

Tesis de Posgrado

Epidemiología de meningitis bacterianas : Evaluación de distintos tipos de vacunas antimeningocóccicas y un nuevo método de diagnóstico rápido serotipo-específico

Kahn, Tomás Miguel

1982

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. 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. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Kahn, Tomás Miguel. (1982). Epidemiología de meningitis bacterianas : Evaluación de distintos tipos de vacunas antimeningocóccicas y un nuevo método de diagnóstico rápido serotipo-específico. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1715_Kahn.pdf

Cita tipo Chicago:

Kahn, Tomás Miguel. "Epidemiología de meningitis bacterianas : Evaluación de distintos tipos de vacunas antimeningocóccicas y un nuevo método de diagnóstico rápido serotipo-específico". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1982.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1715_Kahn.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

**Epidemiología de meningitis bacterianas:
Evaluación de distintos tipos de vacunas
antimeningocócicas y un nuevo método de
diagnóstico rápido serotipo-específico**

TOMAS MIGUEL KAHN

Director de Tesis: Dr. SAUL GRINSTEIN

Consejero de Estudios: Dr. JORGE DECARLO

**Tesis presentada para optar al título de
Doctor de la Universidad Nacional de Buenos Aires**

AÑO 1982

1715

DEDICATORIA:

A mi esposa.

A mis padres.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. S. Grinstein por su permanente estímulo y guía, y que con su extraordinaria inventiva para resolver problemas aparentemente insolubles, posibilitó este trabajo.

Al Sr. Director de Sanidad Naval, Contralmirante Médico D.M.V. Talarico y el Sr. Jefe del Depto. Planes de Sanidad Naval, Capitán de Navío Médico D.E. Guerrero, que auspiciaron la iniciación de este estudio.

Al Sr. Jefe del Depto. Planes de Sanidad Naval, Capitán de Navío Médico D.A. Schwartz, durante cuya gestión se llevó a cabo la mayor parte de este estudio, quien hizo cumplir los complejos pasos logísticos que conllevan trabajos como el aquí presentado, y que con sus meditadas sugerencias contribuyó a enriquecerlo.

Al Dr. G. Sommersguter, Director Médico de Hoechst en Argentina, y a los Dres. O. Zwisler y C.D. Hungerer de Behringwerke, Rep. Fed. Alemana, que se interesaron vivamente en este proyecto, facilitando en todo momento su colaboración en forma de antisueros, polisacáridos purificados y otros reactivos, así como en la discusión de los resultados y la realización de Poder Bactericida en parte de los sueros aquí estudiados.

A la Dra. R. Cetrángolo, Jefa de Contralor del Instituto Nacional de Microbiología, por la provisión de reactivos para las determinaciones de anticuerpos antitetánicos.

A los Dres. E. López y L. Fernández Perona que posibilitaron el estudio de niños sobrevivientes de meningitis y al Dr. G.

Weyland por el registro de las reacciones clínicas en vacunados.

A mis compañeros del Laboratorio de Serología - Virología del Hospital de Niños de Buenos Aires, que me apoyaron en todo momento con trabajo, discusión de ideas y amistad.

A Miriam Denegri por su eficiente asistencia como dactilógrafa.

INDICE

Dedicatoria	I
Agradecimientos	II
I. INTRODUCCION	1
II. GRUPOS POBLACIONALES ESTUDIADOS - RECAUDOS ETICOS	13
III. MATERIAL Y METODOS	17
IV. RESULTADOS Y CONCLUSIONES	45
V. DISCUSION	69
Bibliografía	96

I. INTRODUCCION

I.1. Objetivos:

El objeto de este trabajo es contribuir al mejor conocimiento de la epidemiología de las meningitis bacterianas en la República Argentina.

Contribuir a un diagnóstico rápido etiológico, serotipo - específico de la enfermedad, con el doble propósito de posibilitar la institución de una terapia racional temprana (fundamental para el pronóstico de los pacientes) y a la vez proveer los datos bacteriológicos que permitan adoptar rápidamente las medidas de prevención más adecuadas para detener el avance de un brote epidémico.

Describir la respuesta inmunitaria a un novedoso tipo de vacuna antimeningocócica desde el punto de vista de la evaluación de su efectividad y duración en distintas poblaciones y su estabilidad, para aumentar las posibilidades de uso de las vacunas preventivas con que actualmente se cuenta y colaborar en la demostración de la riqueza teórica y práctica del concepto de vacunas compuestas por antígenos químicamente definidos.

Enfocar el problema de la aplicación simultánea de distintas vacunas.

I.2. Bacterias causantes de meningitis bacteriana:

Son básicamente tres: Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae tipo b y Streptococcus pneumoniae (83 serotipos). En las sépsis y meningitis de los recién nacidos intervie-

nen también Escherichia coli con antígeno capsular K1, Streptococcus β hemolíticos grupo B, etc. (Esta lista sólo menciona las bacterias que aparecen con mayor frecuencia, y no es en modo alguno exhaustiva).

Neisseria meningitidis: Son diplococos Gram-Negativos, no esporulados, no móviles, cápsula poco conspicua. Aeróbicos. El aislamiento primario se realiza en agar "chocolate" o agar de Mueller - Hinton, en una atmósfera de aire con un 2 a 8% de dióxido de carbono. Son oxidasa - positivos, catalasa - positivos. Fermentan glucosa y maltosa, no sacarosa ni fructosa (1).

Poséen nueve serogrupos aceptados: A, B, C, D, X, Y, Z, 29E y W135. Los grupos A, B, C e Y son los responsables de la gran mayoría de las enfermedades en humanos causadas por los Neisseria meningitidis. Son una causa primaria de meningitis y septicemia (denominada comunmente meningococemia), recuperándose de sangre y líquido cefalorraquídeo. Es sin embargo importante (aunque variable según las poblaciones estudiadas), el porcentaje de portadores sanos (hasta un 90% de individuos portadores en poblaciones militares)(1, 2, 3). Los portadores sanos proveen el reservorio de meningococos, ya que el hombre parece ser el único huésped natural para estas bacterias. El estado del portador induce al huésped a la formación de anticuerpos. Pero en algunos casos, cuando individuos sin un nivel adecuado de anticuerpos específicos adquieren meningococos, en general por contacto con portadores sanos, ésto resulta en una infección nasofaríngea que puede llevar rápidamente a una bacteremia, a la cual sigue habitualmente una

meningitis purulenta aguda. (Ver I.3.)

La incidencia de la enfermedad es máxima entre los 6 y los 24 meses de edad. (Los menores de seis meses son todavía portadores de anticuerpos maternos IgG adquiridos por pasaje transplacentario).

La virulencia está relacionada con las propiedades antifagocíticas del polisacárido capsular. Esto explicaría por qué los grupos A, B y C son los responsables de la mayoría de los casos, siendo raros los causados por los demás grupos, aunque también poseen cápsulas. (El grupo Y ha sido causante de numerosos casos de neumopatías, pero de pocos casos de meningitis, en reclutas de la Fuerza Aérea Norteamericana (4).)

Esta idea se ve reforzada por el hecho de que el principal causante de meningitis y sepsis neonatal en nuestro medio, el Esherichia coli K1 (Saúl Grinstein, comunicación personal; en Estados Unidos es la segunda causa; la primera es el Streptococo β hemolítico grupo B)(5), posee un polisacárido capsular indistinguible inmunológicamente del meningococo grupo B (6).

Estos hechos, sumados a la demostración de que la presencia de anticuerpos bactericidas contra N. meningitidis es protectora (7), y que individuos que enfermaban y sobrevivían una meningitis meningocócica y producían anticuerpos bactericidas, no repetían la enfermedad (7), hizo pensar en la posibilidad de vacunas basadas en los polisacáridos capsulares de los meningococos.

Esta idea se vio favorecida por la imposibilidad de plantear en este caso vacunas basadas en bacterias enteras o lisados de

las mismas, por el contenido de endotoxinas que tornaría peligrosas este tipo de preparaciones.

I.2. Necesidad de vacunas:

La necesidad de vacunas contra los serogrupos que más frecuentemente causan meningitis se ve completamente justificada por:

a) El número de casos registrado en niños, sobre todo entre los 6 y 24 meses de edad, con una mortalidad del 85% en casos no tratados, y del 1% en casos con óptimo tratamiento (antibiótico y de terapia intensiva) pero del 15% de mortalidad promedio en la población general (3).

b) Las secuelas severas en muchos sobrevivientes, en casos de meningococemia, incluso necesidad de amputación de miembros.

c) La incidencia de la enfermedad meningocócica que se aproximaba al 1% de la población de reclutas militares en los Estados Unidos, con epidemias causadas principalmente por los grupos A y B (antes de 1950), B (entre 1950 y 1956) y C (de 1965 en adelante)(3).

d) El carácter endemo-epidémico que reviste la meningitis a meningococo grupo A en vastas regiones del Africa (3).

e) La relativa ineficacia de medidas quimioprolifácticas de prevención, por haberse tornado rápidamente resistentes cepas de meningococos a las sulfas y la incapacidad de la rifampicina de eliminar por períodos prolongados el estado de portador en poblaciones militares (8).

f) El conocimiento detallado que se tenía de la química de los polisacáridos capsulares de los principales grupos (ver Cuadro 1)

Cuadro 1

Composición química de los polisacáridos capsulares de los serogrupos epidemiológicamente más importantes de Neisseria meningitidis.

Serogrupo	Composición
A	N-acetil-O-acetil-manosaminofosfato (α 1→6)
B	ácido N-acetil-neuramínico (α 2→8)
C	ácido N-acetil-O-acetil-neuramínico (α 2→9)
X	N-acetil-glucosaminofosfato (α 1→4)
W135	ácido N-acetil-neuramínico (galactosa)
Y	ácido N-acetil-neuramínico (glucosa)

y la posibilidad de purificarlos altamente sin degradarlos.

g) El conocimiento que se tenía del hecho que anticuerpos humorales detectables por Poder Bactericida y por Inmunofluorescencia bastaban para producir una inmunidad duradera (7).

h) La trágica historia de epidemias causadas por meningococos, con los consecuentes costos en tratamiento, rehabilitación, secuelas permanentes y mortalidad asociada. (Ver I.3. y I.4.)

I.3. La enfermedad meningocócica y sus secuelas más frecuentes:

La penetración a las meninges se logra en general a través de una bacteremia (3,9), que sucede a una infección del tracto respiratorio superior. (Han sido descritos casos en médicos después de realizar respiración boca a boca como intento de resucitación en enfermos). La mayoría de los portadores de meningococos en nasofaringe no presentan ningún tipo de síntoma. Incluso la bacteremia puede ser relativamente asintomática en algunos, pero en otros aparecen lesiones en piel, meninges, articulaciones, ojos, pulmones, pericardio, etc.

La secuencia de eventos suele ser: infección respiratoria inferior, bacteremia, septicemia, meningitis y/o lesiones de tipo metastásico. En caso de ocurrir meningococemia (cuya forma aguda puede producir la muerte del paciente a pocas horas de iniciados los síntomas), las lesiones esenciales son vasculares, con daño endotelial y hemorragias focalizadas. Puede aparecer el síndrome de Waterhouse - Friderichsen (púrpura, baja tensión sanguínea, respiración rápida y gran bacteremia) con colapso circulatorio y coagula-

ción intravascular. También aparecen coagulopatías por consumo. Esta enfermedad tan severa hace acentuar la necesidad de un diagnóstico temprano y rápido e intensivo tratamiento.

Si bien las meningitis constituyen sólo un pequeño porcentaje del número total de infecciones meningocócicas, constituyen la manifestación más característica e importante.

El inicio suele ser indistinguible de la enfermedad generalizada. Además de la sepsis y el "rash" aparece entonces la inflamación de las meninges, dolor y rigidez de nuca, signos de Kernig y Brudzinski positivos, hiperirritabilidad e hiperreflexia. Dolor de cabeza, náuseas, vómitos, diarrea, fiebre, etc. La afectación de los nervios craneanos puede resultar en estrabismo y sordera.

Las secuelas más comunes de la meningitis y sus complicaciones en los sobrevivientes son: sordera, ceguera, hidrocefalia, capacidad intelectual disminuída y psicosis.

El tratamiento se basa hoy en día en la penicilina, pues no se han descrito hasta el presente meningococos resistentes. La mortalidad está relacionada con la edad: es mayor en menores de ocho años o mayores de cuarenta.

La penicilina no es efectiva como profilaxis (por no secretarse suficientemente en saliva). La rifampicina, que sí se elimina por saliva (600 mgr diariamente por 5 días) es efectiva, pero aparecen cepas resistentes (9).

I.4. Epidemias causadas por N. meningitidis:

Las mayores epidemias a N. meningitidis grupo A se han sucedi-

do en ciclos de 20 - 30 años: 1805 a 1830, epidemias en Suiza, Italia, Francia; de 1835 a 1875, epidemias en E.E.U.U. y Alemania; en 1877 a 1897 en Francia: en 1906 en Inglaterra. En ambas Guerras Mundiales se registraron numerosos casos, tanto entre civiles como en militares. Además de estas grandes oleadas, ocurren epidemias menores intermedias, más localizadas, como ser:

a) Detroit, 1929, causada por N. meningitidis A, con 724 casos en ocho meses, con una mortalidad general del 50% (84% en niños). (No había terapia específica disponible).

b) Santiago de Chile, 1941-42, causada por N. meningitidis A, con 5.885 casos, mortalidad 15,9% (ya se disponía de sulfas).

c) La zona de Africa al Sur del Sahara y al norte del Ecuador: el "cinturón de meningitis africano" tiene entre 10.000 y 50.000 casos por año con 1.200 muertes (causados por N. meningitidis A)(10). De 1939 a 1962 se denunciaron 593.738 casos con 102.956 (17%) de muertes. En epidemias anteriores las tasas de mortalidad llegaron al 85%.

d) La epidemia brasileña comenzó como epidemia a N. meningitidis en 1971 hasta 1973, época en que el N. meningitidis C fue substituído por N. meningitidis A, llegando a atacar en la zona de San Pablo al 65 por cien mil habitantes; registrados mensualmente (11, 12). Esta epidemia empezó a declinar en 1975 y casi desapareció como tal en 1976. Se desconoce la razón por la cual se superpusieron esas epidemias en una misma área general.

Otras epidemias ocurrieron en Canadá, Finlandia, Mongolia Exterior y Marruecos (N. meningitidis A) y recientemente en Noruega (N. meningitidis B).

El 60% de los casos ocurren en menores de 15 años. Reclutas militares son particularmente vulnerables. Los casos entre ellos aparecen en un 80% dentro de los 90 primeros días de Servicio Militar. No parecen influir raza ni color, pero sí el sexo (mayor frecuencia en varones). Durante epidemias, el estado "portador" llega a un 90% en poblaciones militares (13) (Contra un aproximadamente 5% habitual entre epidemias). Por esta razón, desde el advenimiento de las sulfas hasta 1963 se las usó para tratamiento y para profilaxis masiva. A partir de ese año empezaron a surgir cepas resistentes a las sulfas, obligando a replantear la cuestión de la profilaxis y dando fuerza a la idea de desarrollar vacunas (3, 9).

I.5. Situación en la Argentina:

Las meningoencefalitis son consideradas endemoepidémicas en nuestro medio y como tales están incluídas en la Ley 15.465 de Notificaciones Médicas Obligatorias, pero son consideradas todas las formas agudas de meningitis, encefalitis y meningoencefalitis sin especificar. En los registros del Boletín Epidemiológico Nacional (14) se consigna que hasta el año 1973 el nivel endémico es de menos de 1.000 casos anuales, y un incremento a partir de 1974 con un máximo de 4.035 casos en 1976 y una declinación desde entonces.

Esto sólo representa una infradenuncia revertida parcialmente en 1974 por una sensibilización al problema causada por la epidemia en Brasil y la implementación de un programa especial de

notificación de meningitis bacterianas.

De los datos del Boletín Epidemiológico Nacional se puede ver que es muy alto el número de meningitis de las cuales no se especifica el germen causante (esto vale para todas las jurisdicciones), y que el 90% de las meningitis notificadas en Capital Federal son internadas en los Hospitales Muñiz, Ricardo Gutiérrez y Elizalde, y de éstas, más del 70% provienen de residentes del Gran Buenos Aires y en un 7% adicional del resto del país, siendo alta la letalidad, especialmente en menores. El 50% de los casos lo constituyen menores de cuatro años y el 75%, menores de 15 años.

Del total de los casos notificados en el país, menos de la mitad lo son por ficha epidemiológica completa. E incluso, de estos últimos, a lo sumo se puede averiguar el germen causante en un bajo porcentaje de casos, pero casi nunca el serotipo del mismo.

Este panorama francamente desalentador impide la experimentación y correcta utilización de vacunas contra las bacterias causantes de meningitis, ya que la primera condición para un trabajo de esa naturaleza es el conocimiento exacto del número de casos y sus causas específicas.

Quedan aquí planteados por lo tanto, dos problemas básicos que deben ser resueltos para poder encarar la prevención de la meningitis: 1) La infradenuncia de los casos; 2) su correcto y completo diagnóstico, desarrollando metodologías de laboratorio simples, rápidas y poco costosas para permitir no sólo la deter-

minación a nivel de especie de las bacterias, sino también su serotipo.

El primer punto obedece a profundas causas estructurales del país, cuyo análisis (por no hablar de soluciones) escapan a los objetivos y posibilidades de este estudio. El segundo punto quedó resuelto con la introducción en el país de la técnica de Contraimmunoelectroforesis Discontinua y su aplicación al diagnóstico serotipo - específico de las meningitis bacterianas en el Laboratorio de Virología - Serología del Hospital de Niños "Ricardo Gutiérrez" por parte del Dr. Saúl Grinstein en 1975 (15).

La insistencia en los párrafos precedentes acerca de la necesidad de un diagnóstico serotipo - específico surge de que, si bien la primera vacuna antimeningocócica experimental apareció en 1967 (16), ya desde un primer momento y debido al concepto de vacuna utilizado, sobre el que se volverá más adelante, se sabía que estas vacunas, de ser útiles, sólo iban probablemente a proteger contra el serotipo particular de meningococo a partir del cual fueron preparadas. De modo que el primer planteo para intentar estudiar estas vacunas era un método adecuado de diagnóstico. Si bien desde hacía muchísimos años ya se conocía la tipificación de bacterias a partir de cultivos obtenidos de pacientes mediante antisueros adecuados, debido a las falencias estructurales en nuestro país apuntadas más arriba, era necesario contar con técnicas capaces de realizar la tipificación, incluso en aquellos en que no fuera posible recuperar bacterias viables. La Contraimmunoelectroforesis cumple con este cometido.

El segundo planteo crucial para poder realizar un estudio de efectividad de una vacuna es el de contar con una población estrictamente controlable, en la cual fuera ético aplicar la vacuna por ser importante el riesgo de los individuos integrantes de adquirir la enfermedad que se desea prevenir. Ya se mencionó anteriormente que las poblaciones más expuestas a la meningitis meningocócica son los niños menores de cuatro años y los reclutas militares, así como otros individuos que viven en estrecho contacto entre sí, como en orfanatos, internados, etc.

En la época en que se planteó la posibilidad de prevenir mediante vacunas las meningitis meningocócicas, simultáneamente se registró un aumento significativo de casos de meningitis en la Armada Argentina, cuyo asesor epidemiológico es el Director de este trabajo (Cuadro 2). La particular situación epidemiológica, al contar con vacunas experimentales de seguridad probada, de métodos de diagnóstico eficaces, y de poblaciones pertenecientes o vinculadas a la Armada en situación de particular riesgo y bajo total control de las autoridades de la Dirección de Sanidad Naval decidió a estas últimas a encarar un plan de investigación de vacunas antimeningocócicas, bajo la responsabilidad del Departamento Planes de la Dirección de Sanidad Naval.

I.6. Plan de trabajo:

I.6.1. Desarrollo de los métodos de Hemoaglutinación Indirecta con glóbulos rojos humanos estabilizados e Inmunofluorescencia Indirecta para la determinación de anticuerpos

Cuadro 2

Casos de Meningitis Bacteriana

Hospital	Año	
	1974	1975
H. N. Puerto Belgrano	4	8*
H. N. Río Santiago	3	8**

* Tres con secuelas graves

** Dos muertos

Anti - Neisseria meningitidis grupos A y C.

I.6.2. Adaptación del método de Coaglutinación como método diagnóstico rápido serotipo - específico para ser utilizado directamente sobre materiales biológicos (Líquidos cefalorraquídeos).

I.6.3. Determinación de la prevalencia de anticuerpos Anti - Neisseria meningitidis grupos A y C (principales grupos conocidos por producir brotes epidémicos y casos aislados) en poblaciones rurales y urbanas de la República Argentina.

I.6.4. Evaluación de la eficiencia inmunogénica y protectora de vacunas Anti - Neisseria meningitidis A + C sólo estables a -20°C.

I.6.5. Duración de la respuesta inmunológica a estas vacunas.

I.6.6. Comparación con la evolución de los títulos de anticuerpos de individuos sobrevivientes a la enfermedad meningocócica.

I.6.7. Comparación de las vacunas sólo estables a -20°C con vacunas supuestas estables a 4°C.

I.6.8. Determinación del efecto de vacunaciones simultáneas anti-meningocócicas, antiparotídicas y con vacuna T.A.B.D.T..

II. GRUPOS POBLACIONALES ESTUDIADOS - RECAUDOS ETICOS.

II.1. Recaudos éticos:

Los grupos poblacionales se seleccionaron de modo de contar con individuos de distintas edades, sexos y nivel socioeconómico. Cuatro de estos grupos fueron seguidos en el tiempo para poder cumplir con el punto I.6.5. del Plan de Trabajo (Duración de la respuesta inmunitaria). Todos los grupos pertenecen o están vinculados a la Armada Argentina, con la única excepción del grupo de niños sobrevivientes a meningococemias. Estos últimos eran necesarios para cumplir el punto I.6.6. del Plan de Trabajo, y sus niveles de anticuerpos nos permiten definir los conceptos de niveles "altos" y "bajos" de los mismos, constituyendo un control biológico de las respuestas serológicas en los grupos vacunados con las distintas vacunas.

En el caso de las poblaciones vinculadas con, o pertenecientes a la Armada, todas deben ser consideradas de alto riesgo respecto de la meningitis, en unos por tratarse de conscriptos, en los cuáles la incidencia de la enfermedad es mayor que en la población civil, y en los otros por tratarse de niños de un orfanato o cadetes, ambos grupos semi-cerrados, en los cuáles también el riesgo de meningitis es elevado. Estos grupos fueron, por lo tanto, directamente incorporados a este estudio por las autoridades de la Sanidad Naval con vistas a reducir el riesgo de brotes epidémicos en los mismos, particularmente en un momento (1975) en que se registraba un aumento de casos de meningitis tanto en la población civil general como en los miembros de la Armada Argentina (Cuadro 2).

En el caso de los niños sobrevivientes a meningococemias, de los cuales se sabe por estudios epidemiológicos que no repiten la enfermedad (17) (salvo en casos de ciertas deficiencias genéticas, por ejemplo en la síntesis de factores del complemento (17)), los padres fueron citados por los médicos que los trataron en oportunidad de la enfermedad por correo, mediante una carta en la que se explicaba que se solicitaba la presencia de los niños tanto para efectuarles controles de rutina para estudiar la aparición o la evolución de posibles secuelas de la enfermedad, como para tomar una muestra de sangre necesaria para este estudio, todo sobre una base voluntaria. La mayoría de los padres que recibieron la citación respondieron positivamente al requerimiento.

II.2. Descripción de los grupos poblacionales estudiados:

II.2.1. Hogar Naval "Stella Maris" (SM):

Niños de ambos sexos fueron asignados a dos grupos, S.M.₁, con edades de 5 a 11 años, y S.M.₂, con edades de 12 a 16 años. Su nivel socioeconómico es bajo y duermen en dormitorios de 15 camas. La separación por sexos es total, incluso para asistir a las clases del Colegio Primario que funciona en el mismo Hogar. Los mayores asisten a Colegios Secundarios externos. Aquellos niños que poseen familiares en áreas cercanas a la Capital, suelen pasar los fines de semana con los mismos.

II.2.2. Liceo Naval "Almirante Brown" (LN):

Fueron seleccionados los individuos ingresantes en 1976 (LN-76)

y 1977 (LN-77), de sexo masculino y edades de 13 a 14 años. Los individuos de 1976 fueron incorporados al estudio cinco meses después de ingresados. Los de 1977, tres meses después de ingresados. Todos pertenecen a un segmento socioeconómico medio o elevado, con residencia habitual en Buenos Aires y alrededores. Los dormitorios son de 385 camas separadas entre sí por un metro de distancia.

II.2.3. Escuela de Enfermería "Puerto Belgrano"(PB):

Comprende estudiantes de ambos sexos, con edades comprendidas entre 17 y 22 años. Los varones residen en la Escuela. Las estudiantes retornan diariamente a sus domicilios particulares, constituyendo el segmento femenino una población abierta.

II.2.4. Los restantes individuos son conscriptos de 18 años de edad, incorporados en 1977 (CIPE-77) y 1980 (CIPE-80) a la Armada Argentina para cumplir con el Servicio Militar Obligatorio. Los individuos del CIPE-77 provenían de las provincias de Catamarca, La Rioja, Chubut y La Pampa. Los del CIPE-80, de las provincias de Buenos Aires y San Luis.

II.2.5. Observaciones:

Las edades mencionadas en las poblaciones SM₁, SM₂, LN-76, LN-77 y PB, son las que tenían los individuos al tomar la primera muestra de sangre. A partir de ese momento fueron seguidos por un lapso de hasta cinco años (tres años tomando muestras de sangre anualmente).

Las edades de los niños sobrevivientes a meningococcemias aparecen consignadas en el respectivo análisis de los datos obtenidos .

(

Todos los individuos incluidos en este estudio fueron considerados clínicamente sanos de acuerdo con los parámetros de aptitud reglamentarios en la Armada Argentina. Ninguno había recibido vacunas antimeningocócicas antes de ser incorporados al estudio.

III. MATERIAL Y METODOS.

III.1. Muestras de sangre:

Fueron tomadas inmediatamente antes, al mes, al año y a los dos años de vacunados con la vacuna Lote 4 (Ver III.2.), con una muestra adicional a los 17 meses en SM, y antes, un mes y 16 meses de vacunados con el Lote 8 de vacunas. A los individuos del CIPE-80 se les extrajo una muestra antes y otra un mes después de vacunarlos con las vacunas que se consignan en III.2..

Todos los sueros obtenidos fueron conservados a -20°C.

Todas las muestras pertenecientes a un mismo individuo fueron analizadas simultáneamente. En los casos en que se contaba con más de tres muestras de un mismo individuo, fueron analizadas por lo menos tres de ellas simultáneamente, incluyendo siempre que fue posible la muestra prevacunación.

III.2. Vacunas utilizadas:

III.2.1. Vacunas antimeningocóccicas:

"Vaccinum meningitidis cerebrospinales" A + C Lote N°4 (sólo estable a -20°C)(18). Lote N°8 (supuesto estable a 4°C)(19, 20) y Lote N°9 (también supuesto estable a 4°C).

Meningovax A + C, Merck Sharp Dohme, Lote 0415 B (sólo estable a -20°C).

Vaccine Meningococcique A + C, Merieux, Lote T 0306.

Todas las vacunas utilizadas contenían 50 µgr de cada polisacárido por dosis de 0,5 ml inyectable en forma subcutánea.

Cuadro 3

Propiedades químicas de vacunas de polisacáridos meningocócicos*

Contenido de	Cantidad
Proteínas	≤ 10 mg/g
Acidos Nucleicos	≤ 10 mg/g
Grupos O-Acetilo	
Grupo A	≥ 2,0 m mol/g
Grupo C	≥ 1,5 m mol/g
Fósforo (Grupo A)	≥ 80 mg/g
Ac. Siálico (Grupo C)	≥ 800 mg/g
Peso Molecular	Kd 50,40
Pirógenos* Grupo A	0,0025 µg/kg
Pirógenos Grupo C	0,0025 µg/Kg
Pirógenos Grupo A+C	0,0050 µg/Kg

* OMS, Serie de Informes Técnicos, Nº 594: 52-78, 1976.

** Según el Addendum de 1977 (OMS, Serie de Informes Técnicos Nº 610: 57-58, 1977), el contenido en pirógenos expresado en ug de vacuna por Kg. de conejo aceptable fue reducido en un factor 10.

Todas estas vacunas fueron elaboradas siguiendo el método básico de Gotschlich (16). Todas se ajustaban a las normas de la Organización Mundial de la Salud sobre "Normas para la vacuna de polisacáridos meningocócicos" (Normas para Sustancias Biológicas Nº23)(Cuadro 3)(21, 22). La diferencia entre las primeras vacunas ensayadas (sólo estables a -20°C) y las últimas (supuestas estables a 4°C) está en la substancia utilizada para su liofilización (Manitol para las primeras, Lactosa para las supuestas estables a 4°C), y además en pasos de purificación adicional para cumplir con las nuevas normas de OMS respecto del contenido de pirógenos. Los pasos de purificación en sí mismos constituyen secreto industrial; los efectos sobre los polisacáridos de los mismos serán comentados en la sección IV.5..

III.2.2. Vacunas antiparotídica:

Merck, Sharp, Dohme, Lote 0976 B.

III.2.3. Vacuna T.A.B.D.T.:

Vacuna antitífica, paratífica, tetánica y diftérica elaborada por el Laboratorio 601 del Ejército Argentino, Serie 2.

III.3. Métodos para la determinación de anticuerpos séricos

Anti - N. meningitidis A y C. Justificación de su selección:

En el momento de iniciarse el estudio se conocían distintos métodos para la determinación de anticuerpos antimeningocócicos:

III.3.1. Poder Bactericida:

Consistente en enfrentar una concentración fija de bacterias

a diluciones crecientes del suero problema, adicionando una cantidad fija de complemento. Los anticuerpos más complemento son capaces de convertir en no-viables a los meningococos, pudiéndose definir un título de anticuerpos como la máxima dilución de suero capaz de destruir el 50% de los meningococos. Este método fue el primero usado y debe considerárselo como el "método clásico" en el tema, pues con él se demostró que los individuos carentes de anticuerpos detectables por Poder Bactericida son los que son susceptibles a la enfermedad. El autor de ese trabajo (23)(Heist), vió trágicamente confirmada su aseveración, pues murió de meningococcemia después de la publicación del trabajo. Su propio suero, incluido en el estudio, carecía de anticuerpos detectables por Poder Bactericida contra los meningococos.

El método adolece, sin embargo, de grandes inconvenientes: un gran error (aproximadamente del 20%), su alto costo, la necesidad de trabajar permanentemente con cantidades relativamente grandes de meningococos, pero manteniéndose dentro de los cinco repiques a partir del inóculo inicial recibido de un centro de referencia internacional, lo que significa poseer un stock congelado importante de bacterias, y la necesidad de complemento. Algunos autores trataron de disminuir estas desventajas. (particularmente el gran error y el costo), llevando la técnica a micrométodo con la utilización de distintos tipos de policubetas plásticas (estériles, descartables), y diseñando un test bactericida utilizando N. meningitidis marcado radioactivamente (24). Con esto se reducía el error, pero se aumentaba enormemente el costo. De to-

dos modos, el error seguía siendo importante, y se decidió no utilizarlo en primera instancia, a pesar de ser el método exigido por la Food and Drug Administration de los E.E.U.U. para la certificación de vacunas antimeningocóccicas.

Retrospectivamente, esta decisión fue acertada, ya que Käyhty (25)(1980), determinó que las causas del gran error y de discrepancias del método del Poder Bactericida en el caso particular que nos ocupa con otros métodos, no se debe a su complejidad intrínseca, sino a la esencia de los fenómenos inmunológicos que provocan (o impiden) la lisis de los meningococos durante el ensayo. Sobre esto se volverá en la discusión (Ver V.2.).

De todos modos se dispone de datos (relativamente escasos) de Poder Bactericida realizado sobre una pequeña parte de los sueros aquí estudiados, efectuados en la sede de los Behringwerke (Marburg, Alemania Federal) que confirman las conclusiones de este estudio.

III.3.2. Radioinmunoensayo (RIA):

Técnica altamente sensible y reproducible que fue ampliamente utilizada de 1979 en adelante (26). Tiene una alta correlación con la Hemoaglutinación Indirecta (HAI). Su desventaja reside en el costo. La base de su especificidad reside en la utilización de polisacáridos altamente purificados, marcados radioactivamente. Se decidió no utilizarlo en una primera etapa, debido a que en esencia la base de la bondad del método era la misma que la Hemoaglutinación pasiva: el uso de polisacáridos bacterianos muy purificados. Además, no interesaba para los objetivos de este tra-

bajo, de enfoque epidemiológico, registrar sutiles diferencias, detectables por RIA pero no seguramente por HAI, ya que toda aplicación epidemiológica válida requiere en principio grandes diferencias para poder cerrar favorablemente la ecuación costos - beneficios.

III.3.3. Hemoaglutinación Indirecta (HAI) o Pasiva:

III.3.3.1. En el momento de iniciar la selección de métodos, había antecedentes de la utilización de la HAI para la medición de anticuerpos antimeningocócicos post-infección y post-vacunación experimental de unos pocos individuos (27). Los resultados eran excelentes, pero al probar el método tal como lo usaba Artenstein, su creador, y uno de los creadores de las vacunas antimeningocócicas que nos ocupan, resultó evidente que se iban a presentar problemas al tener que sensibilizar con polisacáridos glóbulos rojos de distintos donadores diariamente por períodos considerables de tiempo, por la variación de sensibilidad en los ensayos debido a una diferente afinidad por los polisacáridos que presentan glóbulos rojos de diferentes procedencias. Se planteó entonces estabilizar los glóbulos rojos, a fin de poder trabajar por tiempos prolongados con el mismo lote de eritrocitos sensibilizados. Los eritrocitos "frescos" (llamando así a los no sometidos a ningún tratamiento estabilizante) se mantienen ligados a los polisacáridos A y C de N. meningitidis por 24 horas. Algunos autores lograban extender este período a unos pocos días con un tratamiento a base de glutaraldehído.

Utilizando el método de Daniel (para antígenos proteicos)(28) se logró mantener sensibilizados con polisacáridos a eritrocitos tratados previamente con formaldehído y ácido tánico por períodos superiores a un año, aumentando paralelamente la sensibilidad respecto del mismo método efectuado con glóbulos rojos "frescos".

Para demostrar la mayor sensibilidad arriba mencionada se sensibilizaron por el método de Artenstein (27) glóbulos rojos "frescos" y glóbulos rojos formalinizados y tanados previamente (18). La única modificación realizada fue la de realizar un calentamiento de 30 minutos a 56°C de los polisacáridos del grupo C previo a la sensibilización. Sin este pretratamiento no se producía ningún tipo de unión entre los polisacáridos por nosotros utilizados y los glóbulos rojos. Para ver además si la mayor sensibilidad se debía o no a los tratamientos de los eritrocitos, sino al polisacárido utilizado, se probaron glóbulos rojos "frescos" sensibilizados con polisacáridos de Behringwerke y de Merck, y de glóbulos rojos formalinizados y tanados sensibilizados con polisacáridos de Behringwerke, Merck y Merieux. Los resultados para glóbulos rojos sensibilizados con polisacáridos del grupo A son mostrados en la Tabla I.

Realizando análisis de Varianza (29) para comparar las cinco medias se comprobó que hay diferencia significativa entre los glóbulos rojos estabilizados y los "frescos", alcanzándose títulos mayores con los primeros. No se registraron diferencias significativas entre los glóbulos "frescos" ni entre los glóbulos estabilizados con polisacáridos de distintas procedencias.(Nivel

Tabla I

Títulos obtenidos utilizando eritrocitos frescos y estabilizados sensibilizados con polisacáridos de N. meningitidis grupo A de las procedencias que se indican.

Polisacáridos:	Eritrocitos "frescos"		Eritrocitos estabilizados		
	Behringwerke	Merck	Behringwerke	Merck	Merieux
Nº de suero					
1	9	8	10	9	9
2	9	8	10	9	9
3	2	2	6	6	6
4	3	2	4	5	4
5	3	2	4	6	4
6	2	2	1	4	4
7	5	5	5	7	4
8	1	3	5	5	4
9	4	4	5	7	5
10	5	4	5	5	5
11	5	4	5	6	5
12	3	2	5	5	5
13	6	5	7	7	6
14	3	1	4	3	4
15	5	5	5	5	5
16	3	3	5	5	5
17	5	4	5	6	6
18	2	2	5	4	5
19	2	1	5	5	8
20	2	3	6	4	5
21	5	4	7	5	6

Títulos expresados en Nº de tubo. Dilución inicial (tubo Nº1)= 1/2.
Diluciones al 1/2.

de significación: 5%). Iguales resultados se obtuvieron para el grupo C.

En consecuencia, se adoptó la HAI como técnica básica según el procedimiento que a continuación se describe:

III.3.3.2. Estabilización y Sensibilización de los glóbulos rojos para HAI:

a) Se lava tres veces los eritrocitos O Rh+ en PBS, pH: 7,2 (Buffer fosfato salino)(0,15 M).

b) Un volumen del paquete de eritrocitos lavados se resuspenden en cinco volúmenes de formaldehído al 3% en PBS 7,2 (a 4°C) dejando reposar 24 horas a 4°C.

c) Agregar dos volúmenes de formaldehído puro, con agitación continua por 24 horas, a 4°C.

d) Lavar los glóbulos rojos diez veces en 8 a 10 volúmenes de PBS 7,2 cada vez. La última vez se resuspende al 10%.

e) Se agrega azida sódica o Mertiolate 1:10.000.

f) Se conservan a 4°C hasta por dos años.

III.3.3.3. Tanado de los glóbulos rojos:

a) Una alícuota de glóbulos rojos formalinizados se los lava tres veces en PBS 7,2 y se los resuspende al 2,5% después del último lavado.

b) A un volumen de glóbulos rojos al 2,5% se le agrega un volumen de ácido tánico 1:20.000 disuelto en PBS 7,2, se incuba a 37°C por 10 minutos (con agitación).

c) Se centrifuga y se lava a los glóbulos rojos en un volu-

men de PBS 7,2 y se los resuspende al 4% en PBS 6,9. El siguiente paso se realiza inmediatamente.

III.3.3.4. Sensibilización de los glóbulos rojos:

a) A un volumen de glóbulos rojos formalizados y tanados resuspendidos al 4% en PBS 6,9 se le agrega un volumen de una solución de antígeno A (40 µgr/ml, precalentada por una hora a 56°C) y se incuba por una hora a 37°C con agitación ocasional. Las concentraciones óptimas de los polisacáridos deben ser obtenidas para cada lote, pero las indicadas fueron las concentraciones óptimas con todos los lotes utilizados en este estudio.

b) Se lava tres veces en PBS 7,2. Se resuspende al 0,5%. Los glóbulos rojos así sensibilizados se mantienen útiles hasta un año sin modificar su título contra sueros hiperinmunes de conejo y sueros humanos de alto y bajo título.

III.3.3.5. Las drogas utilizadas fueron de Merck (sales) y Fisher (el formaldehído). Es fundamental la pureza del formaldehído, pues trazas de acetona provocan la lisis de los eritrocitos.

III.3.4.1. Inmunofluorescencia Indirecta (IF):

Si bien como método de base se decidió utilizar la técnica del HAI antes descrita, la buena práctica serológica exige tener al menos un método de alternativa con el cual ensayar parte de las muestras.

En este caso se seleccionó la IF debido a presentar igual sensibilidad que el Poder Bactericida (7), y medir esencialmente lo mismo, es decir, anticuerpos no sólo ~~contra~~ los polisacáridos

capsulares (que otorgan la especificidad de grupo), sino también contra otros componentes de la cápsula, particularmente lipopolisacáridos y lipoproteínas (que dan la especificidad de serotipo). Se pensó que la comparación HAI-IF podría resultar interesante particularmente en los seguimientos a largo plazo, pues un incremento de título por IF no acompañado por el título en HAI sería indicio de infecciones (subclínicas o clínicas leves, por ejemplo: resfríos comunes) causadas por otras Neisserias (no - meningitidis) o meningitidis no A ni C, de las que se sabe que comparten antígenos distintos de los que dan la especificidad de grupo.

Esto, que en sí mismo es una limitación de la IF, compartida por otro lado con el Poder Bactericida, permitiría, en conjunto con la HAI, suplir parcialmente los hisopados retrofaríngeos periódicos en los seguimientos. Así, un aumento de IF no acompañado por HAI representaría una infección con una bacteria no contemplada en la vacuna. Un aumento por ambas técnicas significaría una infección (subclínica) con N. meningitidis A o C. Una caída progresiva en ambas representaría no - infección con bacterias inmunológicamente relacionadas con N. meningitidis A o C.

En efecto, en dos casos (se verán más adelante) ocurrió un pico por IF no acompañado por HAI. En todos los restantes, la caída fue paralela.

III.3.4.2. Preparado de las improntas para IF:

Se utilizaron las cepas A4 y C11 para las determinaciones anti - N. meningitidis A y C respectivamente. Estas cepas fueron

provistas por Behringwerke, R.F.A., y se utilizaron siempre dentro de los tres a cinco repiques contando a partir del stock liofilizado original. El stock de trabajo (tres a cinco repiques a partir del liofilizado) se conservó a -20°C en suero de caballo (previamente estudiado para demostrar su no toxicidad para estos meningococos).

Para preparar las improntas se descongelaba rápidamente un frasco de meningococos y se lo sembraba sobre una placa de "agar chocolate" con suplemento B (Difco), incubando a 35°C en atmósfera de CO_2 por 24 horas, tiempo después del cual se repicaba a nuevas placas. Tras una incubación similar, se procedía a cosechar bacterias (previo control de no contaminación mediante tinción de Gram) con un hisopo de algodón embebido en PBS 7,2, que luego se hacía rotar en un tubo de centrifuga conteniendo también PBS 7,2. Tras cosechar, se realizaban tres lavados por centrifugación, se ajustaba a una escala tres de Mac Farland y se procedía a sembrar las improntas. Tras secar en estufa a 37°C , estas improntas se mantienen útiles por tiempos prolongados, almacenadas en seco a -20°C .

A partir de ahí se siguió la técnica de Artenstein. En resumen, tras descongelar los portaobjetos necesarios, se siembran sobre cada campo una dilución del suero a titular. (Las diluciones de los sueros se realizaban en policubetas con microdiluidores, y a partir de ahí se sembraban con un capilar sobre el portaobjeto). Tras incubar por 30 minutos a 37°C , en cámara húmeda, junto a diluciones de sueros humanos de control positivos altos,

bajos y negativos, se realizaban dos lavados de cinco minutos cada uno en PBS 7,2 , se secaba con papel de filtro y al aire el exceso de PBS, se incubaba con una dilución 1:20 de anti - inmunoglobulinas humanas totales de cabra (Immunochemia, Lote 587) conjugadas con isotiocianato de fluoresceína. (Previamente se buscó la dilución óptima de conjugados y se estudió la no reacción inespecífica del suero de cabra con los N. meningitidis A y C.)

Tras similar incubación y lavados se montan los preparados con glicerina tamponada con el mismo PBS 7,2 (glicerina: PBS=9:1). Las observaciones fueron realizadas por epifluorescencia con un microscopio Reichert Fluorpan, con lámpara HBO de 50W. Filtros de absorción azul U.V. DG1 de 1,5 mm, filtro excitador BG12 de 3 mm y objetivo de inmersión en glicerina de 95X.

Al igual que en HAI, los títulos fueron expresados como el número de la última dilución (partiendo de la dilución Nº1=1/2, diluciones al 1/2) capaz de dar IF positiva. El conjugado utilizado fue absorbido con N. meningitidis grupo A (por observarse una reacción directa del conjugado con meningococos de ese grupo utilizado para hacer improntas. La absorción se realizó creciendo meningococos como para hacer improntas, pero tras el tercer lavado se descartó el sobrenadante, poniendo en contacto el pellet con el conjugado en una proporción de 1:40, resuspendiendo y manteniendo la suspensión por 30 minutos a 37°C y 18 horas a 4°C. Este procedimiento se repitió dos veces, tras lo cual se eliminó totalmente la reacción inespecífica, sin pérdida de potencia del conjugado.

III.3.4.3. Correlación entre HAI e IF:

La correlación entre ambas técnicas resultó elevada, con un coeficiente de correlación $r = 0,9401$ para anticuerpos Anti-N. meningitidis A y de $r = 0,8334$ para anticuerpos Anti -N. meningitidis C. Esto indica que el principal componente en ambas reacciones son los anticuerpos dirigidos contra el polisacárido capsular que da la especificidad de grupo.

III.4. Métodos para la determinación de anticuerpos anti - tetánicos:

Se utilizó Contrainmunolectroforesis Discontinua, según la técnica del Instituto Pasteur de París para muestreo (Buffer Veronal/Veronal Sódico pH= 8,6 , 0,05 M para la cuba electroforética, y el mismo buffer diluido a 0,02 M para la preparación de la agarosa).

Con este método, utilizando toxoide y antisuero titulado en animales provisto por la Dra. Cetrángolo (Depto. Contralor, Instituto Nacional de Microbiología) se llegó a una sensibilidad de 0,5 UI (Más detalles de la corrida en III.6.1.). Si bien la sensibilidad es apreciable, no permite asegurar que un individuo negativo por este método no esté protegido, ya que se consideran generalmente protectivos valores incluso inferiores a 0,1 UI. De todos modos, como lo que se pretendía era observar seroconversiones o pasajes de títulos bajos a otros mayores, y esto se logró en un número apreciable de casos como se describe en Resultados, la técnica se reveló útil a los fines indicados. La sensibilidad se incrementó ligeramente (aproximadamente en una dilución al 1/2,

es decir, hasta detectar 0,25 UI) coloreando con Amido Schwartz.

También se utilizaron equipos de aglutinación con látex sensibilizado del Instituto Pasteur de París (Lote 06).

III.5. Método para la determinación de anticuerpos Anti - parotídicos:

Se utilizó inhibición de la Hemoaglutinación, usando antígeno comercial y sueros humanos de títulos conocidos como control (Flow) y glóbulos rojos de pollo, lavados tres veces en PBS 7,2 (diez volúmenes o más) antes de su uso. Los sueros fueron pretratados para eliminar inhibidores inespecíficos con nueve volúmenes de kaolin 14% en PBS. Tras 20 minutos se elimina el kaolin por centrifugación y se agrega 1/4 del volumen de suero de pellet de glóbulos rojos. Tras una hora a 40C se centrifuga; así se eliminaron las aglutininas anti - glóbulos rojos de pollo. Al sobrenadante se lo considera una dilución de 1:10 del suero. El ensayo fue realizado en policubetas descartables con fondo en V, haciendo diluciones seriadas de los sueros al 1/2. Luego se agrega 25 µl de antígeno conteniendo cuatro unidades hemoaglutinantes a todas las diluciones. Tras una hora a temperatura ambiente se agregan glóbulos rojos de pollo al 0,5% y se incuba a 40C. En general se considera protectivos a títulos de anticuerpos de 1:40 ó mayores. Títulos de 1:10 ó 1:20 son dudosos a este respecto (30).

III.6. Métodos de detección de antígenos bacterianos en líquidos biológicos:

La necesidad de la utilización de este tipo de técnicas además de los cultivos y tinción del Gram tradicionales fue discutida en I.5.. Las ventajas son:

a) Rapidez (cinco minutos para Coaglutinación, 30 a 45 minutos para Contraimmunoelectroforesis); un diagnóstico inmediato y a nivel específico en meningitis o meningococcemias, lo que aumenta las chances de sobrevivida y disminuye el riesgo de secuelas en los pacientes, permitiendo instaurar una terapéutica antibiótica racional.

b) Especificidad a nivel del serotipo o serogrupo: si bien esto no tiene valor clínico, sí tiene valor epidemiológico, ya que permite determinar si es posible combatir un brote epidémico con las vacunas existentes o no.

c) No requiere viabilidad de los gérmenes: esto es de enorme importancia en países como el nuestro, donde un elevadísimo número de pacientes recibe antibióticoterapia antes de la toma de material para cultivos, tornando alto el porcentaje de falsos negativos y dificultando la interpretación del Gram.

d) Permite transportar muestras embebidas en papel de filtro y secadas desde lugares sin facilidades de laboratorio a centros capaces de tipificar las bacterias actuantes. Si bien esto no es de utilidad para el paciente, sí lo es desde el punto de vista epidemiológico. Si bien ninguna de las muestras de pacientes estudiados fueron transportadas de este modo, se estudiaron las con-

diciones de tiempo y temperatura extrema para este tipo de transporte en el caso de la Coaglutinación (III.6.2.).

e) El consumo mínimo de antisueros en las tipificaciones. El listado de estas ventajas no significa en modo alguno que se pretende suplantar a los cultivos y tinciones habituales. Sencillamente es en manos idóneas, un valioso complemento que permite resolver casos que de otro modo hubieran quedado sin resolver. Está demostrado (15) que combinando CIED, cultivos y Gram es cuando se llega a cerca del 80% de los diagnósticos en nuestro medio.

Debe tenerse además en cuenta la posibilidad de falsos positivos (por bandas inespecíficas, reacciones cruzadas) y falsos negativos (concentración de antígenos inferior a la sensibilidad del método, muestra tomada o transportada en forma inadecuada).

En todos los pacientes directamente relacionados con las vacunas antimeningocócicas o con la puesta a punto del método de Coaglutinación, se realizaron los cultivos y tinciones de Gram según standards habitualmente utilizados en bacteriología y mencionados en I.2.. Debe señalarse la contemporaneidad de las ideas de vacunar con antígenos definidos químicamente y diagnosticar enfermedades buscando esos mismos antígenos en líquidos biológicos de pacientes.

III.6.1. Contrainmunolectroforesis Discontinua (CIED):

Fue realizada tal como fuera desarrollada por Grinstein y col. (15), utilizando sueros anti - Str. pneumoniae del Statens Seruminstitut de Dinamarca (Omniserum, que es una combinación de

los 83 serogrupos y tipos conocidos, pools parciales A hasta I y serogrupos individuales), suero anti - Haemophilus influenzae tipo b de igual procedencia y sueros anti - N. meningitidis grupos A, B, C, D, X, Y, Z, 29E y W135 provistos por el Naval Research Unit Nº1 de Berkeley, California, E.E.U.U., y también sueros contra los grupos A y C provistos por Behringwerke, República Federal Alemana, y suero de burro contra el grupo B provisto por el Dr. J. Robbins, Food and Drug Administration, N.I.H., E.E.U.U.. Este antisuero es utilizado también para detectar antígenos de Escherichia coli K1, causante de sepsis neonatales, debido a la identidad inmunológica que presentan los polisacáridos capsulares del E. coli K1 con el grupo B de N. meningitidis (este dato fue utilizado en la puesta a punto de la técnica de Coaglutinación)(31).

La base de la técnica consiste en enfrentar a antígenos y anticuerpos ubicados en sendos orificios practicados en un soporte semisólido (agarosa) y hacer actuar sobre ellos una corriente eléctrica. Los polisacáridos capsulares, por estar cargados negativamente, migran al polo positivo, y los anticuerpos, que al pH de corrida son casi neutros, migran al polo negativo por un efecto de electroendosmosis. Si se encuentran antígenos y anticuerpos en proporciones adecuadas, se forma un complejo inmune insoluble visualizable a ojo desnudo iluminando con luz oblícua sobre fondo negro. La sensibilidad depende de la potencia del antisuero empleado, ya que la masa visible es aportada en este caso por los anticuerpos, detectándose cantidades de

antígeno del orden de los nanogramos en condiciones óptimas.

Las corridas se realizaron sobre portaobjetos a los cuales se aplicó una precubierta con agarosa al 1% en agua destilada, dejando secar en estufa hasta sequedad total. Sobre el porta así preparado se coloca la cubierta de 3 ml de agarosa 0,85% en buffer veronal (pH=8,2 , μ = 0,075) diluído 1:5 en agua destilada. (En la cuba electroforética se coloca el buffer sin diluir). Una vez solidificada la agarosa y mantenida por no menos de 30 minutos en heladera en cámara húmeda, se practican orificios de 2 mm de diámetro, a 10 mm de los bordes y con 5 mm de separación entre orificios. Se siembran los líquidos biológicos o suspensiones bacterianas a tipificar del lado correspondiente al polo negativo mediante capilares y los antisueros del mismo modo; pero del lado del polo positivo. Se somete el portaobjeto a una corriente de 5 mA por 30 a 45 minutos, incluyendo en cada portaobjetos controles positivos. Como cada material es corrido contra varios antisueros simultáneamente, cada uno es su propio control negativo y control negativo para los antisueros. Una vez finalizada la corrida se realiza la lectura, que se repite tras 18 horas en heladera en cámara húmeda. Las técnicas de tinción habituales no incrementan la sensibilidad, que está en el orden de 0,45 μ g/ml para N. meningitidis A y C; 0,39 μ gr/ml para Streptococcus pneumoniae; 8,87 μ gr/ml para H. influenzae tipo b y 23 μ gr/ml para N. meningitidis B (o E. coli K1), usando como patrones polisacáridos purificados del mismo tipo que los usados en las vacunas para N. meningitidis A y C, polirribosa - fosfato para

H. influenzae tipo b y polisacárido capsular K1 purificado según el método de Orsskoff (32). Esta última medida es por supuesto menos precisa que todas las demás y la sensibilidad real debe ser apreciablemente mayor que la indicada debido a la relativa impureza del antígeno utilizado.

III.6.2. Coaglutinación (CoA):

Es una técnica que permite realizar el mismo tipo de diagnósticos que la CIED (o tipificaciones sobre colonias obtenidas de cultivos), pero presenta determinadas ventajas sobre la CIED que serán discutidas más abajo.

El método se basa en la capacidad de la proteína A que está presente en alta concentración en la superficie de ciertas cepas de Staphylococcus aureus, de ligar los extremos fijadores de complemento de las inmunoglobulinas G (subclases 1, 2 y 4). Quedan así libres los extremos Fab para ligarse a antígeno homólogo, en cuya presencia se produce co-aglutinación de los S. aureus sensibilizados con anticuerpos (33).

Si bien se ha utilizado esta propiedad de los S. aureus en trabajos de tipo inmunológico y de serotipificación con fines diagnósticos de bacterias obtenidas de cultivos (34, 35), son muy escasos los trabajos en que se intenta utilizar esta técnica directamente sobre líquidos orgánicos (36), sin llegar a resolver en forma reproducible el problema de ciertas aglutinaciones inespecíficas que aparecen y son atribuidas a macroglobulinas inespecíficas por algunos autores. Estas aglutinaciones inespecíficas también se suelen dar cuando se utiliza látex como soporte. Este pro-

blema ha sido aquí resuelto habiéndose diseñado además una contrapueba o prueba confirmatoria. La CoA permite detectar antígenos solubles específicos en muestras de pacientes en sólo cinco minutos, utilizando para ello volúmenes aproximadamente 100 veces menores de antisueros que la CIED sin requerir ningún equipo especial. De ahí su valor diagnóstico y epidemiológico, y la razón del esfuerzo puesto en esta técnica durante este trabajo, en el cual se ensayaron líquidos cefalorraquídeos (LCR) en el día de su obtención, congelados por distintos períodos o embebidos en papel de filtro y mantenidos en seco por tiempos variables. Todo esto para asegurar la tipificación de las bacterias causantes de meningitis en grupos poblacionales vacunados y no - vacunados a fin de poder garantizar los resultados de protectividad en campo de las vacunas, y como una contribución para resolver el problema nacional de no - determinación de los agentes causantes de meningitis purulentas y la consecuente imposibilidad de tomar medidas adecuadas para prevenirlas.

III.6.2.1. Detalles técnicos de la CoA:

a) LCR: Se utilizaron los extraídos de pacientes con diagnóstico presuntivo de meningitis, enviados para realizar la confirmación del diagnóstico por CIED (otras alícuotas fueron enviadas para el examen citoquímico, cultivos y coloración de Gram). Se ensayaron el día de su recepción o después de haber sido mantenidos congelados a 0°C o a -20°C por distintos períodos hasta un máximo de un año.

b) Inhibición en papel de filtro: Trozos de papel de filtro

Whatmann Nº1 de 7 x 3 cm fueron embebidos en LCR y dejados a secar al aire. Luego se los conservó a temperatura ambiente o a 37°C por distintos períodos, tras lo cual se los eluyó con 0,6 ml de agua destilada, realizando CoA y CIED sobre el eluido.

c) Antisueros: Fueron utilizados los mismos que fueron descritos para CIED (III.6.1.).

d) Preparación y sensibilización de los S. aureus: Fue utilizada la cepa Cowan 1, conocida por tener una alta concentración de proteína A en su superficie, gentilmente provista por el Dr. E. A. Edwards, Naval Health Research Center, San Diego, California, E.E.U.U.. Los S. aureus fueron crecidos en caldo Triptosa - Soya (Merck), a 37°C y bajo agitación continua y burbujeo de aire por 18 horas. (Es importante hacer notar que si no se cumple estrictamente con los requisitos de temperatura y aireación se obtiene igual un rendimiento importante (en cantidad de células) de S. aureus pero la concentración de proteína A baja sensiblemente y con ella, la sensibilidad del método. (Experimentos llevados a cabo para demostrar esto no serán descriptos por ser irrelevantes respecto del objetivo general propuesto). Los S. aureus fueron cosechados por centrifugación, lavados tres veces en buffer fosfato salino (PBS, 0,15 M, pH=7,2) y resuspendidos al 10% V/V en formaldehído al 0,5% en PBS por tres horas. Después de tres lavados adicionales en PBS se los calentó por una hora a 80°C con agitación, tras lo cual fueron vueltos a lavar tres veces, y finalmente resuspendidos al 10% V/V en PBS. Se sensibilizaron alícuo-

tas de 1 ml de esta suspensión agregándole 0,1 ml de cada uno de los antisueros arriba mencionados, agitando ocasionalmente durante una hora a temperatura ambiente, llevando luego a 10 ml con PBS. El reactivo así preparado se lava una vez y se mantiene estable a 4°C por lo menos 14 meses.

3) Ensayo de CoA: Cada LCR fue ensayado simultáneamente contra por lo menos tres suspensiones de S. aureus sensibilizadas con antisueros diferentes. En cada caso una gota de LCR colocada sobre una placa de vidrio se le agregó una gota de suspensión de S. aureus sensibilizados, mezclando con una varilla plástica. Las lecturas fueron realizadas con iluminación oblicua contra fondo oscuro a simple vista, y tras no más de cinco minutos de iniciada la reacción para evitar artefactos por secado.

Se usó la siguiente escala: 0, si la suspensión se mantuvo uniforme; 1+, granulosidad mínima; 2+, granulosidad franca; 3+, con grumos y líquido casi cristalino; 4+, grandes grumos de aglutinación y líquido remanente completamente transparente. El ensayo fue considerado positivo en presencia de aglutinaciones de 2+ o mayores con una sola de las suspensiones de S. aureus sensibilizadas, y 0 con las otras dos suspensiones corridas en paralelo, las cuales hacen las veces de control negativo. También se consideró positivo el ensayo con aglutinación de 3+ ó 4+ con una de las suspensiones y aglutinación de no más de 1+ en los controles negativos. Como controles positivos se utilizaron suspensiones obtenidas a partir de cultivos y LCR positivos por CIED y cultivo. Estas mismas suspensiones se usaron también como control ne-

gativo para S. aureus sensibilizados con antisueros no homólogos con los antígenos de la suspensión.

f) Pretratamiento de los LCR: Procedimiento que fue desarrollado para eliminar aglutinaciones inespecíficas que a veces se presentaron al poner a los S. aureus (sensibilizados o no) en contacto con algunos LCR. Consistió en calentar por 20 segundos a 100°C una alícuota del LCR a ensayar por CoA. (Otros variados tratamientos ensayados, como ser tratamientos enzimáticos en distintas condiciones de pH y temperatura con pepsina y tripsina, así como absorciones previas con S. aureus sin sensibilizar no dieron resultado).

g) Ensayo confirmatoria: Consistió en absorber un volumen de LCR con un volumen igual obtenido por centrifugación de cinco minutos a 2.500 r.p.m. de la suspensión de S. aureus sensibilizados que habían dado un resultado positivo con ese mismo LCR en un ensayo previo de CoA. Igual absorción se realiza con S. aureus sin sensibilizar. Se suspendieron los S. aureus sensibilizados y no sensibilizados en el LCR y tras una incubación de cinco minutos a temperatura ambiente se elimina a los S. aureus por centrifugación, realizando CoA con ambos sobrenadantes. El resultado se consideró confirmado si el LCR absorbido con S. aureus sin sensibilizar mantenía su positividad.

h) Resultados obtenidos en comparación con CIED: Fue realizada CoA y CIED en paralelo en 150 LCR el mismo día de su extracción y 20 LCR mantenidos congelados por períodos de hasta un año.

No se produjeron discrepancias entre ambos métodos en los materiales congelados. Del total de 170 muestras probadas, 73 fueron positivas y 88 fueron negativas por ambos métodos, ninguna de las muestras fueron positivas por CIED y negativas por CoA, pero nueve fueron positivas por CoA y negativas por CIED.

Sesenta y cinco de los LCR estudiados tuvieron aglutinaciones de 2+ ó mayores con S. aureus sensibilizados con distintos antisueros y no - sensibilizados. En todos estos casos esta aglutinación inespecífica fue eliminada mediante el pre - tratamiento a 100°C por 20 segundos.

El Cuadro 4 indica las frecuencias de detección de las distintas bacterias buscadas, especialmente cuando el diagnóstico fue positivo sólo por CoA.

En los dos casos positivos para Haemophilus influenzae tipo b por CoA, pero negativos por CIED, los pacientes tenían cuatro y siete meses de edad, respectivamente. Los cultivos fueron negativos en el segundo de los casos, probablemente debido a aplicación de antibióticos antes de la toma del material a cultivar, en el que se observaron diplobacilos Gram (-). En ambos casos se llevó a cabo el test confirmatorio, reafirmando el resultado obtenido por CoA.

Los seis LCR que resultaron positivos por CoA para Str. pneum al tiempo que negativos por CIED fueron obtenidos de los siguientes pacientes: tres LCR obtenidos de dos pacientes con cultivos Gram positivos para Str. pneumoniae. En uno de ellos, determinaciones realizadas sobre gotas del caldo de cultivo fueron positi-

Cuadro 4

Número de muestras en las cuales se detectó bacterias por Coaglutinación y Contrainmunolectroforesis simultáneamente, o sólo por Coaglutinación (con Contrainmunolectroforesis negativa).

Bacteria	CoA +, CIED +	CoA +, CIED -
Haemophilus influenzae tipo b	43	2
Streptococcus pneumoniae	13	6
Neisseria meningitidis C	7	0
Neisseria meningitidis B	5	1
Escherichia coli K1	4	0
Haemophilus influenzae tipo b y Streptococcus pneumoniae simultáneamente	1	0
Total	73	9

CoA: Coaglutinación

CIED: Contrainmunolectroforesis discontinua

vas para CoA y negativas por CIED. Debe destacarse que hasta ese momento (79 muestras estudiadas), no se disponía de antisueros específicos para los serotipos 7 y 14 de Str. pneumoniae. A partir de ese punto, se logró obtener pooles parciales y serotipos 3, 7 y 14 y S. aureus fueron sensibilizados con los mismos. Estos reactivos fueron utilizados en LCR negativos por CIED y CoA (con S. aureus sensibilizados sólo con Omniserum) o positivos sólo por CoA. Así, los tres restantes LCR mencionados como CoA positivos y CIED negativos para Str. pneumoniae (dos con cultivo positivo y uno con cultivo negativo) pudieron ser confirmados. Dos de los LCR (uno con cultivo positivo y el de cultivos negativos) fueron positivos para serotipo 14; el tercero resultó serotipo 7. Así pudieron ser explicadas estas discrepancias entre CIED y CoA (ver Discusión).

El LCR positivo para N. meningitidis grupo B por CoA pero no por CIED no desarrolló en cultivo, pero el Gram demostró diplococos negativos. El test Confirmatorio reafirmó el resultado obtenido por CoA.

Esta prueba confirmatoria fue usada además en cinco casos adicionales (tres H. influenzae tipo b, un E. coli K1 y un N. meningitidis grupo C). En todos los casos resultó confirmado el resultado original obtenido por CoA.

De los 88 resultados negativos por CIED y CoA, 69 muestras no desarrollaron en cultivo y 19 desarrollaron bacterias para las cuales no había anticuerpos específicos disponibles.

-

i) Valor como herramienta epidemiológica: Para determinar la utilidad de la CoA para estudios epidemiológicos y en zonas con facilidades mínimas de laboratorio, se estudiaron los siguientes parámetros: 1) estabilidad de los S. aureus sensibilizados, mantenidos a 4°C; 2) la posibilidad de obtener resultados satisfactorios a partir de LCR eluidos de papel de filtro previamente embebido en el LCR; 3) el tiempo que se mantiene la positividad de los LCR embebidos en papel de filtro bajo condiciones severas de temperatura (37°C).

i.1. Para evaluar la estabilidad, se sensibilizaron tres lotes de S. aureus con suero anti - H. influenzae tipo b, dos lotes con anti - N. meningitidis C y se conservaron S. aureus sin sensibilizar de esos mismos lotes. Fueron mantenidos hasta un máximo de 20 meses a 4°C sin pérdida apreciable de sensibilidad. Alícuotas de estos mismos lotes fueron usados para los estudios arriba descritos, sufriendo frecuentes cambios de 4°C a temperatura ambiente sin pérdida de sensibilidad.

i.2. Papeles de filtro Whatmann Nº1 fueron embebidos en LCR, dejados secar al aire y mantenidos por 24 horas y hasta 28 días a temperatura ambiente o a 37°C (Cuadros 5 y 6). Se estudió además si el pretratamiento con calor era necesario en estas condiciones. Ninguna de las muestras mostró reacciones inespecíficas a pesar de no haber sido calentadas previamente, a pesar de que todos los LCR (pero no la suspensión obtenida a partir de un cultivo) las tuvieron antes de ser embebidas en el papel de filtro.

El calentamiento del material eluído resultó en falsos negativos en dos ocasiones para CIED y en tres para CoA (Cuadro 5).

El Cuadro 6 muestra los resultados obtenidos tras realizar CoA sobre material eluído a distintos tiempos después de colocadas tiras de papel de filtro previamente embebidas en una mezcla de dos LCR positivos para H. influenzae tipo b a 37°C.

Los resultados que se muestran fueron obtenidos sin precalentar el material eluído. La positividad se mantuvo hasta el día 21. En todos los ensayos que se muestran en los Cuadros 5 y 6, los controles negativos dieron una lectura de 0.

j) Discusión de los resultados de CoA: CoA y CIED coincidieron en 94,7% de los 170 LCR estudiados. Hubo discrepancias en sólo nueve casos (5,3%). En todos ellos, la CoA fue positiva y la CIED negativa, y los resultados de CoA fueron confirmados por al menos uno de los siguientes criterios: cultivo, tinción de Gram, o la Prueba Confirmatoria. De modo que la CoA demostró ser una técnica altamente confiable para el diagnóstico de meningitis bacterianas.

La sensibilidad de la CoA fue al menos igual a la de CIED. De los nueve CoA positivos y CIED negativos, sólo los dos casos de H. influenzae tipo b y el caso de N. meningitidis grupo B pueden ser explicados por una mayor sensibilidad de la CoA. Esto fue particularmente así en uno de los casos de H. influenzae tipo b, en el cual el primer LCR fue positivo sólo por CoA, y el segundo y tercero (tomados a las 24 y 48 horas después del primero) fueron ambos positivos usando las dos técnicas. Una cuarta muestra fue

Cuadro 5

Resultados obtenidos por CoA y CIED en cultivos y líquidos cefalorraquídeos eluidos de papel de filtro después de conservarlos en seco por 24 horas a temperatura ambiente.

Material	CIED		CoA	
	s/P	c/P ^o	s/P	c/P ^o
LCR 1 (negativo)	-	-	-	-
LCR 2 (negativo)				
LCR 3 (H. influenzae b)	+	+	+	+
LCR 4 (H. influenzae b)	+	+	+	
LCR 5 (H. influenzae b)	+		+	
LCR 6 (N. meningitidis C)	+		+	
Cultivo N. meningitidis C	+		+	+

+: Resultado positivo

-: Resultado negativo

^o: 20 segundos a 100 °C

CoA: Coagulación

CIED: Contrainmunolectroforesis discontinua

LCR: Líquido Cefalorraquídeo

s/P: Sin Pretratamiento

c/P: Con Pretratamiento

Cuadro 6

CoA aplicada a un pool de Líquidos Cefalorraquídeos eluidos de papel de filtro conservado previamente a 37°C.

Días a 37°C	Resultados*	Tiempo de reacción
1	++++	2' 30''
2	+++	2' 30''
3	+++	2' 30''
4	+++	2'
14	+++	5'
21	++	5'
28	+	5'

*: Escala descripta en III.6.2.1.e).

': Minutos

": Segundos

CoA: Coaglutinación

negativa usando ambas técnicas.

Tres LCR positivos por CoA y negativos por CIED para Str. pneumoniae fueron procesados antes de obtener los sueros contra los serotipos 7 y 14. Estos no pueden ser detectados por medio de CIED debido a la carga eléctrica neutra de sus polisacáridos capsulares (37). Esto último no interfiere en la detección por CoA, tal como fue fehacientemente demostrado en los restantes tres LCR, que fueron sólo positivos por CoA para Str. pneumoniae y que poseían estos serotipos. Por lo tanto, las discrepancias observadas en la detección de Str. pneumoniae no se debieron a una mayor sensibilidad de la CoA, sino a una limitación fisicoquímica de la CIED, que puede ser superada adicionando al buffer de corrida ácido carboxifenilborónico (38).

Tanto CIED como CoA son eficientes herramientas diagnósticas rápidas, útiles para proporcionar junto con la tinción de Gram y los cultivos tradicionales datos esenciales en situaciones que siempre constituyen una emergencia médica y eventualmente también epidemiológica.

El gran número de cultivos negativos observados puede ser explicado en algunos casos por la dificultad de recuperar a ciertas bacterias de requerimientos nutricionales complejos, pero en la mayoría de los casos se debe al tratamiento antibiótico previo a la admisión en el Hospital, y por lo tanto, previa a la toma de material para cultivar.

Esta situación lamentable, cuya existencia no se puede pasar por alto, aumenta la importancia de la utilización de técnicas

inmunológicas como CoA y CIED, las cuales en cierta medida pueden superar dificultades diagnósticas que por esa causa suceden.

Los resultados de CoA obtenidos en eluidos de LCR previamente embebidos en papeles de filtro y secados, muestran que este método es útil para transportar muestras a través de grandes distancias, tanto con fines diagnósticos como para establecer medidas epidemiológicas.

No se ha tratado de dilucidar las razones por las cuales la absorción en papel de filtro elimina las aglutinaciones inespecíficas que se manifiestan en algunos LCR y que son atribuidas por algunos autores a macroglobulinas inespecíficas.

La Prueba Confirmatoria desarrollada fue útil en confirmar resultados obtenidos durante el estudio, pero de acuerdo a los datos observados, es innecesario utilizarla en forma rutinaria.

Los resultados obtenidos con CoA en relación a su alta sensibilidad, especificidad, simplicidad, velocidad de reacción, bajo consumo de antisueros, estabilidad a largo plazo de los reactivos y la posibilidad de utilizar muestras transportadas en condiciones severas embebidas en papel de filtro, hacen de ésta una técnica altamente confiable y fácilmente accesible, incluso a laboratorios de baja complejidad, y capaz de proveer la información necesaria para llevar a cabo un control epidemiológico eficiente.

IV. RESULTADOS Y CONCLUSIONES.

Puestas a punto todas las técnicas antes descriptas, se estuvo en condiciones de evaluar adecuadamente los resultados de las vacunaciones, tanto desde el punto de vista inmunológico como de su protectividad en ensayos de campo.

IV.1. Determinación de la prevalencia de anticuerpos anti - N. meningitidis A y C en poblaciones rurales y urbanas de la Argentina (Punto I.6.3. del Plan de Trabajo).:

Al iniciarse este estudio, no se contaba con ningún dato respecto de prevalencia de anticuerpos anti - meningocócicos en nuestro país. Sólo se conocía el serogrupo de los N. meningitidis causantes de enfermedad en pacientes del Hospital de Niños "Ricardo Gutiérrez" y del Instituto Malbrán, que en ese momento (1975), eran casi con exclusividad del grupo C. Más adelante aparecieron N. meningitidis grupo B y ocasionalmente algunos otros (por ejemplo, W135 en un conscripto de la Armada Argentina), pero nunca desde esa fecha a la actualidad se encontró un N. meningitidis grupo A.

Se carecía por lo tanto de todo indicio respecto de la probable susceptibilidad a la enfermedad meningocócica de las poblaciones que se pretendía proteger. Este tipo de información tiene especial utilidad en meningitis meningocócicas debido al hecho de que la aparición de la enfermedad meníngea está más relacionada con la particular susceptibilidad de los huéspedes individuales que con la virulencia innata del organismo infectante (Ver III.3.).

El primer planteo fue por lo tanto evaluar las muestras pre-
vacunación de individuos pertenecientes a los distintos grupos po-
blacionales estudiados.

En la Tabla II se observan los niveles promedio de anticuer-
pos en todos los grupos estudiados. Para anticuerpos anti -
N. meningitidis C el cuadro que se presenta es bastante homogéneo,
en el sentido de que salvo en PB (Puerto Belgrano, Escuela de En-
fermería)(grupo que presenta la mayor edad) y en RR y RU (La Rio-
ja Rural y Urbano respectivamente) donde los niveles son modera-
damente elevados (superiores a tres), en todos los grupos restan-
tes el nivel promedio es bajo. Por el contrario, los anticuerpos
anti - N. meningitidis A son en general elevados y en SM1, SM2
(Hogar Naval Stella Maris) y PB, extremadamente elevados, sorpren-
diendo el hecho de que sea precisamente el grupo de menor edad
el que presenta el promedio más elevado; si bien debe recordarse
que se trata de una población semicerrada. La única excepción la
constituyen el LN-76, con un muy bajo nivel promedio.

En todos estos grupos poblacionales, los niveles de anticuer-
pos anti - N. meningitidis A fueron significativamente superiores
a los correspondientes niveles de anticuerpos anti -
N. meningitidis C realizando la comparación mediante el test de
Student para muestras pareadas, con un nivel de significación del
5%, con la única excepción de LN-76, población en que el nivel
de anticuerpos anti - N. meningitidis C supera al de anticuerpos
anti - N. meningitidis A, siendo bajos los promedios en ambos ca-
sos. (Se utilizó una diferencia de medias en unidades de desvío

Tabla II

Niveles de anticuerpos anti-N. meningitidis A y C en distintas poblaciones, expresados en media aritmética. HAI. Dilución inicial (Tubo Nº1)= 1/2. Diluciones al 1/2.

Población	Edad	Ac. Anti-N.m. A			Ac. Anti-N.m. C		
		n	\bar{x}	s	n	\bar{x}	s
SM1	5-11	64	5,7	0,7	64	1,9	1,2
SM2	12-16	48	5,6	1,1	48	2,1	1,7
LN-76	13	84	1,9	1,2	84	2,5	1,6
LN-77	13	79	3,7	0,8	79	2,8	0,9
PB	17-22	54	5,0	1,0	54	3,6	1,4
CR	18	96	3,3	1,0	96	2,6	1,1
CU	18	82	3,2	0,8	82	2,6	0,9
RR	18	30	3,6	1,4	30	3,2	1,4
RU	18	37	4,1	0,9	37	3,4	1,1
Ch	18	12	2,5	0,5	12	1,9	0,6
LP	18	37	2,9	0,7	37	1,6	0,6

HAI: Hemoaglutinación Indirecta

n: tamaño muestral; \bar{x} : media aritmética; s: desviación standard.

Poblaciones: ver II.2.

SM: Hogar Naval Stella Maris

LN: Licen Naval, años 76 y 77

PB: Escuela de Enfermería de Puerto Belgrano

CR: Catamarca rural

CU: Catamarca urbana

RR: La Rioja rural

RU: La Rioja urbana

Ch: Chubut

LP: La Pampa

standard de $\delta = 0,5$ y una potencia de mayor o igual que el 90%, salvo en el caso de Ch, en que fue del 50%).

En poblaciones con individuos de ambos sexos (SM y PB) no se encontró diferencias significativas entre las medias de los sexos (test de Student para muestras independientes, nivel de significación 5%). No hay diferencias significativas entre los grupos rurales y urbanos de la provincia de Catamarca a un nivel de significación del 5% para los dos tipos de anticuerpos considerados, ni entre los grupos urbano y rural de La Rioja (anticuerpo anti - N. meningitidis C). La media para anticuerpos anti - N. meningitidis A de RU es significativamente superior a la de RR a un nivel de significación del 5% (en estos tres últimos casos se utilizó un $\delta = 0,5$ y una potencia igual o mayor que el 90%).

Enfocando el problema desde otro punto de vista, las Tablas III y IV muestran el número y porcentaje de individuos con títulos de 4 ó mayores y de título menor o igual que uno, respectivamente.

En la Tabla III se observa que, en general, son más los individuos con título mayor o igual que cuatro tubos para anticuerpos anti - N. meningitidis A que para anticuerpos anti - N. meningitidis C (con la única excepción de LN-76 y la igualdad en Ch, en que ningún individuo alcanza este límite). Para anticuerpos anti - N. meningitidis C ocho de los once grupos poblacionales tienen menos que el 30% de sus individuos por encima del límite fijado. En la Tabla IV se ve que es muy baja la proporción de individuos con título de uno o menor para anticuerpos anti -

Tabla III

Número y porcentaje de individuos pertenecientes a distintas poblaciones que presentaron títulos de anticuerpos anti-Neisseria meningitidis A y C de 4 ó mayores. Títulos expresados en Nº de tubo. Hemoaglutinación Indirecta. Dilución inicial (Tubo Nº1)= 1/2. Diluciones al 1/2.

Población	Ac.Anti N. meningitidis A		Ac.Anti N.meningitidis C	
	n		n	
	(1)	(2)	(1)	(2)
SM1	63 / 64	98,4	5 / 64	7,8
SM2	46 / 48	95,8	12 / 48	25,0
LN-76	5 / 84	5,9	22 / 84	26,1
LN-77	44 / 79	55,6	16 / 79	20,2
PB	51 / 54	94,4	33 / 54	61,1
CR	39 / 96	40,6	23 / 96	23,9
CU	32 / 82	39,0	14 / 82	17,0
RR	14 / 30	46,4	14 / 30	46,6
RU	28 / 37	75,6	19 / 37	51,3
Ch	0 / 12	0	0 / 12	0
LP	8 / 37	21,6	0 / 37	0

(1) Nº de individuos con título de 4 ó mayor.

(2) Nº total de individuos en la población.

Ac.: Anticuerpos

Siglas de los grupos poblacionales: igual que en Tabla II.

Tabla IV

Número y porcentaje de individuos pertenecientes a distintas poblaciones que presentan títulos de Ac. Anti-Neisseria meningitidis A y C de 1 ó menores. Títulos expresados en Nº de tubos. Hemoaglutinación Indirecta.

Dilución inicial (Tubo Nº1)=1/2. Diluciones al 1/2.

Población	Ac. Anti-N. meningitidis A		Ac. Anti-N. meningitidis C	
	n (1)	% (2)	n (1)	% (2)
SM1	1 / 64	1,5	22 / 64	34,3
SM2	0 / 48	0,0	26 / 48	54,1
LN-76	35 / 84	41,6	33 / 84	39,2
LN-77	0 / 79	0,0	8 / 79	10,1
PB	1 / 54	1,8	6 / 54	11,1
CR	3 / 96	3,1	17 / 96	17,7
CU	1 / 82	1,2	11 / 82	13,4
RR	1 / 30	3,3	5 / 30	16,6
RU	0 / 37	0,0	3 / 37	8,1
Ch	0 / 12	0,0	3 / 12	25,0
LP	1 / 37	2,7	16 / 37	43,2

(1) Nº de individuos con título de 1 ó menor.

(2) Nº total de individuos en la población.

Siglas de los grupos poblacionales : igual que Tabla II.

N. meningitidis A (salvo en LN-76) siendo, por el contrario, muy importante la proporción de individuos con esos títulos para anticuerpos anti - N. meningitidis C.

IV.2. Evaluación de una vacuna antimeningocócica "A + C" (sólo estable a -20°C).

Como se mencionó más arriba, se inició la evaluación en poblaciones de alto riesgo respecto de las meningitis bacterianas (SM, PB, LN-76). Ninguno de los individuos incluidos había recibido antes una vacuna antimeningocócica, ni había padecido de meningitis o meningococemias. A todos se los siguió desde el punto de vista clínico. Las reacciones fueron nulas en casi todos los casos, mostrándose una reactividad ligeramente mayor en el grupo de mayor edad (PB)(Cuadro 7). Estas reacciones prácticamente desaparecieron a las 48 horas, de modo que desde el punto de vista de la seguridad las condiciones son óptimas. Estos datos fueron ampliamente confirmados en los posteriores ensayos de campo en aproximadamente 25.000 conscriptos por año, aplicando la vacuna antimeningocócica sola o en combinación con las vacunas T.A.B.D.T. y antiparotidítica, sin ninguna reacción sistémica de importancia, y locales mínimas o nulas.

Desde el punto de vista de la respuesta inmunitaria, y como está detallado más arriba, el criterio utilizado fue que el 80% o más de los individuos de cada grupo poblacional incrementarían su título de anticuerpos en por lo menos dos diluciones al 1/2.

Cuadro 7

Evaluación clínica post-vacunación con "Vaccinum meningitidis cerebrospinalis A + C", lote 4. (Datos obtenidos por el Capitán de Corbeta Médico G. Weyland) Escuela de Enfermería Puerto Belgrano.

Reacción a las 24 hs.	Nº de individuos
Sin reacción	23
Eritema*	38
Eritema + Edema*	25
Eritema + Edema + Fiebre leve (debajo de 37º5)	12
Eritema + Edema + Fiebre superior a 37º5	1
Total	99

En el sitio de inyección.

En un primer momento pareció que no se alcanzaba a cumplir con este criterio (Tabla V, Columna de "Totales"), particularmente para anticuerpos anti - N. meningitidis A. Sin embargo se observó que casi los únicos individuos que no respondían a la vacuna eran aquellos que presentaban un título inicial de cuatro (dilución 1:16) o mayor aún. Revisando datos de otros autores y que habían utilizado una metodología parecida (Hemoaglutinación Indirecta pero utilizando glóbulos rojos sin estabilizar)(27), se vio que les ocurría lo mismo, sólo que no le adjudicaron importancia a la observación por ser muy baja la proporción de individuos con las especiales características mencionadas. En otros términos, no les llegaba a afectar en la decisión acerca de la vacuna. Como se puede ver en IV.1., en los grupos poblacionales aquí estudiados, la proporción de individuos con altos títulos anti - N. meningitidis Aes (salvo LN-76) extremadamente elevada. Por lo tanto, se separó en la Tabla V a los individuos con títulos iniciales menores que cuatro (dilución 1:16), y dentro de este grupo se tabuló el número y porcentaje de individuos con dos o más incrementos en el suero post - vacunación respecto del suero pre - vacunación. Como se ve, en todos los grupos poblacionales se superó ampliamente el límite del 80% requerido.

No hubo diferencias de respuesta significativas entre los sexos (SM1 y 2; PB)(Test de Student para muestras independientes, nivel de significación 5%, diferencia de medias en unidades de desvío standard $\delta = 1$, potencia aproximada 95%).

Analizando las figuras 1a, b, c y d; 3a y b; y 5a y b, se

Tabla V

Número y porcentaje de individuos vacunados que presentaron 2 ó más incrementos al 1/2. Hemoaglutinación Indirecta. (Δ + = Postvacunado - Prevacunado > 2).

Ac	Población	Totales		Título inicial= 3 ó menor	
		n (1)	% (2)	n (3)	% (4)
A	SM ₁	31 / 64	48,4	1 / 1	100
	SM ₂	28 / 48	58,3	1 / 1	100
	PB	14 / 54	25,9	2 / 2	100
	LN-76	69 / 84	82,1	69 / 79	87,3
C	SM ₁	61 / 64	95,3	58 / 58	100
	SM ₂	38 / 48	79,1	32 / 33	96,9
	PB	27 / 54	50,0	18 / 19	94,7
	LN-76	71 / 84	84,5	60 / 64	93,7

Siglas de las poblaciones igual que en Tabla II. (1) y (2) como en Tabla III.

Figuras 1a, b, c y d; 3a y b; 5a y b:

Distribución porcentual de los incrementos observados un mes después de la vacunación, expresados en números de tubos de diferencia. ($\Delta +$ = título postvacunado - título prevacunado).
Hemoaglutinación Indirecta. Tubo Nº 1 = dilución 1/2. Diluciones al 1/2.

Fig.1a

SM. 5-II AÑOS
ANTICUERPOS ANTI-N.MENINGITIDIS "A"

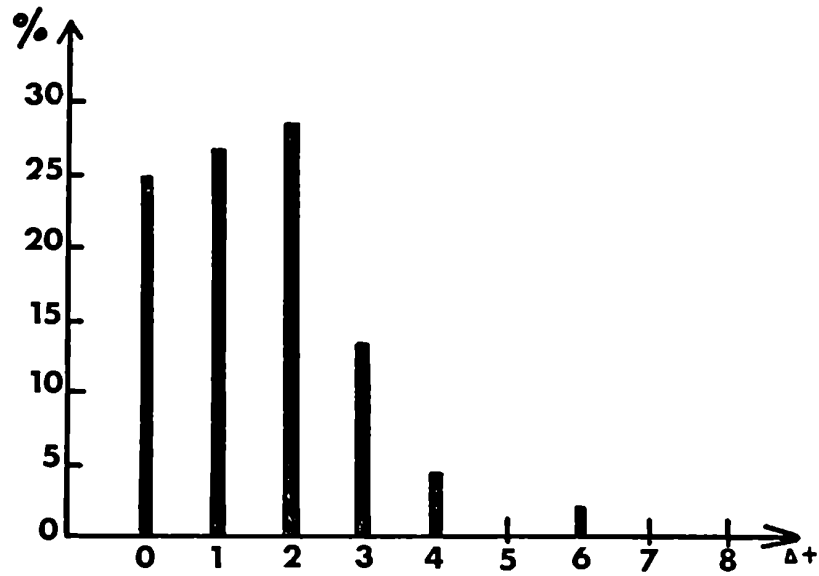


Fig.1b

SM. 5-II AÑOS
ANTICUERPOS ANTI-N.MENINGITIDIS "C"

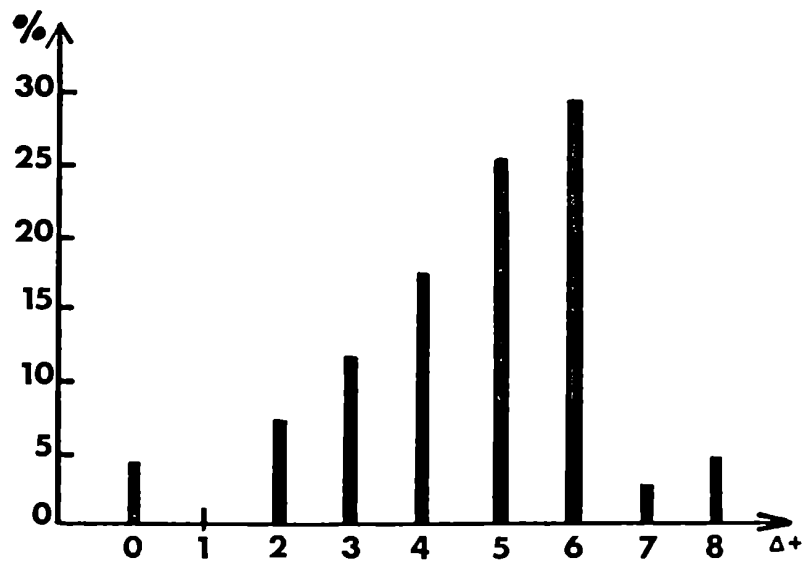


Fig.1c

-SM. 12-16 AÑOS. ANTICUERPOS ANTI-N.MENINGITIDIS "A"

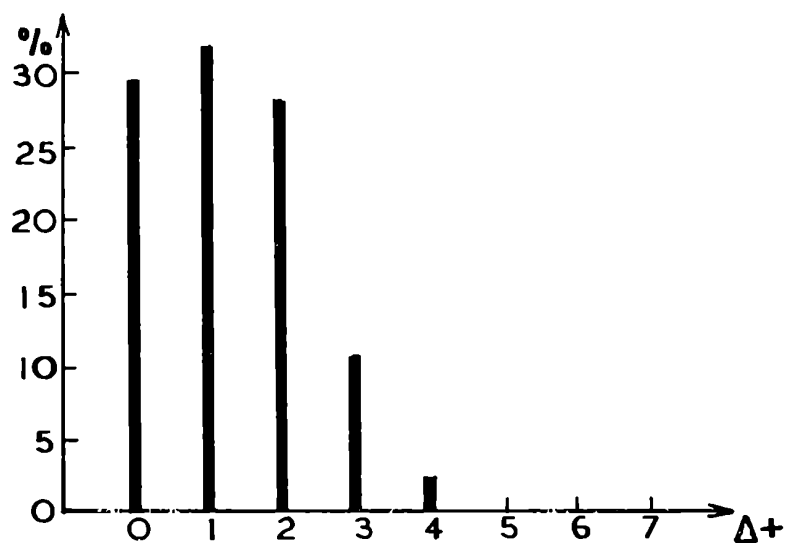


Fig.1d

-SM. 12-16 AÑOS. ANTICUERPOS ANTI-N.MENINGITIDIS "C"

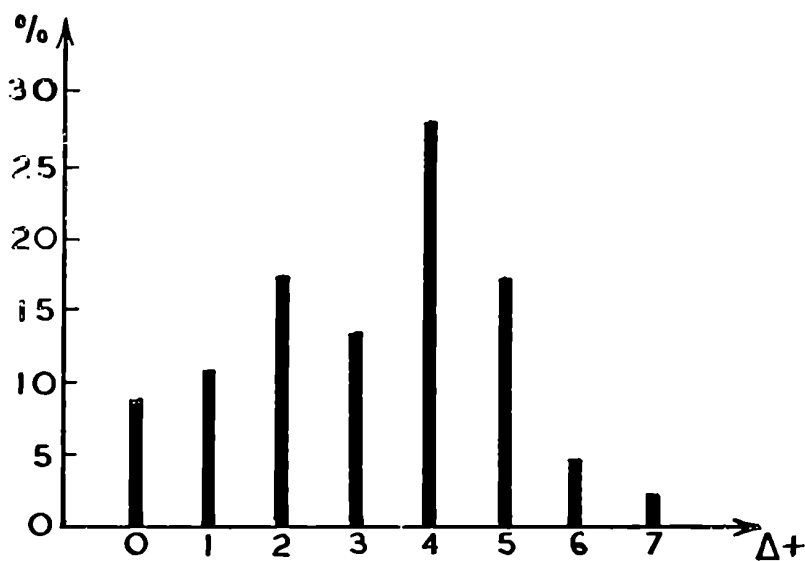


Fig.3a

- PB. 17-22 AÑOS. ANTICUERPOS ANTI-N.MENINGITIDIS "A"

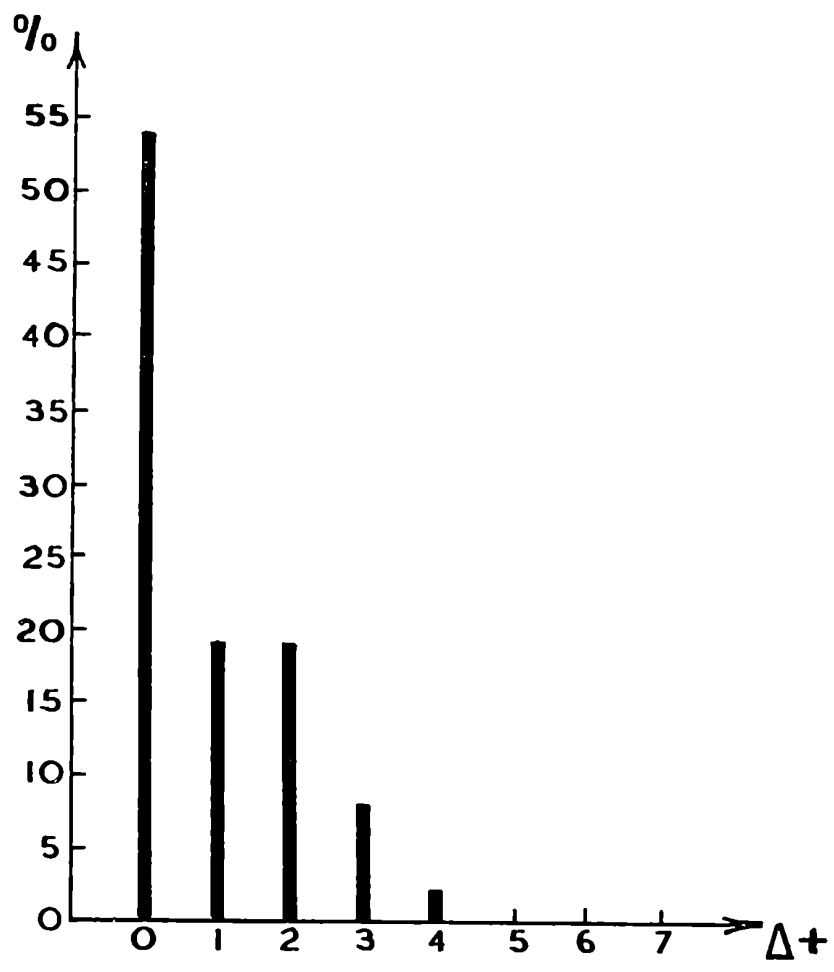


Fig.3b

- PB. 17-22 AÑOS. ANTICUERPOS ANTI-N.MENINGITIDIS "C"

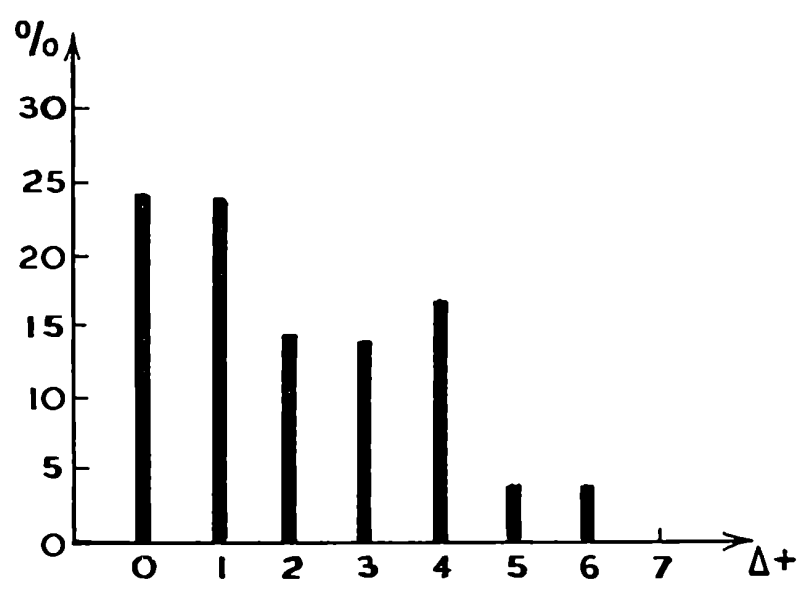


Fig. 5a

- LN. 13 AÑOS. ANTICUERPOS ANTI-N.MENINGITIDIS "A"

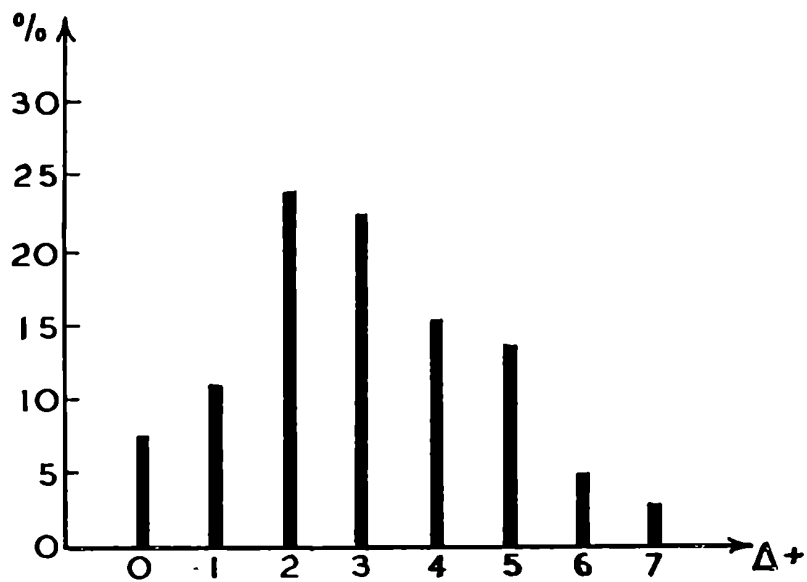
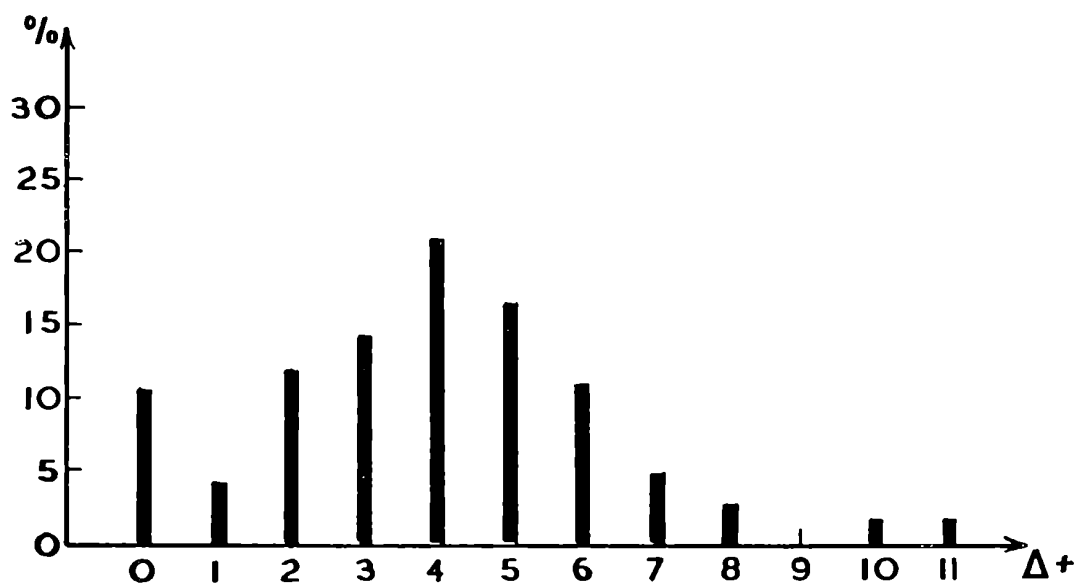


Fig.5b

- LN. 13 AÑOS. ANTICUERPOS ANTI-N.MENINGITIDIS "C"



observar como no sólo se logra una respuesta de dos incrementos, sino que se alcanzan en ocasiones hasta 11 incrementos. (Esto se revelaría como crucial en la evaluación de la duración de la respuesta inmunitaria). Si se grafican los títulos iniciales de aquellos individuos que no respondieron a la vacuna (o respondieron con sólo un incremento al 1/2) podemos ver como casi todos ellos tienen títulos iniciales de cuatro o mayores (Figuras 2a, b, c y d; 4a y b; y 6a y b).

Estos resultados no deben interpretarse en el sentido de que aquellos individuos con alto título inicial no respondan en absoluto a la vacuna, sino que sus respuestas son muy dispares, y que si bien algunos logran varios tubos de incremento, la mayoría no responde o lo hace con sólo un tubo de incremento (Ver Cuadros 8a, b, c, d; 9a y b; 10a y b).

Es importante señalar (y estos últimos cuadros permiten visualizarlo con facilidad) que no se observaron caídas de título por debajo del nivel inicial en ningún caso (ni con títulos iniciales altos, ni con títulos iniciales bajos) al mes de realizada la vacunación. Es decir que la vacunación no produce efectos clínicos indeseables ni tampoco perjudica a aquellos que ya poseen anticuerpos antimeningocócicos antes de ser vacunados. En aquellos que no poseían dichos anticuerpos al momento de la vacunación, les induce una producción intensa de anticuerpos contra ambos grupos de N. meningitidis considerados.

Figuras 2a, b, c y d; 4a y b; 6a y b:

Número de individuos que no han producido incrementos de título de anticuerpos un mes después de la vacunación, y cuyo título previo a la misma se indica, expresado en número de tubos. Hemoaglutinación Indirecta. Tubo Nº 1 = dilución 1/2. Diluciones al 1/2.

Fig.2a

SM.5-II AÑOS
ANTICUERPOS ANTI-N.MENINGITIDIS "A"

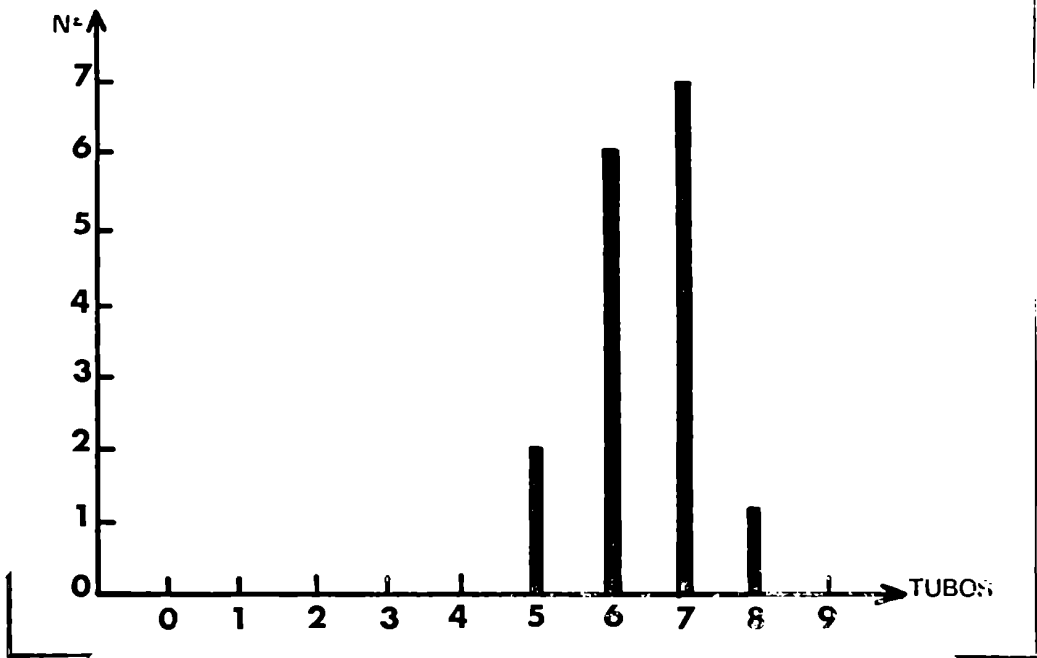


Fig. 2b

SM.5-II AÑOS
ANTICUERPOS ANTI-N.MENINGITIDIS "C"

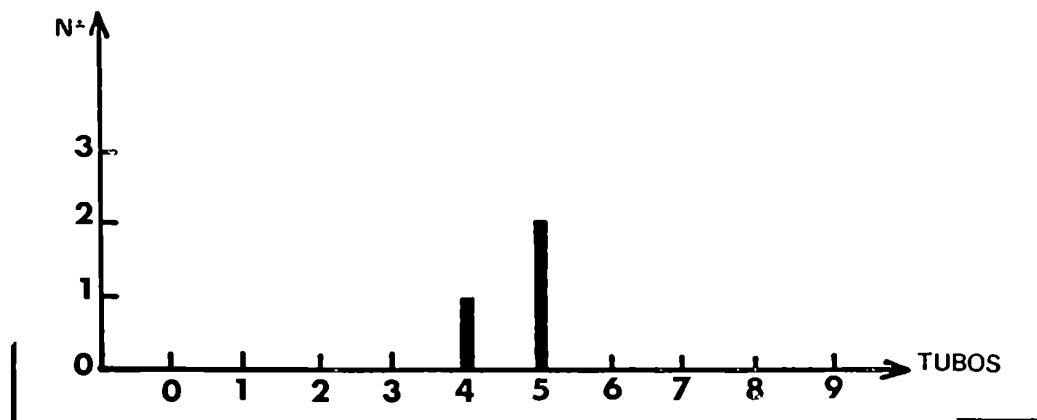


Fig.2c

SM.12-16 AÑOS
ANTICUERPOS ANTI-N.MENINGITIDIS "A"

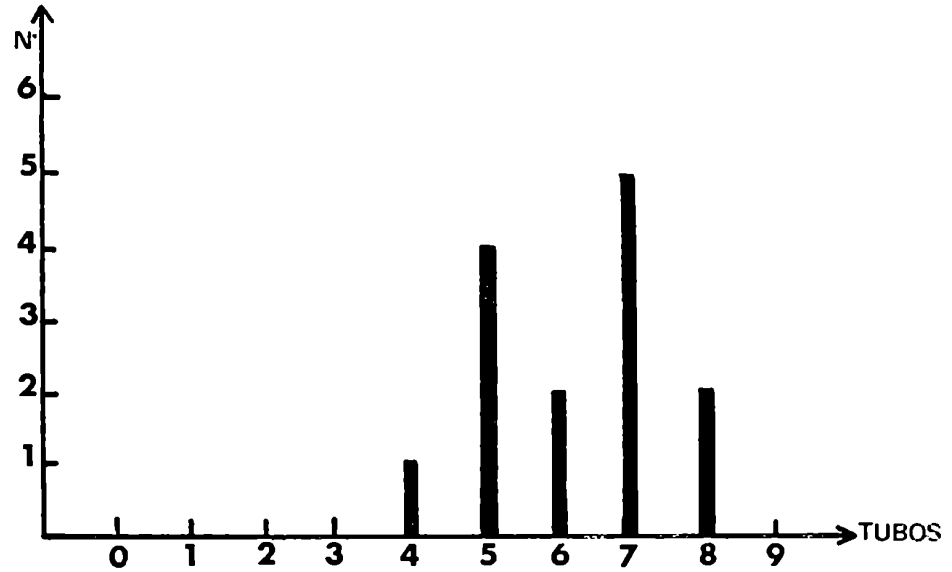


Fig.2d

SM.12-16 AÑOS
ANTICUERPOS ANTI-N.MENINGITIDIS "C"

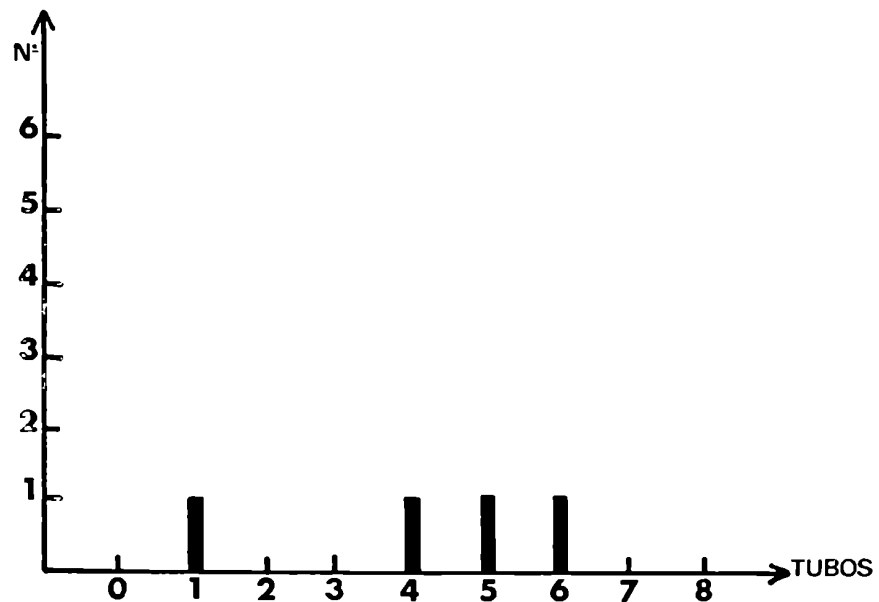


Fig.4a

PB. ANTICUERPOS ANTI-N.MENINGITIDIS "A"

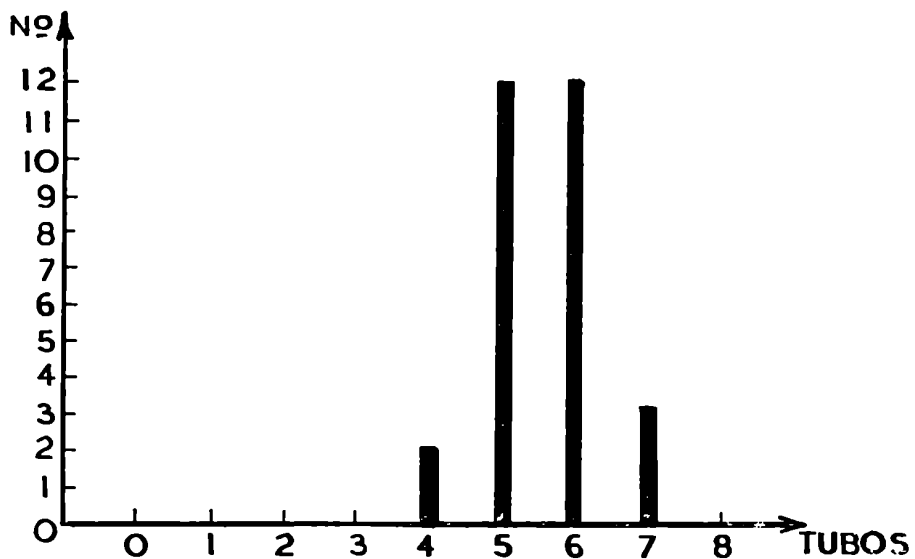


Fig.4b

PB. ANTICUERPOS ANTI-N.MENINGITIDIS "C"

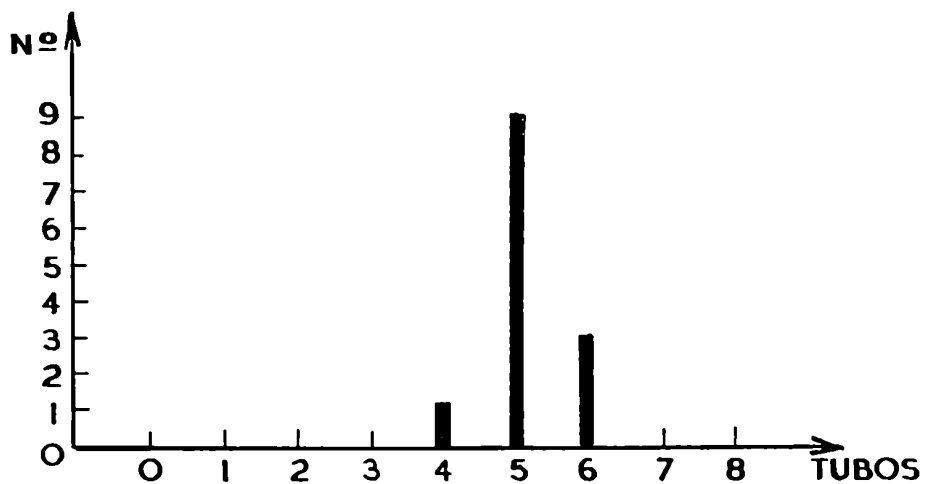


Fig. 6a

LN. ANTICUERPOS ANTI-N. MENINGITIDIS "A". EDAD 13 AÑOS

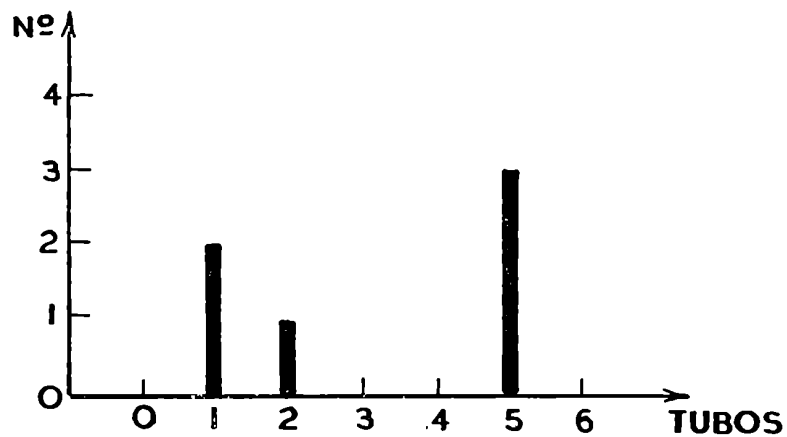
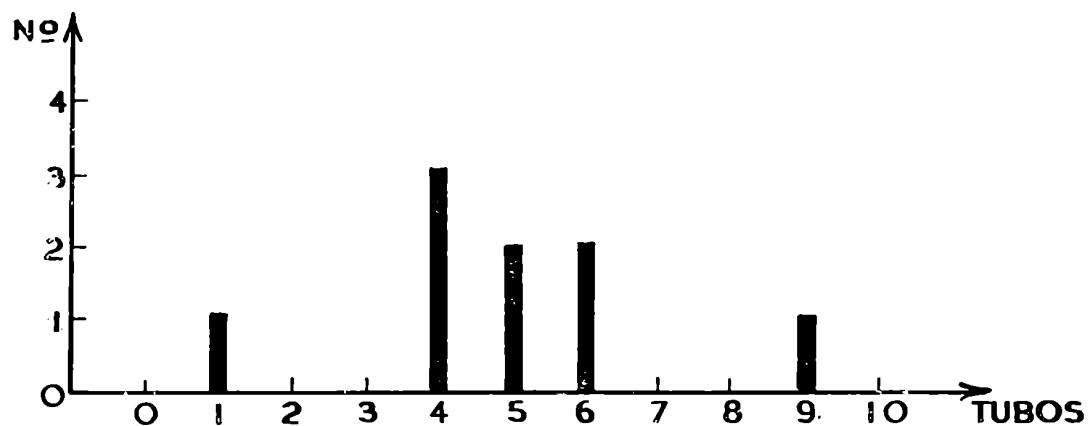


Fig. 6b

LN. ANTICUERPOS ANTI-N. MENINGITIDIS "C". EDAD 13 AÑOS



Cuadros 8 a, b, c y d; 9 a y b; 10 a y b:

Número de individuos que presentaron los incrementos que se indican como $\Delta +$ = Postvacunado (1 mes) - prevacunado para los distintos títulos iniciales registrados. Hemoaglutinación Indirecta. Títulos e incrementos expresados en número de tubo. Dilución inicial (tubo número 1) = 1/2. Diluciones al 1/2.

Cuadro 8.a.

SM 5 - 11. Anticuerpos Anti-N. meningitidis A

Título Inicial	$\Delta + = \text{Postvacunado} - \text{Prevacunado}$									Total
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	
1 ó menor							1			1
2										
3										
4		2	1	3	2					8
5	2	2	6	3	1					14
6 ó mayor	15	12	11	3						41
Total	17	16	18	9	3		1			64

Cuadro 8.b.

SM 5 - 11. Anticuerpos Anti-N. meningitidis C

Título Inicial	$\Delta + = \text{Postvacunado} - \text{Prevacunado}$									Total
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	
1 ó mayor				2	3	7	13	1	1	27
2			1	2	5	7	4		1	20
3			1	2	3	2		1		9
4	1		1	1	1					4
5	2		1							3
6 ó mayor										
Total	3		4	7	12	12	17	2	2	63

Cuadro 8.c.

SM 12 - 16. Anticuerpos Anti-N. meningitidis A

Título Inicial	$\Delta + = \text{Postvacunado} - \text{Prevacunado}$											Total	
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		11
1 ó menor													
2													
3					1								1
4	1	1	1	3									6
5	4	6	2	2									14
6 ó mayor	10	7	10										27
Total	15	14	13	5	1								48

Cuadro 8.d.

SM 12 - 16. Anticuerpos Anti-N. meningitidis C.

Título Inicial	$\Delta + = \text{Postvacunado} - \text{Prevacunado}$											Total	
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		11
1 ó menor	1			4	11	7	1	1					25
2				2	1	1							4
3			3				1						4
4	1	2	5		1								9
5	1	3											4
6	1												1
Total	4	5	8	6	13	8	2	1					47

Cuadro 9.a.

P.B. Anticuerpos Anti - N. meningitidis A

Título Inicial	$\Delta + = \text{Postvacunado} - \text{Prevacunado}$									Total
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	
1 ó menor										
2										
3			1							1
4	1	2	1							4
5	13	4	8	3						28
6 ó mayor	14	2								16
Total	28	8	10	3						49

Cuadro 9.b.

P.B. Anticuerpos Anti - N. meningitidis C

Título Inicial	$\Delta + = \text{Postvacunado} - \text{Prevacunado}$									Total
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	
1 ó menor					3	1				4
2				4	1		1			6
3		1	2	2	3	1				9
4	1	8	4	2	2					17
5	9	3	1							13
6 ó mayor	2									2
Total	12	12	7	8	9	2	1			51

Cuadro 10.a.

LN-76. Anticuerpos Anti-N. meningitidis A

Título Inicial	$\Delta + = \text{Postvacunado} - \text{Prevacunado}$									Total
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	
1 ó mayor	2		8	10	7	4	3	1		35
2	1	6	7	7	3	4	1	1		30
3		1	6	1	3	3				14
4		1								1
5	3	1								4
6 ó mayor										
Total	6	9	21	18	13	11	4	2		84

Cuadro 10.b.

LN-76. Anticuerpos Anti-N. meningitidis C

Título Inicial	$\Delta + = \text{Postvacunado} - \text{Prevacunado}$											Total	
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		11
1 ó menor	1	1	2	6	5	7	3	1	2		1	1	30
2				2	6	6	5						19
3		2	4	1	3	1	1	3					15
4	3	1	2		4								10
5	2		1	3									6
6 ó mayor	3		1										4
Total	9	4	10	12	18	14	9	4	2	0	1	1	84

IV.3. Duración de la respuesta inmunológica a vacunas sólo estables a -20°C (Punto I.6.5. del Plan de Trabajo):

En todo estudio de vacunas nuevas, una vez establecida la seguridad y eficiencia inmunogénica (y si es posible la protectividad), es fundamental determinar la duración de la respuesta inmunitaria lograda. A tal fin se siguió por dos años a las poblaciones exitosamente vacunadas según lo descrito en IV.2.. El número y porcentaje de individuos que tras ese tiempo mantenían aún dos o más incrementos se muestra en la Tabla VI. Esta tabla debe ser comparada con la Tabla V, que muestra la situación de estas mismas poblaciones al mes de efectuada la vacunación. Se observa que dos años después de efectuada la vacunación, el 44% de los individuos de LN-76 (anticuerpos anti - N. meningitidis A) y 42 al 80% de los individuos de distintas poblaciones (anticuerpos anti - N. meningitidis C), todavía presentan dos o más incrementos por encima de sus niveles iniciales bajos. Considerando el total de inoculados con esta vacuna y que tenían bajo título inicial, 24 de 52 individuos (46%) y 66 de 102 individuos (65%), todavía presentaban dos años después dos o más incrementos para anticuerpos A y C respectivamente. Estos mismos individuos exhibían en un 86% y 99% respectivamente uno o más incrementos dos años después de la vacunación.

La cinética de la caída de anticuerpos se observa en la Figura 7a y 7b. De estos datos se puede inferir una segura protección de la mayoría de los individuos al año, y una protección de una parte significativa de las poblaciones a los dos años y en

Tabla VI

Número y porcentaje de individuos vacunados que aún presentaban 2 ó más incrementos al 1/2 dos años después de haber sido vacunados. Hemoaglutinación Indirecta. (Δ + = Postvacunado (2 años) - Prevacunado > 2).

Ac	Población	Totales		Título inicial= 3 ó menor	
		n (1)	(2) %	n (1)	(2) %
A	SM ₁	1 / 50	2	1 / 1	100
	SM ₂	1 / 13	8	1 / 1	100
	PB	1 / 22	5	1 / 2	50
	LN-76	21 / 52	40	21 / 48	44
C	SM ₁	37 / 51	73	37 / 46	80
	SM ₂	8 / 13	62	7 / 9	78
	PB	6 / 22	27	6 / 9	67
	LN-76	16 / 52	31	16 / 38	42

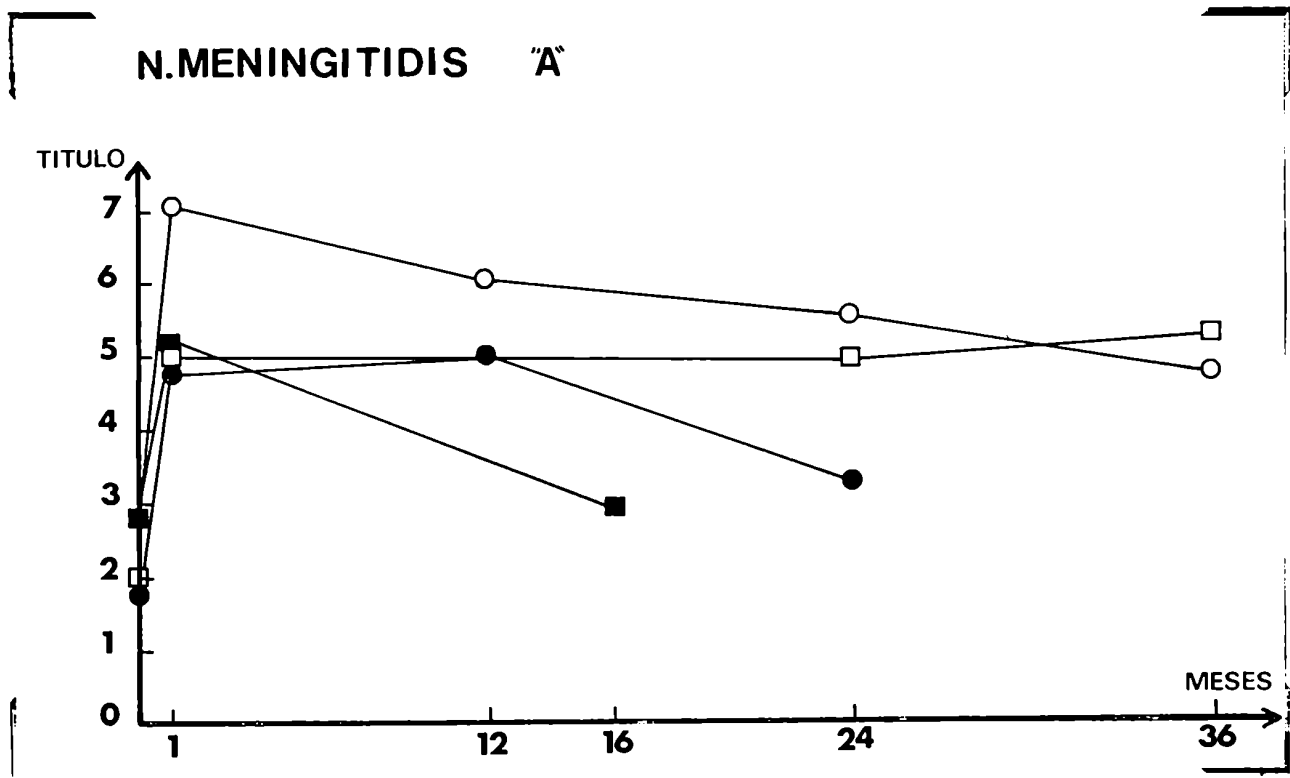
Siglas de las poblaciones igual que en Tabla II. (1) y (2) como en Tabla III.

Figuras 7a y b:

Nivel promedio de anticuerpos Anti - N. meningitidis A y C en individuos con un título inicial de tres o menor antes (t = 0) y a distintos tiempos después de ser vacunados. SM, PB y LN-76: inoculados con vacuna Lote 4, sólo estable a -20°C. LN-77: inoculados con vacuna Lote 8, mantenida cuatro meses a 4°C, supuesta estable a 4°C.

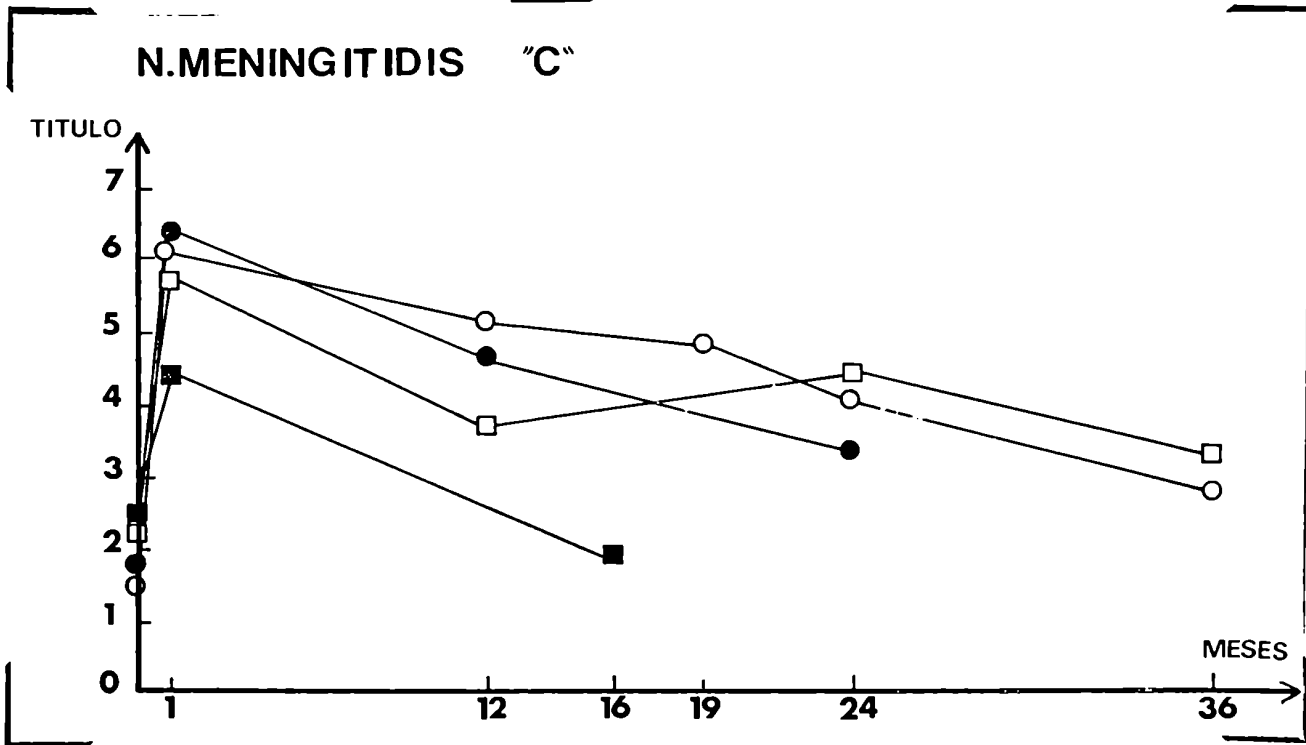
Hemoaglutinación Indirecta. Títulos expresados en número de tubo. Dilución inicial (Tubo Nº 1) = 1/2. Diluciones al 1/2.

Fig. 7a



REFERENCIAS:
LN-76: ○
LN-77: ■
SM : □
PB : ●

Fig. 7b



y en algunos casos incluso a los tres años (Ver más adelante).

Aquí sí es dable observar cómo bajan respecto de su nivel inicial los títulos de anticuerpos de aquellos individuos con altos títulos iniciales. Se observa una mayor caída en aquellos con más elevado título inicial (Cuadros 11a y b; 12a y b; 13a y b) (Hasta cuatro diluciones por debajo del título inicial registrado).

No hubo diferencia de respuesta significativa entre los sexos (SM y PB) ni al mes ni a los dos años después de vacunar (Test de Student para muestras independientes, nivel de significación 5%, diferencia de medias en unidades de desvío standard $\delta = 1$, potencia aproximada 5%)

A 43 individuos del LN-76 se les extrajo una muestra adicional de sangre a los tres años de efectuada la vacunación. Los títulos remanentes respecto de los niveles iniciales se observan en los Cuadros 14a y b. Considerando sólo aquellos con títulos iniciales de tres o menos, el 92% (36/39) de los individuos (para anticuerpos anti - N. meningitidis A) y el 40,6% (13/32) para anticuerpos anti - N. meningitidis C), presentaban dos o más incrementos respecto de los niveles registrados tres años antes. Si se toma en cuenta que el criterio de bondad de la vacuna establece que el 80% de los inoculados debe presentar dos o más incrementos al mes de la vacunación, y que en algunos casos esto se sigue cumpliendo tres años después, esto indica una adecuada duración de la respuesta inmune.

A 32 individuos del SM se les extrajo una muestra tres años

Cuadros 11a y b; 12a y b; y 13a y b:

Número de individuos que presentaron los incrementos que se indican como Δ + = Postvacunado (2 años) - prevacunados para los distintos títulos iniciales registrados. Hemoaglutinación Indirecta. Títulos e incrementos expresados en número de tubo. Dilución inicial (tubo número 1) = 1/2. Diluciones al 1/2.

Cuadro 11a

SM (Total): Anticuerpos Anti - N. meningitidis A

$\Delta+$ = Postvacunado (2 años) - Prevacunado

Título inicial	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4	5	Total
1 ó menor									1		1
2											
3							1				1
4					3	2					5
5				2	10	2					14
6		2	7	9	8						26
7		4	3	3	2						12
8	1	3									4
Total	1	9	10	14	23	4	1		1		63

Cuadro 11b

SM (Total): Anticuerpos Anti - N. meningitidis C

$\Delta+$ = Postvacunado (2 años) - Prevacunado

Título inicial	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4	5	Total
1 ó menor							3	16	7		26
2						5	9	5	1		20
3					1	5	1	2			9
4				1	2	2	1				6
5					2	1					3
6 ó mayor											
Total				1	5	13	14	23	8		64

Cuadro 12a

PB. Anticuerpos Anti - N. meningitidis A

Δ_+ = Postvacunado (2 años) - Prevacunado

Título inicial	-3	-2	-1	0	1	2	3	4	5	Total
1 ó menor									1	1
2										
3					1					1
4					2					2
5			2	4	6					12
6 ó mayor	2	1	2	1						6
Total	2	1	4	5	9				1	22

Cuadro 12b

PB. Anticuerpos Anti - N. meningitidis C

Δ_+ = Postvacunado (2 años) - Prevacunado

Título inicial	-3	-2	-1	0	1	2	3	4	5	Total
1 ó menor							1			1
2					1		2			3
3				1	1	2	1			5
4			2	2	4					8
5			3	1						4
6 ó mayor		1								1
Total		1	5	4	6	2	4			22

Cuadro 13a

LN-76. Anticuerpos Anti - N. meningitidis A

$\Delta +$ = Postvacunados (2 años) - Prevacunados

Título inicial	-2	-1	0	1	2	3	Total
1 ó menor				3	13	4	20
2			1	12	4		17
3			6	5			11
4			1				1
5	2		1				3
Total	2		9	20	17	4	52

Cuadro 13b

LN-76. Anticuerpos Anti - N. meningitidis C

$\Delta +$ = Postvacunados (2 años) - Prevacunados

Título inicial	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	Total
1 menor						5	7	4	16
2					2	7	4		13
3					2	6	1		9
4				2	4				6
5		1	1	1	3				6
6 ó mayor	2								2
Total	2	1	1	3	11	18	12	4	52

Cuadros 14a y b;y 15a y b:

Número de individuos que presentaron los incrementos que se indican como $\Delta +$ = Postvacunados (3 años) - prevacunados para los distintos títulos iniciales registrados. Hemoaglutinación Indirecta. Títulos e incrementos expresados en número de tubo. Dilución inicial (tubo número 1) = 1/2. Diluciones al 1/2.

Cuadro 14a

LN-76. Anticuerpos Anti - N. meningitidis A

$\Delta +$ = Postvacunado (3 años) - Prevacunado

Título inicial	-2	-1	0	1	2	3	4	5	Total
1 ó menor					2	5	8	3	18
2				2	2	9	1		14
3				1	4	2			7
4				1					1
5			2	1					3
Total			2	5	8	16	9	3	43

Cuadro 14b

LN-76. Anticuerpos Anti - N. meningitidis C

$\Delta +$ = Postvacunado (3 años) = Prevacunado

Título inicial	-3	-2	-1	0	1	2	3	4	5	Total
1 ó menor					4	8	3	1		16
2			1	3	7	1				12
3		1	1	2						4
4		1	2	1						4
5		3	1	1						5
6 ó mayor	2									
Total	2	5	5	7	11	9	3	1	0	43

Cuadro 15a

SM (Total). Anticuerpos Anti - N. meningitidis A

$\Delta +$ = Postvacunado (3 años) - Prevacunado

Título inicial	-2	-1	0	1	2	3	4	5	Total
1 ó menor							1		1
2									
3									
4		1		2					3
5			6	3	2				11
6 ó mayor	5	6	5	1					17
Total	5	7	11	6	2		1		32

Cuadro 15b

SM (Total). Anticuerpos Anti - N. meningitidis C

$\Delta +$ = Postvacunado (3 años) - Prevacunado

Título inicial	-2	-1	0	1	2	3	4	5	Total
1 ó menor				1	5	6	2		14
2				4	5	2	1		12
3			3		1				4
4	1		1						2
5									
6 ó mayor									
Total	1		4	5	11	8	3		32

después de la vacunación. Tal como puede deducirse del Cuadro 15a, el 9,3% (3/32) y el 28,1% (9/32) presentan aún dos o más incrementos o uno o más incrementos con referencia a su nivel inicial, respectivamente (anticuerpos anti - N. meningitidis A). Si bien estos porcentajes son muy bajos, se explican porque todos estos individuos fueron malos respondedores a la vacuna debido a su alto título inicial. El único individuo de bajo título inicial poseía aún cuatro incrementos respecto del mismo.

En cambio para anticuerpos anti - N. meningitidis C (Cuadro 15b), donde el número de individuos de bajo título inicial resultó mayoría, al 68,7% (22/32) y el 84,3% (27/32) de los individuos totales presentaron dos o más incrementos respectivamente. Considerando sólo a los de bajo título inicial, el 73,3% (22/30) y el 93,7% (30/32) tenían dos o más incrementos o uno o más incrementos con referencia a su título inicial, respectivamente.

IV.4. Comparación con la evolución de los títulos de anticuerpos de individuos sobrevivientes a la enfermedad meningocócica:

La importancia de la disparidad de títulos promedio de anticuerpos anti - N. meningitidis A (en general de cuatro o mayores) respecto de los anti - N. meningitidis C (en general menores que cuatro) en las poblaciones estudiadas antes de vacunarlas, quedó claramente establecida ante la diferente respuesta a la vacuna que muestran individuos con bajo título inicial (en general excelente) frente a individuos con alto título inicial (en general pobre). Además, después de la vacunación se superaba ampliamente

ese límite de cuatro, haciendo caer a todos los individuos en la calificación de títulos "altos" tal como aquí se los ha definido, tanto para A como para C, por tiempos prolongados.

El punto crucial que por lo tanto quedaba por dilucidar era si los anticuerpos detectados por Hemoaglutinación Indirecta e Inmunofluorescencia eran además protectivos.

Por una parte en ese momento ya se había iniciado la vacunación masiva de personal en la Armada, no volviéndose a registrar hasta 1981 inclusive ningún caso de meningitis meningocócica en vacunados (Ver más adelante).

Por otra parte se sabía que individuos sobrevivientes a la enfermedad no la repiten (17) salvo en casos muy especiales de ciertas deficiencias genéticas (17). Se decidió por lo tanto titular los anticuerpos anti - meningocócicos de niños (ex - pacientes del Hospital de Niños "Ricardo Gutiérrez"), dos años después de la enfermedad. Todos habían padecido meningitis o meningococemia causada por N. meningitidis grupo C. No obstante, también se analizaron los anticuerpos anti - N. meningitidis A.

En la Tabla VII, bajo totales, se puede ver cómo en promedio, los anticuerpos anti - N. meningitidis C tienen un nivel superior a tres (3,2), en coincidencia con el nivel que fue elegido como límite para definir a los títulos como "altos" o "bajos" en función tanto de los títulos iniciales (comparando A con C) como del nivel de corte para "buena respuesta a las vacunas" - "mala respuesta a las mismas".

Sólo el grupo que enfermó entre los 12 y 24 meses de edad

Tabla VII

Niveles de Anticuerpos Anti-N. meningitidis A y C dos años después de haber sufrido la enfermedad. Hemoaglutinación Indirecta.

Edades	Ac. Anti-N. meningitidis A		Ac. Anti-N. meningitidis C	
	\bar{x}	s	\bar{x}	n
Menores de 12 meses	3,9	1,0	3,5	12
Entre 12 y 24 meses	4,4	1,0	2,46	15
Mayores de 24 meses	3,7	1,0	3,6	43
TOTAL	4	0,9	3,2	70

\bar{x} : Media aritmética

s: Desviación standard

n: Tamaño muestral

*: Edades en el momento de haber sufrido la enfermedad

Ac.:Anticuerpos

presenta un promedio inferior (2,46). Esto podía estar en relación con complejos efectos notados cuando se vacunan niños menores de dos años, que serán mencionados en la Discusión. La comparación con las poblaciones incluídas en este estudio debe efectuarse con el grupo "Mayores de 24 meses" y corresponde exactamente al nivel de corte propuesto ($\bar{x} = 3,6$). Queda así asegurado el significado biológico de los títulos de anticuerpos expuesto.

Considerando los anticuerpos anti - N. meningitidis A, todos los grupos presentan títulos relativamente altos, en coincidencia con los demás grupos poblacionales analizados.

IV.5. Comparación de las vacunas sólo estables a -20°C con vacunas supuestas estables a 4°C:

La vacuna hasta aquí estudiada tenía como única pero importante desventaja su relativa inestabilidad, de modo que el almacenaje y transporte de la vacuna liofilizada debía hacerse a -20°C. Las dificultades que esto produce son enormes, incluso trabajando en sitios con personal entrenado y vehículos propios, como en la Armada. Es de imaginar lo que puede significar en una situación epidémica, en la cual sería necesario transportar miles de dosis por distancias considerables.

Por eso se trató de modificar la vacuna tornándola más estable. Se logró liofilizando con lactosa en vez de manitol, purificando simultáneamente más aún los polisacáridos capsulares que constituyen el inmunógeno. Ensayos "in vitro" realizados por los productores de vacuna y por investigadores independientes (39,20)

hacían pensar que se habían conservado las propiedades inmunógenas de los polisacáridos almacenados a 4°C.

Para una comprobación final se diseñó un experimento en el cual se inculaba vacuna supuesta estable a 4°C, manteniendo la dosis a utilizar a -20°C, y por 7, 22, 37 y 120 días a 4°C. Las vacunas mantenidas hasta 37 días a 4°C o sólo a -20°C fueron inoculadas simultáneamente a un grupo de conscriptos (CIPE en la Tabla VIII).

Aquí es importante aclarar que por razones éticas y reglamentarias a los individuos del CIPE aquí vacunados se les suministró simultáneamente la vacuna T.A.B.D.T. (anti - tífica, paratífica A y B, tetánica y diftérica). Como se desconocía si esto podía afectar en algún modo la respuesta a la vacuna antimeningocócica, se vacunó con la vacuna mantenida a 4°C por 120 días a cadetes del Liceo Naval (LN-77). Estos habían sido vacunados meses antes con la T.A.B.D.T., y fueron por lo tanto vacunados sólo con vacuna anti - meningocócica, no mejorándose (ni empeorándose) por eso la respuesta a la vacuna.

Sobre la no afectación en el rendimiento de la T.A.B.D.T. se volverá en la sección IV.6. (Determinación del efecto de vacunaciones simultáneas) y en la sección IV.7. (Ensayos de campo).

En la Tabla VIII se ve que en general no se cumple el criterio de bondad del 80% exigido. Incluso, donde se cumple, por ejemplo en LN-77, anticuerpos anti - N. meningitidis A, a los 16 meses ya casi todos los individuos volvieron a su nivel inicial (Tabla VIII, Figura 7a). La causa de esto es que aquellos que tienen

Tabla VIII

Número y porcentaje de individuos que presentaron 2 ó más incrementos al 1/2 después de ser inoculados con una vacuna supuesta estable a 49C, mantenida por distintos períodos a esa temperatura. Títulos registrados antes y 1 y 16 meses postvacunación. Hemoaglutinación Indirecta.

Ac	Población	1 mes Postvacunación			16 meses Postvacunación			
		Total n	Tít. inic.= 3 ó menor n	%	Total n	Tít. inic.= 3 ó menor n	%	
A	CIPE 0*	11/27	41	6/9	67	-	-	
	CIPE 7	18/25	72	15/16	94	-	-	
	CIPE 22	2/16	13	1/6	17	-	-	
	CIPE 37	5/24	21	5/9	56	-	-	
	LN-77	23/38	61	13/14	93	1/32	3	
							1/14	7
C	CIPE 0	12/27	44	12/14	86	-	-	
	CIPE 7	16/25	64	16/21	76	-	-	
	CIPE 22	9/16	56	7/9	78	-	-	
	CIPE 37	17/24	71	11/12	92	-	-	
	LN-77	24/38	63	23/30	77	0/32	0	
							0/28	0

n: Número de individuos con 2 ó más incrementos respecto de un nivel inicial respecto del total de individuos del grupo.

%: Porcentaje de individuos con 2 ó más incrementos.

*: Días que la vacuna fue almacenada a 49C. 0 indica: mantenida a sólo -209C

Tít. inic.: Título inicial

dos o más incrementos, tienen en general dos o tres incrementos pero no más, contrastando notablemente con lo observable en los Cuadros 8, 9 y 10, donde en un caso se llegan a registrar 11 incrementos al 1/2.

Sin embargo, este bajo rendimiento no está relacionado con el tiempo de almacenamiento a 4°C, ya que la vacuna mantenida exclusivamente a -20°C no cumple con la norma impuesta mejor que la misma vacuna mantenida a 4°C. En otros términos, no hay un descenso del rendimiento en función del tiempo a 4°C. Por lo tanto se consideró que el problema no era de estabilidad a 4°C, sino que era causado por la purificación adicional empleada.

Efectivamente, en nuevos lotes de vacuna estable a 4°C ensayados posteriormente, las normas se cumplieron sin dificultades, tras mejorarse los métodos de purificación.

Para establecer esto último, se vacunó en paralelo grupos de conscriptos del CIPE con la vacuna tradicional sólo estable a -20°C (Merck), y con vacuna supuesta estable a 4°C de Behringwerke y Merieux. Como paralelamente se inocularon grupos de individuos así vacunados con vacuna antiparotidítica, se describirán estos resultados en la siguiente sección (IV.6.1.).

IV.6. Evaluación de nuevos lotes de vacunas antimeningocócicas supuestas estables a 4°C (Behringwerke y Merieux). Comparación con una vacuna sólo estable a -20°C (Merck). Determinación del efecto de vacunaciones simultáneas antimeningocócicas (4°C y -20°C) y antiparotidíticas:

Como fuera aclarado en la sección anterior, también aquí los individuos del CIPE fueron todos vacunados simultáneamente con la vacuna T.A.B.D.T. y además de las distintas vacunas antimeningocócicas y/o antiparotidíticas.

Las reacciones clínicas a la vacunación fueron mínimas, no registrándose reacción sistémica de ningún tipo, y sí reacciones locales muy leves (eritema o eritema más edema) en los sitios en que se aplicaban las vacunas anti - meningocócica y/o anti - parotidíticas (una en cada brazo cuando se aplicaban ambas) y manifestaciones locales más marcadas en el sitio de inoculación (dorsal) de la T.A.B.D.T..

Se dividió a los conscriptos en seis grupos, que fueron inoculados respectivamente con: a) Vacuna a -20°C (Merck) + anti - parotidítica; b) vacuna a -20°C (Merck); c) vacuna supuesta estable a 4°C (Merieux); d) vacuna supuesta estable a 4°C (Behringwerke); e) vacuna supuesta estable a 4°C (Behringwerke) + anti - parotidítica; f) antiparotidítica. El grupo (b) hace las veces de control para (a), (c), y (d). El (d) para (e) y el (f) para todos los anteriores.

Las vacunas supuestas estables a 4°C fueron mantenidas a esa temperatura por aproximadamente seis meses.

IV.6.1. Vacunas supuestas estables a 4°C comparadas con vacunas estables sólo a -20°C:

Como se puede apreciar en la Tabla IX (individuos con título inicial menor o igual a tres), las tres vacunas anti - meningocócicas ensayadas cumplieron holgadamente con la norma impuesta.

Tabla IX

Número y porcentaje de individuos inoculados con las vacunas que se indican y que registraron 2 ó más incrementos al 1/2 un mes después de la vacunación. Hemoaglutinación Indirecta.

Anticuerpos	Vacunas	Número y porcentaje con 2 ó más incrementos			
		Título inicial=3 ó menor		Total	
		n (1)	% (2)	n (1)	% (2)
A	A+C Merck(-20°C)+P	13/13	100	19/53	35,8
	A+C Merck(-20°C)	10/12	83,3	23/55	41,8
	A+C Merieux(4°C)	13/13	100	22/53	41,5
	A+C Behringw.(4°C)	14/14	100	21/52	40,3
	A+C Behringw.(4°C)+P	5/5	100	8/17	47
	P	0/13	0	0/13	0
C	A+C Merck(-20°C)+P	29/29	100	37/52	71,1
	A+C Merck(-20°C)	19/20	95,0	38/55	69,0
	A+C Merieux(4°C)	18/19	94,7	32/53	60,3
	A+C Behringw.(4°C)	29/30	96,6	37/52	71,1
	A+C Behringw.(4°C)+P	12/13	92,3	15/17	88,2
	P	1/6	16,6	1/13	7,6

A + C Vacuna antimeningocócica A + C

P Vacuna antiparotidítica

A Anticuerpos Anti - N. meningitidis A

C Anticuerpos Anti N. meningitidis C

n Número de individuos: (1):con 2 ó más incrementos;
(2):total del grupo

% Porcentaje

Además, no sólo se alcanzó (y superó) el 80% requerido, sino que numerosos individuos (la mayoría) alcanzaron entre tres y cuatro incrementos respecto de su título inicial, lo cual nos asegura además una adecuada duración de la respuesta inmune lograda (Cuadros 16a y b; 17 a y b; y 18a y b). Como se puede además apreciar, el rendimiento de las vacunas estables a 4°C no sólo es similar a la vacuna sólo estable a -20°C de Merck utilizada aquí como control, sino que es comparable al rendimiento mostrado por las vacunas sólo estables a -20°C utilizadas en SM, PB y LN-76 (Cuadros 8a, b, c y d; 9a y b; y 10a y b, habiendo sido vacunadas estas últimas tres poblaciones sólo con vacuna antimeningocócica, y no como el CIPE también con vacuna T.A.B.D.T.). Esta comprobación por lo tanto una vez más que la vacuna T.A.B.D.T. no afecta la respuesta a las vacunas antimeningocócicas.

IV.6.2. Determinación del efecto de vacunaciones simultáneas antimeningocócicas (4°C y -20°C) y antiparotidíticas:

En la Tabla IX puede observarse cómo para anticuerpos anti - N. meningitidis A la respuesta en el grupo vacunado simultáneamente con vacuna antimeningocócica y antiparotidítica es igual de buena que inoculando vacuna antimeningocócica exclusivamente, cumpliendo las normas del 80%. Ningún individuo vacunado sólo con vacuna antiparotidítica exhibió un incremento de su título de anticuerpos anti - meningocócicos grupo A. Por lo tanto, no hay diferencia en la respuesta a las vacunas tanto sólo estables a -20°C o estables a 4°C aplicadas solas o simultáneamente con va-

Cuadros 16a y b; 17a y b; 18a y b; 19a y b; y 20a y b:

Número de individuos que presentaron los incrementos que se indican como $\Delta +$ = Postvacunado (1 mes) - prevacunado para los distintos títulos iniciales registrados. Hemoaglutinación Indirecta. Títulos e incrementos expresados en número de tubo. Dilución inicial (tubo número 1) = 1/2. Diluciones al 1/2.

Cuadro 16a

CIPE. Vacuna Anti - N. meningitidis A + C (-20°C) Merck. Anticuerpos
Anti - N. meningitidis A.

$\Delta +$ = Postvacunado (1 mes) - Prevacunado

Título inicial	0	1	2	3	4	5	Total
1 ó menor							
2				1			1
3		2	3		3	3	11
4	1	1	5	4	2		13
5	5	3	1	1			10
6 ó mayor	16	4					20
Total	22	10	9	6	5	3	55

Cuadro 16b

CIPE. Vacuna Anti - N. meningitidis A + C (-20°C) Merck. Anticuerpos
Anti - N. meningitidis C.

$\Delta +$ = Postvacunado (1 mes) - Prevacunado

Título inicial	0	1	2	3	4	5	Total
1 ó menor				1			1
2			2	1			3
3	1		4	5	6		16
4	2		3	5			10
5	5	3	8	3			19
6 ó mayor	2	4					6
Total	10	7	17	15	6		55

Cuadro 17a

CIPE. Vacuna Anti - N. meningitidis A + C (40C) Merieux. Anticuerpos
Anti - N. meningitidis A.

$\Delta +$ = Postvacunado (1 mes) - Prevacunado

Título inicial	0	1	2	3	4	5	Total
1 ó menor							
2							
3			4	4	5		13
4	1	1	1	1			4
5	13	1	5	1			20
6 ó mayor	14	1	1				16
Total	28	3	11	6	5		53

Cuadro 17b

CIPE. Vacuna Anti - N. meningitidis A + C (40C) Merieux. Anticuer-
pos Anti - N. meningitidis C.

$\Delta +$ = Postvacunado (1 mes) - Prevacunado

Título inicial	0	1	2	3	4	5	Total
1 ó menor							
2			1	1			2
3	1		4	4	6	2	17
4	2	1	3	3	2		11
5	13		4	2			19
6 ó mayor	4						4
Total	20	1	12	10	8	2	53

Cuadro 18a

CIPE. Vacuna Anti - N. meningitidis A + C (49C) Behringwerke.
Anticuerpos Anti - N. meningitidis A.

$\Delta+$ = Postvacunado (1 mes) - Prevacunado

Título inicial	0	1	2	3	4	5	Total
1 ó menor						1	1
2				1			1
3			4	3	4	1	12
4	1	1	1	3			6
5	11	5	3				19
6 ó mayor	13						13
Total	25	6	8	7	4	2	52

Cuadro 18b

CIPE. Vacuna Anti - N. meningitidis A + C (49C) Behringwerke.
Anticuerpos Anti - N. meningitidis C.

$\Delta+$ = Postvacunado (1 mes) - Prevacunado

Título inicial	0	1	2	3	4	5	Total
1 ó menor					1		1
2				4	1		5
3		1	6	9	7	1	24
4	4		3	2			9
5	3		2	1			6
6 ó mayor	7						7
Total	14	1	11	16	9	1	52

Cuadro 19a

CIPE. Vacuna Anti - N. meningitidis A + C (-20°C) Merck + Vacuna Antiparotidítica. Anticuerpos Anti - N. meningitidis A.

Δ + = Postvacunado - Prevacunado

<u>Título inicial</u>	<u>0</u>	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>Total</u>
1 ó menor							
2			1	2		1	4
3			2	2	5		9
4		1	1	2	1		5
5	8	3	1	1			13
6 ó mayor	19	3					22
Total	27	7	5	7	6	1	53

Cuadro 19b

CIPE. Vacuna Anti - N. meningitidis A + C (-20°C) Merck + Vacuna Antiparotidítica. Anticuerpos Anti - N. meningitidis C.

Δ + = Postvacunado - Prevacunado

<u>Título inicial</u>	<u>0</u>	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>Total</u>
1 ó menor			1	1	2	2	6
2			1	2	4	1	8
3			5	5	5		15
4	3		2	2			7
5	5		2	2			9
6 ó mayor	7						7
Total	15		11	12	11	3	52

Cuadro 20a

CIPE. Vacuna Anti - N. meningitidis A + C (49C) Behringwerke + Vacuna Antiparotidítica. Anticuerpos Anti - N. meningitidis A.

$\Delta +$ = Postvacunado - Prevacunado

Título inicial	0	1	2	3	4	5	6	Total
1 ó menor							1	1
2								
3			1	1	2			4
4	1			2				3
5	1	1	1					3
6 ó mayor	4	2						6
Total	6	3	2	3	2		1	17

Cuadro 20b

CIPE. Vacuna Anti - N. meningitidis A + C (49C) Behringwerke + Vacuna Antiparotidítica. Anticuerpos Anti - N. meningitidis C.

$\Delta +$ = Postvacunado - Prevacunado

Título inicial	0	1	2	3	4	5	6	Total
1 ó mayor			1					1
2			3					3
3		1	2	2	4			9
4			1	1	1			3
5		1						1
6 ó mayor								
Total		2	7	3	5			17

Cuadro 21

Número de individuos que presentan los incrementos que se indican como $\Delta + = \text{Postvacunado (1 mes)} - \text{Prevacunado para los distintos títulos iniciales registrados, tras ser vacunados con vacuna antiparotidítica.}$

Cuadro 21a

CIPE. Vacuna Antiparotidítica. Anticuerpos Anti-N. meningitidis A

$\Delta + = \text{Postvacunado} - \text{Prevacunado}$

Título inicial	0	1	Total
1 ó menor			
2			
3	6		6
4	3		3
5	2		2
6 ó mayor	2		2
Total	13	0	13

Cuadro 21b

CIPE. Vacuna Antiparotidítica. Anticuerpos Anti-N. meningitidis C

$\Delta + = \text{Postvacunado} - \text{Prevacunado}$

Título inicial	0	1	2	Total
1 ó menor				
2	1			1
3	4	1	1	6
4	5	1		6
5				
6 ó mayor				
Total	10	2	1	13

cuna antiparotídica. Esto se visualiza también con ayuda de los Cuadros 16 a 21, donde se observa que además también se conservan las características antes descritas en la respuesta a estas vacunas: mala respuesta con títulos iniciales altos, buena con títulos menores que cuatro y que las respuestas no son sólo de dos sino de tres y más incrementos, no afectándose por lo tanto al parecer la duración de la respuesta inmune.

Todo lo antedicho vale para anticuerpos anti - N. meningitidis C, con la única diferencia que en el grupo control no vacunado, uno de los individuos mostró dos incrementos respecto de su título inicial. No se realizaron cultivos para verificar si este se debió a colonización por N. meningitidis C.

IV.6.3. Efecto de la revacunación con vacuna antimeningocócica.

Determinación del efecto de vacunación simultánea antimeningocócica - antineumocócica:

De acuerdo a lo detallado en las secciones anteriores, se puede casi asegurar una significativa protección un año después de la vacunación en la mayor parte de los individuos de los grupos poblacionales estudiados, con una paulatina disminución de los niveles de anticuerpos. Desde el punto de vista de individuos transitoriamente en alto riesgo, como lo puede ser la población general en un brote epidémico, o personal de conscriptos, con asegurar un año de protección la vacuna cumple adecuadamente su cometido. En zonas endemoepidémicas o personal militar permanente o semi - permanente, como por ejemplo, cadetes, es necesario efectuar revacunaciones en el momento en que un porcentaje impor-

tante de la población haya disminuído apreciablemente sus niveles de anticuerpos respecto del pico alcanzado inmediatamente después de la vacunación. Esta es una solución empírica que se adopta al desconocerse con precisión cuál es el nivel de anticuerpos mínimo por debajo del cuál ya no hay protección (si bien las evidencias indirectas presentadas lo hacen oscilar alrededor de un título de tres medido por Hemoaglutinación). Por lo tanto se revacunó a un pequeño grupo de cadetes del LN-76 y LN-77 con vacuna antimeningocócica A + C. Los resultados pueden analizarse a partir de los Cuadros 25a y b. En ambos se observa una respuesta de similar tipo que la obtenida en la primer vacunación, con buena respuesta sólo en aquellos individuos con bajo título inicial, y no alcanzando niveles de respuesta superiores a la misma (no hay efecto "booster"). Para anticuerpos anti - N. meningitidis A los tres individuos de bajo título inicial muestran respuestas de dos o más incrementos. Para anticuerpos anti - N. meningitidis C el 75% (6/8) alcanzan dos o más incrementos (tres de ellos con cuatro o cinco incrementos).

Naturalmente, es mucho más probable encontrar individuos con títulos relativamente altos en grupos previamente vacunados, lo cual dificulta el estudio de las revacunaciones al achicarse la porción útil de la muestra por esa causa.

Los individuos del LN-76 y LN-77 revacunados, sirvieron de control a la revacunación de un grupo de niños del SM inoculados simultáneamente con vacuna antineumocócica (14 serotipos) de Merck. La razón de esta vacunación simultánea es que idealmente,

se debería vacunar contra todos los serogrupos de N. meningitidis, contra H. influenzae tipo b y contra los principales serotipos causantes de meningitis de Str. pneumoniae en una población de niños de alto riesgo, como lo es el SM. Esto no es posible primeramente por no contarse con todas esas vacunas mencionadas. En el momento de la revacunación se intentó este ensayo por disponerse en ese momento de una vacuna antineumocócica aprobada para su uso por la Food and Drug Administration, E.E.U.U. (más detalles en la Discusión). Los resultados obtenidos respecto de la vacuna antimeningocócica están presentados en los Cuadros 27a y b. En ellos se ve por un lado el mismo efecto de respuesta desapareja en aquellos individuos de alto título pre - revacunación. Por otro, si bien para anticuerpos anti- N. meningitidis A los dos individuos con bajo nivel inicial presentan dos incrementos tras la revacunación, sólo 9/14 (64,2%) de los individuos con bajo título de anticuerpos anti - N. meningitidis C presentan dos o más incrementos de título, y ninguno presentó más de tres.

Si bien del grupo control sólo el 75% de los individuos de bajo título inicial presentó dos o más incrementos, tres de ellos los presentó de cuatro o cinco incrementos.

Y si bien el tamaño muestral es reducido, parece haber una tendencia a una menor respuesta a la vacuna antimeningocócica suministrada simultáneamente con vacunas antineumocócicas.

En el Cuadro 26 se observa el resultado de primovacunar a niños del SM simultáneamente con vacuna antimeningocócica y antineumocócica. Al igual que en la revacunación con antimeningo-

cóccica y primovacunación antineumocóccica, los resultados fueron peores que en el control de individuos vacunados sólo con vacuna antimeningocóccica de igual lote, especialmente para anticuerpos anti - N. meningitidis C, con sólo 58,9% (33/56) de individuos de títulos menores que cuatro con dos o más incrementos. Aquí, si bien hay individuos con cuatro y cinco incrementos, hay un gran número de individuos de bajo título inicial ($13/56 = 23,2\%$) sin respuesta alguna.

En resumen, tanto en primo- como en revacunación, parecería poco aconsejable apocar la vacuna antimeningocóccica (particularmente al componente C) simultáneamente con la vacuna antineumocóccica de 14 serotipos.

IV.6.4. Efecto de la vacunación con vacuna antimeningocóccica sobre la respuesta a vacunas antiparotidíticas y T.A.B.D.T.:

En las secciones anteriores se demostró que la respuesta a la inoculación con vacuna antimeningocóccica no es afectada por la simultánea inoculación de las vacunas T.A.B.D.T. y antiparotidítica. Naturalmente surge la pregunta si la inversa también es cierta. Si bien esto escapa al objetivo de este estudio, que se refiere específicamente a las vacunas antimeningocóccicas, se han hecho algunas determinaciones serológicas y observaciones en ensayo de campo tendientes a hallar respuesta, al menos preliminar, a estos interrogantes.

IV.6.4.1. Vacuna T.A.B.D.T.:

Se realizó contrainmunolectroforesis discontinua en sueros

de individuos antes y después de un mes de ser vacunados sólo con la vacuna T.A.B.D.T. o con la T.A.B.D.T. simultáneamente con antimeningocócica y/o antiparotidítica . Los resultados están presentados en la misma forma que los resultados para anticuerpos antimeningocócicos (Cuadros 22, 23 y 24), si bien la interpretación no puede hacerse de manera similar. Efectivamente, la sensibilidad de la CIED para la detección de anticuerpos antitetánicos como fue aquí realizada es de 0,25 UI/ml, considerándose en general como probadamente protectivos niveles séricos incluso inferiores a 0,1 UI/ml. Por lo tanto, se puede afirmar que todos aquellos que presentaron un valor detectable de anticuerpos antitetánicos están protegidos, independientemente de que hayan o no presentado incrementos de título tras la vacunación. Además debe considerarse significativo en este caso particular incluso un único tubo de incremento de título debido a que el sistema, al ser menos sensible que la Hemoaglutinación Indirecta, detecta diferencias en el orden de 0,25 UI o mayores, siendo esta diferencia por sí misma protectora. Finalmente, no puede afirmarse que aquellos que no poseen anticuerpos detectables por este sistema después de la vacunación, no están protegidos.

Teniendo todo esto en cuenta, y aclarando desde ya que los datos aportados son escasos y se pretende exclusivamente marcar con ellos una tendencia, se puede decir que aparentemente el componente antitetánico de la vacuna T.A.B.D.T. da buen resultado, tanto cuando la misma se aplica sola como cuando se la aplica junto con la antimeningocócica y/o antiparotidítica simultáneamente,

ya que en los Cuadros 22, 23 y 24 se pueden observar individuos con uno hasta inclusive cinco incrementos de título, representando una concentración de anticuerpos protectivos muchas veces superior al mínimo considerado protectorio. Sin embargo, se debe tener en cuenta que un total de 12 individuos en total (considerando los tres cuadros en conjunto) no aumentan sus anticuerpos hasta el nivel de detección del método, y de ellos no se puede saber si no respondieron a la vacuna o si respondieron sin alcanzar niveles detectables por CIED (protectivos o no).

Parecería haber una tendencia también aquí a que los individuos de menores niveles iniciales presenten los mayores incrementos, pero esta interpretación debe tomarse con mucha cautela, dado que podría reflejar también el hecho que seguramente una parte de estos individuos ha recibido dosis previas de vacuna anti-tetánica. La respuesta secundaria es mucho más intensa que la respuesta a la primovacunación en este tipo de vacunas; así los individuos de bajo título y que no muestran incremento de título detectable, podrían ser aquí primovacunados. Los restantes podrían responder tan enérgicamente por tratarse de una revacunación. A diferencia de los vacunados con vacuna antimeningocócica, que nunca habían sido vacunados con anterioridad (por no haber existido previamente la vacuna), aquí no fue posible determinar fehacientemente quiénes habían recibido la vacuna antitetánica en los cinco años previos a su incorporación.

Cuadro 22

Número de individuos que presentaron los incrementos en anticuerpos antitetánicos que se indican, un mes después de la vacunación con vacuna T.A.B.D.T.. Contraimmunoelectroforesis Discontinua. Títulos expresados como número de tubo de dilución. Nº 1: suero puro; Nº 2: dilución 1/2; Nº 3: Dilución 1/4.

$\Delta + = \text{Postvacunado} - \text{Prevacunado}$

Título inicial	0	1	2	3	Total
Mínimo	5	5	4	4	18
1	2	3	1		6
2	2				2
3					
Total	9	8	5	4	26

Cuadro 23

Número de individuos que presentaron los incrementos en anticuerpos antitetánicos que se indican, un mes después de la vacunación simultánea con vacuna T.A.B.D.T., anti - N. meningitidis A + C y antiparotidítica. Contrainmunoelectroforesis Discontinua. Títulos expresados como número de tubo de dilución. Nº 1: suero puro; Nº2: dilución 1/2; Nº3: dilución 1/4; Nº4: dilución 1/8.

$$\Delta + = \text{Postvacunado} - \text{Prevacunado}$$

<u>Título inicial</u>	<u>0</u>	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>Total</u>
<u>1 ó menor</u>	3		1		1	5
<u>1</u>		1				1
<u>2</u>						
<u>3</u>						
<u>Total</u>	3	1	1		1	6

Cuadro 24

Número de individuos que presentaron los incrementos en anticuerpos antitetánicos que se indican, un mes después de la vacunación simultánea con vacuna T.A.B.D.T. y antiparotidítica. Contraimmunoelectroforesis Discontinua. Títulos expresados como número de tubo de dilución. Nº 1: suero puro; Nº 2: dilución 1/2; Nº 3: dilución 1/4; Nº4: dilución 1/8; Nº5: dilución 1/16.

$\Delta + = \text{Postvacunado} - \text{Prevacunado}$

Título inicial	0	1	2	3	4	5	Total
1 ó menor	4		4		1		9
1		1				1	2
2	1						1
3							
4		1					1
Total	5	2	4		1	1	13

Cuadro 25

Número de individuos que presentaron los incrementos que se indican como $\Delta + =$ Post-Revacunación (1 mes) - Pre-Revacunación para los distintos títulos Pre-revacunación registrados, tras ser revacunados con vacuna antimeningocócica A + C. Hemoaglutinación Indirecta. Títulos expresados en número de tubo. Dilución inicial (tubo número 1)=1/2. Diluciones al 1/2.

Cuadro 25a. LN-76 y 77. Anticuerpos Anti - N. meningitidis A

$\Delta + =$ Post-Revacunación (1 mes) - Pre-Revacunación

Título inicial	0	1	2	3	4	5	Total
1 ó menor							
2							
3			2	1			3
4		2	2				4
5 ó mayor	2	1					3
Total	2	3	4	1			10

Cuadro 25b. LN-76 y 77. Anticuerpos Anti - N. meningitidis C

$\Delta + =$ Post-Revacunación (1 mes) - Pre-Revacunación

Título inicial	0	1	2	3	4	5	Total
1 ó menor			2		2	1	5
2			1				1
3	1	1					2
4		1	1				2
5 ó mayor							
Total	1	2	4		2	1	10

Cuadro 26

Número de individuos que presentan los incrementos que se indican como $\Delta + = \text{Postvacunado (1 mes)} - \text{Prevacunado para los distintos títulos iniciales registrados, tras ser vacunados con vacuna antimeningocócica A + C y vacuna antineumocócica - (14 serotipos) simultáneamente.$

Cuadro 26a. S.M. Anticuerpos Anti - N. meningitidis A

$\Delta + = \text{Postvacunado (1 mes)} - \text{Prevacunado}$

Título inicial	0	1	2	3	4	5	6	Total
1 ó menor								
2								
3			1	1	2			4
4	1	2	6					9
5	16	10	5	1				32
6 ó mayor	21	4	3					28
Total	38	16	15	2	2			73

Cuadro 26b. S.M. Anticuerpos Anti - N. meningitidis C

$\Delta + = \text{Postvacunado (1 mes)} - \text{Prevacunado}$

Título inicial	0	1	2	3	4	5	6	Total
1 ó menor								
2		1	8	7	1	1		18
3	13	9	10	4	2			38
4	7	1	1					9
5	5	1	2					8
6 ó mayor								
Total	25	12	21	11	3	1		73

Cuadro 27

Número de individuos que presentaron los incrementos que se indican como $\Delta +$ = Post-Revacunación (1 mes) - Pre-Revacunación para los distintos títulos Pre-revacunación registrados, tras ser revacunados con vacuna antimeningocócica A + C y haber sido simultáneamente primovacunados con vacuna antineumocócica (14 serotipos).

Cuadro 27a. SM. Anticuerpos Anti - N. meningitidis A

$\Delta +$ = Post-Revacunación (1 mes) - Pre-Revacunación

Título inicial	0	1	2	3	4	5	Total
1 ó menor							
2							
3			2				2
4			1				1
5	10	3	3	1			17
6 ó mayor	11	1					12
Total	21	4	6	1			32

Cuadro 27b. SM. Anticuerpos Anti - N. meningitidis C

$\Delta +$ = Post-Revacunación (1 mes) - Pre-Revacunación

Título inicial	0	1	2	3	4	5	Total
1 ó menor				1			1
2			1	1			2
3		5	4	2			11
4	8	3		1			12
5	4	1					5
6 ó mayor		1					1
Total	12	10	5	5			32

IV.6.4.2. Vacuna antiparotidítica:

Si bien se han realizado unas pocas determinaciones serológicas por inhibición de la Hemoaglutinación, se posee una evidencia tan decisiva obtenida en ensayos de campo acerca del buen funcionamiento de la aplicación simultánea de vacunas antiparotidíticas y antimeningocócicas en grandes grupos poblacionales que se discutirá ese punto en la sección respectiva.

IV.6.5. Ensayos de campo:

La única forma definitiva de determinar que una vacuna además de ser segura y eficiente en su capacidad de generar una respuesta en forma de anticuerpos humorales es además protectora, es demostrar su eficacia en evitar la aparición de casos de la enfermedad en poblaciones perfectamente controladas.

La eficacia (E) de una vacuna puede calcularse en base a la fórmula $E = 1 - \frac{a \cdot d}{b \cdot c}$, donde a es el número de vacunados que enfermaron a causa de una bacteria de serotipo contenido en la vacuna, b es el número de vacunados que enfermaron a causa de una bacteria de serotipo no contenido en la vacuna, c es el número de no vacunados que enfermaron a causa de bacterias de serotipo contenido en la vacuna y d es el número de no vacunados que enfermaron a causa de bacterias de serotipo no contenido en la vacuna(40).

Si se analiza el cuadro 28 se ve que en 1975 el número de casos había alcanzado una incidencia de 16/25000 verdaderamente alarmante. Estos casos se reducen a tres en 1976; en este caso, los dos casos a N.meningitidis C que ocurren constituyen "experimentos naturales" que demuestran que las bacterias siguen circu-

Cuadro 28

Número de casos de meningitis bacterianas en personal de la Armada Argentina (1974-1981)

Hospital	1974	1975	1976*	1977	1978	1979	1980	1981
Hospital Naval Puerto Belgrano	4	8**	1***	2***	0	0	0	0
Hospital Naval Río Santiago	3	8**	2**	2***	1**	0	2**	0
Total	7	16	3	4	1	0	2	0

* Inicio vacunación masiva (aproximadamente 25.000 individuos anualmente)

** Tres con secuelas graves

*** Str. pneumoniae

** N. meningitidis C: uno no vacunado, uno vacunado el día anterior

** N. meningitidis C: no vacunado

** Uno N. meningitidis 8; uno N. meningitidis W135

** Dos muertos

lando en la comunidad vacunada, y que es realmente la vacuna la que evita la aparición de casos y no una súbita desaparición del germen causante de la enfermedad que se pretende combatir.

En este estudio en particular, que estuvo y está bajo la directa responsabilidad del Dr. S. Grinstein, se optó por vacunar a toda la población en alto riesgo en la medida de lo posible, y no sólo a parte de la misma, por razones éticas.

Si bien el diseño experimental exigiría en este tipo de trabajos una vacunación inicial parcial, las consecuencias de una actitud purista desde el punto de vista estadístico en una época casi epidémica hubiera podido causar graves consecuencias, como se trasunta de los casos habidos en individuos no vacunados por causas fortuitas (1976 y 1978 en el Cuadro 28). En todo momento la eficiencia calculada según la fórmula antes expuesta resultó del 100%. La aparición de casos causados por otros serogrupos de N. meningitidis (B y W135) y otros causados por Str. pneumoniae, reafirman la idea de tratar de conseguir vacunas polivalentes, es decir, contra un mayor número de serogrupos, e incluso contra distintas bacterias causantes de meningitis y que las vacunas antimeningocócicas no brindan protección cruzada.

Las poblaciones de conscriptos del Cuadro 28 fueron vacunadas simultáneamente con vacunas antiparotidíticas y T.A.B.D.T., con lo cual queda demostrado que éstas no afectan el rendimiento de la vacuna antimeningocócica.

Si se analizan los resultados de las vacunaciones simultáneas desde el punto de vista de la vacuna antiparotidítica, se puede

ver su altísima efectividad incluso cuando se vacuna sólo una parte de la población (Cuadro 29).

Esto se hizo así porque en este caso, si bien la parotiditis puede dejar secuelas (la más importante de ellas es la esterilidad), no es una enfermedad mortal como lo puede ser la meningitis. Hasta 1978 inclusive se aplicaba la vacuna antiparotidítica cinco días después de la inoculación con las vacunas T.A.B.D.T. y antimeningocócica. Si bien el número de casos disminuyó drásticamente, se notó que una parte de los individuos se infectaban en ese corto período, por lo cual la vacunación era inefectiva por realizarse ya en el período de incubación (30 casos). Hubo diez casos en individuos correctamente vacunados en este período. A partir de 1979 se decidió vacunar simultáneamente al ingreso, no aumentándose por ello las reacciones indeseadas. En este período (1979-81) no fueron vacunados por distintas causas 100 individuos, registrándose diez casos en no vacunados y tres en correctamente vacunados.

En los Cuadros 28 y 29 queda totalmente demostrada la altísima efectividad de las vacunas antimeningocócica A + C y antiparotidítica aplicadas simultáneamente.

Los N. meningitidis fueron en todos los casos recuperados por cultivo y tipificados por Contraimmunoelectroforesis y Coagulación.

Cuadro 29

Número de casos de parotiditis en personal de la Armada Argentina (1971-1981)

	1971	1972	1973	1974	1975	1976	1977	1978	1979	1980	1981
Hospital Naval Puerto Belgrano	420	300	600	350	81*	32	43	12	0	0	3
Hospital Naval Río Santiago	24	31	200	260	145	29	104**	13	0	6**	4
Total	444	331	800	610	226	61	147	25	0	6	7

Se vacunó un tercio del personal. La diferencia con años anteriores es significativa.

** No se vacunó la Escuela de Mecánica de la Armada.

** Vacunados 15 días después de la incorporación. Enfermados a los 20 días. Vacunación masiva: aproximadamente 25.000 individuos por año a partir de 1976.

V. DISCUSION

V.1. Introducción:

El objetivo central de este trabajo fue el demostrar la riqueza teórica y práctica del concepto de antígenos bacterianos químicamente definidos, utilizados con un doble propósito: por un lado como inmunógeno y por otro como posibilidad diagnóstica a través del reconocimiento específico de bacterias por medio de estos mismos antígenos.

El origen del concepto fue el planteo de base químico-inmunológica de la división en grupos de los N. meningitidis. Estos grupos se caracterizan por poseer polisacáridos capsulares que permiten diferenciarlos. Como se encuentran en la superficie de estas bacterias, constituyen precisamente la superficie libre cuyas propiedades le otorgan las características de invasividad propias de los meningococos.

Resultó lógico plantear la posibilidad de utilizar como sustancias vacunantes a esos antígenos, a los que debe poder reconocer el organismo para poder combatir eficientemente una infección, evitando simultáneamente la inoculación de proteínas, ácidos nucleicos, etc. y las complicaciones concomitantes. La única objeción era que tradicionalmente los polisacáridos han sido considerados pobres inmunógenos. Efectivamente se observó que el polisacárido del grupo B no resultó útil como tal en el hombre, pero sí lo fueron los de los grupos A y C.

Los resultados obtenidos aseguran que estos antígenos definidos están llamados a revolucionar el concepto de vacuna tradi-

cional. Incluso, en todo este estudio y por costumbre, repetidas veces se utilizó la palabra "vacuna" en relación con estos polisacáridos meningocócicos. No debe sin embargo perderse de vista que se está haciendo referencia a inmunógenos químicamente definidos y que contienen un único tipo de antígeno por cada polisacárido, lo que diferencia netamente estas preparaciones de las tradicionales.

V.2. Métodos de laboratorio utilizados:

En la Sección III.3. se mencionó ya que las razones por las cuales se prefirió la Hemoaglutinación Indirecta y la Inmunofluorescencia al Poder Bactericida.

La esencia del concepto fue el de seleccionar un método altamente sensible en la detección de antígenos específicos, para evaluar vacunas cuya característica es precisamente el estar compuestas por antígenos química e inmunológicamente definidos.

En el trabajo de Käyhty ya citado (25), se llega efectivamente a la conclusión que si bien tanto la Hemoaglutinación (con glóbulos rojos sin estabilizar en el caso de esa autora), el Radioinmunoensayo y el Poder Bactericida eran útiles en la evaluación de vacunas, el Poder Bactericida presentaba las siguientes dificultades en determinados casos: falsos negativos por el efecto bloqueante de altas concentraciones de IgA, la cual al competir por los sitios antigénicos con la IgG e IgM pero no fijar complemento, no ejerce un poder bactericida; y falsos positi-

vos debidos a inmunoglobulinas dirigidas contra antígenos capsulares distintos del polisacárido que da la especificidad de grupo de los N. meningitidis. Otros autores, estudiando vacunas experimentales anti - N. meningitidis grupo B demostraron una importante variación en los resultados de Poder Bactericida según la fuente del complemento utilizada (de conejo o humano)(42).

Respecto de la Hemoaglutinación, según Käyhty puede dar falsos negativos en sueros de individuos con respuesta exclusivamente (o casi) a anticuerpos del tipo IgG, con carencia de IgA e IgM. Esto no parece una desventaja del método, porque de alguna manera representa una respuesta inmune alterada, ya que los anticuerpos IgA e IgM específicos inducen una acción antimeningocócica en monocitos y linfocitos K (independiente del complemento); la IgM es mucho menos efectiva en esta acción que la IgA (43). Es interesante destacar que absorbiendo sueros de vacunados con el polisacárido de la vacuna (anti-grupo C), esta actividad se anula, no así si se realiza la absorción con otros antígenos de superficie del N. meningitidis C (proteínas o lipopolisacáridos)(44). Esto reafirma el efecto protector de los anticuerpos humorales inducidos por los inmunógenos aquí ensayados.

Una desventaja de la Hemoaglutinación (con glóbulos rojos frescos) respecto del Radioinmunoensayo es su menor sensibilidad, por lo que a algunos autores no les fue posible detectar diferencias entre lotes de vacunas sí diferenciables por Radioinmunoensayo (25). En este estudio, sin embargo, sí fue posible dis-

tinguir entre lotes de vacunas de diferente capacidad inmunogénica (primer ensayo de polisacáridos supuestos estables a 40°C). Si bien seguramente la Hemoaglutinación utilizada es menos sensible que el Radioinmunoensayo, esto fue posible debido probablemente a tres razones: Primeramente, el uso de glóbulos rojos estabilizados, lo cual aumenta su sensibilidad (Tabla I) y además hace más reproducibles los resultados porque al mantenerse estables por períodos prolongados de tiempo permiten analizar sueros tomados a distintos tiempos con el mismo lote de glóbulos. En segundo lugar, es posible que en el caso particular estudiado la diferencia entre los lotes de vacunas fuera tan grande que resultó detectable incluso sin una metodología ultrasensible. En tercer lugar, autores que no pudieron detectar diferencias entre lotes usando Hemoaglutinación, no tomaron en cuenta los niveles iniciales de anticuerpos (45), criterio esencial y que facilita las comparaciones.

Los altos títulos de anticuerpos anti - N. meningitidis grupo A no son un artificio de técnica como quedó demostrado por la alta correlación de esos títulos con los obtenidos por Inmunofluorescencia, la existencia de individuos aislados e incluso todo un grupo poblacional (LN-76) con títulos iniciales incluso inferiores al promedio registrado en esa misma población para anticuerpos anti - N. meningitidis C y la correlación que parece existir entre los altos títulos y la no aparición de casos de enfermedad causados por bacterias del grupo A (sobre esto último se volverá más adelante). A esto puede sumarse la di-

ferente respuesta a la vacunación exhibida por los individuos aquí definidos como de títulos previos altos o bajos, que además constituye una prueba indirecta de no reacción cruzada en la detección de anticuerpos contra los grupos A y C, pues se dan prácticamente todos los casos posibles: altos títulos A iniciales con bajos C iniciales, seguidos al mes de un aumento sólo del título para el grupo C; bajos de A y altos de C con respuesta sólo para A; bajos títulos iniciales para ambos seguidos de buenas respuestas para ambos; altos títulos de ambos con malas respuestas postvacunación e incluso bajos títulos de ambos con buena respuesta para sólo uno o el otro de los grupos, en distintos individuos.

La utilidad de la Contraimmunoelectroforesis y Coaglutinación fue ampliamente discutida en las secciones respectivas, así como el método de detección de anticuerpos anti-tetánicos utilizado y la interpretación de los resultados con el obtenido.

Conviene recalcar una vez más en este punto, que estas técnicas (junto con técnicas rápidas que son útiles en la diferenciación de meningitis bacterianas de virales como el "Limulus test" y la técnica del ácido láctico, aunque nada permiten afirmar acerca de cual es la bacteria causante de la enfermedad del paciente) fueron utilizadas y desarrolladas para facilitar la tipificación de bacterias por una parte, para permitir el diagnóstico en aquellos casos (desgraciadamente frecuentes) en que no se produce desarrollo bacteriano en los cultivos, y para producir un diagnóstico rápido para permitir instaurar una terapia

y medidas preventivas adecuadas mucho antes de contar con los resultados de los cultivos tradicionales.

De ninguna manera se pretendió suplantar sino complementar con métodos rápidos y específicos a los procedimientos habituales. De los resultados se desprende que sólo se puede llegar a un óptimo de diagnósticos combinando los estudios citoquímicos, los cultivos y la tinción de Gram con Contraimmunoelectroforesis y/o Coaglutinación. El hecho de que estas últimas dos técnicas permitan clasificar las bacterias hasta el nivel de serogrupo las hacen especialmente valiosas desde el punto de vista epidemiológico, particularmente para la utilización correcta de las vacunas antimeningocócicas estudiadas en este trabajo, ya que sólo protegen contra el serogrupo específico a partir del cual fueron elaboradas.

V.3. Métodos estadísticos utilizados:

Se utilizó: Análisis de la Varianza, test de Student para muestras independientes y para muestras pareadas. La única particularidad es que en general estos métodos son demasiado sensibles para su uso en comparaciones de títulos previos y posteriores a vacunaciones, por lo que en todos los casos se siguió el criterio descrito de exigir que un 80% o más individuos de un grupo poblacional vacunado debían exhibir dos o más incrementos de título respecto de su valor inicial. La utilización del método de Scheffé para comparación de medias ($\mu_i - \mu_j \geq 0$) en el análisis de las medias de los títulos de anticuerpos obtenidos

de grupos de individuos provenientes de distintas regiones geográficas fue realizado, pero no aportó ningún elemento adicional a lo que salta a la vista de una observación directa de los datos, por lo cual sólo se menciona aquí como realizado pero no se discute el método en profundidad.

La razón de esto, es que en estudios de corte epidemiológico no es suficiente detectar diferencias que simplemente excedan a aquellas debidas a la variabilidad intrínseca de los individuos, sino que sólo se deben y pueden tomar en cuenta diferencias grandes, a fin de asegurar buenos resultados al tomar medidas epidemiológicas extrapolando a grandes comunidades los resultados obtenidos en muestras relativamente pequeñas.

En ese sentido, sí es interesante contar con tests muy sensibles para demostrar por ejemplo que no hay diferencia significativa en la respuesta a la vacuna entre los sexos, como se hizo, y para fines metodológicos (por ejemplo, diferencias entre glóbulos rojos "frescos" y estabilizados). Pero para decisiones acerca de la bondad de una vacuna como la antimeningocócica, se puede ver realizando los cálculos, que el criterio de que el 80 % de los vacunados incrementaran cuatro veces o más su título de anticuerpos específicos es una exigencia enorme. Se asegura así que la validez de los resultados dependerá entonces sólo de que el grupo poblacional estudiado constituya una muestra adecuadamente representativa.

Respecto de este punto, debe tomarse en cuenta que tratándose de ensayos en humanos, muchas veces el tamaño muestral de-

pende más de las reales posibilidades de conseguir poblaciones en que sea ético aplicar vacunas y otras sustancias que del diseño estadístico.

Por otra parte, por el mismo hecho de tratarse de ensayos en seres humanos, no necesitándose realizar extrapolaciones a partir de modelos animales, el número de individuos requeridos es mucho menor que si se ensayara sobre animales.

Finalmente no es suficiente tomar en cuenta simplemente el número de individuos sino sus características (edad, sexo, grado de encerramiento, procedencia geográfica, estado sanitario).

Desde el punto de vista simplemente del número, cabe aclarar que de haberse podido utilizar directamente una técnica como el test de Student (o Análisis de la Varianza llegado el caso) el tamaño muestral surge directamente de fijar los errores de tipo I y de tipo II, pudiéndose conocer también la potencia del test a fines de poder comparar ensayos basados en distintos tamaños muestrales.

En el caso que nos ocupa, la solución es más empírica. En la Food and Drug Administration de los EE.UU. se llegó a la conclusión que alcanza con 25 individuos para poder certificar la buena inmunogenicidad de un lote de vacunas antimeningocóccicas.

En diversos estudios realizados por grupos de investigadores de la Organización Mundial de la Salud, tendientes a determinar características en grandes poblaciones, se ha llegado a la conclusión que una muestra de aproximadamente 600 individuos seleccionados aleatoriamente de entre los grupos de distinta edad, etc., constituye una muestra que en general puede ser conside-

rada representativa de la comunidad de la que fue extraída. No se va a discutir aquí este problema por exceder los alcances de este trabajo. Lo que sí se puntualizará aquí es el alcance que se pretende dar a las conclusiones.

Respecto de los conscriptos se debe destacar que se trata de una muestra aleatoria (dado que su incorporación depende de un sorteo basado en el número de Documento de Identidad) de la población de 18 años físicamente apta de la provincia respectiva. Fueron realizadas determinaciones serológicas en 592 conscriptos y fue ejercido estricto control respecto de la aparición de casos de meningitis en aproximadamente 25.000 hombres vacunados anualmente, provenientes de todo el país (aproximadamente 150.000 hombres en total). Estas cifras, y dada la forma de toma de muestra, hace suponer que las conclusiones acerca de efectividad de la vacunación antimeningocócica y las distintas vacunaciones simultáneas son extrapolables a la comunidad de adultos jóvenes en general.

Las poblaciones SM, PB y LN-76, en cambio, constituyen casos un tanto particulares por su encerramiento, edad y nivel socioeconómico. Totalizan 112, 54 y 84 individuos respectivamente. Los datos obtenidos deben en principio extrapolarse sólo a poblaciones de características comparables, si bien la similitud de resultados con los observados en conscriptos hacen pensar en una validez más general. En realidad, su particularidad se expresa no en las respuestas a las vacunas, sino en sus niveles iniciales; de no haberse manifestado diferencias tan gran-

des entre los niveles iniciales de estos tres grupos poblacionales, probablemente hubiera quedado inadvertida la importancia de dichos niveles en la evaluación de las vacunas. Los seguimientos registrados (tres años serológicamente, cinco años controlando la no aparición de casos de meningitis) son particularmente útiles pues en esta clase de grupos poblacionales donde es más necesario conocer la duración de la respuesta inmunitaria para disponer eventuales revacunaciones.

El seguimiento serológico realizado es particularmente importante, debido a que el estudio metodológicamente más perfecto realizado, lo fue sobre 23 voluntarios adultos jóvenes y sólo respecto de anticuerpos anti N. meningitidis C (41) o estudios de campo sin seguimiento serológico (en Egipto)(52) o con seguimiento serológico pero sin tomar en cuenta los niveles iniciales y por períodos menores y sólo para N. meningitidis A (54).

Sin embargo, aquí es importante recordar que el grupo poblacional de menor edad considerado (SM), comprendía individuos de 5 a 16 años, debiéndose considerar válidas las conclusiones para esas edades.

En menores de dos años de edad, la respuesta es menor y parece requerir revacunaciones. La respuesta inicial al polisacárido A es mejor que la obtenida con el polisacárido C, pero la respuesta a la revacunación parece ser mejor para este último (55). Nótese que la mejor respuesta se obtiene aquí en el grupo con menores niveles de anticuerpos en promedio, lo que

también habla en favor de lo postulado en este trabajo (pero no en el citado) de la importancia de los niveles previos de anticuerpos (que en lactantes pueden ser de origen materno), además de los lógicos y complejos factores que introduce la inmadurez del sistema inmunitario en los primeros meses de vida.

No puede considerarse resuelta por el momento la cuestión de la vacunación en el primer año de vida, ni la posible ventaja de vacunar mujeres embarazadas (de demostrarse además la seguridad de este último procedimiento, no estudiado aún).

V.4. Modelo experimental utilizado:

Se estudió la protección conferida por polisacáridos meningocócicos A y C solos o dados simultáneamente con otras vacunas en dos tipos de poblaciones: por un lado conscriptos, de renovación anual, de modo que las conclusiones se refieren a ese lapso de tiempo en cuanto a protectividad y a un mes en cuanto a respuesta de anticuerpos; y por otro lado, cadetes, miembros de una Escuela de Enfermería y niños del Hogar Naval, que fueron seguidos durante lapsos variables de tiempo (hasta tres años) con dosajes de anticuerpos. Todos estos individuos estuvieron por todo el lapso de estudio bajo control estricto de las autoridades de la Sanidad Naval, habiéndose registrado casos de meningitis sólo en conscriptos (Cuadro 28).

Se analizaron los anticuerpos previos y un mes post-vacunación (y durante lapsos mayores según los casos). En el caso de las vacunas antimeningocócicas se vacunó íntegramente a los

grupos poblacionales considerados. Si bien esto es criticable desde el punto de vista del diseño experimental, pareció éticamente insostenible otro tipo de conducta, considerándose suficiente control la toma de sueros previos a la vacunación (en aquellos individuos a los que se les tomó muestras de sangre) y en aquellos en los que sólo se esperó la aparición o no de enfermedad se tomaron como control los individuos no vacunados por razones fortuitas (incorporación retrasada, enfermedad menor en el momento de la vacunación, etc.) entre los cuales efectivamente se registraron casos de meningitis (Cuadro 28, 1976 y 1978) y la existencia de casos en la población civil en general y en Ejército y Fuerza Aérea, donde también se registraron (y registran) casos todos los años.

Dado los brillantes resultados obtenidos (ningún caso en vacunados, sobre un total de aproximadamente 150.000 individuos) y la demostración de la continuada circulación de N. meningitidis C en la población general (y en los casos aislados en la misma Armada), tratándose además de poblaciones de alto riesgo, y habiéndose demostrado buena respuesta de anticuerpos en la mayoría de los individuos estudiados serológicamente, se considera que la conducta seguida no afecta la interpretación de los resultados, y evitó probablemente un número importante de casos, con la mortalidad y secuelas asociadas.

Un segundo punto es que no se tomaron hisopados retrofaríngeos a lo largo de los seguimientos. Esto no fue posible realizarlo por falta de recursos materiales. Sin embargo, es altamen-

te improbable que hayan circulado N. meningitidis grupo A entre los individuos estudiados, por no haberse registrado ni un sólo caso de meningitis causado por el grupo A desde 1974 hasta 1981 inclusive, en los principales centros de derivación y referencia en donde se realiza como rutina la tipificación de los N. meningitidis aislados de pacientes (L. Saubert, Jefa de la División de Diagnóstico Bacteriológico del Instituto Nacional de Microbiología, y S. Grinstein, comunicaciones personales).

Sí es posible, en cambio, que hayan circulado N. meningitidis C entre los vacunados. Si esto fue así, no se afectaron por ello los niveles de anticuerpos, ya que todos los vacunados registraron una lenta caída de su nivel de anticuerpos (tanto por Hemoaglutinación como por Inmunofluorescencia), salvo en dos casos en que se registraron picos por Inmunofluorescencia no acompañados por picos de Hemoaglutinación, y que fueron atribuidos a infección subclínica con organismos que compartían antígenos con los N. meningitidis, distintos de los polisacáridos capsulares específicos de los grupos A o C. Estos datos coinciden con los obtenidos en un estudio con vacunas antimeningocócicas realizado a escala reducida durante el cual individuos vacunados se tornaron portadores sin modificar por ello sus títulos de anticuerpos (41). A la luz de los resultados obtenidos en este trabajo, la interpretación sería que una vez alcanzado un pico de anticuerpos superando o igualando al título límite de cuatro por Hemoaglutinación, no se responde en general con un aumento en el nivel de anticuerpos anti - polisacáridos meningocócicos

ante un nuevo estímulo, sea éste una reinoculación con polisacárido o, al parecer, incluso ante una colonización con N. meningitidis:

Por lo tanto consideramos que un aumento del título de anticuerpos sólo se registraría de infectarse un individuo con bajo título (vacunado o no). Efectivamente, en el Cuadro 21b, un individuo no vacunado presentó un incremento de dos títulos sobre su nivel inicial (bajo), que pudo haber sido causado tal vez por colonización.

En conclusión, si bien hubiera sido interesante contar con hisopados retrofaríngeos seriados, el no haberlos podido realizar tampoco afecta la validez de los resultados obtenidos. Impide, eso sí, terciar en una polémica de tipo ecológico que se ha suscitado respecto de las vacunas aquí estudiadas. La cuestión planteada es si la vacunación contra los grupos A y C, además de proteger, no disminuye también el estado de portador, disminuyendo paralelamente los N. meningitidis A y C circulantes en una comunidad vacunada, favoreciendo quizá la circulación de los demás grupos de N. meningitidis. No se tiene aún una respuesta a este interrogante, que es válido, ya que estas vacunas no confieren inmunidad cruzada.

Un punto fundamental en todo el proyecto fue el garantizar la serotipificación de los meningococos causantes de meningitis. Esto fue logrado con ayuda de la Coaglutinación y Contraínmuno-electroforesis, que hubieran permitido la identificación de los gérmenes, incluso si éstos no hubieran crecido en cultivo, y

fueron utilizados en la tipificación de los casos en vacunados, como en diagnóstico y tipificación de bacterias causantes de meningitis en pacientes del Hospital de Niños "Ricardo Gutiérrez" y del Instituto Nacional de Microbiología que han servido de control para este estudio, en el sentido de poder conocer en cada momento cuál era el microorganismo que con más frecuencia era causa de meningitis y demostrar que el N. meningitidis grupo C continuó circulando en la comunidad durante todo el período 1975-1981 (si bien no se registraron epidemias en ese lapso). En resumen se consideró adecuado el modelo experimental utilizado, no habiendo afectado en forma significativa sus limitaciones arriba señaladas, la obtención de la información que se pretendió obtener.

V.5. Importancia de la prevalencia de anticuerpos anti - N. meningitidis A y C en poblaciones rurales y urbanas de la Argentina:

En IV.1. se mencionó que al iniciarse este estudio se carecía de todo indicio acerca de la prevalencia de anticuerpos antimeningocócicos en poblaciones de nuestro país, a pesar del innegable interés de este tipo de datos debido a la relación existente (ya conocida) entre anticuerpos y protección. Para una correcta interpretación de los datos aportados, debe recordarse que si bien la presencia de estos anticuerpos en niveles adecuados es indicio de protección, su ausencia no indica necesariamente susceptibilidad, ya que básicamente se buscaron aquí anti-

cuerpos específicos contra los polisacáridos capsulares que dan la especificidad de grupo de los N. meningitidis A y C (por Hemoaglutinación), pudiendo un individuo poseer anticuerpos contra antígenos proteicos o lipoproteicos capaces de proporcionar protección contra diversos grupos de meningococos (46). Sin embargo, resultó notable la relación encontrada entre los títulos de anticuerpos detectados y los casos de meningitis efectivamente registrados, ya que en general se encuentran altos títulos para anticuerpos anti - N. meningitidis A y virtualmente no se detectan casos, y simultáneamente bajos títulos de anti - N. meningitidis C y un número importante de casos de enfermedad causados por el N. meningitidis grupo C. Si bien la denuncia y tipificación de los meningococos en la Argentina es insuficiente, la coincidencia resulta llamativa. La concordancia entre falta de anticuerpos en población sana y aislamiento de meningococos en pacientes fue también recientemente observado por investigadores italianos, quienes utilizaron para la detección de anticuerpos Hemoaglutinación Indirecta con glóbulos rojos "frescos" (es decir, una técnica menos sensible pero bastante comparable a la aquí utilizada), aumentando la significación de sus datos el eficiente seguimiento y tipificación de los meningococos causantes de enfermedad con que se cuenta en Italia (47).

Una evidencia indirecta adicional que permite creer que los títulos de anticuerpos de individuos sanos reflejan el grado de protección de la población general frente a los meningococos, es que no parece haber una relación obvia entre estos

títulos de anticuerpos y factores tales como edades (superiores a los dos años), geografía, procedencia rural o urbana o grado de encerramiento. Baste como ejemplo de esto, que el promedio de anticuerpos anti - N. meningitidis A más elevado se observa en SM1, es decir, una población de 5 a 11 años de edad e importante grado de encerramiento, al tiempo que el promedio más bajo entre todos los grupos estudiados se da en LN-76, con individuos de 13 años de edad, que si bien llevaban menos tiempo como grupo semicerrado, habían sufrido un grado de encerramiento mayor, y que éste último grupo a su vez se diferencia muy apreciablemente del LN-77, con el que comparten todas las demás características (nivel socioeconómico, edad, etc.).

La presencia de elevados títulos de anticuerpos anti N. meningitidis A no se debe aparentemente a la circulación de N. meningitidis A en nuestra población, sino probablemente a la circulación de otras bacterias entéricas no asociadas con enfermedades, que poseen polisacáridos capsulares idénticos inmunológicamente al polisacárido capsular A y que han sido descritos por distintos autores (48,49). Esto último es una opinión basada en el no aislamiento de N. meningitidis A de pacientes, pero por supuesto debería ser demostrado haciendo hisopados retrofaríngeos y coprocultivos a un número grande de individuos sanos para aislar o bien meningococos grupo A o bacterias entéricas que por el método de Agar-antisuero o Coaglutinación presentaran reacciones cruzadas con el polisacárido A. Esto, si bien de sumo interés, escapa a los objetivos de este estudio. En rea-

alidad, para poder tener una imagen clara de lo que ocurre en una comunidad respecto de la enfermedad meningocócica y poder por lo tanto planificar una política de vacunaciones o mantenimiento de stocks de vacunas para poder actuar en forma rápida ante la aparición de un brote, no basta con aislar y tipificar a todos (o casi todos) los meningococos causantes de enfermedad, sino que se debería utilizar muestras de sueros que de todos modos se toman (por ejemplo anualmente a todos los argentinos varones de 18 años que se presentan ante los distintos Distritos Militares para su revisión médica previa al Servicio Militar) para evaluar año a año no sólo la prevalencia de anticuerpos anti - N. meningitidis A y C, sino también de los demás grupos de N. meningitidis, particularmente al B por causar ya numerosos casos, y los grupos W135 e Y pues ya se está estudiando la posibilidad de una vacuna combinada A + C + W135 + Y (50) (Es posible destacar aquí que el Ministerio de Salud Pública mantiene en la actualidad un stock permanente de vacunas A + C para poder enfrentar un eventual brote epidémico, en vista de los excelentes resultados obtenidos con estas vacunas en la Armada Argentina).

V.6. Respuestas a antígenos sólo estables a -20°C y supuestos estables a 4°C:

En las secciones respectivas quedó demostrada la eficacia en producir respuestas inmunológicas bajo la forma de anticuerpos humorales circulantes de las vacunas sólo estables a -20°C (IV.2),

el fracaso inicial de las vacunas supuestas; estables a 4°C (IV.5) y su posterior mejoramiento hasta lograr una eficacia comparable a los estables a -20°C (IV.6.).

En las secciones mencionadas, quedó paralelamente comprobada la importancia decisiva de los niveles previos de anticuerpos específicos sobre la respuesta a la vacuna, la eficacia de la Hemoaglutinación Indirecta tal como aquí fue realizada en diferenciar entre los lotes de vacuna de distinta potencia inmunogénica y la ineludibilidad de realizar ensayos finales en seres humanos a fin de asegurar la eficiencia de este tipo de vacunas. Esto último, que debería haberse considerado como sobreentendido en todo momento, se descuidó cuando una serie de métodos de laboratorio (por otra parte inobjetable y que fueron correctamente realizados) indicaron que los polisacáridos A y C conservaban sus propiedades fisicoquímicas y antigénicas al ser liofilizados en presencia de lactosa, ya que en ese punto se consideró prácticamente concluida la cuestión (20). Los resultados de la vacunación de un grupo de individuos demostró que si bien la estabilidad a 4°C había sido efectivamente lograda, se habían introducido modificaciones en pasos previos a la liofilización que afectaron negativamente la antigenidad de las preparaciones. Esta menor antigenidad no fue revelada por los habituales ensayos fisicoquímicos, el más crucial de los cuales es el mantenimiento de un alto peso molecular promedio de los polisacáridos, medido a través del perfil de elución obtenido por cromatografía en columnas de Sepharosa 4B. Pero resulta e-

vidente que incluso el alto peso molecular conservado no es una garantía absoluta, ya que se pueden producir modificaciones de tipo estérico en estas moléculas, alterando su capacidad de estimular la producción de anticuerpos sin afectar necesariamente su peso molecular. De hecho, todavía no se conoce completamente la estructura tridimensional de estos polisacáridos en solución a pesar de una activa búsqueda mediante técnicas sofisticadas como espectroscopía de resonancia magnética nuclear del C^{13} , ultracentrifugaciones, cromatografía en distintos geles (51). Es dable de imaginar que si se logra un método que permitiera resolver completamente estas cuestiones estructurales, sería posible evaluar con mayor perfección distintos lotes de vacunas, pudiéndose así reducir la frecuencia de ensayos en humanos.

El hallazgo de la importancia de los niveles previos de anticuerpos permitió determinar que ciertos lotes de vacunas eran excelentes a pesar de que un porcentaje importante de un grupo poblacional dado no respondía adecuadamente a la inoculación, permitiendo separar a individuos en dos categorías: de "altos" o de "bajos" títulos previos de anticuerpos, lo cual, de acuerdo a las evidencias indirectas aportadas puede también considerarse como de "probablemente protegidos" o de "probablemente susceptibles" a la enfermedad meningocócica respectivamente.

Presenta por otra parte el inconveniente de reducir el tamaño muestral elegido en forma impredecible para el investigador, por tener que eliminarse de la muestra a aquellos individuos con títulos previos de anticuerpos elevados. Esto es una dificul-

tad típica al tratar de aplicar tratamientos estadísticos a procesos biológicos y cuya única solución teórica posible es aumentar el número de individuos a vacunar, cosa no siempre fácil de lograr en la práctica.

La comprobación final del buen funcionamiento de las vacunas estables a 4°C de distintas procedencias, otorga a estos polisacáridos una nueva dimensión práctica, ya que se ven así enormemente incrementadas las posibilidades de combatir efectivamente un brote epidémico incluso en regiones sin adecuadas instalaciones de refrigeración.

La extrapolación de los resultados obtenidos en la titulación de los anticuerpos circulantes se vio justificada por los resultados obtenidos al vacunar gran cantidad de individuos sin un sólo fracaso en forma de meningitis causada por N. meningitidis A o C (sección IV.6.5.).

V.6. Duración de la respuesta inmunológica a las vacunaciones. Comparación con sobrevivientes a la enfermedad. Revacunaciones:

Se observó una prolongada persistencia de anticuerpos en concentraciones apreciablemente superiores a las iniciales hasta por lo menos tres años después de la vacunación (Sección IV.3.). Debido a las variaciones individuales, pueden reunirse los datos como indicativos de protección por por lo menos un año, y probablemente hasta tres años, tanto si se toma en cuenta sólo el nivel inicial de anticuerpos, como si tomamos en cuenta los

niveles registrados en niños sobrevivientes a la enfermedad, los cuales dos años después de haber sufrido una meningitis o meningococemia causada por N. meningitidis grupo C, situaban sus niveles de anticuerpos en promedio exactamente en el nivel de corte propuesto para separar individuos "probablemente protegidos" de "probablemente susceptibles" (Sección IV.4.).

Los datos al año se ven corroborados en la práctica por las vacunaciones masivas realizadas en individuos controlables por un período de 14 meses. No se posee igual certeza para el lapso comprendido entre el año y los tres años, pero los datos presentados concuerdan con los resultados obtenidos en ensayos de campo en Egipto, zona endemoepidémica para N. meningitidis grupo A (52) durante el cual, si bien no se midieron anticuerpos, se registraron con alta eficiencia los casos en vacunados y no vacunados, y con resultados obtenidos en un reducido grupo de voluntarios adultos jóvenes evaluados sólo respecto de la duración de su respuesta al polisacárido del grupo C, midiendo los anticuerpos mediante Radioinmunoensayo, Poder Bactericida y Hemoaglutinación Indirecta, con glóbulos rojos "frescos"(41).

La separación de individuos bajo estudio según sus títulos iniciales y la tabulación de los datos representando los incrementos de título logrados en función de esos títulos iniciales, permite una visualización de los datos que facilita la predicción, ya que la duración de niveles de anticuerpos significativamente superiores a los iniciales resultó mayor cuanto más incrementos se registraban al mes de la vacunación.

Representa además una forma de evaluar la eficiencia inmunogénica de estas vacunas más allá del simple cumplimiento de la norma del 80 % utilizada y es una prueba adicional del significado biológico de los niveles de anticuerpos detectados por los métodos aquí empleados.

En las revacunaciones se observaron respuestas del mismo tipo al observado en las primovacunaciones, tanto respecto del efecto del nivel inicial de anticuerpos como al número de incrementos obtenidos. La ausencia de efecto "booster" es atribuida en general al carácter de antígenos timo-independientes que poseen los polisacáridos en general.

V.7. Vacunaciones simultáneas:

Durante el transcurso del trabajo fueron evaluadas respuestas obtenidas tras inocular simultáneamente vacunas antimeningocócicas A + C, anti - parotidíticas, T.A.B.D.T. y antineumocócicas.

Las inoculaciones simultáneas debieron ser realizadas atendiendo las especiales características de las poblaciones de alto riesgo estudiadas.

Las conclusiones obtenidas pueden resumirse en tres puntos:

- 1) La inoculación de vacuna antineumocócica parece afectar negativamente a la respuesta a la vacuna antimeningocócica.
- 2) Las vacunas anti - parotidíticas y T.A.B.D.T. no afectan la respuesta a la vacuna antimeningocócica.
- 3) Inversamente, la vacuna antimeningocócica no afecta la

respuesta a la vacuna anti - parotidítica y no afecta la respuesta al componente antitetánico de la vacuna T.A.B.D.T..

Tomando estos resultados en conjunto, esto significa que, por un lado, estamos aún lejos del ideal de una vacuna polivalente contra las tres bacterias causantes de la mayor parte de las meningitis en niños, no sólo por carecerse de adecuadas vacunas anti - Haemophilus influenzae tipo b, y no poseer igual efectividad los distintos polisacáridos que integran la vacuna anti - Streptococcus pneumoniae (14 serotipos) de que se dispone, sino que incluso ofrece al menos dudas la inoculación simultánea de polisacáridos meningocócicos y neumocócicos.

Por otra parte se ve favorecida la utilización de las vacunas antimeningocócicas en poblaciones militares, por no interferir (y no ser interferida) con las demás vacunas que es necesario suministrar. Queda abierto el interrogante sobre la inoculación simultánea de vacuna antimeningocócica con vacuna anti - sarampionosa (que sería aconsejable de adoptar en poblaciones militares debido a los brotes de sarampión que periódicamente ocurren en conscriptos provenientes de regiones rurales causando incluso muertes entre los mismos) ya que se poseen datos obtenidos en niños que sugieren una disminución de la respuesta a la vacuna anti - sarampionosa debida al polisacárido del grupo A, al tiempo que la respuesta antimeningocócica no se ve afectada (53).

La aplicación simultánea de por ejemplo toxoide tetánico y polisacáridos A y C sin inconvenientes, facilita la búsqueda

de sustancias proteicas a las cuales ligar el polisacárido característico del grupo B de Neisseria meningitidis, el cual por sí mismo no es inmunogénico en el hombre. Se han intentado dos caminos: acomplejar este polisacárido con proteínas o lipoproteínas extraídas de la cápsula del N. meningitidis B, o bien acomplejarlo con sustancias vacunantes conocidas como lo es el toxoide tetánico. Los datos aquí presentados son indicativos de que no hay antagonismos en la respuesta a los polisacáridos A y C meningocócicos y el toxoide tetánico contenido en la vacuna T.A.B.D.T. suministrados simultáneamente, lo cual puede ser sumamente importante respecto de la elección de sustancias para acomplejar al polisacárido del grupo B.

Respecto de las vacunas antineumocócicas, las cuales son del mismo tipo que las antimeningocócicas aquí estudiadas, es decir, vacunas basadas en antígenos definidos, es de interés destacar que está actualmente en marcha un estudio colaborativo entre la Armada Argentina, el Hospital de Niños "Ricardo Gutiérrez" y el Instituto Nacional de Microbiología para la determinación de los serotipos de Str. pneumoniae causantes de neumatías, meningitis, otitis, sinusitis y conjuntivitis en nuestro medio, a fin de determinar si son iguales a los que han sido elegidos para integrar las vacunas de que actualmente se dispone. Datos preliminares obtenidos tipificando 220 neumococos indican la presencia frecuente de los serotipos 5 y 24 no contenidos en las vacunas. Dada la característica de estos polisacáridos de no conferir protección cruzada, esto cuestionaría la

utilidad de estas vacunas en nuestro medio.

Inversamente, agregando los serotipos faltantes y eliminando otros poco frecuentes, eventualmente se podría mejorar la posibilidad de vacunación simultánea anti - meningocócica - antineumocócica que a la luz de los resultados presentados no parece en este momento demasiado promisorio.

V.8. Consideraciones finales:

Deben considerarse como aportes originales de este trabajo al conocimiento y manejo de la epidemiología de las meningitis meningocócicas en nuestro medio el desarrollo de los métodos de Hemuaglutinación Indirecta y Coaglutinación para la detección de anticuerpos y antígenos respectivamente, la demostración de la factibilidad de transportar muestras embebidas en secantes para la tipificación de bacterias causantes de meningitis, el primer relevamiento de anticuerpos antimeningocócicos realizado en el país, el establecimiento de un límite y su significado biológico para la definición de niveles "altos" o "bajos" de anticuerpos, tanto referido a títulos pre- y post- vacunación, como a niños sobrevivientes a la enfermedad meningocócica, el establecimiento de la seguridad y eficiencia inmunogénica y protectora de polisacáridos meningocócicos estables a -20°C y a 4°C, la importancia crucial de los niveles prevacunación en la respuesta a los mismos, la duración de la respuesta inmunitaria, y el efecto de inoculaciones simultáneas con otras vacunas.

A pesar de la infredenuncia y no tipificación de los

N. meningitidis que habitualmente ocurre en nuestro medio, no se puede dejar de destacar los trabajos clínicos y epidemiológicos realizados en nuestro país en base a los datos de denuncia disponibles, y la preocupación de las autoridades de Salud Pública de la Nación en mantener un stock permanente de vacunas A + C para combatir un eventual brote epidémico.

De todos modos, estos siguen siendo, al igual que el presente trabajo, esfuerzos relativamente aislados de individuos preocupados por este tema.

La implementación a nivel nacional de un sistema de vigilancia epidemiológica que permita la tipificación de todas las bacterias causantes de meningitis (usando donde no hubiera otra posibilidad el envío de muestras embebidas en papel de filtro para ser procesadas por Coagulación, como aquí se demostró que es técnicamente factible), permitiría la aplicación racional de los polisacáridos meningocócicos aquí estudiados en la población en general cuando fuere necesario, ya que por el momento no parece justificarse una vacunación masiva.

Quedan por resolver cuestiones acerca de vacunaciones simultáneas (particularmente con sarampión y profundizar el estudio con las vacunas antineumocócicas), y sobre todo, el logro de vacunas anti - N. meningitidis B y anti - H. influenzae tipo b y vacunas más efectivas durante el primer año de vida, con lo que se podría lograr una efectiva protección contra los principales causantes de meningitis.

BIBLIOGRAFIA

- 1- Lennette, E.H.; Spaulding, E.H.; Truant, J.P.: Manual of Clinical Microbiology, 2ª edición, Cap. 10, ASM, Washington, 1974.
- 2- Greenfield, S.; Sheehe, P.R. y Feldman, H.A.: Meningococcal carriage in a population of "normal" families. J. Infect. Dis. 123: 67-73, 1971.
- 3- Davis, B.D.; Dulbecco, R.; Eisen, H.N.; Ginsberg, H.S. y Wood, W.B.: Microbiology, 2ª edición, Cap. 28, Harper & Row, Singapur, 1973.
- 4- Koppes, G.M., et al. Group Y Meningococcal Disease in United States Air Force Recruits. Am. J. Med. 62: 661-666, 1977.
- 5- Remington, J.S.; Klein, J.O.: "Infectious diseases of the fetus and newborn infant.", Cap. 17. W.B. Saunders and Co., Philadelphia, 1976.
- 6- Kasper, D.L.; Winkelhake, J.L.; Zollinger, N.D.; Brandt, B.L.; Artenstein, M.S.: Immunochemical similarity between polysaccharide antigens of E. coli O7:K₁ (L):NM and group B Neisseria meningitidis J. Immunol. 110: 262-266, 1973.

- 7- Goldschneider, I.; Gotschlich, E.C.; Artenstein, M.S.:
Human immunity to the meningococcus. I. The role of humoral
antibodies. II. Development of natural immunity. J. Exp. Med.
129: 1307-1330, 1969.
- 8- Sivonen, A., et al.: The effect of chemoprophylactic use of
Rifampin and Mynoclycline in meningococcal meningitis. J. Inf.
Dis. 137: 238-242, 1978.
- 9- Cecil, Textbook of Medicine, Fifteenth edition, p. 411 y ss.,
W.B. Saunders G., Philadelphia, U.S.A., 1979.
- 10- Gotschlich, S.: The immunological responses observed in field
studies in Africa with group A meningococcal vaccines. Program.
Immunobiol. Stand. 5: 485-495, 1972.
- 11- Ristori, C.: Meningitis meningocócica en Brasil. En: "Menin-
gitis en la Infancia", Coord. Puga, T., Panamericana, Buenos Ai-
res, 1976.
- 12- Souza de Moraes, J., et al.: Epidemic disease due to
N. meningitidis group C in San Pablo, Brasil. J. Infect. Dis.
129: 568-573, 1971.
- 13- Altman, G., et al.: Observations on asymptomatic infections
with N. meningitidis. Amer. J. Epidemiol. 96: 446-450, 1973.

- 14- "Meningoencefalitis en la República Argentina."(2ª parte), "Peso de las meningitis bacterianas.", Boletín Epidemiológico Nacional, Año 9, Nº 13, 1978.
- 15- Grinstein, S., et al.: Experiencia en el uso de la Contra-immunoelectroforesis. Rev. Hosp. de Niños de Buenos Aires, 18: 199-202, 1976.
- 16- Gotschlich, E.C., et al.: Human immunity to the meningococcus. III. Preparation and immunochemical properties of the group A, B and C meningococcal polysaccharides. J. Exp. Med. 129: 1349-1364, 1969.
- 17- Clough, J.D.: Familiar Complement Component (C6, C7) deficiency with chronic meningococemia. Arch. Int. Med. 140: 929-935, 1980.
- 18- Helting, T.B.; Zwisler, O.: Bakterielle meningitiden: neue Entwicklungen bei Impfstoffen. Immunobiologische Informationen, Behringwerke 4: 153-159, 1977.
- 19- Ambrosch, F.; Wiedermann, G.; Stanek, G.: Serologic and epidemiologic factors influencing the immune response against meningococcal polysaccharides. Comunicación al "Fourth International Conference on Immunity and Immunization in cerebrospinal meningitis.", Siena, Italia, Nov. 16-17, 1981. Libro de resúmenes, p. 25.

- 20- Tiesjma, R.H.; Beuvery, E.C.; Teper, B.J.: Enhanced stability of meningococcal polysaccharide vaccines by using lactose as a menstruum for lyophilization. Bulletin of the World Health Organization 55: 43-47, 1977.
- 21- OMS, Serie de Informes Técnicos Nº 594: 52 y ss., 1976.
- 22- OMS, Serie de Informes Técnicos Nº 610: 57 y ss., 1977.
- 23- Heist, G.D.; Solis-Kohen, S.; Solis-Kohen, M.: A study of the virulence of meningococci for man and of human susceptibility to meningococcal infection. J. Immunol. 7: 1-15, 1922.
- 24- Kasper, D.; Wyle, F.: Bactericidal antibody assay using C14 labelled N. meningitidis. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 139: 1175-1181, 1972.
- 25- Käyhty, H.: Comparison of passive hemoagglutination, bactericidal activity, and radioimmunological methods in measuring antibody responses to Neisseria meningitidis group A capsular polysaccharide vaccine. J. Clin. Microb. 12: 256-263, 1980.
- 26- Brandt, B.L.; Wyle, F.A.; Artenstein, M.S.: A radioactive antigen-binding assay for N. meningitidis polysaccharide antibody. J. Immunol. 108: 913-920, 1972,

- 27- Artenstein, M., et al.: Serologic studies of meningococcal infection and polysaccharide vaccination. *J. Infect. Dis.* 124: 277-288, 1971.
- 28- Daniel, T.; Weyand, J.; Stavitzky, A.: Micromethod for the study of proteins and antibodies. *J. Immunol.* 90: 741-750, 1963.
- 29- Dixon, W.; Massey, F.: *Introducción al análisis estadístico.* 2ª edición. Capítulo 10. Mac Grow Hill, México, 1965.
- 30- Block, F.L.; Houghton, N.J.: The significance of mumps hemoagglutination inhibition titers in normal populations. *Am. J. Epidemiol.* 85: 101-107, 1967.
- 31- Kasper, D.C., et al: Immunochemical similarity between polysaccharide antigens of E. coli O7:K1(L):NM and group B N. meningitidis. *J. Immunol.* 110: 262-267, 1973.
- 32- Orskov, F., et al.: Immuno-electrophoretic patterns of extracts from all E. coli O and K antigen strains. Correlation with pathogenicity. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B* 79: 142-152, 1971.
- 33- Kronwall, G.; Messner, R.P.; Williams, R.C.: Immunochemical studies on the interaction between staphylococcal protein A and γ G globulins. *J. Immunol.* 105: 1353-1356, 1970.

- 34- Edwards, E.A.; Hilderbrand, R.L.: Method for identifying Salmonella and Shigella directly from the primary isolation plate by coagglutination of protein A containing staphylococci sensitized with specific antibody. J. Clin. Microbiol. 3: 339-343, 1976.
- 35- Kronwall, G.: Rapid slide-agglutination method for typing pneumococci by means of specific antibody adsorbed to protein A-containing staphylococci. J. Med. Microbiol. 6: 187-190, 1973.
- 36- Thirumoorthi, M.C.; Dajani, A.S.: Comparison of staphylococcal coagglutination, latex agglutination and counterimmunoelectrophoresis for bacteria antigen detection. J. Clin. Microbiol. 9: 28-32, 1979.
- 37- Kwapinsky, J.B.G., et al.: Molecular Microbiology, p.129 y ss. John Wiley & Sons, New York, 1974.
- 38- Anhalt, J.P.; Yu, P.K.W.: Counterimmunoelectrophoresis of pneumococcal antigens: improved sensitivity for the detection of types VII and XIV. J. Clin. Microbiol. 2: 510-515, 1975.
- 39- Baroyan, O.V., et al.: The experience of vaccination against meningitis in children, Comunicación al "Fourth International Conference on Immunity and Immunization in cerebrospinal meningitis.", Siena, Italia, Nov. 16-17, 1981. Libro de resúmenes p.16.

40- Broome, C.V.; Facklam, R.R.; Fraser, D.W.: Pneumococcal disease after pneumococcal vaccination. An alternative method to estimate the efficacy of pneumococcal vaccine. New Engl. J. Med. 303: 549-580, 1980.

41- Brandt, B.L.; Artenstein, M.S.: Duration of antibody responses after vaccination with group C Neisseria meningitidis polysaccharide. J. Infect. Dis. 133: 562-572, 1975.

42- Zollinger, W.D.; Mandrell, R.E.; Griffiss, J.M.: Effect of composition and dose on the human immune response to complexes of meningococcal group B polysaccharide and outer membrane protein. Comunicación al "Fourth International Conference on Immunity and Immunization in cerebrospinal meningitis.", Siena, Italia, Nov. 16-17, 1981. Libro de resúmenes, Pág. 38.

43- Lowell, G.H., et al.: IgA-dependent, Monocyte-mediated, antibacterial activity. J. Exp. Med. 152: 452-457, 1980.

44- Smith, L.F.; Lowell, G.H.: Antibody-dependent cell-mediated antibacterial activity of human mononuclear cells. II. Immune specificity of antimeningococcal activity. J. Infect. Dis. 141: 748-751, 1980.

45- Brandt, B.L.; Artenstein, M.S.; Smith, C.D.: Antibody responses to meningococcal polysaccharide vaccines. Inf. Imm. 8: 590-596, 1973.

46- Barth Reller, L.; MacGregor, R.R.; Beaty, H.N.: Bactericidal antibody after colonization with Neisseria meningitidis. J. Infect. Dis. 127: 56-62, 1973.

47- Galli, M.G.; Ruggeri, R.: Distribution of meningococcal antibody in the Lombard population, Italy. Comunicación al "Fourth International Conference on immunity and immunization in cerebrospinal meningitis.", Siena, Italia, Nov. 16-17, 1981, Libro de resúmenes pág. 52.

48- Robbins, J., et al.: Enteric bacteria cross-reactive with N. meningitidis groups A and C and Diplococcus pneumoniae type I and III. Infect. Immun. 6: 651-656, 1972.

49- Vann, W.; Liu, T.; Robbins, J. Bacillus pumilus polysaccharide cross-reactive with meningococcal group A polysaccharide. Infect. Immun. 13: 1654-1657, 1976.

50- Armand, J., et al.: Clinical and serological evaluation of tetravalent meningococcal polysaccharide vaccine groups A, C, Y, W135. Comunicación al "Fourth International Conference on Immunity and Immunization in cerebrospinal meningitis.", Siena, Italia, Nov. 16-17, 1981, Libro de resúmenes, Pág. 28.

51- Ikic, D.; Petres, J.J.; Jusic, D.: A study of the structure of the group A meningococcal polysaccharide in solution. Comuni-

cación al "Fourth International Conference on Immunity and Immunization in cerebrospinal meningitis.", Siena, Italia, Nov. 16-17, 1981, Libro de resúmenes, Pág. 20.

52- Wahdan, M.H., et al.: A controlled field trial of a sero-group A meningococcal polysaccharide vaccine. Bull. of the W.H.O. 55: 645-651, 1977.

53- Ajjan, N., et al.: Combination of attenuated measles vaccine (Schwartz) with meningococcus A and A + C vaccine. Develop. Biol. Standard. 41: 209-216, 1978.

54- Peltola, H., et al.: Clinical efficacy of meningococcus group A capsular polysaccharide vaccine in children three months to five years of age. New Engl. J. Med. 297: 686-691, 1977.

55- Gold, R., et al.: Kinetics of antibody production to group A and group C meningococcal polysaccharide vaccines administered during the first six years of life: prospects for routine immunization of infants and children. J. Inf. Dis. 140: 690-697, 1979.