

Evaluación de la capacidad inmunogénica de la vacuna antirrábica tipo Fuenzalida-Palacios (CRL) y de la vacuna antirrábica de cultivo celular (Verorab®) en personas con tratamiento preexposición

Myriam Favi C¹, Verónica Yung P², Orietta Roos K²,
Luis Rodríguez A¹, Rodrigo Trujillo M³, Attia Acevedo A³.

Immune response of suckling mouse brain (CRL) rabies vaccine and tissue culture rabies vaccine (Verorab®) in pre-exposure prophylaxis in humans

Background: A WHO experts committee recommended the substitution of antirabic vaccines produced in nervous tissue, by vaccines produced in tissue cultures. **Aim:** To compare the immunogenic capacity of antirabic vaccines CRL (produced in nervous tissue) and Verorab® (produced in tissue culture), used for pre-exposure prophylaxis in humans. **Patients and methods:** Fifty four volunteers were immunized for this study. The first group, vaccinated with CLR was treated with a scheme of 4 subcutaneous peri umbilical doses in days 0, 3, 7 and 28. The second group, vaccinated with Verorab® vaccine was treated with a scheme of 3 intramuscular doses in deltoid zone at days 0, 7 and 28. Blood samples were obtained at days 0, 7, 42 and 365 to measure neutralizing antibodies using the Inhibition of Fluorescent Focus Technique (RFFIT). **Results:** At day seven, a primary non protective immunologic response was observed in both groups, with titers significantly higher in the group vaccinated with Verorab®. At day 42, no differences were observed. At day 365, all subjects vaccinated with Verorab® and 50% of individuals vaccinated with CRL had protective antibody titers ($p < 0,05$). **Conclusions:** The vaccine produced in cell breeds (Verorab®) produces a better and faster immunologic response compared to the CRL vaccine (Rev Méd Chile 2004; 132: 41-6).
(Key Words: Antibodies, viral; Rabies vaccine; Vaccines)

Recibido el 15 de marzo, 2003. Aceptado en versión corregida el 16 de octubre, 2003.
Trabajo financiado por MINSAL, División Salud del Ambiente (Campaña Antirrábica).
¹Médico Veterinario. Instituto de Salud Pública de Chile.
²Tecnólogo Médico. Instituto de Salud Pública de Chile.
³Alumno de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Santo Tomás.

Correspondencia a: Myriam Favi Cortés. Instituto de Salud Pública. Maratón 1000, Ñuñoa, Santiago. Fono: 3507-411. Fax: 3507596. E mail:mfavi@ispch.cl

La rabia se describe como una encefalitis viral que puede afectar a cualquier vertebrado homeotermo y constituye un problema relevante en la salud pública de gran parte del mundo debido a su amplia distribución y a sus características de zoonosis¹.

Se han descrito dos ciclos epidemiológicos de la enfermedad: rabia urbana en la que el principal reservorio y transmisor es el perro y rabia silvestre en que actúan como reservorio y transmisor diferentes especies de animales silvestres. La rabia en sus dos ciclos epidemiológicos es endémica en la mayoría de los países sudamericanos².

Desde 1885, en que Pasteur realizó el primer tratamiento antirrábico, hasta la actualidad se ha tratado de mejorar la eficacia e inocuidad de las vacunas desarrollando distintas técnicas de producción³.

Debido al alto índice de letalidad de la rabia, es de suma importancia la prevención de la enfermedad a través de la vacunación antirrábica. Para esto se utilizan diferentes esquemas de vacunación recomendados por la Organización Mundial de la Salud.

El tratamiento preexposición está recomendado a personas en gran riesgo de contacto con el virus tales como el personal de laboratorios, médicos veterinarios, personas que manipulan animales y personas que viven en zonas donde la rabia es endémica, con el objetivo de lograr un nivel de anticuerpos protectores suficientes para producir una respuesta inmunológica secundaria rápida en caso de requerir una revacunación⁴.

El esquema de vacunación preventiva con la vacuna antirrábica CRL consta de cuatro dosis los días 0, 3, 5 y 30⁵; sin embargo con la vacuna Verorab® el esquema recomendado es de tres dosis los días 0, 3 y 28⁴. La OMS recomienda como títulos de anticuerpos protectivos en suero un mínimo de 0,5 UI/ml, por lo tanto, siempre que sea posible se debe verificar la presencia de anticuerpos neutralizantes en las personas vacunadas que necesiten mantener un nivel protector de anticuerpos, empleando suero colectado una a tres semanas después de la última dosis y dependiendo de los títulos obtenidos, se aplicará anualmente una dosis de refuerzo⁴.

En Chile, desde 1955 se elabora y utiliza la vacuna antirrábica según la técnica desarrollada

por E Fuenzalida y R Palacios⁶, la que ha sido una herramienta eficaz en el control de la rabia animal y humana; sin que se hayan reportado reacciones adversas graves a la vacuna.

Los esquemas de vacunación postexposición en Chile, hasta el año 1982 eran de 14 a 21 dosis dependiendo del lugar de la mordedura, después de un estudio realizado por Fábrega y Sepúlveda se implementó el esquema reducido de vacunación de 6 dosis y dos refuerzos, independientemente del lugar de la mordedura⁷, esto llevó a que disminuyeran las molestias provocadas en el paciente al recibir muchas dosis en la zona abdominal y a que se redujeran los costos de la vacunación.

El uso de esta vacuna dentro del Programa de Control y Prevención de la Rabia, ha hecho que esta zoonosis presente una disminución significativa, cambiando desde una forma endémica en la década de 1950 a 1960, con numerosos casos humanos y animales, a la presentación de casos esporádicos en la década de 1970 y finalmente a la ausencia, desde 1972, de casos humanos por variante canina⁸. Sin embargo, en 1996 se registró un caso humano de rabia en el país; el cual ocurrió en un niño de siete años, sin antecedentes de mordedura o exposición al virus, comprobándose que la fuente de infección fue un murciélago insectívoro⁹.

En Chile la situación epidemiológica actual está circunscrita a la presentación de casos en murciélagos insectívoros con la circulación de 4 variantes genéticas correspondiente a los 4 principales reservorios de murciélagos que se encuentran en el país, sin la circulación de variante canina¹⁰. La alta diversidad de la población de murciélagos en el país y la presencia de especies infectadas dentro de esta población, hacen de estos mamíferos una importante fuente de transmisión de la rabia, tanto para el hombre como para los animales domésticos⁸.

El comité de expertos de rabia de la OMS ha recomendado la sustitución de las vacunas producidas en tejido nervioso por vacunas producidas en cultivos celulares. Esta recomendación se basa fundamentalmente en la menor presentación de reacciones neurológicas y mayor poder inmunogénico⁴.

El objetivo de este estudio fue determinar la capacidad inmunogénica neutralizante de la vacu-

na CRL tipo Fuenzalida-Palacios y de la vacuna en cultivo celular Verorab® en tratamiento preexposición en adultos.

Se comparó la respuesta inmunológica generada por ambas vacunas a los 7, 42 y 365 días después de recibir el tratamiento preexposición.

MATERIAL Y MÉTODO

Este estudio se inició el año 2000, para el cual se solicitó la participación voluntaria de estudiantes, de ambos sexos, entre 22 y 24 años de edad del último año de la carrera de Medicina Veterinaria de la Universidad Santo Tomás, los que no habían sido sometidos a vacunación antirrábica previamente. Cada uno de los participantes debió firmar un documento de consentimiento informado.

Se vacunaron 54 voluntarios, asignados al azar usando una tabla de números aleatorios en dos grupos. El primer grupo fue vacunado con vacuna CRL tipo Fuenzalida-Palacios en una dilución al 2,5% en dosis de 2 ml (0,6 UI/dosis) con un esquema de 4 dosis subcutáneas peri umbilical en los días 0, 3, 7 y 28. La vacuna CRL tipo Fuenzalida-Palacios es una suspensión de cerebro de ratón lactante que se infectan con tres cepas distintas de virus rábico CVS, 51 y 91; la primera es una cepa adaptada a laboratorio y las otras dos son de origen canino y humano respectivamente, esta suspensión es inactivada por luz ultravioleta⁶.

El segundo grupo fue vacunado con vacuna Verorab® en dosis de 0,5 ml (2,5 UI/dosis) con un

esquema de 3 dosis intramusculares en la zona deltoidea a los días 0, 7 y 28. La vacuna Verorab®, es realizada en células Vero (proveniente de riñón de mono verde africano) las que son inoculadas en etapa de crecimiento celular con la cepa Pittman-Moore. Posteriormente, el virus es inactivado con betapropiolactona, cosechado del sobrenadante, concentrado y purificado por medio de centrifugación¹¹.

Para determinar el nivel inmunológico basal de los participantes se tomó una muestra de sangre el día 0 junto con la aplicación de la primera dosis de vacuna antirrábica y posteriormente se tomaron muestras de sangre los días 7, 42 y 365 (Tabla 1).

Los sueros ingresados al laboratorio fueron inactivados a 56°C por 30 min. La determinación de anticuerpos neutralizantes se realizó mediante la técnica de Inhibición de Focos Fluorescente (RFFIT) que consiste en hacer diluciones seriadas de los sueros 1:5 a 1:625 que se enfrentan a una dosis de virus constante, calculada previamente conteniendo 32 a 100 FFD/50. Se incubaba a 37°C en una estufa con 0,5% de CO₂ por 90 min. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se agregan 0,2 ml de una suspensión de células MNA (Neuroblastoma de ratón) y se incubaba por 20 h a 37°C¹². Luego las células son teñidas por la técnica de inmunofluorescencia directa¹³, y observadas al microscopio de fluorescencia.

Para obtener el título del punto final se utilizó el Método de Reed y Muench definido como el factor de dilución mayor en el cual el 50% de los

Tabla 1. Esquemas de vacunación según tipo de vacuna utilizada

	CRL tipo Fuenzalida-Palacios*	Verorab®
Día 0	1° dosis de vacuna 1° muestra de sangre	1° dosis de vacuna 1° muestra de sangre
Día 3	2° dosis de vacuna	-----
Día 7	3° dosis de vacuna 2° muestra de sangre	2° dosis de vacuna 2° muestra de sangre
Día 28	4° dosis de vacuna	3° dosis de vacuna
Día 42	3° muestra de sangre	3° muestra de sangre
Día 365	4° muestra de sangre	4° muestra de sangre

*Se cambió el día 5 por el día 7 y el día 30 por el 28 para hacer más operativa la toma de muestra de sangre durante el tratamiento.

campos observados al microscopio contiene una o más células infectadas¹².

Estadística: Se realizó análisis de varianza (ANDEVA) de respuestas múltiples para comparar los títulos de anticuerpos entre individuos de cada grupo de vacunación¹⁴. Todas las pruebas realizadas fueron analizadas con un intervalo de confianza de 95,0%, aceptando $p \leq 0,05$. Se utilizó el paquete estadístico STAT 6.0 y STAGRAPHICS 5.0 para todos los análisis.

RESULTADOS

La Tabla 2 muestra los títulos de anticuerpos neutralizantes expresados en Unidades Internacio-

Tabla 2. Título de anticuerpos en el grupo vacunado con vacuna CRL tipo Fuenzalida-Palacios (FP)

	Día 7 (UI)	Día 42 (UI)	Día 365 (UI)
FP-1	0,09	6,88	1,3
FP-2	0,06		
FP-3	0	5,98	
FP-4	0	11,63	0,09
FP-5	0,09	5,17	0,8
FP-6	0	11,53	0,09
FP-7	0,08	1,19	0,1
FP-8	0,06	24,74	1,5
FP-9	0,38	7,07	0,05
FP-10	0,19	3,43	0,25
FP-11	0	2,26	0,1
FP-12	0,12	3	0,7
FP-13	0	2,21	0,3
FP-14	0	13,64	0,5
FP-15	0,07	5,91	2,1
FP-16	0,13	4,32	0,7
FP-17	0,08	7,48	0,15
FP-18	0	14,7	1,2
FP-19	0	3,74	0,6
FP-20	0	8,88	2,6
FP-21	0,06	12,48	2,3
FP-22	0	7,73	0,1
FP-23	0,14	12,8	0,2
FP-24	0,1	7,67	0,5

(UI) Unidades Internacionales

nales (UI) a los días 7, 42 y 365, en 24 alumnos inmunizados con vacuna CRL. En la Tabla 3 se muestra los títulos de anticuerpos neutralizantes a los días 7, 42 y 365, en 31 alumnos inmunizados con vacuna Verorab[®]. Se eliminaron del análisis los casos identificados como FP-2 y FP-3 en que no fue posible obtener la segunda y tercera muestra de sangre, y el caso VR-19 que presentó niveles de anticuerpos basales.

De un total de 22 individuos vacunados con F-P, ninguno de los sueros analizados presentó

Tabla 3. Título de anticuerpos en el grupo vacunado con vacuna Verorab[®]

	Día 7 (UI)	Día 42 (UI)	Día 365 (UI)
VR-1	0,22	11,33	1,8
VR-2	0,3	5,77	4,4
VR-3	0	11,63	2,63
VR-4	1,56	5,99	4,9
VR-5	0,56	6,49	0,8
VR-6	0,06	14,02	0,6
VR-7	0,5	5,25	3,4
VR-8	0	11,78	2,5
VR-9	0	5,89	1,2
VR-10	0,09	9,92	1,4
VR-11	0,07	5,66	1,5
VR-12	0,28	6,94	1,9
VR-13	0,58	9,7	1,1
VR-14	0,13	11,58	2,7
VR-15	0,15	4,75	1,4
VR-16	0,08	6,78	1,6
VR-17	0,11	15,44	1,7
VR-18	0,16	17	1,3
VR-19			
VR-20	0,15	3,8	1,5
VR-21	0,3	8,77	2,7
VR-22	0,21	6,14	1,9
VR-23	0	5,29	1,4
VR-24	0,17	4,01	1,6
VR-25	0,08	4,56	2,3
VR-26	0,06	4,415	1,3
VR-27	0,19	19,45	2,8
VR-28	0,39	21,39	1,7
VR-29	0	12,57	4,5
VR-30	0,67	9,09	1,5
VR-31	0,1	32,38	2,2

Tabla 4. Título protector de vacunas CRL tipo Fuenzalida-Palacios (F-P) y Verorab® (V-R)

Vacunas	Título protector Día 7			Título protector Día 42			Título protector Día 365		
	n	%	Promedio UI	n	%	Promedio UI	n	%	Promedio UI
F-P	0	0	0,0688	23	100	8,019	10	54,6	0,7377
V-R	5	16,7	0,2390	30	100	9,917	30	100	2,0653

n = número de individuos.

títulos protectores ($\geq 0,5$ UI) a los 7 días; sin embargo de 30 individuos vacunados con Verorab®, 5 sueros analizados presentaron títulos protectores.

En los sueros analizados a los 42 días todos los individuos presentaron títulos protectores con ambas vacunas, no existiendo una diferencia estadísticamente significativa en el promedio de los títulos. El nivel de títulos de anticuerpos seroneutralizantes en los sueros colectados a los 365 días marcó una diferencia significativa, al comparar ambas vacunas, en que 10 de 22 individuos vacunados con F-P, presentaron títulos protectores; en cambio con Verorab® el 100% de los individuos tenía títulos de anticuerpos seroneutralizantes mayores de 0,5 UI y cuyo título promedio fue de 2,065 UI, este hallazgo marca una diferencia estadísticamente significativa entre ambas vacunas con relación a la vacuna FP en que el promedio fue de 0,73 UI/ml ($p \leq 0,05$) (Tabla 4).

DISCUSIÓN

El objetivo de los tratamientos preexposición es mantener un nivel de anticuerpos séricos neutralizantes suficiente como para producir una respuesta inmunológica rápida, en personas que por la naturaleza de las actividades que desarrollan tienen la posibilidad de infectarse con el virus de la rabia. La profilaxis preexposición es administrada entre otras razones, con el fin de simplificar la terapia después de la exposición eliminando la aplicación de globulina antirrábica (RIG) y disminuir el número de vacunas antirrábicas necesarias, punto de particular importancia en personas con alto riesgo de exposición¹⁵.

La medición de los títulos de anticuerpos a los 7 días de iniciado el tratamiento, es de gran

importancia para tratamientos postexposición, en que es fundamental la formación de anticuerpos lo antes posible para evitar el avance del virus al sistema nervioso central. En individuos vacunados con Verorab® el nivel de anticuerpos alcanzado es mayor, aun cuando no sea protector. Si bien es cierto, la diferencia en el nivel de anticuerpos alcanzados por ambas vacunas en este período podría estar dada por la potencia de las vacunas, considerando que la vacuna CRL tiene una potencia de 0,6 UI por dosis y que la vacuna Verorab® tiene una potencia de 2,5 UI por dosis, cumpliendo con las exigencias de la OMS en cuanto a la actividad inmunogénica, este hallazgo debería ser considerado al momento de tomar decisiones con relación a la vacuna que se debería aplicar en accidentes rábicos graves.

El hecho de que, a los 42 días se obtenga una respuesta inmunológica con títulos seroneutralizantes protectores en los dos grupos en estudio, nos permite decir que hasta ese período de tiempo, ambas vacunas son comparables. Sin embargo la medición de anticuerpos a los 365 días postvacunación nos permite entregar una conclusión más clara, sobre cuál de estas vacunas es más eficaz en relación a la permanencia de la respuesta inmune en el tiempo.

Nuestros resultados nos permiten decir que con la vacuna de cultivos celulares Verorab® se alcanzan títulos protectores en el 100% de los individuos con un promedio de nivel de anticuerpos superior al alcanzado en individuos vacunados con vacuna CRL en que solamente 54,5% presentó títulos de anticuerpos neutralizantes mayores o igual a 0,5 UI.

Mantener un nivel de anticuerpos protectores en aquellas personas que son consideradas en riesgo de exposición es muy importante, ya que de esta manera se pueden evitar las revacunacio-

nes y frente a algún accidente rábico la aplicación de un refuerzo asegura la producción de altos títulos de anticuerpos neutralizantes.

Nuestros resultados nos permiten determinar con base experimental la inmunogenicidad de

ambas vacunas, y afirmar que la vacuna en cultivos celulares Verorab® es más eficiente en cuanto a generación y mantención de anticuerpos neutralizantes, transcurrido un año de haber recibido un esquema de vacunación preexposición.

REFERENCIAS

1. AVERILL D JR, BEAL C, BLAKEMORE W, BRAUND K. Symposium on Advances in Veterinary Neurology. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*. Vol. 1, Number 1. Editorial W.B. Saunders Company. Philadelphia, Estados Unidos 1980; 50-5.
2. DE MATTOS CA, DE MATTOS CC, SMITH JS, MILLER ET, PAPO S, UTRERA A, OSBURN BI. Genetic characterization of rabies field isolates from Venezuela. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 1553-8.
3. STANLEY P. Rabies. *Clinical Infectious Diseases* 2000; 30: 4-12.
4. Organización Panamericana de la Salud (OPS). *Guía para el tratamiento de la rabia en el hombre*. 1994 Publicación Técnica N° 2 pp. 28- 32.
5. Ministerio de Salud. *Norma General Técnica de Control y Prevención de Rabia en el Hombre y los Animales*. Documento de Trabajo. Diciembre 2000; 1-42.
6. FUENZALIDA E, PALACIOS R. Un método mejorado en la preparación de la vacuna antirrábica. *Bol Instit Bacteriol Chile* 1995; 8: 3-10.
7. FAVI M, CATALÁN R. Rabia en murciélagos en Chile. *Av Ciencias Vet* 1986; 1: 73-6.
8. FAVI M, YUNG V, PAVLETIC C, RAMÍREZ E, DE MATTOS CC, DE MATTOS CA. Rol de los Murciélagos Insectívoros en la Transmisión de la Rabia en Chile. *Arch Med Vet* 1999; XXXI, N°2, 157.
9. FAVI M, DE MATTOS CA, YUNG V, CHALA E, LÓPEZ L, DE MATTOS CC. *Emerging Infectious Disease* 2002; 8: 79-81.
10. YUNG V, FAVI M, FERNÁNDEZ J. Genetic and Antigenic Typing of rabies virus in Chile. *Arch Virol* 2002; 147: 2197-205.
11. PASTEUR MÉRIEUX CONNAUGHT, RHONEPOULENC GROUP. Boletín informativo *Rabies in 60 questions. A complete range for optimal protection*. 1999.
12. SMITH JS, YAGER PA, BAER GL. A rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) for determining rabies virus-neutralizing antibody. In *Laboratory Techniques in Rabies*. WHO IV Edition 1996; Chapter 15: 181-91.
13. KOPROWSKI H. The fluorescent antibody test. In: *Laboratory techniques in rabies*. 4th Edition, FX Merlin, MM Kaplan and H Koprowsky (eds). World Health Organization, Geneva, Switzerland, 1996; 88-95.
14. CANOVOS G. *Probabilidad y Estadística. Aplicaciones y Métodos*. Ed. McRraw-Hill. México, DF 1999; 572-92.
15. Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis (IMPZA). *Guía para el tratamiento de la Rabia en el Hombre*. Publicación Técnica 1994; N°2 pp. 52-8.
16. FÁBREGA F, SEPÚLVEDA C. Rabies treatment with vaccine of the Fuenzalida-Palacios type. *Bull Panam Health Org* 1982; 16: 40-6.

Agradecimientos:

Al personal del Laboratorio Diagnóstico de Rabia y a la Dra. Luz María Hederra. Agradecemos especialmente a los dos revisores anónimos, quienes con sus sugerencias y críticas constructivas han contribuido a mejorar este artículo.