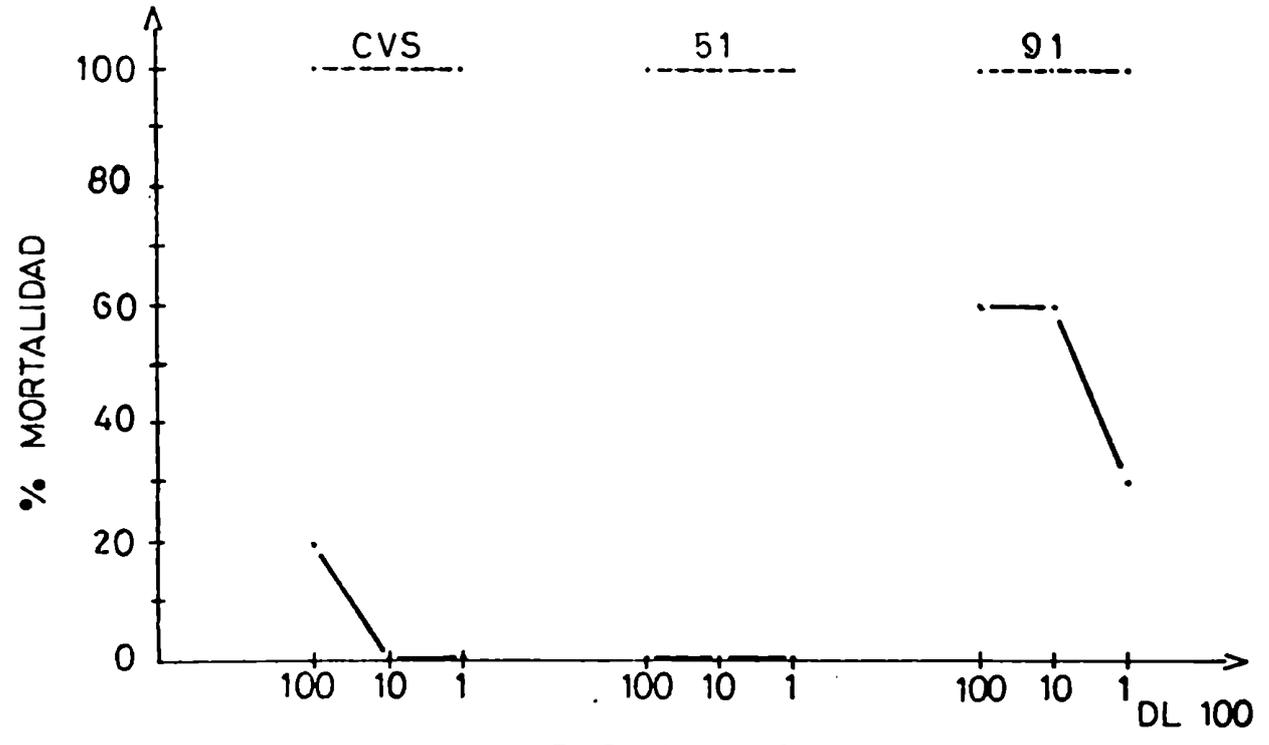


GRAFICO N.º 9

PRUEBA DE INMUNIDAD CRUZADA EN RATONES INMUNIZADOS  
 CON LA VACUNA CRL MONOVALENTE A VIRUS 91 SIN DI-  
 LUIR FRENTE A LOS VIRUS FIJOS CVS, 51 Y 91

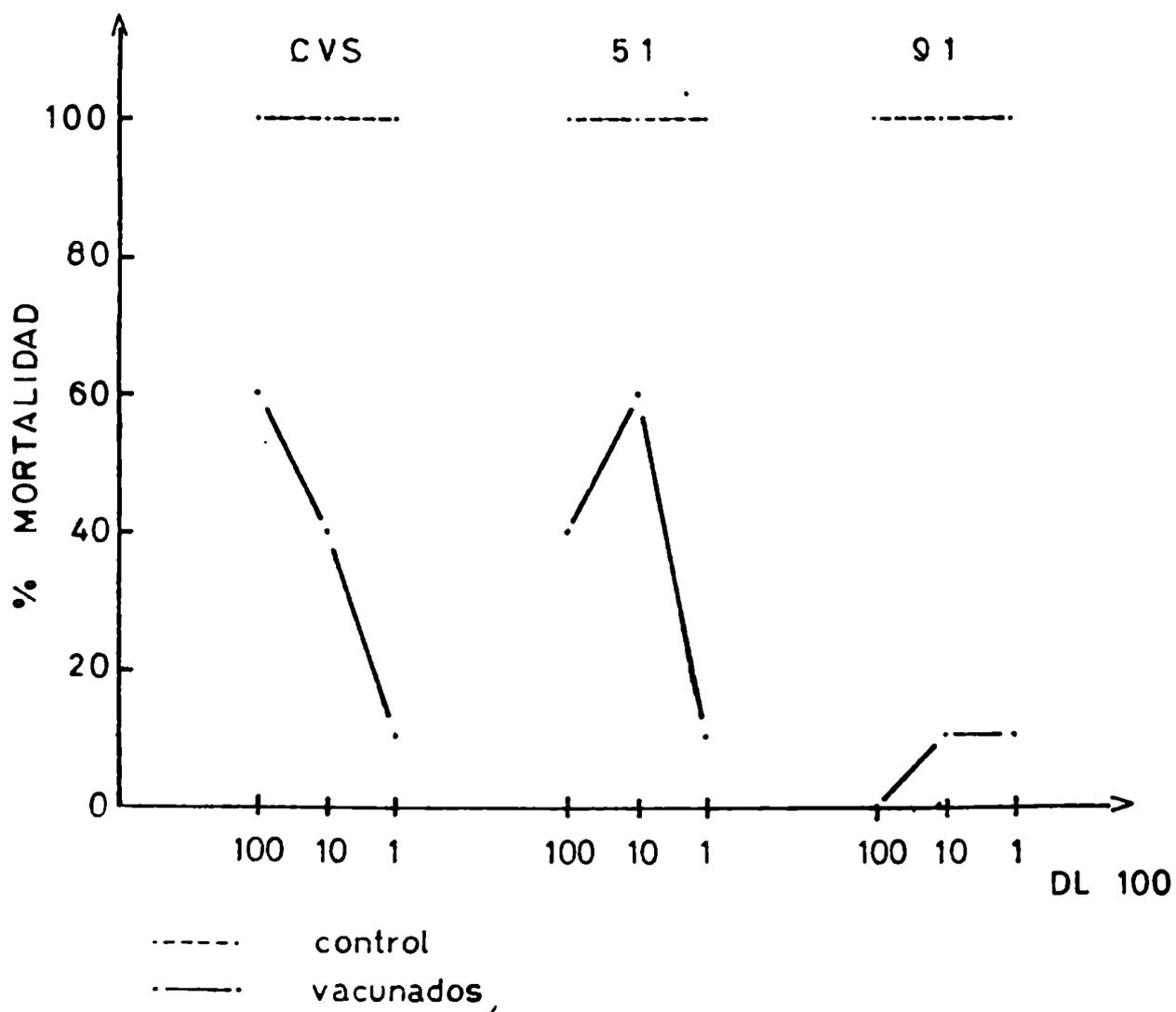


GRAFICO N° 10

fectó con este virus.

En base a los resultados obtenidos en la experiencia anterior, se decidió realizar un tercer ensayo similar inmunizando a los animales con cada una de las vacunas sin diluir. El objetivo de esta prueba fue determinar la capacidad de cada vacuna per se, tal como se las usa, de proteger a los ratones de una infección IC con dosis diferentes de los virus homólogos y heterólogos.

Los resultados figuran en los gráficos N° 7 B, 8 B, 9 B y 10.

1.- Las mortalidades observadas en animales inmunizados con las vacunas trivalente y monovalentes CVS y 51 puras, fueron menores o iguales al 20% cuando se los infectó con cualquiera de las 3 dosis probadas de los virus CVS y 51. Los animales no resultaron protegidos cuando se los infectó con 10 ó 100 DL100% de virus 91 (gráficos N° 7 B, 8 B y 9 B).

2.- Las mortalidades observadas en animales inmunizados con las vacunas trivalente y monovalente CVS sin diluir, fueron menores e iguales al 20% respectivamente, cuando se los infectó con 1 DL100% de virus 91 (gráficos N° 7 B y 8B).

3.- Las mortalidades observadas en animales inmunizados con la vacuna monovalente 51 sin diluir fueron superiores al 20% cuando se los infectó con cualquiera de las 3 dosis de virus 91 probadas (gráfico N° 9 B).

Los resultados obtenidos en esta experiencia con las vacunas trivalente y monovalentes CVS y 51 muestran una relación directa entre concentración de antígeno en la vacuna y protección conferida, de modo que una baja concentración antigénica induciría una respuesta inmunitaria insuficiente para proteger a los animales frente a dosis masivas aun de los virus homólogos. Por otra parte, la escasa protección alcanzada con estas mismas vacunas puras frente al virus 91 pone en evidencia que la respuesta inmunitaria inducida por estos antígenos no es eficiente para proteger a los ratones de la infección con esta cepa de virus. En contraposición, la vacuna 91 induce una respuesta inmunitaria adecuada para proteger a los animales de la infección por el virus homólogo e insuficiente para protegerlos de los heterólogos.

Un estudio similar realizado por Larghi y col. (177), mostró que cuando se inmunizaba a ratones con vacuna CRL (VA = 1,76) diluida 5 veces o con una vacuna elaborada

con células BHK con virus PV (VA = 3,68) diluida 25 veces, 12 de las 16 cepas estudiadas producían mortalidades superiores al 20% y en consecuencia podían considerarse como "atípicas". Cuando los animales se inmunizaban con la misma vacuna CRL sin diluir, sólo 2 de estas cepas (DR 19 y virus 91) seguían comportándose como "atípicas", mientras que no se detectaba ninguna cepa atípica de las 16 estudiadas en los animales inmunizados con la vacuna PV-BHK (de mayor valor antigénico) sin diluir.

Si se tienen en cuenta los VA de las vacunas utilizadas en ambos estudios, se observa que los correspondientes a las vacunas utilizadas en el presente trabajo son intermedios (2,3 - 3,0) entre los hallados por Larghi y col. para las vacunas CRL y BHK por ellos probadas y los resultados hallados son concordantes.

La vacuna 91 utilizada en esta experiencia, a pesar de tener un VA muy bajo (0,08), fue efectiva en proteger a los animales de la infección por virus homólogo.

De lo expuesto, y en base a estudios de diferenciación de cepas realizados por otros autores (79), cabe pensar que el virus 91 presenta ciertas diferencias antigénicas de carácter cualitativo y/o cuantitativo respecto de otros virus fijos como son el CVS y el 51. Sin embargo, no se conoce bien el significado de estas posibles diferencias, ya que vacunas de mayor valor antigénico y preparadas en distinto sustrato como la PV-BHK utilizada por Larghi y col. logran proteger a los animales de la infección por este virus.

Hayashi y col. (178) realizaron en Brasil una experiencia similar a las anteriores, utilizando una vacuna CRL monovalente a virus CVS inactivada con betapropiolactona y diluida 20 veces. Los ratones inmunizados se desafiaron con 1, 10 ó 100 DL100% de virus CVS o de cada una de 24 cepas de virus rábico aisladas de distintas especies en distintas regiones de Brasil. En base a los porcentajes de mortalidad observados, concluyeron que las cepas probadas podían clasificarse en 5 grupos antigénicamente diferenciados.

El diseño experimental utilizado en todos estos trabajos parecería ser útil para poner en evidencia diferencias antigénicas sutiles entre distintas cepas de virus rábico, hecho que le daría un significativo valor teórico. Sin embargo, no debe olvidarse que desde el punto de vista práctico, la importancia de determinar si existen en

la naturaleza cepas atípicas, radica en la posibilidad de que éstas sean las responsables de los fracasos de vacunación que se observan ocasionalmente. A fin de esclarecer este punto debe estudiarse la capacidad de conferir protección de las vacunas per se, tal como se las administra en el huésped a inmunizar. De acuerdo con este enfoque cabe preguntar qué comportamiento hubieran mostrado las cepas virales estudiadas por Hayashi y col. de haber inmunizado a los ratones con esa misma vacuna pero sin diluir, posiblemente sólo unas pocas o tal vez ninguna habrían aparecido como "atípicas".

Estos mismos autores observaron además que para algunas cepas la mortalidad de los animales vacunados disminuía cuando se los infectaba experimentalmente con dosis menos concentradas de virus, como es de esperar, mientras que otras mostraban mayor porcentaje de mortalidad en dosis intermedias de virus; resultados similares fueron hallados por Habel en pruebas de potencia por ruptura de la inmunidad (157). En este trabajo, también se ha observado este comportamiento aberrante para algunas de las vacunas frente a ciertas cepas de virus, por ejemplo en el gráfico N° 8 A frente a virus CVS. De acuerdo a la interpretación de Habel y Wright esto podría deberse a un fenómeno de refuerzo producido selectivamente por las dosis de virus más elevadas (157).

#### 6.1.6.- Tratamientos postexposición

La profilaxis de la rabia en el hombre, a diferencia de otras virosis, se realiza después de la presunta exposición al virus. Se considera indispensable que las vacunas antirrábicas sean capaces de inducir una sólida respuesta inmunitaria en el menor tiempo posible, a fin de prevenir el acceso del virus al SNC.

Para valorar la capacidad protectora de las vacunas en estudio, se aplicó el esquema de tratamiento postexposición en ratones descrito por Bijlenga (179).

6.1.6.1.- Esta experiencia se realizó para determinar la dosis de virus fijos (CVS, 51 y 91) cuya infectividad pudiera ser inhibida por las vacunas en estudio.

Se infectaron grupos de 40 ratones con 1, 10 y 100 DL50 de los virus CVS, 51 ó 91 con volúmenes de 0,2 ml. por vía intramuscular. Después de 24 hs., se dividieron en grupos de 10 animales cada uno y se inmunizaron por vía I.P. con 0,5 ml. de cada una de las vacunas a estudiar.

Por cada tipo de virus se infectaron además grupos de 10 ratones con 1, 10 y 100 DL50% de virus, que no fueron posteriormente vacunados.

Los resultados observados muestran que:

- a) Una DL50% de virus produjo una baja mortalidad, lo que impidió sacar conclusiones respecto de la capacidad protectora de las diferentes vacunas. Pudo observarse una letalidad levemente mayor en vacunados que en animales control, para algunas vacunas (tabla 12).
- b) 10 y 100 DL50% de virus produjeron un 100% de mortalidad tanto en animales controles como en vacunados, lo que impidió nuevamente sacar conclusiones.

6.1.6.2.- En base a los resultados presentados en el punto 6.1.6.1. y a la técnica descrita por Mifune, K. y Yamada, A. (132) se decidió repetir el estudio variando el número de animales por grupo, la concentración de virus infectante, y el esquema de inmunización.

Se infectaron grupos de 160 ratones con 2 DL50% (IM) de los virus CVS, 51 ó 91 con volúmenes de 0,2 ml. por vía IM. Inmediatamente después de la infección, se dividieron en grupos de 40 animales cada uno que se inmunizaron por vía IP con 0,5 ml. de cada una de las vacunas a estudiar. La inmunización se repitió a las 24, 48, 72 y

96 hs. después de la infección.

Todos los animales se observaron durante 14 días, registrándose diariamente la evolución de los síntomas y las muertes producidas.

Se fijó arbitrariamente, como criterio de protección mínima, una reducción de la mortalidad igual o superior al 20% respecto de la de los animales control.

Ninguna de las vacunas estudiadas alcanzó el nivel de protección establecido como mínimo (tabla 13).

Tabla 12

Resultados de los tratamientos postexposición de ratones infectados con 1 DL50 (\*) de los virus CVS, 51 ó 91, e inmunizados con una única dosis de vacuna (\*\*)

Tipos de virus	Tipos de vacunas								Controles no vacunados	
	Trivalente		CVS		51		91		% M	% M
	M/T (x)	% M (xx)	M/T	% M	M/T	% M	M/T	% M		
CVS	1/10	10	3/10	30	2/10	10	1/10	10	0	0
51	0/10	0	2/10	20	0/10	0	0/10	0	0	20
91	3/10	30	2/10	20	3/10	30	5/10	50	50	20

(\*) Vía IM, 0,2 ml.

(\*\*) 24 hs. postinfección, 0,5 ml. vía IP.

(x) Muertos sobre total

(xx) Porcentaje de mortalidad

Tabla 13

Resultados de los tratamientos postexposición de ratones infectados con 2 DL50 (\*) de los virus CVS, 51 ó 91, e inmunizados con cinco dosis de vacuna (\*\*)

Tipos de virus	Tipos de vacunas								Controles no vacunados	
	Trivalente		CVS		51		91		% M	% M
	M/T (x)	% M (xx)	M/T	% M	M/T	% M	M/T	% M		
CVS	23/40	57,5	27/39	69,3	25/40	62,5	20/39	51,3	66,7	66,7
51	32/40	80	31/39	79,5	35/40	87,5	33/40	82,5	85	85
91	34/38	89,5	38/40	95	33/39	84,6	36/40	90	90	87,5

(\*) Vía IM, 0,2 ml.

(\*\*) 0, 24, 48, 72 y 96 hs. postinfección

(x) Muertos sobre total

(xx) Porcentaje de mortalidad

Los resultados observados muestran que las vacunas en estudio no son capaces de proteger a los ratones inmunizados con una o cinco dosis de las mismas después de una infección por los virus fijos CVS, 51 ó 91. Estos resultados no son sorprendentes, si se tiene en cuenta que los virus fijos presentan períodos de incubación muy cortos (entre 5 y 6 días), lo que impide que transcurra el tiempo suficiente para que las vacunas induzcan una sólida respuesta inmunitaria.

Los datos bibliográficos muestran que los estudios de tratamientos postexposición, se realizan en distintos modelos animales, con diferentes tipos de vacuna y esquemas de vacunación, pero en todos ellos, se trabaja invariablemente con virus calle. Esto obedece por un lado, a la necesidad de tratar de reproducir fielmente las condiciones naturales de una infección por virus rábico, pero además, probablemente se deba a la imposibilidad de comprobar la capacidad protectora de una dada vacuna después de una exposición por virus fijos.

Los resultados hallados en esta experiencia, sugieren la necesidad de estudiar la capacidad de protección de las vacunas CRI trivalente y monovalentes CVS, 51 y 91 en tratamientos postexposición con virus calle.

## 6.2.- Virus calle

Hasta el momento, en este trabajo se ha estudiado mediante diversas experiencias, la capacidad de las vacunas CRL trivalente y monovalentes CVS, 51 y 91 de inducir una respuesta adecuada de anticuerpos y de estimular una respuesta inmunitaria eficiente para proteger ratones vacunados antes o después de una infección con las cepas de virus rábicos fijos que las componen.

Por otra parte, debe tenerse en cuenta que la infección natural se produce habitualmente por mordedura de un animal rabioso. Este introduce una cepa de virus rábico de la calle, por vía periférica, en un huésped que será vacunado después de la exposición.

Como se ha visto en el punto 6.1.6, las vacunas en estudio no lograron proteger ratones previamente infectados con virus fijos, posiblemente debido a la patogenia de los mismos. Los virus calle presentan una patogenia diferente (puntos 3.2 y 3.3) y podrían además diferir antigénicamente de los fijos. Por ello, resultó de interés investigar la eficacia del estado inmunitario inducido por las vacunas CRL en estudio, frente a virus calle. Para ello, se seleccionaron dos cepas de virus que fueran aisladas de dos de los huéspedes más importantes en los ciclos de rabia doméstica en nuestro país: rabia canina y bovina (ver punto 5.2.2.) y se recurrió a las mismas pruebas que se utilizaran en el estudio precedente con virus fijos.

Los detalles del diseño experimental se describen en la sección respectiva del punto 6.1.

### 6.2.1.- Pruebas de potencia cruzadas

Esta experiencia se realizó para comprobar si el estado inmunitario en ratones inmunizados con las vacunas trivalente o monovalentes CVS, 51 ó 91, era capaz de protegerlos frente a una infección letal, por vía IC, con los virus calle 1026/80 y 1426/79 (ver punto 5.2.2.).

Los animales se inmunizaron e infectaron experimentalmente siguiendo la técnica de NIH descrita en el punto 5.5.6.

Los resultados obtenidos se observan en la tabla 14.

Tabla 14

Resultados de las pruebas de potencia de NIH de las vacunas antirrábicas trivalente, CVS, 51 y 91 frente a dos cepas de virus calle: 1026/80 y 1426/79

Tipo de virus	Tipos de vacunas									
	Trivalente		CVS		51		91		CPZ/19(x)	
	DE50	VA	DE50	VA	DE50	VA	DE50	VA	DE50	VA
1026/80	65,4	2,0	80,6	2,4	50,3	1,5	41,4	1,2	33,4	1,0
1426/79	155,0	8,0	96,6	5,0	103,7	5,4	47,6	2,5	19,3	1,0

(x) RMP CPZ/19 = 0,3

1.- Las DE50% obtenidas para todas las vacunas estudiadas, fueron elevadas (19,3-155), los VA hallados fueron en todos los casos superiores al RMP = 0,3.

2.- Las DE50% y los VA hallados fueron más elevados cuando se desafió con el virus 1426/79 que cuando se lo hizo con el 1026/80, para todas las vacunas exceptuando la de referencia.

3.- Las DE50% halladas para la vacuna CPZ/19 frente a los dos virus calle probados fueron menores que las halladas para cualquiera de las vacunas en estudio.

#### 6.2.2.- Pruebas serológicas

##### 6.2.2.1.- Pruebas de seroneutralización cruzadas

Esta experiencia se realizó para estudiar la capacidad de los anticuerpos inducidos por cada tipo de vacuna CRL estudiada, de neutralizar a los virus calle 1026/80 y 1426/79 (ver punto 5.2.2.).

Los ratones se inmunizaron y se sangraron de acuerdo al esquema descrito en el punto 6.1.4. Los sueros se titularon por seroneutralización en ratones siguiendo la técnica descrita en el punto 5.6.1. Los animales se observaron durante un mes, registrándose diariamente la evolución de los síntomas y las muertes producidas.

Los resultados obtenidos figuran en la tabla 15.

Tabla 15

Resultados (\*) de las pruebas de seroneutralización cruzadas obtenidas con sueros (\*\*) anti CVS, 51, 91 y CPZ/19

Tipos de virus	Tipos de vacunas				
	Trivalente	CVS	51	91	CPZ/19
1026/80	30	25	17	66	5
1426/79	125	125	69	106	17

(\*) Expresados como títulos: inversa de la dilución que protege al 50% de los ratones inoculados.

(\*\*) Una inoculación de 0,5 ml., vía IP. Sangrías: trivalente y CPZ/19, día 7; CVS, 51 y 91, día 14.

- 1.- Todos los sueros estudiados fueron capaces de neutralizar a los dos virus calle, siendo mayores los títulos alcanzados frente al virus 1426/79.
- 2.- Los sueros correspondientes a la vacuna trivalente y monovalentes CVS y 51 alcanzaron títulos comparables frente al virus 1026/80.
- 3.- El suero correspondiente a la vacuna 91 alcanzó el mayor título frente al virus 1026/80.
- 4.- Los sueros obtenidos por inmunización con las vacunas trivalente y monovalente CVS, alcanzaron los mayores títulos neutralizantes frente al virus 1426/79.
- 5.- El suero obtenido por inmunización con vacuna 91 mostró una capacidad neutralizante comparable y en algunos casos mejor que los otros sueros frente a ambos virus.
- 6.- El suero obtenido por inmunización con la vacuna de referencia CPZ/19 mostró poca capacidad neutralizante frente a los dos virus calle estudiados.

#### 6.2.3.- Pruebas de inmunidad cruzadas

Esta experiencia se realizó para estudiar la capacidad de las vacunas CRL en estudio de conferir inmunidad frente a una infección letal, por vía IC, con los virus calle 1026/80 y 1426/79 (ver punto 5.2.2.).

Los detalles del diseño experimental se describen en el punto 6.1.5.

PRUEBA DE INMUNIDAD CRUZADA EN RATONES INMUNIZADOS CON LA VACUNA CRL TRIVALENTE FRENTE A LOS VIRUS CALLE 1026/80 Y 1426/79

Fig. A DILUIDA 20 VECES

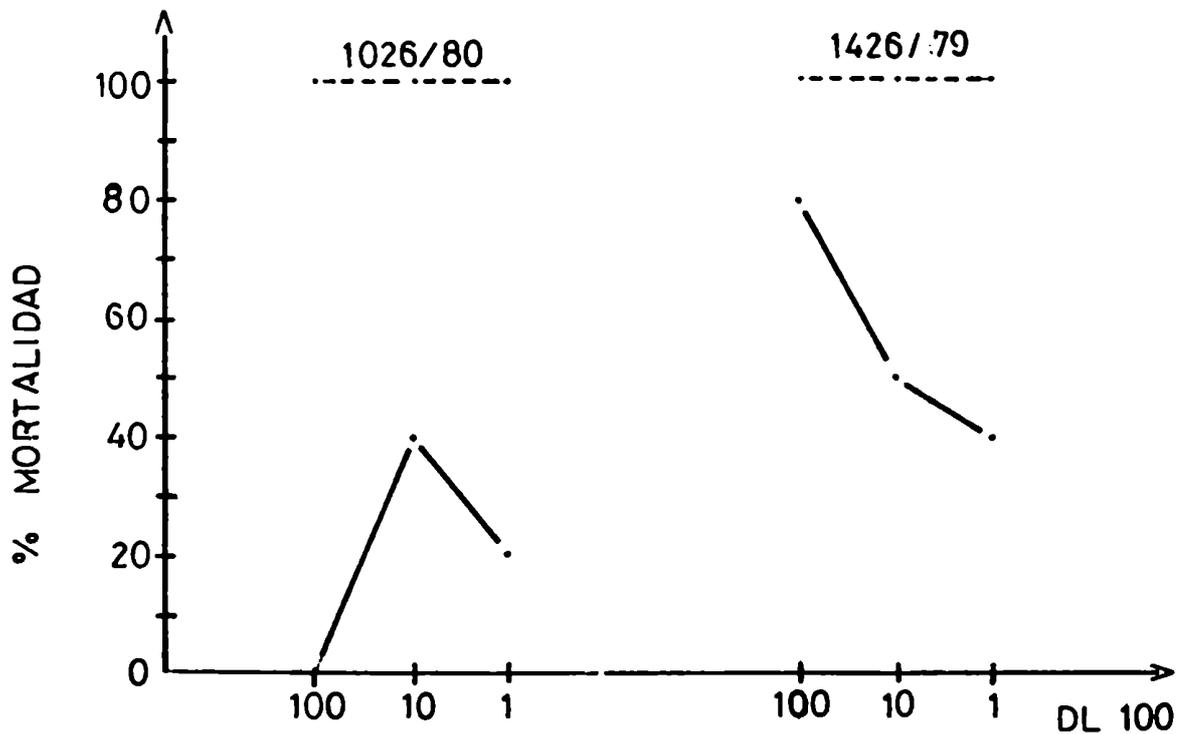


Fig. B SIN DILUIR

----- control  
 - - - - - vacunados

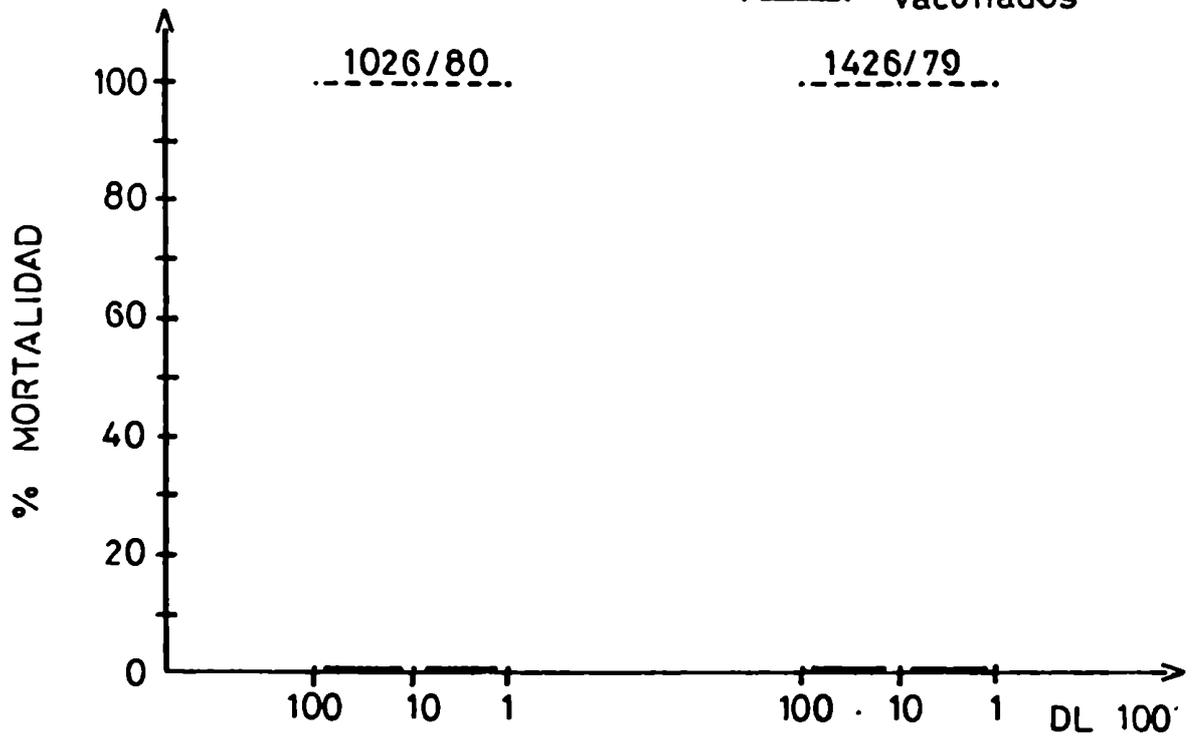


GRAFICO N° 11

PRUEBA DE INMUNIDAD CRUZADA EN RATONES INMUNIZADOS CON LA VACUNA CRL MONOVALENTE A VIRUS CVS FRENTE A LOS VIRUS CALLE 1026/80 Y 1426/79

Fig. A DILUIDA 5 VECES

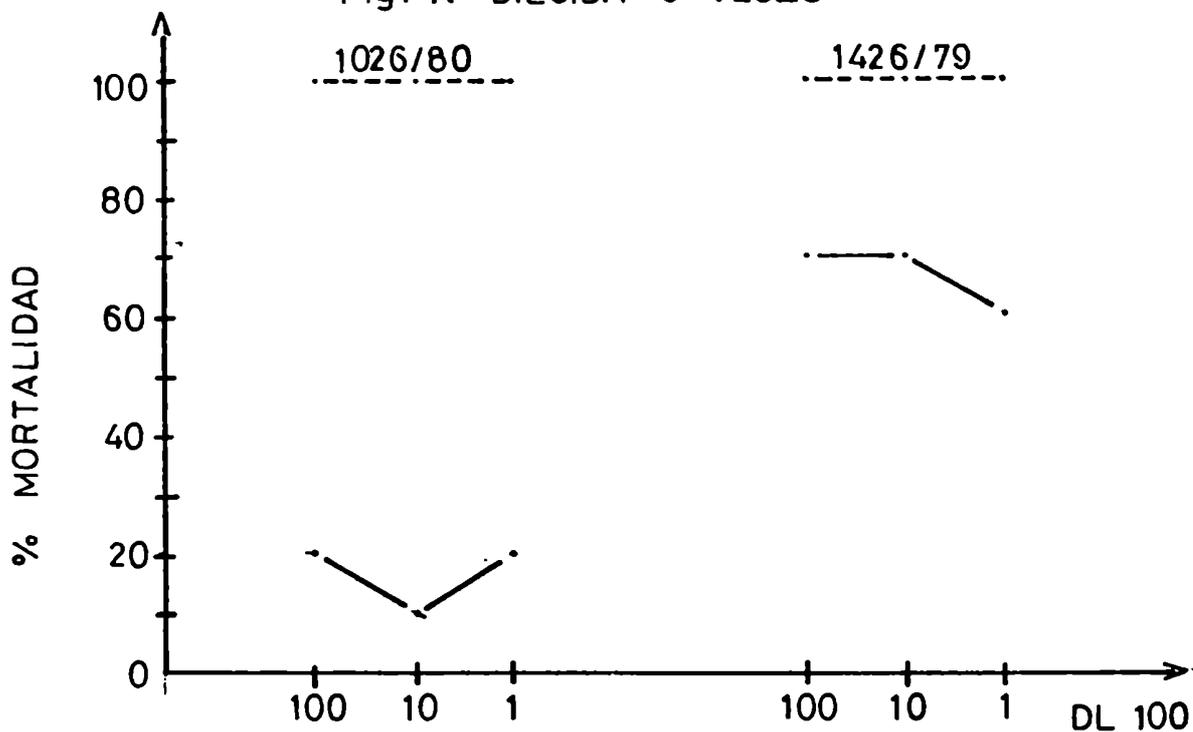


Fig. B SIN DILUIR

----- control  
 - - - - - vacunados

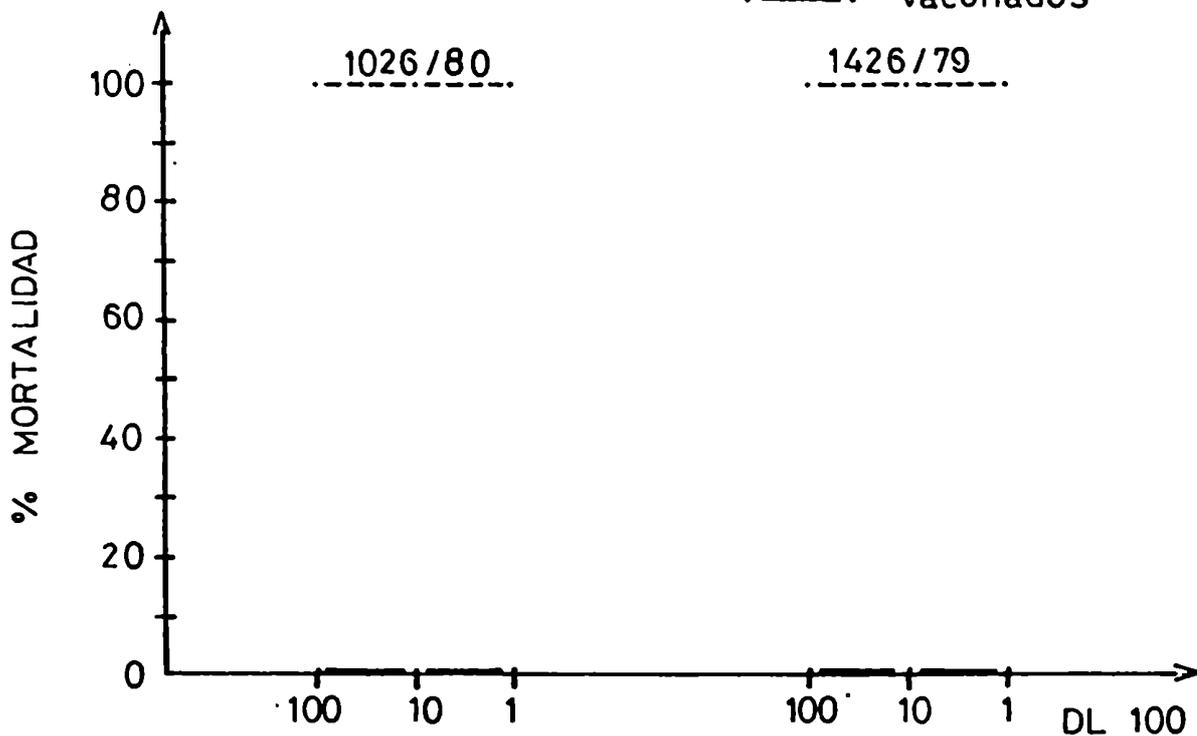


GRAFICO N° 12

PRUEBA DE INMUNIDAD CRUZADA EN RATONES INMUNIZADOS CON LA VACUNA CRL MONOVALENTE A VIRUS 51 FRENTE A LOS VIRUS CALLE 1026/80 Y 1426/79

Fig. A DILUIDA 10 VECES

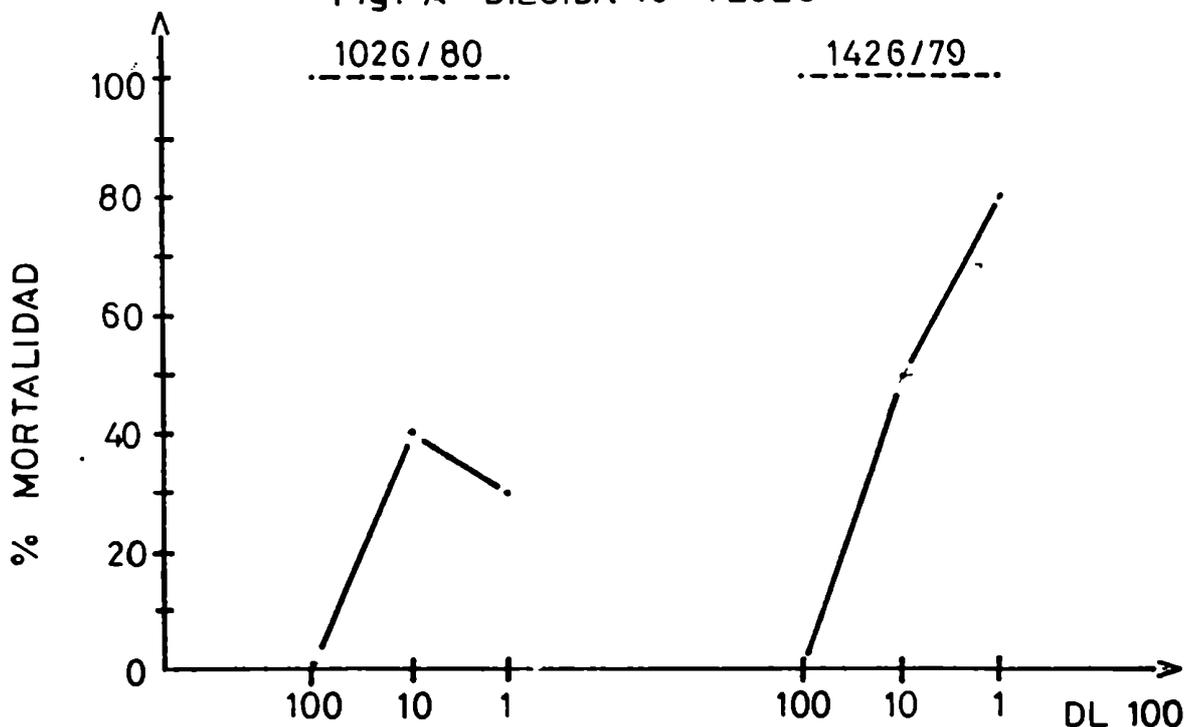


Fig. B SIN DILUIR

----- control  
 - - - - - vacunados

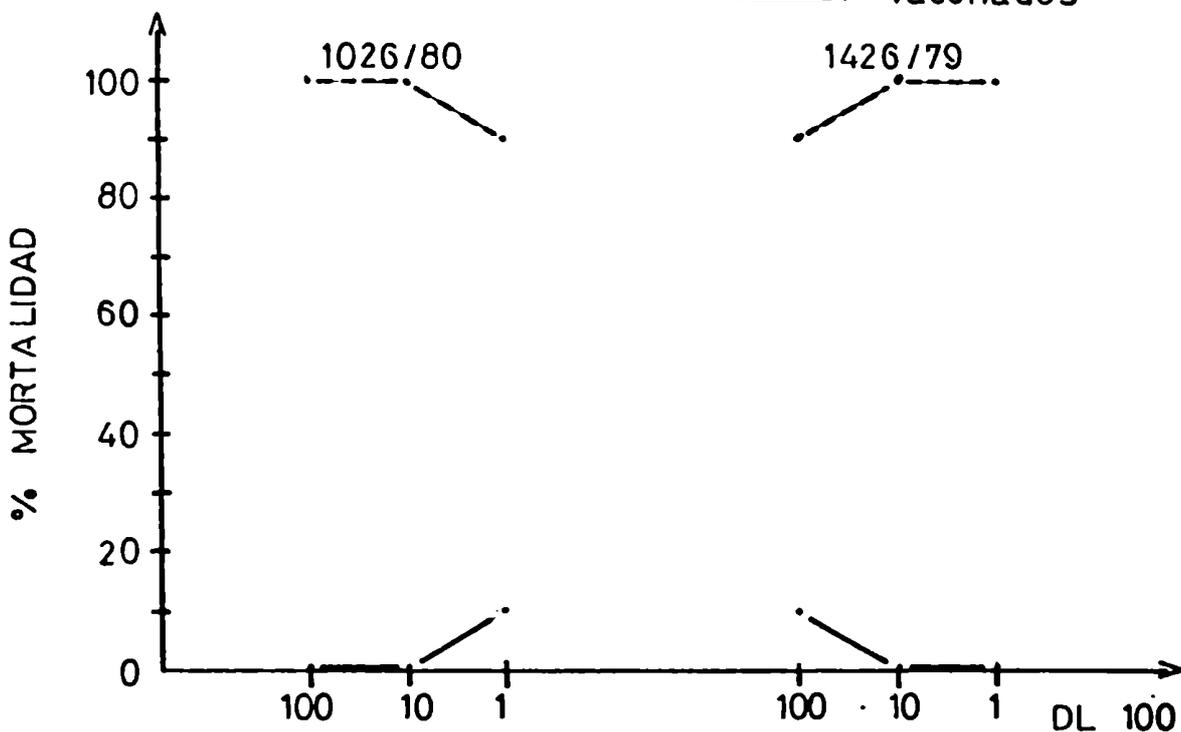


GRAFICO N° 13

PRUEBA DE INMUNIDAD CRUZADA EN RATONES INMUNIZADOS  
 CON LA VACUNA CRL MONOVALENTE A VIRUS 91 SIN DI-  
 LUIR FRENTE A LOS VIRUS CALLE 1026 / 80 Y 1426 / 79

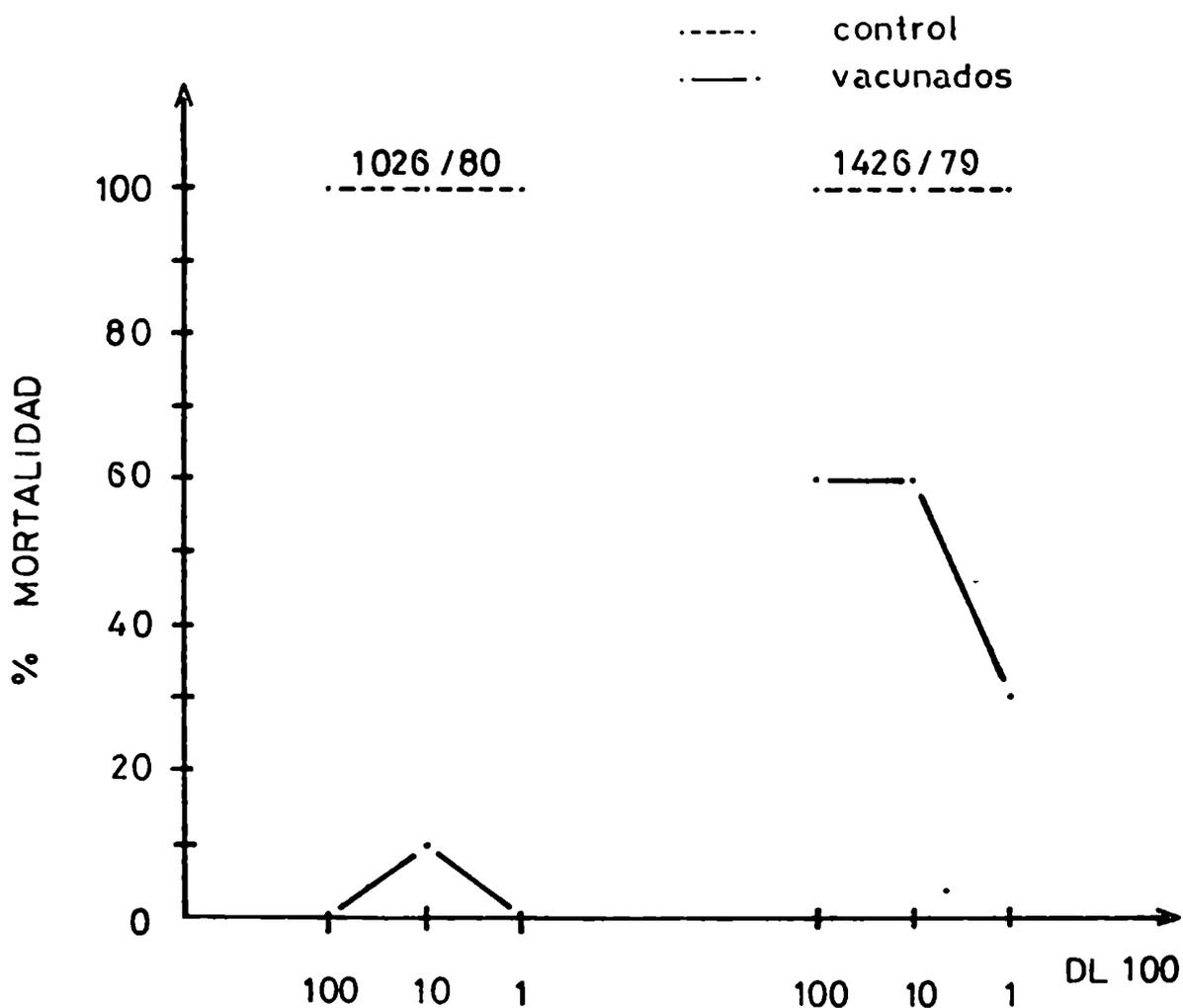


GRAFICO N° 14

*El criterio adoptado para considerar aceptable la capacidad inmunogénica de las vacunas en estudio fue una mortalidad máxima del 20% en los animales vacunados.*

Los resultados obtenidos figuran en los gráficos 11, 12, 13 y 14.

- 1.- Las mortalidades observadas en animales inmunizados con la vacuna trivalente diluida 20 veces fueron inferiores al 20% sólo cuando se los infectó con 100 DL100% del virus 1026/80. Cuando los ratones se infectaron con 1 DL100% del mismo virus, el porcentaje de mortalidad observado fue el máximo aceptable de acuerdo al criterio de protección establecido. No se observó protección frente al virus 1426/79 (gráfico N° 11 A).
- 2.- Las mortalidades observadas en animales inmunizados con la vacuna CVS diluida 5 veces fueron iguales o menores al 20% cuando se infectaron con 1, 10 ó 100 DL100% del virus 1026/80. No se observó protección frente al virus 1426/79 (gráfico N° 12 A).
- 3.- Las mortalidades observadas en animales inmunizados con la vacuna 51 diluida 10 veces fueron menores al 20% sólo cuando los ratones se infectaron con 100 DL100% de los virus 1026/80 y 1426/79 (gráfico N° 13 A).
- 4.- Las mortalidades observadas en animales inmunizados con la vacuna 91 sin diluir fueron menores al 20% cuando se infectaron con cualquiera de las 3 dosis probadas de virus 1026/80. No se observó protección frente al virus 1426/79 (gráfico N° 14).
- 5.- No se observó mortalidad alguna en animales inmunizados con las vacunas trivalente y monovalente CVS sin diluir, cuando se los infectó con cualquiera de las 3 dosis de los dos virus calle probados (gráficos Nos. 11 y 12 B).
- 6.- Las mortalidades observadas en animales inmunizados con la vacuna monovalente 51 sin diluir, fueron inferiores al 20% cuando se los infectó con cualquiera de las 3 dosis de los dos virus calle probados (gráfico N° 13 B).

#### 6.2.4.- Tratamientos postexposición

Esta experiencia se realizó para investigar la capacidad de las vacunas CRL en estudio de proteger a los ratones después de una infección por vía periférica con las cepas de virus rábico de la calle 1026/80 y 1426/79 (ver punto 5.2.2.).

Los ratones se infectaron y vacunaron siguiendo el esquema descrito en el punto 6.1.6. Todos los animales se observaron durante un mes, registrándose diariamente la evolución de los síntomas y las muertes producidas.

Los resultados obtenidos figuran en las tablas 16 y 17.

Tabla 16

Resultados de los tratamientos postexposición de ratones infectados con 2 DL50 (\*) de los virus 1026/80 y 1426/79, e inmunizados con una dosis de vacuna (\*\*)<sup>o</sup>

Tipos de virus	Tipos de vacunas										Controles no vacunados
	Trivalente		CVS		51		91		CPZ/19		
	M/T (x)	% M (xx)	M/T	% M	M/T	% M	M/T	% M	M/T	% M	
1026/80	9/20	45	7/20	35	10/17	59	11/20	55	5/20	25	55
1426/79	6/20	30	12/20	60	10/20	50	12/20	60	15/20	75	55

(\*) Vía IM, 0,2 ml.

(x) Muertos sobre total.

(\*\*) Vía IP, 0,5 ml., hora 0.

(xx) Porcentaje de mortalidad.

o Criterio de protección: reducción de la mortalidad igual o superior al 20% respecto de la de los animales testigos no vacunados.

Tabla 17

Resultados de los tratamientos postexposición de ratones infectados con 2 DL50 (\*) de los virus 1026/80 y 1426/79, e inmunizados con 5 dosis de vacuna (\*\*)<sup>o</sup>

Tipos de virus	Tipos de vacunas										Controles no vacunados
	Trivalente		CVS		51		91		CPZ/19		
	M/T (x)	% M (xx)	M/T	% M	M/T	% M	M/T	% M	M/T	% M	
1026/80	0/20	0	4/20	20	5/20	25	8/20	40	5/20	25	55
1426/79	4/20	20	7/20	35	5/19	26	13/20	65	12/20	60	55

(\*) Vía IM, 0,2 ml.

(x) Muertos sobre total.

(\*\*) Vía IP, 0,5 ml., horas 0, 24, 48, 72 y 96.

(xx) Porcentaje de mortalidad.

o Criterio de protección: reducción de la mortalidad igual o superior al 20% respecto de la de los animales testigos no vacunados.

1.- Cuando el tratamiento consistió en una única dosis de vacuna dada inmediatamente después de la infección, se observó que:

a) las vacunas monovalentes CVS y CPZ/19 fueron las únicas dos que confirieron protección frente al virus 1026/80.

b) sólo la vacuna trivalente confirió protección frente al virus 1426/79.

2.- Cuando el tratamiento consistió en 5 dosis de vacuna dadas a las horas 0, 24, 48, 72 y 96 después de la infección, se observó que:

a) todas las vacunas excepto la monovalente 91, fueron capaces de proteger a los animales frente al virus 1026/80.

b) la vacuna trivalente y las monovalentes CVS y 51 confirieron protección frente al virus 1426/79.

Estos resultados fueron confirmados mediante la repetición de la experiencia, infectando el doble de animales por grupo y tratándolos según el esquema de 5 dosis de vacuna. En esta oportunidad no se incluyó la vacuna de referencia.

Los resultados obtenidos figuran en la tabla 18.

Tabla 18

Confirmación de resultados de los tratamientos postexposición de ratones infectados con 2 DL 50 (\*) de los virus 1026/80 y 1426/79, e inmunizados con 5 dosis de vacuna (\*\*) o

Tipos de virus	Tipos de vacunas								Controles no vacunados
	Trivalente		CVS		51		91		
	M/T(x)	% M (xx)	M/T	% M	M/T	% M	M/T	% M	
1026/80	7/40	17,5	9/40	22,5	10/40	25	16/40	40	55
1426/79	8/40	20	6/40	15	9/36	25	15/40	37,5	50

(\*) Vía IM, 0,2 ml.

(x) Muertos sobre total

(\*\*) Vía IP, 0,5 ml., horas 0, 24, 48, 72 y 96.

(xx) Porcentaje de mortalidad

o Criterio de protección: reducción de la mortalidad igual o superior al 20% respecto de la de los animales testigos no vacunados.

De acuerdo a los objetivos con que se incluyeron los estudios de comportamiento de las vacunas frente a virus calle, se discuten de manera global los resultados obte-

nidos y los mismos se resumen en la tabla 19.

Los títulos de anticuerpos neutralizantes alcanzados por las vacunas trivalente, CVS, 51 y CPZ/19 (punto 6.2.2.) fueron bajos frente a ambos virus calle, si se comparan con los alcanzados frente a los virus fijos (punto 6.1.3.2.). La vacuna 91, en cambio, indujo anticuerpos con una capacidad similar para neutralizar tanto a los dos virus calle como a los fijos. A pesar de los bajos títulos de anticuerpos neutralizantes obtenidos, las DE50% alcanzadas en las pruebas de NIH (punto 6.2.1.) por las vacunas trivalente, CVS, 51 y CPZ/19 fueron comparables a las obtenidas en pruebas similares frente a virus fijos (punto 6.1.2.), y las alcanzadas con la vacuna 91 fueron más elevadas que las obtenidas con virus fijos. Estos resultados indicarían la importancia de otros mecanismos, diferentes de los anticuerpos, involucrados en la protección en este tipo de modelo experimental, tales como interferón (135)(180) o inmunidad celular (143)(144)(145), sin descartar posibles diferencias en la patogenia de los virus fijos y calle estudiados.

Si se comparan los resultados de las pruebas de inmunidad y de potencia cruzadas (puntos 6.2.1. y 6.2.3.), llama la atención que a pesar de que en pruebas de NIH se obtuvieron DE50% elevadas y VA aceptables frente a los dos virus calle; las vacunas trivalente, CVS y 51 diluidas no siempre protegieron a los ratones del desafío IC con mayor número de dosis letales como las usadas en las pruebas de inmunidad cruzadas; los que en cambio resultaron protegidos cuando se inmunizaron con estas mismas vacunas sin diluir. Estos resultados muestran por una parte, la relación que existe entre la dosis de desafío y la protección conferida y por otra, confirman la necesidad de respetar la recomendación del Comité de Expertos en Rabia de la Organización Mundial de la Salud (99) que dice que las vacunas no deben ser diluidas por alto que sea su VA.

El hecho de que la vacuna 91 sin diluir no protegiera en pruebas de inmunidad cruzadas a los ratones desafiados con virus 1426/79 a pesar de su alto VA frente al mismo, puede atribuirse también a la gran diferencia en el número de dosis letales administradas en uno y otro tipo de prueba.

El comportamiento de la vacuna trivalente diluida y sin diluir frente a los vi-

Tabla 19

Resumen de los resultados obtenidos en las pruebas de potencia e inmunidad cruzadas y niveles de anticuerpos neutralizantes alcanzados con las vacunas trivalente y mono-valentes CVS, 51, 91 y CPZ/19 frente a los virus calle 1026/80 y 1426/79

Tipo de virus	Tipo de vacuna	Tipo de prueba				
		NIH		SN	PIC 1]	
		DE50	VA		D 2]	S/D 3]
1026/80	Trivalente	65,4	2,0	30	PP 4]	P 5]
	CVS	80,6	2,4	25	P	P
	51	50,3	1,5	17	PP	P
	91	41,4	1,2	66	-	P
	CPZ/19	33,4	1,0	5	-	-
1426/79	Trivalente	155,0	8,0	125	PP	P
	CVS	96,6	5,0	125	PP	P
	51	103,7	5,4	69	PP	P
	91	47,6	2,5	106	-	NP 6]
	CPZ/19	19,3	1,0	17	-	-

1] Pruebas de inmunidad cruzadas

2] Diluida

3] Sin diluir

4] Protección parcial

5] Protegidos

6] No protegidos

- No estudiado

rus calle 1026/80 y 1426/79 en pruebas de inmunidad cruzadas, es concordante con el observado por Larghi y col. (177) con una vacuna CRL experimental en un estudio similar.

Cabe destacar además, que las mortalidades observadas en las pruebas de inmunidad cruzadas para los distintos tipos de vacuna probados, no siempre siguieron una relación lineal con respecto a la concentración de virus usada en el desaffo, como ya fuera observado por otros autores (157)(178)(181). Este hecho es explicable si se considera que la dosis de desaffo es una de las variables importantes en los mecanismos de interacción virus-huésped y uno de los factores determinantes de la respuesta desencadenada.

El tratamiento postexposición (punto 6.2.4.) con una dosis de vacuna trivalente y de las vacunas monovalentes CVS y CPZ/19 confirió protección a los animales infectados con los virus 1426/79 y 1026/80 respectivamente. Estos resultados contrastan con los hallados por Harmon y Janis (139) quienes inmunizaron ratones 3 horas después de una infección por virus calle con una única dosis IM de la vacuna elaborada en células diploides humanas (HDCS) y no obtuvieron reducción de la mortalidad respecto de los animales control infectados no vacunados.

Baer y Yager (131) utilizaron una dosis de una vacuna de células diploides y otra elaborada en células BHK para inmunizar ratones 24 horas después de la exposición con virus calle y observaron protección sólo con la segunda. Atribuyeron estos resultados a la capacidad de la vacuna BHK de inducir una respuesta de interferón. En una experiencia similar Wiktor y col. (136) utilizando hamsters, también correlacionaron la inducción de interferón con la capacidad protectora de las vacunas utilizadas.

El tratamiento postexposición con cinco dosis de las vacunas trivalente y monovalentes CVS y 51 confirió protección frente a ambos virus calle, mientras que no sucedió lo mismo con la vacuna 91. Estos resultados difieren de los hallados por Harmon y Janis (139) quienes trabajando con ratones inmunizados con 2 dosis de una vacuna antirrábica a subunidades o 7 dosis de vacuna de embrión de pato, no observaron reducción significativa de la mortalidad respecto de los animales testigo.

Mifune y Yamada (132) en cambio, observaron una significativa reducción de la mortalidad (81%) cuando inmunizaron ratones con 5 dosis de una vacuna elaborada en células de embrión de pollo después de una infección IM con virus calle. Esa reducción de la mortalidad fue superior a las observadas para todas las vacunas CRL en estudio aplicadas siguiendo el mismo esquema de inmunización.

En este trabajo se observó una capacidad diferente de las vacunas trivalente, CVS y 51 respecto de la 91 para proteger a los animales después de una infección por los virus calle estudiados.

Dado que numerosos trabajos de protección postexposición realizados por otros autores, parecen indicar que existe una relación directa entre la protección conferida por una vacuna después de una exposición a un virus calle y su capacidad de inducir in-

terferón, resulta de interés estudiar la capacidad que muestra cada una de las vacunas a prueba de inducir una respuesta de interferón.

Asimismo cabe destacar, que si bien se obtuvo una moderada protección con una sola dosis de las vacunas CVS y CPZ/19, sólo el esquema de múltiples dosis fue significativamente efectivo en conferir protección a los ratones infectados con los virus 1026/80 y 1426/79. Estos resultados confirman nuevamente la necesidad de administrar múltiples dosis de vacuna de tejido nervioso para asegurar la protección después de una exposición a virus calle.



### 6.3.- Capacidad de inducción de interferón

Dado que numerosos autores han relacionado la capacidad de las vacunas antirrábicas de proteger animales de experimentación después de una infección por virus calle con su capacidad de inducir interferón (140)(182)(154), esta experiencia se realizó para investigar la capacidad de las vacunas CRL en estudio de inducir interferón en ratones.

Grupos de 20 ratones fueron inmunizados por vía intraperitoneal con una dosis de 0,5 ml. de las vacunas CRL trivalente y monovalentes CVS, 51 y 91. Los animales se sangraron en grupos de a 5 por cada tipo de vacuna a las 4, 8, 12 y 24 horas después de la inmunización. Paralelamente, se inoculó un grupo de 28 ratones por vía EV con 0,1 ml. de un inductor inespecífico de interferón: el ácido poliriboinosínico-poliribocitidílico de doble cadena (poly I:C). Se trabajó con una concentración de 20 ug/ml de poly I:C, después de determinarse que era la máxima que no resultaba tóxica para los animales. Los ratones se sangraron en grupos de 7 a las 4, 8, 12 y 24 hs. después de la inducción. Se sangraron además 10 ratones del mismo lote sin inmunizar. Se separaron los sueros, se fraccionaron en alícuotas de 0,1 ml. y se congelaron a -70°C hasta el momento de su titulación.

A fin de caracterizar la naturaleza de la probable actividad interferente, se descongelaron tres alícuotas de cada una de las muestras (sangrías de 8 y 12 hs.) y se efectuaron los siguientes controles:

- a) estabilidad a 56°C durante 1 hora.
- b) estabilidad a pH 2.
- c) titulación en células Vero, para comprobar especificidad de especie de la actividad interferente.

Todas las muestras se titularon según el método descrito en el punto 5.7. Los resultados obtenidos en los sueros de animales inducidos con poly I:C se muestran en la tabla 20. Los sueros de ratones inducidos con poly I:C no mostraron actividad interferente alguna cuando se titularon en células Vero.

El título del interferón ratón de referencia internacional conteniendo 1200 UI/ml. fue 640.

Tabla 20

Resultados (\*) de las pruebas de producción de interferón en ratones inducidos con ácido poliribonucleico-poliribocitidílico (\*\*)

Sueros	Tiempo en horas			
	4	8	12	24
poly I:C (sin tratar)	320 (600)	640 (1200)	320 (600)	160 (300)
poly I:C (pH 2)	---	320 (600)	160 (300)	---
poly I:C (4°C)	---	640 (1200)	320 (600)	---
poly I:C (56°C)	---	160 (300)	160 (300)	---

(\*) Los títulos se expresan como: inversa de la dilución que produjo efecto citopático en el 50% de la monocapa celular, y entre paréntesis en unidades Internacionales.

(\*\*) dosis de 0,1 ml. (20 ug/ml.), vía EV.

Los títulos obtenidos en los sueros de animales inducidos con las distintas vacunas en estudio, no se tabularon, ya que en todos los casos fueron inferiores a 10, límite de sensibilidad del método utilizado.

Los resultados de esta experiencia muestran que los ratones utilizados (cepa CF1) producen buenos niveles de interferón cuando son inoculados con poly I:C e indican en consecuencia que las vacunas CRL en estudio no son buenos inductores del mismo cuando se usa el ratón como modelo experimental, al menos en la dosis y vía utilizadas.

Estas observaciones están de acuerdo con las efectuadas por Turner (138), quien no observó respuesta de interferón en suero de ratones inmunizados 2 y 24 hs. antes, por vía IP, con 0,5 ml. de vacunas Semple, Fermi, de embrión de pato o HDGS.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo también son concordantes con los hallados por Moreno y col. (141) quienes no detectaron interferón en el suero de ratones

inmunizados por vía IM con 0,1 ml. de vacuna CRL (Fuenzalida-Palacios) inactivada con betapropiolactona o HDCS; y se oponen en cambio, a los obtenidos por Nozaki y Atanasiu (137) quienes detectaron títulos máximos de 400 UI/ml. de interferón en el suero de ratones inmunizados 8 horas antes por vía IP con 0,5 ml. de vacuna CRL a virus PV o de una vacuna de cultivo celular.

Los mecanismos involucrados en la protección conferida por la vacunación después de una infección letal por virus calle aún no están aclarados. Mientras algunos autores atribuyen un papel fundamental al interferón, otros sugieren que mucho más importante es una respuesta eficaz de inmunidad celular, y que el interferón intervendría como potenciador de la misma (144)(180). En todo caso, en el presente estudio no pudo demostrarse la existencia de una relación entre protección en ratones inmunizados después de una infección letal por virus calle y capacidad de las vacunas utilizadas de inducir interferón.

Por otra parte, recientemente se ha demostrado que la vacuna antirrábica producida en células diploides humanas (HDCS) no induce interferón en ratones, mientras que sí lo hace en monos y humanos (180). En base a este hallazgo, cabe preguntar si las vacunas CRL trivalente y monovalentes serían capaces de inducir una respuesta de interferón en otro modelo animal o en el hombre.

VACUNAS	PRUEBAS DE PROTECCION PREEXPOSICION										PRUEB POSICIO
	NIH					INMUNIDAD CRUZADAS (PIC)					
	CEPAS DE VIRUS					CEPAS DE VIRUS					
	CVS	51	91	1026/80	1426/79	CVS	51	91	1026/80	1426/79	
TRIVALENTE			NC								-
CVS			-								-
51			NC					-			-
91			NC							-	-

REFERENCIAS	NIH VA	PIC % M*	PPPE RED**%M	SN TITULOS
	≥ 2	0	>20	≥ 2000
	0.3 - 1.9	10		125-1999
	< 0.3	20	= 20	5-124
-	-	>20	< 20	< 5

NC = NO CALCULABLE

= MEJOR COMPORTAMIENTO

• MORTALIDAD

\*\*REDUCCION

E PROTECCION POST-EX- (PPE)			PRUEBAS SEROLOGICAS							INDUCCION DE INTERFERON
CEPAS DE VIRUS			SERONEUTRALIZACION (SN)							
91	1026/80	1426/79	TITULO MAXIMO (DIAS)	CEPAS DE VIRUS						
				CVS	51	91	1026/80	1426/79		
-			7						-	
-			14						-	
-			14						-	
-	-	-	14						-	

CUADRO 1

Los resultados globales de todos los estudios efectuados en este trabajo de tesis, se resumen en el cuadro 1. En él se destacan los virus frente a los cuales cada una de las vacunas mostrara una buena respuesta en los distintos tipos de pruebas realizados.

Del análisis comparativo de los resultados obtenidos y de la discusión previa, surgen las siguientes conclusiones.

- 1.- Tanto la vacuna trivalente como las monovalentes CVS y 51, son excelentes inmunógenos.
- 2.- La vacuna trivalente aventaja a las monovalentes CVS y 51 en que produce una respuesta de anticuerpos más rápida. Además, cuando las vacunas se administraron en dosis menos concentradas (pruebas de seroneutralización simple), la vacuna trivalente indujo títulos más elevados.
- 3.- La vacuna monovalente 91, no constituye un buen inmunógeno. Sin embargo, fue la única realmente eficaz en conferir protección frente al virus 91. También protegió a los ratones de la infección por uno de los dos virus calle estudiados.
- 4.- El virus 91 difiere antigénicamente de los virus CVS y 51, los cuales son similares entre sí. La existencia de diferencias antigénicas en el virus 91, se puso de manifiesto en las pruebas de seroneutralización y de potencia cruzadas, así como en las de inmunidad cruzadas.
- 5.- Se desconoce hasta el presente la naturaleza y significado de las diferencias antigénicas que se detectaron en el virus 91. Los estudios de protección cruzada realizados por otros autores, sugieren que vacunas de mayor valor antigénico podrían proteger frente a este virus u otros antigénicamente similares a él que pudieran aparecer en condiciones naturales. Sin embargo, dado que es difícil contar con vacunas CRL comerciales de valores antigénicos más altos que las utilizadas en el presente trabajo, no parece prudente eliminar este antígeno de su composición, hasta tanto no se haya probado el comportamiento de las distintas vacunas frente a una batería grande de virus calle aislados de distintos huéspedes en diferentes regiones geográficas.
- 6.- Las vacunas antirrábicas CRL trivalente y monovalentes no indujeron interferón en

el modelo animal utilizado y en las condiciones del estudio, a pesar de lo cual tres de ellas (trivalente, CVS y 51) fueron eficaces en la protección de ratones infectados previamente con virus calle. En este trabajo, no se pudo demostrar que se requiera la producción de interferón para que la vacuna confiera protección en los tratamientos postexposición.

7.- La técnica de contrainmunolectroforesis (CIE) fue útil para la titulación de anticuerpos antirrábicos en el suero de ratones y tuvo buena correlación con la prueba in vivo de seroneutralización en esta especie. Por lo tanto, puede ser utilizada como prueba estimativa de la potencia antigénica de las vacunas antirrábicas en distintas etapas de la producción, cuando se quiere utilizar la inducción de anticuerpos neutralizantes como una medida de la antigenicidad de las vacunas.

8.- No existe relación directa entre valor antigénico y protección conferida por las vacunas, las que por consiguiente deben tener un alto valor antigénico. Es desaconsejable, pues, diluirlas cuando su valor antigénico sea superior al requisito mínimo de potencia = 0,3. Esto confirma lo observado por otros investigadores.

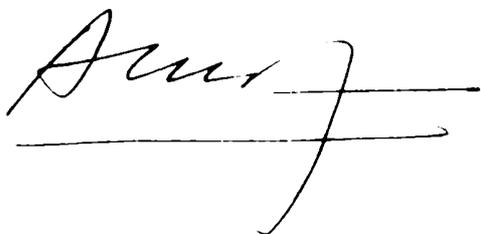
9.- Para garantizar la protección en los tratamientos antirrábicos que se inician después de la exposición al virus, es necesario utilizar esquemas de múltiples dosis de vacuna CRL. Esto confirma lo observado por otros investigadores.

Los resultados de este estudio dejan algunos interrogantes que abren posibles líneas de trabajo para el futuro.

Llama la atención, por ejemplo, que la respuesta máxima de anticuerpos inducida por la vacuna trivalente se alcance 7 días antes que con cualquiera de las monovalentes, desconociéndose como interaccionan los tres antígenos en el mejoramiento de la respuesta humoral. Un estudio de la respuesta inmune de vacunas bivalentes (CVS-51, CVS-91, 51-91) frente a los tres virus fijos y a una amplia batería de virus calle, completaría el análisis y contribuiría a clarificar la situación.

El hecho de que en este trabajo no se detectara interferón en el suero de los animales inmunizados, no permite aseverar que las vacunas no inducieran su producción en otro modelo animal y/o por otra vía. En consecuencia, resulta indispensable estudiar la probable respuesta de interferón en personas primoinmunizadas con vacuna CRL.

Por último, cabe destacar que este trabajo no incluye un estudio comparativo de la respuesta mediada por células inducida por cada tipo de vacuna. Este estudio (que será realizado en una próxima etapa), conjuntamente con los sugeridos anteriormente, permitirán tener una visión acabada del tema y adoptar una decisión final sobre la composición de la vacuna.

A handwritten signature in cursive script, appearing to read "Amurj", with a horizontal line drawn underneath it.A handwritten signature in cursive script, appearing to read "Aureo Deleppine", with horizontal lines drawn underneath the first and last names.

En este trabajo se comparó la capacidad inmunogénica de la vacuna antirrábica de cerebro de ratón lactante (CRL) trivalente con la de tres vacunas monovalentes elaboradas con cada una de las cepas virales que componen antigénicamente la vacuna clásica. Tanto la vacuna trivalente, como las monovalentes CVS y 51, alcanzaron valores antigénicos elevados en pruebas de potencia NIH. No ocurrió lo mismo con la vacuna monovalente 91, que mostró ser un inmunógeno pobre. La vacuna trivalente fue superior a todas las monovalentes cuando se compararon la velocidad en inducir la respuesta de anticuerpos y los títulos alcanzados al administrarlas en diluciones crecientes. Los títulos de anticuerpos obtenidos con las vacunas trivalente y monovalentes CVS y 51, así como su duración en el tiempo, fueron comparables; la vacuna 91 en cambio, indujo bajos títulos de anticuerpos neutralizantes.

El estudio de la capacidad de neutralización cruzada de los anticuerpos inducidos, mostró que el virus 91 difiere antigénicamente de los virus CVS y 51.

Al compararse la eficacia de cada vacuna en proteger a ratones inmunizados con ellas del desafío intracerebral con los virus fijos CVS, 51 y 91 y los virus calle 1026/80 y 1426/79, se comprobó que excepto la 91, todas protegían frente a todos estos virus con excepción del 91, frente al cual lo hacían sólo parcialmente. En contraposición, la vacuna 91 fue la única realmente eficaz para proteger a los ratones del posterior desafío con la cepa de virus homóloga, y fue ineficiente para protegerlos del desafío con los virus CVS, 51 y 1426/79.

Los resultados de los tratamientos postexposición mostraron que tanto la vacuna trivalente como las monovalentes CVS y 51, a diferencia de la 91, protegen de la infección letal por vía parenteral con virus calle. No se pudo detectar interferón en el suero de los ratones inmunizados con ninguna de las vacunas. Por consiguiente no se pudo establecer que exista una relación directa entre producción de interferón y protección en tratamientos postexposición.

Se demostró que la técnica de CIE utilizada para cuantificar anticuerpos en el suero de ratones inmunizados, daba títulos de anticuerpos correlacionados con los obtenidos con la prueba in vivo.

1. Steele, J.M. (1975). History of rabies. In: The Natural History of Rabies. Baer, G.M. (ed.) vol. 1:1. New York, Academic Press.
2. Brown, F. and Crick, J. (1979). Natural history of the rhabdoviruses of vertebrates and invertebrates. In: Rhabdoviruses. Bishop, D.H.L. (ed.) vol. 1:2. CRC Press.
3. Constantine, D.G. (1962). Rabies transmission by nonbite route. Publ. Hlth. Rep. (Wash.), 77:287.
4. Correa-Giron, P., Allen, R. and Sulkin, S.E. (1970). The infectivity and pathogenesis of rabies virus administered orally. Am. J. of Epidemiol., 91:203.
5. Baer, G.M. and Cleary, W.F. (1972). A model in mice for the pathogenesis and treatment of rabies. The J. of Inf. Dis., 125:520.
6. Baer, G.M., Shantha, T.R. and Bourne, G.H. (1968). The pathogenesis of street rabies virus in rats. Bull. WHO. 38:119.
7. Murphy, F.A. (1977). Rabies pathogenesis. Brief Review Arch. of Virol., 54:279.
8. Charlton, K.M. and Casey, G.A. (1979). Experimental rabies in skunks: immunofluorescence, light and electron microscopic studies. Lab. Invest., 41:36.
9. Charlton, K.M. and Casey, G.A. (1981). Experimental rabies in skunks: persistence of virus in denervated muscle at the inoculation site. Can. J. Comp. Med., 45:357.
10. Kawai, A. (1977). Transcriptase activity associated with rabies virion. J. of Virol., 24:826.
11. Flamand, A., Delagneau, J.F., Bussereau, F. (1978). An RNA polymerase activity in purified rabies virions. J. Gen. Virol., 40:233.
12. Tsiang, H. (1979). Evidence for intraaxonal transport of fixed and street rabies virus. J. of Neuropathol. and Exp. Neurol., 38:286.
13. Baer, G.M. (1975). Pathogenesis to the central nervous system. In: The Natural History of Rabies. Baer, G.M. (ed.) vol. 1:181. New York, Academic Press.
14. Matsumoto, S. (1975). Electron microscopy of the central nervous system infection. In: The Natural History of Rabies. Baer, G.M. (ed.) vol. 1:217. New York, Academic Press.
15. Sung, J.H., Hayano, M., Mastri, A.R. and Okagaki, T. (1976). A case of human rabies and ultrastructure of the Negri bodies. J. of Neuropathol. and Exp. Neurol., 35:541.
16. Dierks, R.E., Murphy, F.A. and Harrison, A.K. (1969). Extraneural rabies infection. Virus development in fox salivary gland. Am. J. Pathol., 54:251.
17. Dierks, R.E. (1975). Electron microscopy of extraneural rabies infection. In: The Natural History of Rabies. Baer, G.M. (ed.) vol. 1:303. New York, Academic Press.
18. Hronovský, V. and Benda, R. (1969). Experimental inhalation infection of laboratory rodents with rabies virus. Acta Virologica, 13:193.
19. Hronovský, V. and Benda, R. (1969). Development of inhalation rabies infection in suckling guinea pigs. Acta Virologica, 13:198.

20. Hronovský, V. (1971). Immunofluorescence study on the pathogenesis of fixed rabies virus. Respiratory infection in suckling mice. *Acta Virologica*, 15:58.
21. Jenson, A.B., Rabin, E.R., Bentick, D.C. and Melnick, J.L. (1969). Rabies neuro-nitis. *J. of Virol.*, 3:265.
22. Iwasaki, Y., Wiktor, T.J. and Koprowski, H. (1973). Early events of rabies virus replication in tissue culture. An electron microscopic study. *Lab. Invest.*, 28:142.
23. Hummeler, K., Koprowski, H. and Wiktor, T.J. (1967). Structure and development of rabies virus in tissue culture. *J. Virol.*, 1:152.
24. Hummeler, K. and Koprowski, H. (1969). Investigating the rabies virus. *Nature*, 221:418.
25. Davies, M.D., Englert, M.E., Sharpless, G.R. and Cabasso, V.J. (1963). The electron microscopy of rabies virus in cultures of chicken embryo tissues. *Virology*, 21:642.
26. Atanasiu, P., Lépine, P., Sisman, J., Daugnet, J.O. et Wetten, M. (1963). Etude morphologique du virus rabiques des rues en culture de tissu. *Compt. Rend.*, 256:3219.
27. Murphy, F.A. (1975). Morphology and morphogenesis. In: *The Natural History of Rabies*. Baer, G.M. (ed.) vol. 1:33. New York, Academic Press.
28. Tetkoff, J., Durafour, M., Fargeaud, D., Précauste, P. et Soullebot, J.P. (1982). Particularités de la morphogenese du virus rabique et de sa morphologie vues à l'occasion de controles systematiques du culture par microscopie electronique. *Comp. Immunol. Microbiol. Inf. Dis.*, 5/1-3:9.
29. Andzhaparidze, O.G., Bogomolova, N.N., Boriskin, Y.S., Bektemirova, M.S. and Dry-nov, I.D. (1981). Comparative study of rabies virus persistence in human and ham-ster cell lines. *J. of Virol.*, 37:1.
30. Dierks, R.E., Murphy, F.A. and Harrison, A.K. (1969). Extraneural rabies virus in-fection: Virus development in fox salivary gland. *Am. J. Pathol.*, 54:251.
31. Miyamoto, K. and Matsumoto, S. (1965). The nature of the Negri body. *The J. of Cell Biol.*, 27:677.
32. Hummeler, K., Tomassini, N., Sokol, F., Kuwert, E. and Koprowski, H. (1968). Morpho-logy of the nucleoprotein component of rabies virus. *J. of Virol.*, 2:1191.
33. Baer, G.M., Harrison, A.K., Bauer, S.P., Shaddock, J.H. and Murphy, F.A. (1980). A bat rabies isolate with an unusually short incubation period. *Exp. and Mol. Pathol.* 33:211.
34. Sokol, F., Kuwert, E., Wiktor, T.J., Hummeler, K. and Koprowski, H. (1968). Purifi-cation of rabies virus grown in tissue culture. *J. of Virol.*, 2:836.
35. Sokol, F. (1975). Chemical composition and structure of rabies virus. In: *The Natur-al History of Rabies*. Baer, G.M. (ed.) vol. 1:79. New York, Academic Press.
36. Clark, H.F., Parks, N.F. and Wunner, W.H. (1981). Defective interfering particles of fixed rabies viruses: lack of correlation with attenuation or autointerference in mice. *J. Gen. Virol.*, 52:245.
37. Murphy, F.A. and Harrison, A.K. (1979). Electron microscopy of the rhabdoviruses

- of animals. In: Rhabdoviruses. Bishop, D.H.L. (ed.) vol. 1:65. CRC Press.
38. Sokol, F., Stancek, D. and Koprowski, H. (1971). Structural proteins of rabies virus. *J. of Virol.*, 7:241.
  39. Zaides, V.M., Krotova, L.I., Selimova, L.M., Selimov, M.A., Elbert, L. and Zhdanov, V.M. (1979). Reevaluation of the proteins in rabies virus particles. *J. of Virol.*, 29:1226.
  40. Arita, M. and Atanasiu, P. (1980). Etude comparative du poids moléculaires de plusieurs souches de virus rabique par électrophorese sur gel de polyacrylamide. *Ann. Virol. (Inst. Pasteur)* 131E:201.
  41. Cox, J.H. (1982). The structural proteins of rabies virus. *Comp Immunol. Microbiol. Inf. Dis.*, 5/1-3:21.
  42. Schlumberger, H.D., Schneider, L.G., Kulas, H.P. and Dieringer, H. (1973). Gross chemical composition of strain Flury HEP rabies virus. *Z. Naturforsch.*, 28C:103.
  43. Dietzschold, B. (1977). Oligosaccharides of the glycoprotein of rabies virus. *J. of Virol.*, 23:286.
  44. Blough, H.A., Tiffany, J.M. and Aalestad, H.B. (1977). Lipids of rabies virus and BHK-21 cell membranes. *J. Virol.*, 21:950.
  45. Schlesinger, H.R., Wells, H.J. and Hummeler, K. (1973). Comparison of the lipids of intracellular and extracellular rabies viruses. *J. Virol.*, 12:1028.
  46. Mc Sharry, J.J. (1979). The lipid envelope and chemical composition of rhabdoviruses. In: Rhabdoviruses. Bishop, D.H.L. (ed.) vol. 1:107. CRC Press.
  47. Madore, H.P. and England, J.H. (1977). Rabies virus -protein synthesis in infected BHK 21 cells. *J. Virol.*, 22:102.
  48. Holloway, B.P. and Obijeski, J.F. (1980). Rabies induced RNA synthesis in BHK 21 cells. *J. of Gen. Virol.*, 49:181.
  49. Clewley, J.P. and Bishop, D.H.L. (1979). Rhabdoviral RNA structure. In: Rhabdoviruses. Bishop, D.H.L. (ed.) vol. 1:119. CRC Press.
  50. Sokol, F., Schlumberger, H.D., Wiktor, T.J. and Koprowski, H. (1969). Biochemical and biophysical studies on the nucleocapsid and on the RNA of rabies virus. *Virol.*, 38:651.
  51. Flamand, A. and Delagneau, J.F. (1978). Transcriptional mapping of rabies virus in vivo. *J. of Virol.*, 28:518.
  52. Coslett, G.D., Holloway, B.P. and Obijeski, J.F. (1980). The structural proteins of rabies virus and evidence for their synthesis from separate monocistronic RNA species. *J. Gen. Virol.*, 49:161.
  53. Wunner, W.H., Curtis, P.J. and Wiktor, T.J. (1980). Rabies mRNA translation in Xenopus laevis oocytes. *J. Virol.*, 36:133.
  54. Anilionis, A., Wunner, W.H. and Curtis, P.J. (1981). Structure of the glycoprotein gene in rabies virus. *Nature, Lond.* 294:275.
  55. Anilionis, A., Wunner, W.H. and Curtis, P.J. (1982). Aminoacid sequence of the rabies virus glycoprotein deduced from its cloned gene. *Comp. Immunol. Microbiol. Inf. Dis.*, 5/1-3:27.

56. Aaslestad, G. (1975). Antigenic composition of rabies virus. In: The Natural History of Rabies. Baer, G.M. (ed.) vol. 1:63. New York, Academic Press.
57. Wiktor, T.J., György, E., Schlumberger, H.D., Sokol, F. and Koprowski, H. (1973). Antigenic properties of rabies virus components. J. of Immunol., 110:269.
58. Cox, J.H., Dietzschold, B. and Schneider, L.G. (1977). Rabies virus glycoprotein. II. Biological and serological characterization. Inf. and Immun., 16:754.
59. Dietzschold, B., Cox, J.H., Schneider, L.G., Wiktor, T.J. and Koprowski, H. (1978). Isolation and purification of a polymeric form of the glycoprotein of rabies virus. J. Gen. Virol., 40:131.
60. Cox, J.H., Dietzschold, B., Weiland, F. and Schneider, L.G. (1980). Preparation and characterization of rabies virus hemagglutinin. Inf. and Immun., 30:572.
61. Wunner, W.H., Dietzschold, B., Curtis, P.J. and Wiktor, T.J. (1983). Rabies subunit vaccines. J. Gen. Virol., 64:1649.
62. Dietzschold, B., Wunner, W.H., Wiktor, T.J., Dwight Lopes, A., Lafon, M., Smith, C.L. and Koprowski, H. (1983). Characterization of an antigenic determinant of the glycoprotein that correlates with pathogenicity of rabies virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:70.
63. Dietzschold, B., Wiktor, T.J., Macfarlan, R. and Varrichio, A. (1982). Antigenic structure of rabies virus glycoprotein: Ordering and immunological characterization of the large CNBr cleavage fragments. J. of Virol., 44:595.
64. Lafon, M., Wiktor, T.J. and Macfarlan, R.I. (1983). Antigenic sites on the CVS rabies virus glycoprotein: Analysis with monoclonal antibodies. J. Gen. Virol., 64:843.
65. Dietzschold, B., Wiktor, T.J., Wunner, W.H. and Varrichio, A. (1983). Chemical and immunological analysis of the rabies soluble glycoprotein. Virol., 124:330.
66. Shope, R.E., Murphy, F.A., Harrison, A.K., Causey, O.R., Kemp, G.E., Simpson, D.I.H. and Moore, D.L. (1970). Two african viruses morphologically and serologically related to rabies virus. J. Virol., 6:690.
67. Fenner, F. (1976). Classification and nomenclature of viruses. Second Report of the Int. Committee on Taxonomy of Viruses. Intervirology, 7:109.
68. Shope, R. (1975). Rabies virus antigenic relationships. In: The Natural History of Rabies. Baer, G.M. (ed.) vol. 1:141. New York, Academic Press.
69. Boulger, L.R. and Porterfield, J.S. (1958). Isolation of a virus from nigerian fruit bats. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 52:421.
70. Kemp, G.E., Causey, O.R., Moore, D.L., Odelola, A. and Fabiyi, A. (1972). Mokola virus. Further studies on Ib.An.27377, a new isolated etiologic agent of zoonoses in Nigeria. Am. J. Trop. Med. Hyg., 21:356.
71. Familusi, J.B., Osunkoya, B.O., Moore, D.L., Kemp, G.E. and Fabiyi, A. (1972). A fatal human infection with Mokola virus. Am. J. Trop. Med. Hyg., 21:959.
72. Kemp, G.E., Lee, V.H., Moore, D.L., Shope, R.E., Causey, O.R. and Murphy, F.A. (1973). Kotonkan, a new rhabdovirus related to Mokola virus of the rabies serogroup. Am. J. Epidemiol., 98:43.

73. Wright, J.T. and Habel, K. (1948). A comparison of antigenicity and certain biological characteristics of substrains of Pasteur fixed rabies virus. *J. Immunol.*, 60:503.
74. Crandell, R.A. (1966). Rabies in Northern Greenland: Some observations on the epizootiology and etiology. *Proc. Nat. Rabies Symp. (Atlanta, Ga.)*, 37.
75. Wiktor, T.J. and Clark, H.F. (1973). Application of the plaque assay technique to the study of rabies virus neutralizing antibody interactions. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)* 124A:283.
76. Díaz, A.M. and Varela-Díaz, V.M. (1976). Detection of antigenic differences among street and fixed rabies virus strains by the counterimmunoélectrophoresis test. *Zbl. Bakt. Hyg. I.Abt. Orig.*, A236:185.
77. Flamand, A., Wiktor, T.J. and Koprowski, H. (1980). Use of hibridoma monoclonal antibodies in the detection of antigenic differences between rabies and rabies related virus proteins. I. The nucleocapsid protein. *J. Gen. Virol.*, 48:97.
78. Flamand, A., Wiktor, T.J. and Koprowski, H. (1980). Use of hibridoma monoclonal antibodies in the detection of antigenic differences between rabies and rabies related virus proteins. II. The Glicoprotein. *J. Gen. Virol.*, 48:105.
79. Wiktor, T.J., Flamand, A. and Koprowski, H. (1980). Use of monoclonal antibodies in diagnosis of rabies virus infection and differentiation of rabies and rabies related viruses. *J. of Virol. Methods*, 1:33.
80. Schneider, L.G. (1982). Antigenic variants of rabies virus. *Comp. Immun. Microbiol. Inf. Dis.* 5/1-3:101.
81. Hattwick, M.A.W. and Gregg, M.B. (1975). The Disease in Man. In: *The Natural History of Rabies*. Baer, G.M. (ed.) vol. 2:281. New York, Academic Press.
82. Hattwick, M.A.W., Weis, T.T., Stechschulte, C.J., Baer, G.M. and Gregg, M.B. (1972 a). Recovery from rabies: A case report. *Ann. of Internal Med.*, 76:931.
83. Porras, C., Barboza, J.J., Fuenzalida E., Lopez Adaros, H. and Díaz, A.M. (1976). Recovery from Rabies in Man. *Ann. of Internal. Med.*, 85:44.
84. Rubin, R.H., Gregg, M.B. and Sikes, R.H. (1969). Rabies in citizens of the United States 1963-1968: Epidemiology, treatment and complications of treatment. *J. of Inf. Dis.*, 120:268.
85. Held, J.R., Tierkel, E.S. and Steele, J.H. (1967). Rabies in man and animals in the United States 1946-1965. *Publ. Hlth. Rep.*, 82:1009.
86. Guillon, J.C. et Tsiang, H. (1980). Role de l'interferon et du thymus dans la pathogenese de l'infection rabique chez la souris. *Ann. Virol. (Inst. Pasteur)* 131E:229.
87. Smith, J.S., Mc Clelland, C.L., Reid, F.L. and Baer, G.M. (1982). Dual role of the immune response in street rabies virus infection in mice. *Inf. and Immun.*, 35:213.
88. Guillon, J.C. et Tsiang, H. (1982). Neuronal function impairment in rabies infected rat brain. *J. Gen. Virol.*, 61:277.
89. Baltazard, M. and Ghodisi, M. (1953). Prevention de la rage humaine. *Rev. Immunol.*, 17:366.

90. Wiktor, T.J. (1980). Virus vaccines and therapeutic approaches. In: Rhabdoviruses. Bishop, D.H.L. (ed.) vol. 3:99. CRC Press.
91. WHO, Fifth Report. Technical Series, N° 321. (1966):18.
92. Baltazard, M. and Bahmanyar, M. (1955). Essai pratique du serum antirrabique chez les mordu par loups enragés. Bull. WHO, 13:747.
93. Pasteur, L., Chamberland, C. et Roux, E. (1884). Nouvelle communication sur la rage. C. R. Acad. Sci., 98:457.
94. Crick, J. (1973). The vaccination of man and other animals against rabies. Post-graduate Med. J., 49:551.
95. Plotkin, S.A. (1980). Rabies vaccine prepared in human cell cultures: Progress and perspectives. Rev. of Inf. Dis., 2:433.
96. Fermi, C. (1908). Uber die immunisierung gegen Wutkrankheit. Z. Hyg. Infectkrankh, 58:233.
97. Hempt, A. (1925). Sur une méthode rapide de traitement antirabique. Ann. Inst. Pasteur, 39:632.
98. Semple, D. (1911). The preparation of a safe and efficient antirabic vaccine. Scient. Mem. of the Med. and Sanit. Dep. of India, 44.
99. Organización Mundial de la Salud (1973). Serie de Informes Técnicos, N° 523. Comité de Expertos de la OMS en Rabia. Sexto Informe, 19.
100. Turner, G.S. (1973). Vacunas antirrábicas. Boletín OPS, 74:510.
101. Peck, F.B. Jr., Powell, H.M. and Culbertson, C.G. (1956). Duck embryo rabies vaccine. Study of fixed virus vaccine grown from embryonated duck eggs and killed with betapropiolactone. J. A. M. A., 162:1373.
102. Bell, J.F. (1978). The continuing imperatives of diversity of rabies vaccine. Develop. in Biol. Standard, 40:11.
103. Fuenzalida, E. y Palacios, R. (1955). Un método para la preparación de la vacuna antirrábica. Boletín del Inst. Bact. de Chile, 8:3.
104. Seligman, E.B. Jr. (1973). The NIH test for potency. In: Laboratory techniques in rabies. 3rd. ed. Ed. by Kaplan, M.M. and Koprowski, H. WHO:279.
105. Fuenzalida, E. (1972). Human pre-exposure rabies immunization with suckling mouse brain vaccine. Bull. WHO, 46:561.
106. Díaz, A.M.O. de (1982). Pre-exposure rabies immunization of man with suckling mouse brain vaccine. Amer. J. Epidemiol., 115:274.
107. Held, J. y López Adaros, H. (1971). Complicaciones neurológicas posteriores a la administración de vacuna antirrábica de cerebro de ratón lactante. Bol. OPS, 71:50.
108. Trejos, A., Lewis, V., Fuenzalida, E. and Larghi, O.P. (1974). Laboratory investigations of neuroparalytic accidents associated with suckling mouse brain rabies vaccine. I. Encephalitogenicity and virological studies. Ann. Immunol. (Inst. Pasteur) 125C:917.
109. Varela-Díaz, V.M., Imas, B., Soto, E., Larghi, O.P., Cuba-Caparó, A. and Fuenza-

- lida, E. (1974). Laboratory investigations on neuroparalytic accidents associated to SMB rabies vaccine. II. Encephalitogenicity of murine brain myelin preparations. *Ann. Immunol. (Inst. Pasteur)* 125C:925.
110. Larghi, O.P., Varela-Díaz, V.M., Soto, E., Imas, B., Cuba-Caparó, A. and Fuenzalida, E. (1976). Laboratory investigations on neuroparalytic accidents associated with SMB rabies vaccine. III. Preservation of vaccine potency after elimination of murine brain myelin centrifugation. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)* 127B:567.
  111. Held, J.R., Fuenzalida, E., López Adaros, H., Arrosi, J.C., Poles, N.O.R. y Scivetti, A. (1972). Inmunización humana con vacuna antirrábica de cerebro de ratón lactante. *Bol. OSP*, 72:565.
  112. Díaz, A.M., González Resigno, G., Fernández Munilla, A., Larghi, O.P., Marchevsky, N. y Arrosi, J.C. (1979). Vacuna antirrábica de cerebro de ratón lactante. Esquemas reducidos de inmunización post-exposición. *Rev. Asoc. Arg. de Microbiol.*, 11:42.
  113. Svet-Moldavskij, G. Ja. et al. (1965). An allergen free antirabies vaccine. *Bull. WHO*, 32:47.
  114. Gispen, R. (1973). Suckling rabbit brain vaccine. WHO monograph series, 23:221.
  115. Organización Mundial de la Salud (1981). Serie de Informes Técnicos N° 658. Comité de Expertos de la OMS en Patrones Biológicos, 31°. Informe:56.
  116. Van Wezel, A.L. and Van Steenis, G. (1978). Production of an inactivated rabies vaccine in primary dog kidney cells. *Develop. in Biol. Standard*, 40:69.
  117. Selimov, M., Askenova, T., Klyueva, E., Gribencha, L. and Lebedeva, I. (1978). Evaluation of the inactivated tissue culture rabies vaccine from the Vnukovo-32 strain. Results of its industrial production and field use for post-exposure immunization of man. *Develop. in Biol. Standard*, 40:57.
  118. Atanasiu, P., Tsiang, H. et Gamet, A. (1974). Nouveau vaccine antirabique humaine de culture cellulaire primaire. *Ann. de Microbiol.*, 125B:419.
  119. Wiktor, T.J., Fernández, M.V. and Koprowski, H. (1964). Cultivation of rabies virus in human diploid cell strain WI-38. *J. Immunol.*, 93:353.
  120. Wiktor, T.J., Aaslestad, H.G. and Kaplan, M.M. (1972). Antigenicity of rabies virus inactivated by betapropiolactone acethylethylenimine and ionizing irradiation. *Applied Microbiol.*, 23:914.
  121. Wiktor, T.J., Plotkin, S.A. and Grella, D.W. (1973). Human cell culture rabies vaccine. *J. A. M. A.*, 224:1170.
  122. Wiktor, T.J. and Koprowski, H. (1965). Successful immunization of primates with rabies vaccine prepared in human diploid cell strain WI-38. *Proc. of the Soc. for exp. Biol. and Med.*, 118:1069.
  123. Sikes, R.E., Cleary, W.F., Koprowski, H., Wiktor, T.J. and Kaplan, M.M. (1971). Effective protection of monkeys against death by street virus by post-exposure administration of tissue culture rabies vaccine. *Bull. WHO*, 45:1.
  124. Wiktor, T.J., Plotkin, S.A. and Koprowski, H. (1978). Development and clinical trials of the new human rabies vaccine of tissue culture (human diploid cell) origin. *Develop. in Biol. Standard*, 40:3.

125. Kuwert, E.K., Marcus, I., Werner, J., Iwand, A. and Thraenhart, O. (1978). Some experiences with human diploid cell strain (HDCS) rabies vaccine in pre and post-exposure vaccinated humans. *Develop. in Biol. Standard*, 40:79.
126. Ajjan, N., Soulebot, J.P., Stellmann, C., Biron, G., Charbonnier, C., Triau, R. and Merieux, C. (1978). Résultats de la vaccination antirabique préventive du vaccin préparé sur cellules diploïdes humaines. *Develop. in Biol. Standard*, 40:101.
127. Costy-Berger, F. (1978). Vaccination antirabique préventive par du vaccin préparé sur cellules diploïdes humaines. *Develop. in Biol. Standard*, 40:101.
128. Cox, J.H., Klietmann, W. and Schneider, L.G. (1978). Human rabies immunoprophylaxis using HDC(MRC-5) vaccine. *Develop. in Biol. Standard*, 40:105.
129. Klietmann, W., Domres, B. and Cox, J.H. (1978). Rabies post-exposure treatment and side effects in man using HDC(MRC-5) vaccine. *Develop. in Biol. Standard*, 40:109.
130. Boé, E. and Nyland, H. (1980). Case report: Guillain-Barre syndrome after vaccination with human diploid cell rabies vaccine. *Scand. J. Infect. Dis.*, 12:231.
131. Baer, G.M. and Yager, P.A. (1977). A mouse model for post-exposure rabies prophylaxis: The comparative efficacy of two vaccines and of antiserum administration. *J. Gen. Virol.*, 36:51.
132. Mifune K. and Yamada, A. (1980). Mechanisms of post-exposure prophylaxis of rabies in mice. In: *Cell culture rabies vaccines and their protective effect in man. Proc. of WHO Consultations, Essen:185*.
133. Turner, G.S. (1978). Immunoglobulin (Ig G) and (IgM) antibody responses to rabies vaccine. *J. Gen. Virol.*, 40: 595.
134. Wiktor, T.K., Sokol, F., Kuwert, E. and Koprowski, H. (1969). Immunogenicity of concentrated and purified rabies vaccine of tissue culture origin. *Proc. of the Soc. for Exp. Biol. and Med.*, 131:799.
135. Baer, G.M. (1977). Antiviral action of interferon in animal systems: effect of interferon on rabies infections of animals. *Texas Rep. on Biol. and Med.*, 35:461.
136. Wiktor, T.J., Postic, B., Ho, M. and Koprowski, H. (1972). Role of interferon induction in the protective activity of rabies vaccines. *The J. of Inf. Dis.*, 126:408.
137. Nozaki, J. et Atanasiu, P. (1975). Evaluation du pouvoir inducteur d'interferon des vaccins antirabiques. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, 126B:381.
138. Turner, G.S. (1972). Rabies vaccines and interferon: *J. Hyg. Camb.*, 70:445.
139. Harmon, M.W. and Janis, B. (1975). Therapy of murine rabies after exposure: efficacy of polyribonucleosinic-polyribocytidylic acid alone and in combination with three rabies vaccines. *The J. of Inf. Dis.*, 132:241.
140. Baer, G.M., Shaddock, J.H., Moore, S.A., Yager, P.A., Baron, S.S. and Levy, H.B. (1977). Successful prophylaxis against rabies in mice and rhesus monkeys: The interferon system and vaccine. *The J. of Inf. Dis.*, 136:286.
141. Moreno, J.A., Baughcum, D.S., Levy, H.B. and Baer, G.M. (1979). Further studies on rabies post-exposure prophylaxis in mice: a comparison of vaccine with interferon and vaccine. *J. Gen. Virol.*, 42:219.

142. Kaplan, M.M., Wiktor, T.J. and Koprowski, H. (1975). Pathogenesis in immunodeficient mice. *J. Immunol.*, 114:1761.
143. Wiktor, T.J., Doherty, P.C. and Koprowski, H. (1977). In vitro evidence of cell mediated immunity after exposure of mice to both live and inactivated rabies virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 74:334.
144. Wiktor, T.J. (1978). Cell mediated immunity and post-exposure protection from rabies by inactivated vaccines of tissue culture origin. *Develop. in Biol. Standard.*, 40:255.
145. Lagrange, Ph. H., Tsiang, H. and Hurtrel, B. (1978). Delayed type hypersensitivity in mice immunized with inactivated rabies virus. *Develop. in Biol. Standard.*, 40:63.
146. Atanasiu, P., Nozaki-Renard, J., Savy, V. et Eyquem, A. (1977). Evaluation de l'immunité cellulaire après vaccination rabique chez l'homme. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 285:1187.
147. Boletín informativo. Lucha antirrábica. Vol. 5 (28), 1982. Ministerio de Salud de la Provincia de Bs.As. Argentina.
148. Vacuna antirrábica de referencia. Nota Técnica, N° 19, (1976). Centro Panamericano de Zoonosis, OPS/OMS.
149. Fuenzalida, E. (1973). Suckling mouse brain vaccine. In: *Laboratory techniques in rabies*. 3rd. ed. Ed. by Kaplan, M.M. and Koprowski, H. WHO:216.
150. Branche, R. (1974). Relations entre le titre infectieux du virus rabique et la valeur antigenique du vaccin sur souris. *Symp. Series Immunobiol. Standard*, 21:343.
151. Atanasiu, P. (1973). Quantitative assay and potency test of antirabies serum and immunoglobulin. In: *Laboratory techniques in rabies*. 3rd. ed. Ed. by Kaplan, M. M. and Koprowski, H. WHO:314.
152. Díaz, A.M. and Myers, D.M. (1980). Determination of serum neutralizing antibodies to rabies virus by a modified counterimmunoelectrophoresis test. *J. of Clin. Microbiol.*, 12:175.
153. Archetti, I. and Horsfall, F.L. (1950). Persistent antigenic variation of influenza A viruses after incomplete neutralization in ovo with heterologous immune serum. *J. Exp. Med.*, 92:441.
154. Hilfenhaus, J., Weinmann, E., Majer, E., Barth, R. and Jaeger, O. (1977). Administration of human interferon to rabies virus infected monkeys after exposure. *The J. of Inf. Dis.*, 135:846.
155. Mendoza, G., Rodriguez, B.M. y Rodriguez, M.O. de (1970). Antigenicidad comparativa de cepas rábicas fijas en producción de vacunas antirrábicas CRL. *Memorias del Segundo Seminario Nacional sobre Rabia, Manizales, Colombia*, :87.
156. Hottle, G.A., Peers, J.H. (1954). Studies of the encephalitogenic factor from rabies vaccine. *J. Immunol.*, 72:236.
157. Habel, K., Wright, J.T. (1948). Some factors influencing the mouse potency test for rabies vaccine. *Publ. Hlth. Rep.*, 63:44.
158. Crick, J. and Brown, F. (1974). Comments on the potency testing of rabies vac-

- cines. Symp. Series Immunobiol. Standard., 21:316.
159. Wiktor, T.J., Boegel, K., Cox, J.H., Díaz, A.M., Fitzgerald, E., Netter, R., Turner, G., Schneider, L.G. and van Steenis, G. (1978). Studies on candidate reference preparations of rabies vaccine. Develop. in Biol. Standard, 40:187.
  160. WHO, Techn. Rep. Ser. (1966), N° 329:15.
  161. Plotkin, S.A. (1980). Rabies vaccine prepared in human cell cultures: Progress and perspectives. Rev. of Inf. Dis., 2:433.
  162. Kuwert, E.K., Thraenhart, O., Marcus, I., Werner, J., Atanasiu, P., Bahmanyar, M., Böegel, K., Cox, J.H., Schneider, L.G., Turner, G. and Wiktor, T.J. (1978). Comparative study on antibody determination by different methods in sera of persons vaccinated with HDCS rabies vaccine. Develop. in Biol. Standard., 40:221.
  163. Wiktor, T.J., Atanasiu, P., Bahmanyar, M., Böegel, K., Cox, J.H., Díaz, A.M., van Steenis, G. (1978). Comparison studies on potency tests for rabies vaccines. Develop. in Biol. Standard., 40:171.
  164. Díaz, A.M. and Myers, D.M. (1984). Evaluation of hyperimmune rabies sera by the counterimmunoelectrophoresis test. J. Biol. Standard., 12:61.
  165. Díaz, A.M. (1983). Rabies neutralizing antibodies determination by the modified counterimmunoelectrophoresis test and the Rapid Fluorescent Focus Inhibition test. Zbl. Bakt. Hyg., A256:1.
  166. Fábrega, F., Sepúlveda, C., González-Aguiló, E., González-González, S. (1983). Comparación de los títulos de anticuerpos antirrábicos seroneutralizantes en perros primo-inmunizados con vacuna Fuenzalida-Palacios en estado líquida y liofilizada. Bol. del Inst. de Salud Pública de Chile, 24:32.
  167. Fuenzalida, E., Díaz, A.M.O. and Rivenson, S. (1978). Vacuna antirrábica de cerebro de ratón lactante suplementada con adyuvante, su aplicación en bovinos. Rev. Asoc. Arg. de Microbiol., 10:47.
  168. Díaz, A.M.O., Lombardo, R.A. (1981). Inmunización de terneros con vacuna antirrábica de cerebro de ratón lactante. Rev. Asoc. Arg. de Microbiol., 13:45.
  169. Fuenzalida, E. (1970). Comparación de las vías de inoculación para la inmunización antirrábica en perros. Rev. Pasteur (Bs. As.), 3:3.
  170. Blancou, J., Andral, L., Lagrange, P.H. and Tsiang, H. (1979). Kinetics of different specific immunological parameters after rabies vaccination in mice. Inf. and Immun., 24:600.
  171. Barth, R., Gruschkau, H., Bijok, U., Hilfenhaus, J., Hinz, J., Milcke, L., Moser, H., Jaeger, O., Ronnenberger, H. and Weinmann, E. (1984). A new inactivated tissue culture rabies vaccine for use in man. Evaluation of PCEC-vaccine by laboratory tests. J. of Biol. Standard., 12:29.
  172. Schneider, W. (1966). Influence of the mode of immunization on the evaluation of rabies vaccines in the mouse test. Symp. Series Immunobiol. Standard., 1:407.
  173. Guillemin, F., Tixier, G., Soulebot, J.P. and Chappins, G. (1981). Comparaison de deux méthodes de titrage des anticorps antirabiques neutralisants. J. Biol. Standard., 9:147.
  174. Guillemin, F., Tixier, G., Soulebot, J.P. and Chappins, G. (1981). Resultats

- comparés des titrages des anticorps antirabiques par deux méthodes utilisant l'immunofluorescence. J. Biol. Standard., 9:157.
175. Nicholson, K.G., Harrison, P. and Turner, G.S. (1979). Rabies neutralizing antibody determination by the interference inhibition test (IIT) and the mouse neutralization test (MNT). J. Biol. Standard., 7:253.
176. Mouillot, L., Chaniot, S., Piat, A. et Netter, R. (1978). Le titrage du serum et des immunoglobulines antirabiques par la méthode d'immunodiffusion radiale. Develop. Biol. Standard., 40:243.
177. Larghi, O.P. and Díaz, A.M.O. Cross-protection of mice against different rabies virus isolates. Aceptado para publicación en: Zbl. Bakt. Hyg.
178. Hayashi, Y., Mora, E., Chandelier, E.L., Montaña, J.A., Masahiko, O. (1984). Estudos de proteçao cruzada de 24 cepas de virus rábico isoladas de diferentes espécimes animais no Brasil. Arq. Biol. Tecnol., 27:27.
179. Bijlenga, G. (1978). A potency test which simulates natural exposure for measuring post-exposure activity of rabies vaccines. A proposal for preparing a relevant international reference preparation. Develop. Biol. Standard., 40:203.
180. Atanasiu, P. (1982). Rôle de l'interferon dans l'immunité antirabique. Comp. Immun. Microbiol. Inf. Dis., 5/1-3:123.
181. Sureau, P., Rollin, P. and Wiktor, T. (1983). Epidemiologic analysis of antigenic variations of street rabies virus: detection by monoclonal antibodies. J. of Epidemiol., 117:605.
182. Janis, B. and Habel, K. (1972). Rabies in rabbits and mice: Protective effect of polyribonucleosinic-polyribocytidylic acid. J. of Inf. Dis., 125:345.

10.1.- Diluyente suero equino al 2%

- A.
- Esterilizar suero equino normal por filtración.
  - Inactivar a 56°C durante 30 minutos.
  - Agregar 2 ml. de suero equino esterilizado e inactivado a 98 ml. de agua destilada estéril.
  - Agregar 0.1 ml. de la solución de antibióticos (B).
- B.
- Reconstituir 1 000 000 UI de penicilina sódica en 5 ml. de agua destilada estéril.
  - Con la solución anterior reconstituir 1 g. de estreptomicina.
  - Distribuir en alcuotas de 1 ml. y congelar.
- Cada alcuota contiene 200 000 UI de penicilina y 200 mg. de estreptomicina.

10.2.- Diluyente Agua-Sacarosa-Gelatina

- |  |  |          |
|--|--|----------|
| a) Sacarosa                            |  | . 75 g.  |
| b) Gelatina                            |  | 5 g.     |
| c) H <sub>2</sub> O (bd) pH 7,0 c.s.p. |  | 1000 ml. |

10.3.- Agua bidestilada tamponada, pH 7,0

## A. Soluciones tampón:

- |                                      |       |                                   |
|--------------------------------------|-------|-----------------------------------|
| a) PO <sub>4</sub> HNa <sub>2</sub>  | 0,1 M | 14,2 g/1000 ml. de agua destilada |
| b) PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> Na | 0,1 M | 5,5 g/1000 ml. de agua destilada  |
- c) Mantener las soluciones tampón refrigeradas.

## B. Agua tamponada:

- |                                      |       |           |
|--------------------------------------|-------|-----------|
| a) PO <sub>4</sub> HNa <sub>2</sub>  | 0,1 M | 91,5 ml.  |
| b) PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> Na | 0,1 M | 8,5 ml.   |
| c) H <sub>2</sub> O (bd)             |       | 900,0 ml. |

- Tomar el pH y autoclavar 20 minutos a 15 libras de presión.
- Agregar 1 ml. de la solución de antibióticos descrita en 10.1.B.

10.4.- Solución salina tamponada, pH 7,6

a) ClNa		6,5 g.
b) $PO_4H_2K$	M/15	85,0 ml.
c) $PO_4HK_2$	M/15	15,0 ml.
d) Agua destilada c.s.p.		1000,0 ml.

10.5.- Solución tampón de fosfatos 0,01 M, ph 7

a) $PO_4H_2K$	M/15	37,0 ml.
b) $PO_4HNa_2$	M/15	63,0 ml.
c) Agua destilada c.s.p.		1000,0 ml

10.6.- Solución de sacarosa 7,5%

a) Sacarosa		7,5 g.
b) $H_2O$ (bd)		100,0 ml.

Esterilizar por filtración.

10.7.- Solución de sacarosa-glicina

a) Sacarosa		5,0 g.
b) Glicina		0,01 g.
c) $H_2O$ destilada, pH 7,0		100,0 ml.

10.8.- Solución de bicarbonato de sodio 0,16%, 0,02 M

a) $CO_3HNa$		0,168 g.
b) $H_2O$ destilada		100,0 ml.

Esterilizar por filtración.

10.9.- Solución tampón de veronal 0,05 M, pH 8,2

a) Veronal sódico (5-5 dietil barbiturato de sodio)		10,31 g.
b) Merthiolate		0,1 g.
c) HCl 1 N		23,0 ml.
d) $H_2O$ destilada estéril c.s.p.		1000,0 ml.

e) Disolver el veronal sódico y el merthiolate en 800 ml. de agua destilada.

f) Llevar a pH 8,2 con HCl y completar a volumen.

g) Mantener a 4° C.

10.10.- Solución salina tamponada pH 7,2

a) NaHPO <sub>4</sub>	8,33 g.
b) KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,09 g.
c) ClNa	8,5 g.
d) H <sub>2</sub> O bidestilada	1000,0 ml.

10.11.- Medio de crecimiento

a) Medio MEM (medio mínimo esencial) GIBCO	
b) Suero fetal bovino	10%
c) Gentamicina	100 ug/ml.
d) buffer hepes	20 mM
e) CO <sub>3</sub> H 8,8 g/% agregar hasta llevar a pH 7.	

10.12.- Medio de mantenimiento

a) Medio MEM (medio mínimo esencial) GIBCO	
b) suero fetal bovino	2%
c) Gentamicina	100 ug/ml.
d) buffer hepes	20 mM
e) CO <sub>3</sub> H 8,8 g/% agregar hasta llevar a pH 7.	

10.13.- PBS pH 7,5

a) ClNa	8,0 g.
b) ClK	0,2 g.
c) PO <sub>4</sub> HNa <sub>2</sub>	0,9 g.
d) PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K	0,12 g.
e) Rojo de fenol 1%	2,0 ml.
f) H <sub>2</sub> O destilada c.s.p.	1000,0 ml.

10.14.- Rojo de fenol 1%

- |                                      |           |
|--------------------------------------|-----------|
| a) Rojo de fenol                     | 1,0 g.    |
| b) NaOH 1N                           | 3,0 ml.   |
| c) H <sub>2</sub> O destilada c.s.p. | 100,0 ml. |

10.15.- Tripsina Versene

- |                  |          |
|------------------|----------|
| a) Tripsina 2,5% | 10,0 ml. |
| b) Versene 2%    | 2,0 ml.  |
| c) PBS pH 7,5    | 88,0 ml. |