

PRESENTE Y FUTURO DE LA VACUNA ANTIRRABICA

por el prof. HENRI FOSSAERT

Médico Jefe de la Sección Virus del Instituto Nacional de Higiene, Venezuela

El empleo de vacunas antirrábicas se basa en los mismos principios inmunológicos que gobiernan el uso de otras vacunas destinadas a inmunizar contra otros agentes infecciosos. Sin embargo, las vacunas antirrábicas difieren de las otras en dos aspectos fundamentales:

1. La modalidad de empleo, en la gran mayoría de los casos, es diferente: la rabia es la única enfermedad del hombre contra la cual se procura inmunizar activamente el paciente después de la exposición al riesgo y de la eventual penetración en su organismo del virus rábico.

2. Las vacunas antirrábicas de uso corriente en la actualidad son eminentemente "sucias"; constituyen el producto biológico menos purificado que parenteralmente se le inocula al hombre, no una sino hasta 28 veces en el curso de un tratamiento. Esa circunstancia, presencia de sustancias orgánicas indeseables, es el principal factor que ha limitado el empleo de la vacuna en humanos, a pacientes ya expuestos al riesgo y restringido su aplicación en forma propiamente profiláctica como es norma para las otras vacunas.

El peligro de accidentes post-vacunales con las vacunas actuales, obliga a evaluar cuidadosamente la indicación del tratamiento, aplicando éste sólo a los casos razonablemente justificados. En este sentido, investigaciones recientes¹ indican que la saliva del perro rabioso no es infecciosa más de tres días antes de que aparezcan las manifestaciones clínicas de la enfermedad.

De todas maneras, la solución del problema radica en la elaboración de vacunas potentes, suficientemente puras o purificadas. El ideal sería una vacuna que contuviera el antígeno rábico puro, capaz de inmunizar satisfactoriamente después de aplicarse una, o a lo sumo, tres dosis, desprovistas totalmente de sustancias encefalitógenas y/o de propiedades alergénicas.

Las investigaciones llevadas a cabo en los últimos años, y los resultados preliminares logrados gracias a los progresos técnicos, particularmente en lo que a multiplicación del virus rábico en cultivo de células se refiere, ofrecen las mayores esperanzas de que en un futuro próximo despondremos de este tipo de vacuna.

Varias clasificaciones pueden adoptarse para diferenciar los distintos tipos de vacunas antirrábicas:

1. De acuerdo con la calidad del antígeno empleado en su elaboración, se diferencian las vacunas de virus vivo atenuado de las que contienen virus inactivado.

2. De acuerdo con el sistema susceptible utilizado como fuente de virus, se distinguen las vacunas preparadas en teji-

do cerebral de las producidas en embriones de pollo o de pato.

3. Desde un punto de vista práctico de empleo pueden clasificarse, de acuerdo con las especies que las reciben, en vacunas para usos humanos, canino y bovino.

En realidad, ninguno de los tres grupos anotados puede encerrar todas las vacunas, puesto que un tipo determinado, por sus características de fabricación y/o de empleo, puede incluirse en más de un grupo. Por ejemplo las vacunas de "tipo Semple" y de "tipo Fermi" pueden utilizarse en humanos y también en animales.

Vacunas para uso humano

Las vacunas antirrábicas, hasta ahora utilizadas para inmunizar el hombre, se preparan a partir de tejido cerebral infectado o de embión de pato. En ambos casos se utiliza como semilla cepas de virus fijo adaptado a cerebro. En general, el tejido infectado es tratado con fenol solo, con fenol y calor, con rayos UV, o con beta-propiolactona. Las vacunas de tejido cerebral tratadas con fenol y calor, contienen virus totalmente inactivado y son llamadas "tipo Semple"; mientras que las tratadas sólo con fenol, contienen partículas virales todavía infecciosas y se conocen como "tipo Fermi".

La confianza depositada en las vacunas de "tipo Fermi" ha sido seriamente quebrantada después de los accidentes mortales ocurridos en Fortaleza, Brasil², en 1960, a raíz de la vacunación de 66 personas con vacuna de "tipo Fermi", 18 de las cuales murieron con síntomas de rabia, aislándose virus rábico de los cerebros. La vacuna preparada en tejido cerebral de carnero tenía un título de virulencia en ratones de 10^3 DL₅₀ y se había dado al consumo 4 días después de añadido 0,50% de fenol, sin ningún tratamiento adicional. Los efectos desastrosos observados tienen que ser atribuidos a la patogenicidad para el hombre del virus fijo, lo que echa por tierra la vieja y sólida creencia de que ese tipo de virus era inocuo. Aun cuando se reduzca al mínimo el contenido en virus vivo de una vacuna de "tipo Fermi", parece un acto atrevido y peligroso, el inyectar un humano con una vacuna que contenga virus fijo adaptado a cerebro, cuando se sabe que ese virus es patógeno para muchas especies de animales. "En este momento no se conoce ninguna cepa de virus que haya probado ser capaz de multiplicarse en el hombre produciendo inmunidad sin causar enfermedad. Sin embargo, existen tales cepas para uso en animales"³.

Las vacunas tradicionales de "tipo Semple", preparadas en cerebro de animales adultos, carneros, cabras o conejos, han contribuido eficazmente, sin duda alguna, a evitar la enfermedad en un número probablemente considerable

de mordidos. Pero tratándose de una vacuna inactivada, su poder inmunológico fundamentalmente del contenido en antígeno no alterado de la dosis administrada. Como el título del virus desarrollado en el tejido cerebral de animales adultos es relativamente bajo, la obtención de una vacuna de potencia suficiente obliga a utilizar una concentración relativamente alta de tejido cerebral en su preparación, por una parte, y a multiplicar (14-28) las dosis, por otra.

El gravísimo inconveniente de esas vacunas, además de las numerosas inoculaciones que implican, es el peligro de accidentes sistémicos, en especial de complicaciones neuroparalíticas, que comportan una letalidad habitualmente del orden del 20%. Estos accidentes, de tipo encefalomyelitis alérgica o de parálisis ascendentes de tipo Landry, ocurren con una frecuencia variable, desde un accidente por cada 8.000 a 10.000 tratados, hasta un accidente por cada 500 a 600, dependiendo de los países o grupos étnicos afectados sin que, hasta ahora, haya podido establecerse la causa de la mayor o menor susceptibilidad de los individuos o comunidades. Se observan, en regla general, a partir de la octava o décima inoculación y se deben a una sustancia encefalítogena, proteína básica, contenida en la mielina.

De acuerdo con las recomendaciones del Comité de Expertos de la OMS en Rabia, diversos investigadores se han dado a la tarea de estudiar y preparar vacunas distintas con el fin de disminuir la incidencia de las complicaciones post-vacunales y, eventualmente, de eliminar los factores responsables de ellas.

A partir de 1955, el empleo de embrión de pato por Peck y colaboradores (4-5) para la elaboración de una vacuna para uso humano, corresponde a un primer intento para lograr un producto aceptable. El uso de esta vacuna preparada con virus fijo inactivado con beta-propiolactona no ha suprimido por completo las complicaciones post-vacunales, si bien es cierto que los accidentes neuroparalíticos han sido escasos, debido a la presencia comprobada de una pequeña cantidad del llamado "factor paralizante". Por otra parte, la potencia inmunógena de esa vacuna deja mucho que desear⁶. Los títulos de anticuerpos en voluntarios inoculados, a título profiláctico, han resultado insistentemente inferiores a los obtenidos con otras vacunas particularmente de tejido nervioso. También se han señalado fallas en el tratamiento antirrábico, en especial cuando éste comporta el uso de suero antirrábico, considerándose que la vacuna de embrión de pato no es suficientemente potente para vencer el efecto interferente o inhibidor de la inmunización activa que tiene el suero hiperinmune, aún en casos en que el tratamiento correctamente administrado va seguido de las inyecciones de refuerzo recomendadas⁷.

La observación de que el "factor paratígeno" no existe en el momento de nacer, en el tejido nervioso de muchas especies (ratones, ratas, conejos, z. .) sino que se manifiesta en una etapa ulterior del desarrollo, ha sido aprovechado para obtener vacunas preparadas en cerebro de animales recién nacidos^{8 9}.

La vacuna de Fuenzalida y Palacios es preparada en cerebro de ratones lactantes de 3-4 días de edad utilizando virus rábico fijo. La cosecha de los cerebros infectados se hace 3 a 4 días más tarde, antes de que aparezca en ellos la sustancia encefalítogena (9°-13° día). El virus es inactivado por rayos UV. Esa vacuna ofrece una doble ventaja: por una parte, ausencia de la causa principal de complicaciones neurológicas post-vacunales; por otra, la presencia de antígeno rábico en proporción alta. Esto se logra gracias al hecho de que el virus alcanza títulos de virulencia mucho más altos en cerebros de animales recién nacidos que en tejido nervioso de animales adultos, lo que permite conseguir un producto de alta potencia, aún rebajando al 1% la concentración de material cerebral.

Tal vez, desde el punto de vista de protección contra rabia, esta vacuna sea la más eficaz empleada en la actualidad. Sin embargo, no puede considerársele una vacuna ideal por tratarse de un producto "sucio", tanto por su contenido en sustancias orgánicas extrañas, como por los virus murinos latentes muy diversos, infecciosos y/o oncogénicos que pueda contener. El peligro potencial de esos factores no ha sido debidamente evaluado hasta ahora y, en nuestra opinión, la aplicación en humanos, en gran escala, fue apresurada, sin que se llevaran a cabo estudios experimentales de laboratorio y de campo suficientes. Entre nosotros, se han observado accidentes neuroparalíticos, algunos mortales, relacionados con el empleo de vacuna nacional, pero también de lotes preparados en el exterior. La época de aparición de los accidentes (después de la 8g ó 10g inyección) sugiere la posibilidad de que se trate de una enfermedad inmunológica, por auto-agresión. Sin embargo, queda por establecerse o descartarse el papel que puedan jugar los virus murinos latentes eventualmente presentes, aun cuando, hasta ahora, no se ha comprobado que los virus murinos, exceptuando al virus de corio-meningitis linfocitaria (virus LCM), sean patógenos para el humano.

Vacunas de uso animal

Tal vez no se justifique tanto como en el caso de vacunas para uso humano, el esfuerzo de desarrollar vacunas nuevas para uso canino.

Las vacunas fenoladas preparadas en tejido nervioso han hecho sus pruebas, si bien la duración de la inmunidad conferida es relativamente corta, pero ésta tiende a prolongarse notablemente con la repetición de las dosis.

Mucho más satisfactorio, desde el punto de vista inmunológico, es la vacuna desarrollada en embrión de pollo por Koprowski y colaboradores^{10 11}. El virus utilizado es la cepa Flury, aislada de un caso de rabia humana y pasado por Johnson¹² 136 veces, por vía intracerebral, en pollitos de un día de nacidos. Ese virus fijo, adaptado a cerebro aviar, fue designado LEP (low egg passage) para los pases de 40 a 50 en embrión de pollo. Es avirulento para perros por vía periférica. No se recomienda su uso en cachorros de menos de 3 meses de edad ni en gatos, ya que ha provocado

rabia en esos animales. Estos, sin embargo, no presentan peligro para otros animales contactos.

Afirmar en estos momentos que la vacuna LEP, siempre que tenga una potencia suficiente¹³, ha sido y sigue siendo eficaz en la inmunización de los perros contra la rabia, es casi innecesario. Los estudios experimentales y las pruebas de campo^{14 15}, como la experiencia de su utilización en diversos países, han demostrado que la vacuna a virus vivo avianizado, Flury LEP, después de una sola inoculación, produce una protección del 100%, por 3 años, contra virus rábico callejero, lo que es prueba sólida de la superioridad de este tipo de vacuna sobre las vacunas inactivadas. Las fallas observadas siempre han podido atribuirse al incumplimiento de los requisitos mínimos de los controles de calidad a la producción de la vacuna o a la mala conservación de ésta (liofilización incorrecta, mala conservación del vacío, humedad residual muy alta).

Una variante HFP (high egg passage) de la cepa Flury fue ulteriormente desarrollada por Koprowski y colaboradores^{16 17}, por pases adicionales (176 a 185) en embrión de pollo. Esa variante más atenuada ha perdido patogenicidad para el ratón blanco adulto, conservándolo sólo para ratones de menos de 14 días de edad. Esta vacuna se recomienda para inmunización profiláctica de cachorros, gatos, y, sobre todo, bovinos. Es posible que en estos últimos la vacuna Flury HEP no tenga toda la eficacia deseable, en especial, en condiciones de exposición a riesgo severo de rabia paralizante transmitida por vampiros. Sin embargo, no cabe duda de que en muchos casos, sino en la mayoría, las fallas observadas, ruptura de inmunidad o duración corta de ésta, se deben al empleo de un producto de potencia insuficiente por vicios de fabricación o de conservación.

Cualquiera que sea la eficacia de las vacunas Flury LEP y HEP, un aspecto merece consideración: el hecho de la proporción elevada de su contenido en materia orgánica, causa de accidentes alérgicos. La frecuencia de esos accidentes, siempre relativa, puede reducirse gracias a la clarificación del producto por una centrifugación apropiada destinada a eliminar, sin afectar la potencia de la vacuna, la mayor parte de las partículas tisulares indeseables. En este aspecto, los esfuerzos que se hagan con miras a obtener una vacuna más "pura" para uso humano, podrían beneficiar directa o indirectamente el ejercicio veterinario en lo que respecta a la inmunización más segura de animales domésticos.

Vacunas del futuro

Como se mencionó antes, las vacunas antirrábicas actualmente en uso para el hombre constituyen el producto biológico menos purificado y potencialmente más peligroso que se inocular a esa especie.

Es cierto que se están aplicando a las suspensiones de cerebros métodos físico-químicos modernos con el fin de separar el antígeno viral de los otros componentes indeseables. Thomas y colaboradores¹⁸ han tratado por centrifugación

y cromatografía en columna de celulosa-ECTFOLA, una suspensión de cerebro de ratones blancos inoculados con virus rábico fijo CVS, obteniendo un producto 240 veces más puro. La suspensión original contenía 1.200 microgramos de nitrógeno por centímetro cúbico, la suspensión purificada, menos de 5 microgramos por ml. En cuanto a los títulos virales, éstos eran muy comparables antes y después del tratamiento. Desde el punto de vista de su poder inmunógeno, el substrato purificado, evaluado por la prueba de potencia NIH, tenía una potencia 125 veces superior a la de una vacuna de referencia del NIH. Los resultados obtenidos por Larghi y Sikes¹⁹ sometiendo a procedimientos semejantes una suspensión de cerebro, esta vez de ratones lactantes, inoculados con virus CVS, fueron igualmente satisfactorios.

Todo parece indicar que el temor a la vacunación antirrábica ocasionado por las reacciones locales, sistemáticas o neuroparalíticas producidas por las impurezas de las vacunas, está a punto de desaparecer.

Las perspectivas futuras pueden ser aún mejores si consideramos que los progresos realizados en los últimos años ponen a nuestro alcance una nueva fuente de virus que ofrece grandes promesas para la elaboración de las vacunas del futuro: el cultivo de células no nerviosas.

Después de ensayos hechos por varios autores con resultados variables, el primer trabajo importante fue el de Kissling²⁰ quien logró propagar la cepa CVS de virus fijo y también virus de calle de glándulas salivares infectadas, en cultivos primarios de células renales de hamster.

Posteriormente muchos investigadores^{21 24} han señalado el desarrollo de virus rábico fijo o de calle en una variedad de cultivos celulares primarios, de líneas continuas o semi-continuas. Por una parte, las cepas de virus fijo tienden a adaptarse más fácilmente a los cultivos de tejidos que los virus callejeros; por otra, no suele observarse un efecto citopatógeno franco. Las células infectadas pueden mantenerse durante un período largo, a condición de cambiar el medio nutritivo con la debida frecuencia. De acuerdo con el sistema celular utilizado (endotelio de conejo), y de la etapa de cultivo, el antígeno rábico puede estar presente en todas o casi todas las células sin que el desarrollo del cultivo infectado parezca perjudicarse; el virus permanece en un verdadero estado endosimbótico y sólo una proporción muy reducida de células libera virus infeccioso. En otros sistemas, como células diploides humanas o fibroblastos renales de hamster recién nacido, los eventos intracelulares que siguen a la infección, llevan a la formación de inclusiones citoplasmáticas de gran tamaño que interfieren con el proceso mitótico y finalmente ocasionan la degeneración del cultivo²⁴. Estos estudios constituyen una etapa importante para la mejor comprensión de las interrelaciones virus-célula hospedera y de las modificaciones, particularmente en lo que a virulencia se refiere, que sufre el virus rábico adaptado a cultivos de tejidos.

A pesar de que todos los cultivos de tejidos de mamíferos son sensibles a la infección por virus rábico, el grado de sensibilidad varía desde los sistemas muy susceptibles como células renales de conejo (RK-13) y fibroblastos renales de hamster (BHK-21), hasta las células muy resistentes: células L de ratón y MK2 de riñón de mono Rhesus.

Al principio hubo dificultades considerables para lograr la propagación en serie continua de los virus rábicos en los cultivos; en general, el virus desaparecía después del 6° ó 7° pase. Cuando se descubrió que los cationes aumentaban la adsorción y penetración del virus en la célula, la susceptibilidad a la infección rábica de cualquier sistema de cultivo celular mejoró notablemente al absorber el virus en presencia, por ejemplo, de dietilaminoetil-dextran (DFAE-dextran). El uso de esa substancia en cada pase permite una propagación indefinida del virus rábico en cualquier sistema de cultivo celular⁷.

Fenje²⁶ fue el primero en publicar el uso de una vacuna antirrábica preparada en cultivo de tejido. Utilizó una cepa de virus fijo adaptada a cultivos de células renales de hamster en los cuales obtuvo líquidos de alta infectividad para ratones y conejos. La vacuna obtenida, inactivada con formol, fue probada en conejos. Estos respondieron produciendo altos títulos de anticuerpos y resistiendo a la inoculación intramuscular de virus rábico de glándulas salivales de zorro naturalmente infectado. Mas, recientemente, Fenje²⁷ ha informado los resultados obtenidos con una vacuna del mismo tipo en 450 personas inmunizadas a título profiláctico (antes de exposición al riesgo), empleando varios esquemas: 3 dosis a 2 semanas de intervalo, 3 dosis a 4 semanas de intervalo y 2 dosis separadas por 8 semanas. En todos los casos la conversión serológica fue del 96%, con títulos promedio del orden de 150 para los que recibieron 3 dosis y de 1:20 para los que recibieron 2 dosis solamente.

Ott y Heyke^{28, 29}, en 1962, prepararon una vacuna inactivada con formol, usando virus CVS propagado en cultivo de células renales de Hamster, y consiguieron resultados satisfactorios en perros.

Kissling y Reese³⁰, en 1963, preparan con virus fijo multiplicado en células renales de Hamster, una vacuna inactivada con formol cuya potencia, después de concentración del virus, satisfacía los requisitos mínimos impuestos por el Servicio de Salud Pública de los Estados Unidos.

Una de las primeras vacunas antirrábicas a virus vivo atenuado preparada en cultivo de tejido, fue la de Abelseth^{31, 32}. Utilizó cultivo de células renales de cerdo y como virus infectante, la cepa ERU. Esta fue aislada de un perro rabioso, mantenida durante varios años por pasaje en cerebro de ratones adultos, adaptada a cultivo de células renales de hamster, pasada 10 veces en embrión de pollo y finalmente adaptada a cultivo de tejido renal de cerdo. La virulencia de la cepa ERA para ratones adultos es comparable a la de la cepa Flury LEP; retiene algo de virulencia para perros y bovinos cuando se le inocular por vía intracerebral. Sin em-

bargo, no ha manifestado virulencia en las pruebas de laboratorio y de campo donde se han vacunado más de 200.000 bovinos y animales de otra especie.

La resistencia a la confrontación con virus virulento de origen canino o de zorro, ha demostrado una inmunidad sólida de 3 meses después de 2 años para perros y caballos y de 3 años para bovinos.

En Venezuela, Abelseth, en colaboración con el Centro de Investigaciones Veterinarias de Maracay, llevó a cabo una prueba comparativa en dos grupos de bovinos de aproximadamente 2 años de edad, uno vacunado con vacuna Flury HEP, el otro vacunado con la cepa ERA. La confrontación se hizo en virus rábico de zorro y con una cepa local de origen bovino.

Los resultados aparecen en el cuadro siguiente:

Cepas de Confrontación	Sobrevivientes a la confrontación		
	Vacunados con HEP	Vacunados con ERA	Controles
6818	7/9	8/10	2/5
Zorro	7/10	10/10	0/5

Otra evaluación en bovinos efectuada en Canadá, frente a cepas de virus rábico de murciélago y de zorro dio los resultados siguientes:

Vacunación con ERA	Sobrevivientes a la confrontación	
	Con virus de murciélago	Con virus de zorro
1 dosis	5/5	5/5
2 dosis*	5/5	4/5
Controles	1/5	0/5

*: Segunda vacunación 1 mes después de la primera
Edad de los bovinos: 6-8 meses
Confrontación: Grupo 1 dosis: 44 días después de vacunación
Grupo 2 dosis: 34 días después de la 2a. dosis.

En estudios comparativos de vacunas LEP, HEP preparada en embrión de pollo, y ERA preparada en riñón de cerdo, llevados a cabo en perros en los Laboratorios Connaught, la vacuna de cultivo de tejido confirió una protección francamente superior, aun cuando se diluyera hasta 1: 10.000.

La vacuna ha sido recomendada y empleada, entre otras especies, en perros, gatos, bovinos y equinos.

Cabasso y colaboradores^{33, 34}, en 1965, preparan una vacuna a virus vivo atenuado, adaptando la cepa Flury LEP a cultivo de tejido de embrión de pollo. Aquí, como en otras oportunidades ya señaladas, se observa por inmunofluorescencia una acumulación considerable de antígeno rábico en el citoplasma de las células infectadas. Las pruebas practicadas con esa vacuna por Dean y colaboradores³⁵ revelaron que sólo se necesitaban 350 DL ratones de la vacuna en cultivo de tejido para proteger el 50% de los perros vacunados contra un virus de calle; mientras que se necesitaban 73.000 DL ratones de la vacuna LEP convencional preparada en embrión de pollo para conferir igual protección. El mismo tipo de evaluación practicada por los autores de la vacuna dieron resultados comparables, aun cuando ligeramente inferiores: 5.000 DL de la vacuna en cultivo de tejido protegía el 100% de los perros vacunados; mientras

que 1.250 DL ratones protegía el 50% de los perros vacunados cuando eran confrontados con virus rábico callejero.

En cuanto a la duración de la inmunidad conferida por una dosis única de vacuna, Cabasso y colaboradores encontraron que un año después de la vacunación, 24 de 25 perros (96%) sobrevivían a la inoculación de virus de calle, mientras que 25 de 26 perros controles morían. Tres años después de la vacunación, 15 de 21 perros vacunados (71%) resistían a la confrontación, cuando 93% de los controles morían.

En 1964, Koprowski y colaboradores publican sus resultados de propagación de tres cepas de virus rábico (CVS, PM y Flury HEP) en cultivo de células diploides humanas (HDCS)³⁶.

El proceso de adaptación de los virus rábicos a las células diploides humanas, WI-38, tropezó con las mismas dificultades que conocen bien otros investigadores que han tratado de propagar virus rábico en otros sistemas de cultivo de tejido. Al principio, menos de un 10% de las células se infectaban con el virus y la producción baja de las partículas infecciosas imposibilitaba mantener el virus por pasaje en serie de cultivos frescos utilizando para lograrlo medio infectado o extractos de células infectadas. Ulteriormente, el mantenimiento se alcanzó realizando los subcultivos por traspaso directo de células infectadas. Por este método la proporción de células infectadas fue aumentando progresivamente hasta alcanzar prácticamente la totalidad. En la actualidad, el mismo resultado se obtiene más rápidamente con el empleo de cationes, como ya se ha mencionado. A partir de ese momento, el virus adaptado a las células WI-38 podía mantenerse por pasajes en serie, haciendo las subinoculaciones con medio infectado libre de células. Es interesante señalar que el virus rábico, una vez adaptado al crecimiento en la cepa WI-38 de células diploides humanas, puede ser propagado en otros sistemas de cultivo de células sin relación con el anterior y que, hasta entonces, en general, eran resistentes a la infección con virus no adaptado. Esos estudios revelaron otra característica importante del virus Flury HEP desarrollado en WI-38: la patogenicidad habitual del virus no adaptado para hamster, acures y monos inoculados por vía intracerebral, desaparece completamente. Finalmente, el virus HEP adaptado a WI-38 revela tener un poder antigénico muy superior al del virus HEP de embrión de pollo.

En base a esos resultados preliminares muy promisorios, Koprowski y colaboradores⁷ concentraron sus esfuerzos en la elaboración de dos vacunas de cultivo de tejido (HDCS): una con cepa Pitman-Moore (PM) de virus fijo, inactivada con beta-propiolactina; la otra de virus vivo atenuado con la cepa Flury HEP. Esta, de por sí atenuada después de 200 pases en embrión de pollo, sufrió mayor atenuación después de pases adicionales en células diploides humanas, hasta perder totalmente su poder patógeno, como ya se dijo, para hamster y acures inoculados intracerebralmente.

La evaluación preliminar de los dos tipos de vacunas por la prueba de potencia en ratones, reveló un poder inmunógeno muy superior al de las vacunas standard "tipo Semple", de embrión de pato y de embrión de pollo infectado con Flury-HEP. La protección de perros también es efectiva: 19 animales que recibieron una sola dosis de vacuna HEP-HDCS resistieron todos a la confrontación con virus rábico de calle. En vista de que esas vacunas nuevas habían sido preparadas con miras a su utilización en humanos, se hicieron evaluaciones adicionales de potencia antigénica e inmunógena en primates³⁷. Los resultados de la evaluación del poder antigénico en función de la producción de anticuerpos neutralizantes en monos rhesus, indican que el nivel de anticuerpos después de una sola inyección de vacuna HEP-HDCS es mucho más alto que el obtenido por la inoculación de 3 dosis de la vacuna de embrión de pollo. Por otra parte, se consigue un título más alto en menos de 7 días a partir de la inyección y ese nivel persiste durante un tiempo largo, puesto, que 135 días después, todavía el título es de 1:120.

Los niveles de anticuerpos producidos después de 3 ó de 7 inyecciones de la vacuna inactivada PM-HDCS fueron inferiores a los obtenidos con la aplicación de la vacuna viva HEP-HDCS, pero de todos modos, francamente superiores a los que producen 7 inyecciones de la vacuna inactivada de embrión de pato. También persisten los anticuerpos después de 135 días.

En ensayos llevados a cabo más recientemente en monos "vervet" se trató de relacionar el nivel de anticuerpos inducidos por las vacunas PM-HDCS y HEP-HDCS y la resistencia a una confrontación masiva 10.000.000 de dosis infecciosas administradas en los músculos del cuello de los animales vacunados. Un título de anticuerpos de 1:80 o mayor aseguraba protección. Ninguno de los sueros de monos vacunados con vacuna de embrión de pato presentaba títulos de anticuerpos comparables con los obtenidos con vacunas de cultivo de células.

No hemos mencionado todas las vacunas preparadas en cultivos de células que se conocen, ni pretendemos haber cubierto todos los aspectos que abarca ese campo. Pero sí creemos haber reunido suficientes elementos de juicio para atrevernos a emitir una opinión consistente.

Las vacunas preparadas en cultivo de tejidos no nerviosos están desprovistos de toda substancia encefalitógena o "factor paralizante". Por otra parte, dada la pequeña destrucción de células que ocurre durante la multiplicación del virus rábico en cultivo de tejidos, la mayoría de las vacunas que se preparan de esa manera están relativamente libres de proteínas. Existe la posibilidad, además, de concentrar y purificar la cosecha de virus. En esa forma, parece cumplirse uno de los puntos fundamentales para la obtención de una vacuna ideal: una vacuna "limpia" con antígeno rábico puro, libre de factores responsables de complicaciones post-vacunales.

Los resultados de experiencias realizadas por todos los investigadores coinciden en indicar que el virus rábico pro-

pagado en cultivo de células tiene un poder antigénico netamente superior al de los virus producidos en otros sistemas susceptibles. Si medimos los efectos probables de esas vacunas por los títulos de anticuerpos neutralizantes que inducen y la persistencia de esos anticuerpos, parece próximo el momento de disponer de una vacuna que cumpla con el segundo requisito de una vacuna ideal: su alto poder antigénico e inmunógeno. En este último aspecto, las pruebas de confrontación realizadas hasta ahora, parecen positivas y halagadoras.

Creemos que se han dado los primeros pasos indispensables y que los resultados ofrecen suficientes garantías, particularmente en lo que se refiere a inocuidad de un virus más atenuado por adaptación a cultivo de células, y que ha llegado el momento de hacer los ensayos indicados, en escala suficiente, en el hombre, con el fin de estudiar y adoptar esquemas de vacunación aplicables, unos, al tratamiento de casos posterior a la exposición al riesgo; otros, destinados a la inmunización preventiva, de acuerdo con las normas que rigen la profilaxis de otras infecciones.

BIBLIOGRAFIA

- ¹Vaughn, J. B., Jr., Gerhardt, P., Newell, K. W.: *Excretion of Street Virus in the Saliva of Dogs*. J. A. M. A., 1965, 193, 363-368.
- ²Para, M.: *An Outbreak of Post-Vaccinal Rabies (Rage de Laboratoire) in Fortaleza, Brazil in 1960*. Bull. WHO, 1965, 33, 177-182.
- ³Habel, K.: *Vacunas Antirrábicas*. Seminario de Rabia para las Américas, Buenos Aires, 24-30 septiembre, 1967.
- ⁴Peck, F. B. Jr., Powell, H. M., Culbertson, C. G.: *A New Antirabies Vaccine for Human Use*. J. Lab. Clin. Med., 1955, 45, 679-683.
- ⁵Peck, F. B. Jr., Powell, H. M., Culbertson, C. G.: *Duck embryo Rabies Vaccine: Study of Fixed Virus Vaccine Grown in Embryonated Duck Eggs and Killed with Beta-Propiolactone (BPL)*. J. A. M. A., 1956, 162, 1373, 1376.
- ⁶Atanasiu, P., Cannon, D. A., Fox, J. P., Habel, K., Kaplan, M. M., Kissling, R. E., Koprowski, H., Lepine, P., Perez Gallardo, F.: *Rabies Neutralizing Antibody Response to Different Schedules of Serum and Vaccine Inoculation in Non-Exposed Persons, Part III*. Bull. WHO., 1961, 25, 103-114.
- ⁷Koprowski, H.: *Vaccines against Rabies: Present and Future*. First International Conference on Vaccines against Viral and Rickettsial Diseases of Man, Washington, D. D., 7-11 November 1966. P. A. H. O. Scientific Publication N° 147, 1967, pp. 488-493.
- ⁸Fuenzalida, E., Palacios, R.: *Un Método Mejorado en la Preparación de la Vacuna Antirrábica*. Bol. Inst. Bac. Chile, 1965, 8, 3-10.
- ⁹Svet-Moldavskij, G. Ja., y Colaboradores: *An Allergen Free Antirabies Vaccine*. Bull. WHO., 1965, 32, 47-58.
- ¹⁰Koprowski, H., Cox, H. R.: *Studies on Chick Embryo Adapted Rabies Virus. I. Cultures Characteristics and Pathogenicity*. J. Immunol., 1948, 60, 533-554.
- ¹¹Koprowski, H.: *Biological Modifications of Rabies Virus as a Result of its Adaptation to Chicks and Developing chick Embryos*. Bull. WHO., 1954, 10, 709-724.
- ¹²Johnson, N. N.: *Rabies Virus in Viral and Rickettsial Infections of Man*. F. L. Horsfall, Jr. and I. Tamm. Ed. 4th. Edition, Lippincott Philadelphia, 1965.
- ¹³Laboratory Techniques in Rabies, 2nd Edition, World Health Organization, Geneva, 1966.
- ¹⁴Tierkel, E. S., Koprowski, H., Black, J., Gorrie, R. R.: *Preliminary Observations in the Comparative Prophylactic Vaccination of Dogs against Rabies with Living Virus Vaccine and Phenolized Vaccine*. AM. J. Vet. Res., 1949, 10, 361-367.
- ¹⁵Tierkel, E. S., Kissling, R. E., Edison, M., Habel, K.: *A Brief Survey and Progress Report of Controlled Comparative Experiments in Canine Rabies Immunization*. Proc. 90th. Annual Meeting Am. Vet. Med. Assn., 1953, pp. 443-446.
- ¹⁶Koprowski, H., Black, J., Nelsen, D. J.: *Studies on Chick Embryo Adapted Rabies Virus, VI. Further changes in Pathogenic Properties Following Prolonged Cultivation in the Developing Chick Embryo*. J. Immunol., 1954, 72, 94-106.
- ¹⁷Koprowski, H., Black, J.: *Studies on Chick Embryo Adapted Rabies Virus. VII. Immunological Responses of Animals to Vaccination with High Egg Passage. Flury Strain*. J. Immunol., 1954, 72, 503-510.
- ¹⁸Tomas, J. B., Ricker, A. S., Baer, G. M., Siker, R. K.: *Purification of Fixed Rabies Virus*. Virology, 1965, 25, 271-175.
- ¹⁹Larghi, O. P., Sikes, R. K.: *Una vacuna Antirrábica Purificada por Cromatografía*. Resumen en V. Congreso Panamericano de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Venezuela, 18-24 septiembre, 1966.
- ²⁰Kissling, R. E.: *Growth of Rabies Virus in Non-Nervous Tissue Culture*. Proc. Soc. Exp. Biol. y Med., 1958, 98, 223-225.
- ²¹Frenje, P.: *Propagation of Rabies Virus in Culture of Hamster Kidney Cells*. Can. J. Microbiol., 1960, 6, 479-484.
- ²²Kaplan, M. M., Forsek, Z., Koprowski, H.: *Demonstration of Rabies Virus in Tissue Culture with Fluorescent Antibody Technique*. Bull. WHO, 1960, 22, 434-435.
- ²³Davies, M. C., Englert, M. E., Sharpless, G. R., Cabasso, V. J.: *The Electron Microscopy of Rabies Virus in Culture of Chicken Embryo Tissues*. Virology, 1963, 21, 642-651.
- ²⁴Fernandes, M. V., Wiktor, T. J., Koprowski, H.: *Mechanism of the Cytopathic Effect of Rabies Virus in Tissue Culture*. Virology, 1963, 21, 128-131.
- ²⁵Fernandes, M. V., Wiktor, T. J., Koprowski, H.: *Endosymbiotic Relationship Between Animal Viruses and Host Cells. A Study of Rabies Virus in Tissue Culture*. J. Exp. Med., 1964, 120, 1099, 1115.
- ²⁶Fenje, P.: *A Rabie Vaccine from Hamster Kidney Tissue Cultures: Preparation and Evaluation in Animals*. Can. J. Microbiol. 1960, 6, 605-609.
- ²⁷Fenje, P.: *Section B. Rabies. Discussion, in First International Conference on Vaccines against Viral and Rickettsial Diseases of Man, Washington, D. C., 7-11 November 1966*. P. A. H. O. Scientific Publication N° 147, 1967, pp. 494-495.
- ²⁸Ott, G. L., Heyke, B.: *Preliminary Trials of a New Tissue Culture Rabies Vaccine*. Vet. Med., 1962, 57, 158.
- ²⁹Ott, G. D., Heyke, B.: *Propagation of Rabies Virus. Evaluation of a Vaccine*. Vet. Med., 1962, 57, 613.
- ³⁰Kissling, R. E., Reese, D. R.: *Antirabies Vaccine of Tissue Culture Origin*. J. Immunol., 1963, 91, 362-368.
- ³¹Abelseth, M. K.: *An Attenuated Rabies Vaccine for Domestic Animals Produced in Tissue Culture*. Can. Vet. J. 1964, 5, 279.
- ³²Abelseth, M. K.: *Vacunas Antirrábicas Producidas en Cultivos de Tejidos*. Seminario de Rabia para las Américas, Buenos Aires, 24-30 septiembre, 1967.
- ³³Cabasso, V. J., Stebbins, M. R., Douglas, A., Sharpless, G. R.: *Tissue Culture Rabies Vaccine (Flury LEP) in Dogs*. Amer. J. Vet. Res., 1965, 26, 24.
- ³⁴Cabasso, V. J.: *Developments in Rabies Vaccine for Domestic Animals*. Primer Seminario Nacional sobre Rabia, Medellín, Colombia, 26-29 de julio, 1967.