

Logo:
ELSEVIER

Listas de contenidos, disponibles en ScienceDirect

Inmunología Veterinaria e Inmunopatología

Página Web de la revista: www.elsevier.com/locate/vetimm

Logo:

Artículo de la investigación

Análisis multivariado de la respuesta inmunitaria a una vacuna como alternativa a la repetición de estudios de desafío animal para vacunas con eficacia demostrada

Logo: CrossMark

Ludivine Chapat^a, Florence Hilaire^a, Jérôme Bouvet^a, Daniel Pialot^a, Corinne Philippe-Reversat^a, Anne-Laure Guiot^b, Lydie Remolue^a, Jacques Lechenet^a, Christine Andreoni^a, Hervé Poulet^a, Michael J. Day^c, Karelle De Luca^{a,*}, Carine Cariou^a, Lionel Cupillard^a

^a Merial S.A.S., R & D, 254 rue Marcel Mérieux, 69007 Lyon, France ¹

^b CPB, 2 Place des Quatre vierges, 69110 Sainte Foy Les Lyon, France

^c Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Bristol, Langford, Reino Unido

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Palabras clave:

Vacuna contra la rabia

RABISIN®

Huella inmune

Ánalisis de componentes de principios

3R

RESUMEN

La evaluación de las combinaciones de vacunas, o la evaluación del impacto de modificaciones menores de un componente en vacunas bien establecidas, requiere la realización de pruebas en animales en ausencia de correlaciones de protección previamente validadas. Como alternativa, proponemos realizar un análisis multivariado de la respuesta inmune específica a la vacuna. Este enfoque es coherente con los principios de las 3R (Refinamiento [purificación], Reducción y Reemplazo) y evita repetir estudios de eficacia basados en desafíos infecciosos *in vivo*. Para validar este enfoque, se seleccionó un conjunto de nueve parámetros inmunológicos con el fin de caracterizar las respuestas de linfocitos B y T contra el virus de la rabia canina y evaluar la compatibilidad entre dos vacunas caninas, una vacuna contra la rabia activada (RABISIN®) y una vacuna combinada (EURICAN® DAPPi-Lmulti) inyectada en dos sitios diferentes en los mismos animales. El análisis se centró en la magnitud y calidad de la respuesta inmune. La imagen multidimensional dada por esta 'huella' inmune se utilizó para evaluar el impacto de la inyección concomitante de la vacuna combinada en la inmunogenicidad de la vacuna contra la rabia. Un análisis de componente principal discriminaba completamente el grupo de control de los grupos vacunados con RABISIN® solo o RABISIN® + EURICAN® DAPPi-Lmulti y confirmó la compatibilidad entre las vacunas contra la rabia. Este estudio sugiere que determinar la huella inmune, combinado con un análisis estadístico multivariado, es un enfoque prometedor para caracterizar la inmunogenicidad de una vacuna con un registro establecido de eficacia. También puede evitar la necesidad de repetir estudios de eficacia que implican infección de desafío en caso de modificaciones menores de la vacuna o para estudios de compatibilidad.

1. Introducción

La eficacia de las vacunas veterinarias se demuestra generalmente por su capacidad para proteger a los animales vivos contra el desafío con un agente infeccioso virulento. En su lugar, se pueden utilizar correlaciones de protección como títulos de anticuerpos neutralizantes, siempre que se haya validado la correlación entre la seropositividad y la protección. En Europa, según la directriz EMA/CVMP/IWP/594618/2010 adoptada en julio de 2013 (EMA, 2013), el desarrollo de vacunas combinadas o asociaciones de vacunas requiere la demostración de la eficacia para todos los componentes.

Esta guía, sin embargo, fomenta el uso de marcadores correlacionados con la eficacia para reemplazar el desafío *in vivo* por agente infeccioso virulento. Esta flexibilidad coincide con los principios de las 3R (Reemplazo, Reducción y Refinamiento [purificación]), desarrollado hace más de 50 años como un marco para la investigación animal humana (Russell y Burch, 1959).

Sin embargo, los correlatos de protección no siempre están disponibles. Como alternativa al uso de animales en estudios de desafío, investigamos un nuevo enfoque que describe la respuesta inmune inducida por la vacuna a través del análisis de un conjunto definido de parámetros inmunes. Planteamos que esta 'huella' inmune puede ser utilizada como una alternativa a

* Desarrollo de una alternativa al desafío (3R), estadísticas (Análisis de componentes principales), y centrarse en la rabia con respuestas de células T (IFN- γ , liberación de citocinas), respuestas de células B (células B de memoria y células plasmáticas), y respuestas humorales (neutralización de suero), Subclases IgG e índice de avidez), huella inmune.

* Autor para correspondencia.

† Dirección de correo electrónico: karelle.deluca@merial.com (K. De Luca).

‡ Merial es ahora una empresa de Boehringer Ingelheim.



estudios de eficacia realizados por desafío, para vacunas con un proceso de fabricación confiable y una eficacia demostrada. Este nuevo enfoque evitaría repetir estudios de eficacia en algunas circunstancias específicas, como cuando se realizaron estudios de compatibilidad entre vacunas conocidas o para la evaluación del impacto de modificaciones menores de un componente en vacunas bien establecidas.

Para validar este enfoque, centramos el presente estudio en la calidad y magnitud de la respuesta inmune a la vacuna contra la rabia canina, desarrollando un conjunto de técnicas inmunológicas específicas para caracterizar las respuestas de células T y B caninas al antígeno de la rabia, y evaluamos la compatibilidad entre dos vacunas autorizadas, una vacuna contra la rabia inactivada adyuvante (RABISIN®) y una vacuna viva combinada modificada (EURICAN® DAPPi-Lmulti). Los datos se analizaron mediante un método estadístico multivariado, el análisis de componentes principales (PCA), con el fin de comparar las respuestas a la vacuna contra la rabia en perros en presencia o ausencia de la vacuna viva combinada.

2. Materiales y métodos

2.1. Diseño del estudio y muestreo

Todos los experimentos con animales realizados para este estudio han sido revisados por el Comité ético de Merial (registrado con el número 13 en el Ministerio francés de Educación Nacional, de Educación Superior y de Investigación) antes de realizar el estudio. La aprobación confirma que todos los experimentos se ajustan a las normas reglamentarias pertinentes definidas por las leyes europeas y francesas (directiva EU2010/63 y Decreto no 2013-118).

Cuarenta y dos cachorros Beagle libres de patógenos específicos (SPF) de entre 7 y 9 semanas de edad, fueron proporcionados por un proveedor comercial y fueron asignados al azar en tres grupos de 14 animales cada uno según el sexo y la edad. Los cachorros de los grupos A y B recibieron una inyección de EURICAN® DAPPi-Lmulti (vacuna combinada) por vía subcutánea los días 0 y 28. El día 28, los cachorros del Grupo A también recibieron una inyección de RABISIN® (vacuna contra la rabia) en un lugar de inyección separado. Los cachorros del Grupo C solo recibieron una inyección única de RABISIN® el día 28. Se extrajeron muestras de sangre de todos los cachorros los días 35, 42, 55 y 70. La sangre se recogió en tubos heparinizados y planos. El suero y las células se congelaron antes del análisis.

2.2. Vacunas

RABISIN® (Merial, Lyon, Francia) es una vacuna con adyuvantes inactivada contra la rabia (Minke et al., 2009). EURICAN® DAPPi-Lmulti (Merial, Lyon, Francia) es una vacuna combinada que contiene cuatro organismos vivos atenuados (virus de distemper canino, adenovirus canino tipo 2, parvovirus canino tipo 2 y virus canino de la parainfluenza) y tres cepas inactivadas de *Leptospirans* (sero interrogavares Canicola, Icterohaemorrhagiae y Grippotyphosa) (Bouvet et al., 2016).

2.3. Respuesta de anticuerpos

La respuesta del anticuerpo (es decir, los anticuerpos neutralizantes séricos, la concentración total de immunoglobulina [Ig]G específica de la rabia, la concentración de las diferentes subclases IgG, específicas de la rabia y el índice de avidez de anticuerpos) se evaluó el día 56, es decir, 28 días después de la inyección de la vacuna antirrábica en el pico de la respuesta de anticuerpos.

2.3.1. Títulos de anticuerpos neutralizantes del suero

La valoración de los anticuerpos neutralizantes del virus de la rabia (VNA) del Grupo A y del Grupo C se llevó a cabo utilizando la prueba de neutralización del virus de anticuerpos fluorescentes (FAVN) según la técnica descrita por Cliquet et al. (1998) con un umbral positivo de 0.5 UI/ml. VNA del grupo B no fueron titulados. Brevemente, las diluciones seriales de sueros y una cantidad fija de virus de la rabia de CVS (entre 50-200 TCID₅₀/pozo) fueron incubados por 60 minutos antes de agregar un volumen de 50 µl de una suspensión

de las células de BHK21 C13 (4×10^5 /ml) a cada pozo. Después de la incubación durante 48 h a 37 ± 2 °C en una incubadora humidificada con CO₂ al 5%, las microplacas fueron entonces fijadas en acetona y las células fueron etiquetadas agregando una dilución apropiada de un conjugado de IgG monoclonal antirrábica e isotiocianato de fluoresceína (FITC) (@Diagnostics, Inc. de FUJIREBIO Malvern, Pennsylvania, Estados Unidos) a cada pozo.

Los resultados fueron determinados usando un microscopio equipado para fluorescencia FITC. El pozo se consideró positivo si se observaron una o más células fluorescentes. El criterio de valoración del 50% del contenido de anticuerpos de los sueros de prueba se calculó mediante el método de Spearman y Karber. Los títulos séricos se expresaron como UI por ml en comparación con el suero estándar de la OIE ajustado a 0.5 UI/ml.

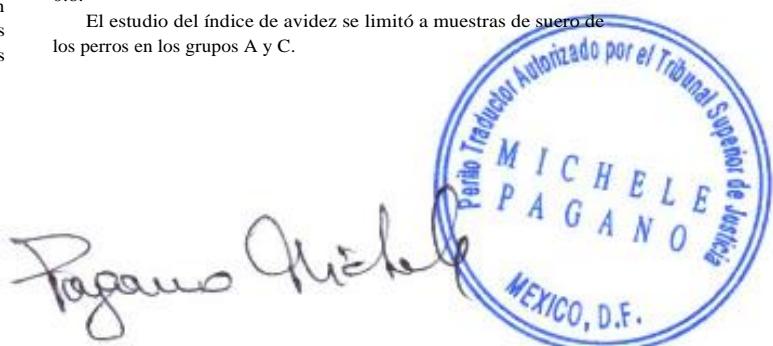
2.3.2. Medición de immunoglobulina total específica para la rabia G (IgG) y subclases IgG específicas de la rabia

La concentración de anticuerpos específicos de rabia de las subclases IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 y el título relativo de anticuerpos IgG antirrábicos se midieron utilizando ensayos immunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA). Las técnicas de ELISA se basaron en la detección de IgG antirrábica por anticuerpos policlonales anti-IgG anti-perro o subclases monoclonales anti-perro IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (Day, 1996, 2012). Las subclases IgG antirrábicas no se midieron en muestras de perros del Grupo B, que no recibieron la vacuna RABISIN®. Brevemente, diluciones seriales de sueros fueron incubadas con antígeno de rabia (MERIAL, Lyon, Francia) recubiertos en los pozos de una placa de microtitulación. La incubación duró al menos 10 h a 5 °C. Después de 3 lavados y una etapa de bloqueo (albúmina de suero bovino al 5% [BSA] en buffer solución salina de fosfato [PBS]), se añadió IgG anti-perro conjugada con peroxidasa (IgG anti-perro de conejo cadenas pesadas y ligeras [H & L]; Nordic Laboratories, Tilburg, Países Bajos) para detectar la unión de IgG total. Para detectar el enlace de subclases IgG, se añadieron anticuerpos monoclonales anti-perro IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 y posteriormente se revelaron utilizando un anticuerpo conjugado con peroxidasa F(ab')₂ conejo anti-ratón IgG (H & L) (Rockland Antibodies & assays, Gilbertsville, PA). Los reactivos secundarios y terciarios fueron incubados durante 1 h a 37 °C. Finalmente, el sustrato (tetra metil benzidina) se añadió a cada pozo y después de un período de incubación de 30 min a 21 °C, la absorbancia en cada pozo fue cuantificada por espectrofotometría. Los títulos relativos de anticuerpos en control positivo y sueros de prueba se calcularon por regresión en comparación con el suero de control de la casa y fueron expresados como Log₁₀OD₅₀. Los sueros de control positivos para anti-IgG1, anti-IgG3 y anti-total IgG ELISA fueron un conjunto de sueros de animales vacunados con una dosis doble de la vacuna RABISIN®. Los sueros positivos del control para ELISA anti-IgG2 y anti-IgG4 fueron tomados a partir de un animal vacunado 5 veces con la vacuna RABISIN®.

2.3.3. Índice de avidez

La técnica para medir la avidez del anticuerpo se basó en la detección de IgG total antirrábica como se describe anteriormente con la inclusión de un paso de la disociación que implicaba la adición de la solución del tiocianato antes de la adición del anticuerpo secundario conjugado-peroxidasa de IgG anti-perro. En un experimento de control, el virus inmovilizado de la rabia fue expuesto primero a este agente caotrópico para definir la concentración y eliminar la posibilidad que el tratamiento caotrópico desprendiera directamente el antígeno de las placas de ELISA. El tiocianato a 0.7 M se añadió durante 14 minutos a temperatura ambiente (RT). El efecto de tiocianato permite la separación de los complejos antígeno-anticuerpo con la avidez de unión de anticuerpos más baja, preservando al mismo tiempo los complejos con mayor avidez de anticuerpos. El cociente de las áreas debajo de las curvas obtenidas en los ELISA de anticuerpos IgG totales antirrábica realizadas con o sin disociación dio el índice de avidez que fue proporcional a la fuerza de unión (Smolander y otros., 2010; Dimitrov y otros., 2011). La avidez más alta estaba cerca de 1, mientras que la avidez más baja estaba cerca de 0.5-0.6.

El estudio del índice de avidez se limitó a muestras de suero de los perros en los grupos A y C.



2.4. Respuestas celulares

2.4.1. Aislamiento de PBMC

Las células mononucleares de sangre periférica canina (PBMC) se extrajeron de sangre entera por centrifugación de gradiente de densidad sobre Pancoll humano (densidad 1.077 g/ml, PAN Biotech, D. Dutscher, Issy-les- Moulineaux, Francia) después de la centrifugación durante 30 min a 1100g a temperatura ambiente (RT). Los PBMC se contaron utilizando un contador de células ABX Pentra 120 (HORIBA Medical, Montpellier, Francia) y resuspendieron a la concentración requerida en RPMI 1640 (Life Technologies, Villebon sur Yvette, Francia) complementado con 10% de suero fetal de ternera irradiado, 1% de penicilina-estreptomicina (Life Technologies, Villebon sur Yvette, Francia) y 0.01% 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin- Fallavier, Francia).

2.4.2. Células B específicas del antígeno de la rabia

Células plasmáticas circulantes y células de memoria B fueron detectadas y enumeradas por el ensayo ELISpot específico del antígeno de la rabia en muestras de sangre recogidas en los días 35 y 70. El método de expansión y diferenciación de células B de memoria de cultivos PBMC enteros fue descrito por Buisman et al. (2009) y fue adaptado para la detección de células B de memoria caninas. Brevemente, las PBMC fueron colocadas en las placas a 1×10^6 en placas de cultivo de 24 pozos y se estimularon con una concentración final de 2.5 $\mu\text{g/ml}$ de CpG ODN2142 Clase B (5' TCGCGTGCCTTGTGCTTGCAGT3') (AVECIA, Milford, MA EE.UU.) e interleucina canina recombinante (IL)-2. El sobrenadante de células transinfectantes CHO-K1 con un plásmido para producir la proteína canina IL-2 (NP_001003305) se añadió en una dilución final de 1/100. Después de 7 días de cultivo, las células fueron cosechadas y transferidas a tubos de polipropileno de 15 ml. Las células se lavaron una vez con PBS estéril (Life Technologies, Villebon sur Yvette, Francia) y se contaron antes de probarlas para la secreción de IgG mediante ensayo ELISpot.

2.4.3. Células plasmáticas circulantes

Las células plasmáticas secretoras de IgG reanina total o específicas de la rabia fueron cuantificadas directamente dentro de la población de PBMC mediante el ensayo ELISpot específico de la rabia.

2.4.4. Ensayos de ImmunoSpot ligados a enzimas (ELISpot)

Brevemente, las placas multiscreen HTS HA ELISpot (Merck Millipore, Molsheim, Francia) se cubrieron durante la noche a 4 °C con antígenos del virus de la rabia canina o del calicivirus felino (FCV) (FCV se utilizó como un control irrelevante; Merial, Lyon, Francia) a una concentración final de 100 $\mu\text{g/ml}$ en PBS estéril. Las placas recubiertas con antígeno se lavaron tres veces en PBS estéril y los sitios desocupados fueron bloqueados con un medio de cultivo estéril + 10% FCS durante 2 h a temperatura ambiente. Las PBMC (5×10^5) se añadieron directamente a los pozos en 200 μl de medio de cultivo y se incubaron durante 24 h a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Las células fueron entonces lisadas por adición de agua destilada en frío (200 μl añadido a cada pozo durante 5 minutos a RT). Las placas se lavaron tres veces en PBS con 0.05% Tween 20 (Merck, Fontenay sous Bois, Francia). Para detectar la IgG canina, 100 μl de IgG de cabra biotinilada anti-perro (dilución 1 en 1000; Nordic MUBio, Susteren, Países Bajos) se añadió a los pozos y las placas se incubaron durante la noche a 4 °C. Las placas fueron lavadas tres veces en PBS Tween y 100 μl de estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante diluida (Laboratorios Vector, Burlingame, CA, EE.UU.) fue añadida a cada pozo durante 1 h a 37 °C. Las placas se lavaron tres veces en PBS Tween y se incubaron durante 15 minutos a RT en la oscuridad con solución de sustrato de 3 aminoácidos-9-etilcarbazol (AEC, Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, Francia). La placa fue después lavada profusamente con agua del grifo y secada. Las manchas fueron contadas con un sistema de cámara CCD controlado por el software SPOT (Microvision Instruments, Lisses, Francia).

2.4.5. Respuesta de células T específica de la rabia

Las PBMC se extrajeron de sangre entera recogida el día 42 y fueron estimuladas con el fin de detectar las respuestas de células T específicas de rabia inducidas por la vacunación.

Las células secretoras de interferón (IFN)- γ específico de rabia (IFN) (células formadoras de manchas IFN- γ , SFC) se cuantificaron mediante un ensayo ELISpot (EL781, R & D Systems, Lille, Francia) después de la estimulación de PBMC 5×10^5 por antígeno de la rabia o antígeno FCV de control a 10 $\mu\text{g/ml}$ durante 48 h a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5% (directamente en placas ELISpot).

Tras la estimulación de las PBMC 5×10^5 durante 72 h a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5%, la concentración de citocinas caninas múltiples (IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, factor de necrosis tumoral [TNF]- α e IFN- γ) liberado en el sobrenadante de cultivo celular se midió utilizando un kit LUMINEX (Affymetrix ProcartaPlex Canine 9-Plex, Ebioscience SAS, París, Francia) según las recomendaciones del fabricante.

2.5. Análisis estadístico

Para cada parámetro inmunológico, se utilizó una prueba *t* para comparar los valores medios obtenidos en los grupos A y C. Transformación de datos [raíz cuadrada Y, $\log_{10}(Y)$, $\log_{10}(Y + 1)$] se aplicó cuando fue necesario, para mejorar la normalidad.

Un 'gráfico de radar' se utilizó para comparar los perfiles medianos de los tres grupos. Para cada parámetro inmunológico, un rango fue definido con base en el valor individual más alto ([0, valor alto]). Para cada grupo y cada parámetro inmunológico, el valor medio se posicionó en una escala de porcentaje utilizando el intervalo predeterminado (valor alto - 100%).

Se utilizó un análisis de componentes principales (PCA) para analizar globalmente los datos inmunológicos. Para estandarizar las características inmunológicas independientemente del conjunto de datos, la transformación siguiente: $Y \rightarrow Y / \text{valor alto}$ fue seleccionada. Cuando se aplicó una transformación para normalizar los datos antes de la prueba *t*, se aplicó la misma transformación para el PCA. El primer PCA eje corresponde al conjunto de las características más intercorrelacionadas. El segundo eje corresponde al segundo (no correlacionado con el primero) el conjunto de características más interequilibrado. Cada perro se caracterizó por dos puntuaciones. La coordenada a lo largo del eje 1 se seleccionó como puntuación 1. Una ligera rotación del eje 2, mejorando la discriminación entre grupos, permitió la derivación de una puntuación inmunológica más relevante que la correspondiente al eje 2. Las coordenadas a lo largo del eje 2 ligeramente girado se seleccionaron como puntuaje 2. Estas dos puntuaciones expresaron colectivamente las variaciones de las características intercorrelacionadas.

Se realizó una prueba *t* para comparar las puntuaciones medias entre grupos. La distribución de cada puntuación dentro de cada grupo se modeló mediante una distribución normal y las tres distribuciones normales se trazaron en el mismo gráfico.

Para los análisis estadísticos, a los sueros del Grupo B que no se probaron se les asignó un valor arbitrario de 0.14 UI para los anticuerpos neutralizantes de la rabia, 0.48 \log_{10} OD₅₀ para las concentraciones de anticuerpos IgG1 (correspondiente a la dilución más baja probada en el ensayo, es decir, 1:3) y 0 para el índice de avidez de anticuerpos (sin anticuerpos en la muestra en el ensayo).

3. Resultados

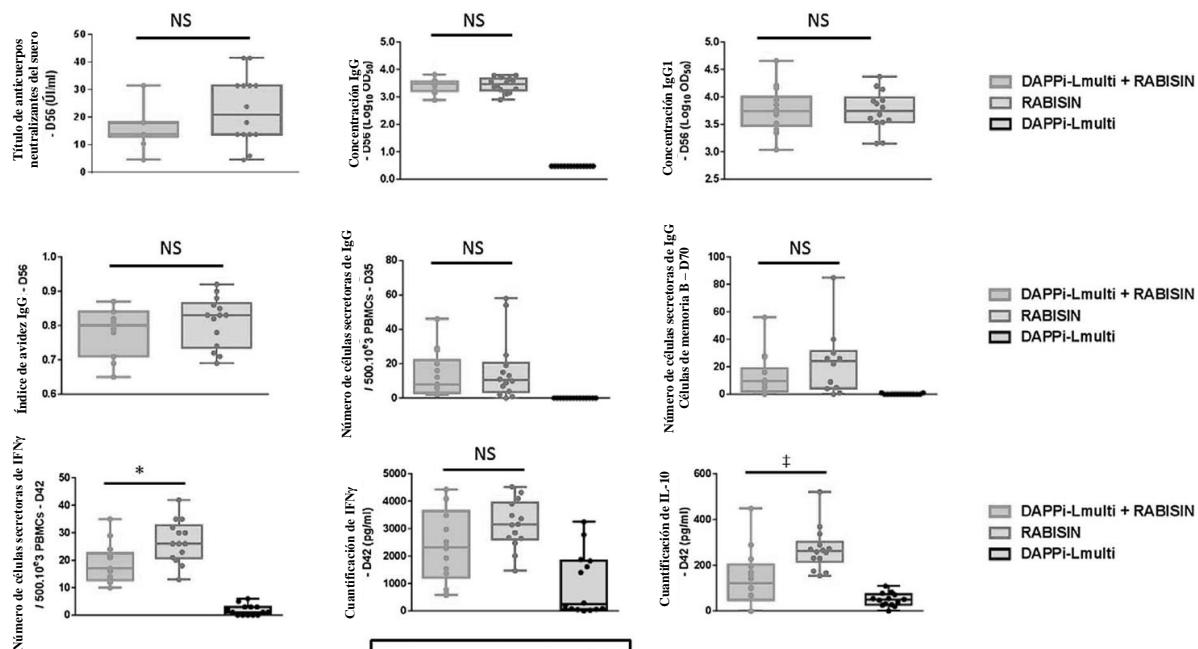
3.1. Respuesta inmune específica de la rabia en perros vacunados

Con el objetivo de caracterizar mejor la respuesta inmune al virus de la rabia canina, se desarrollaron varios análisis inmunológicos para evaluar la respuesta humoral, así como las respuestas celulares B y T en perros vacunados. Los tiempos óptimos para el muestreo de sangre fueron definidos para cada parámetro seleccionando el punto en el que la respuesta fue la más alta y más consistente entre los ensayos independientes (datos no mostrados). Los parámetros inmunes que se seleccionaron sobre la base de su especificidad fueron los títulos de anticuerpos neutralizantes del suero (prueba obligatoria de farmacopea para vacunas contra la rabia), concentraciones de anticuerpos subclase IgG específica para la rabia, la avidez de anticuerpos, las células plasmáticas, las células de memoria B y la secreción celular de citocinas después de la estimulación *in vitro* con antígeno del virus de la rabia canina.

Fig. 1A ilustra las diferentes respuestas inmunitarias específicas para el virus de la rabia canina, y confirma la especificidad de las herramientas para el antígeno del virus de



1-A



1-B

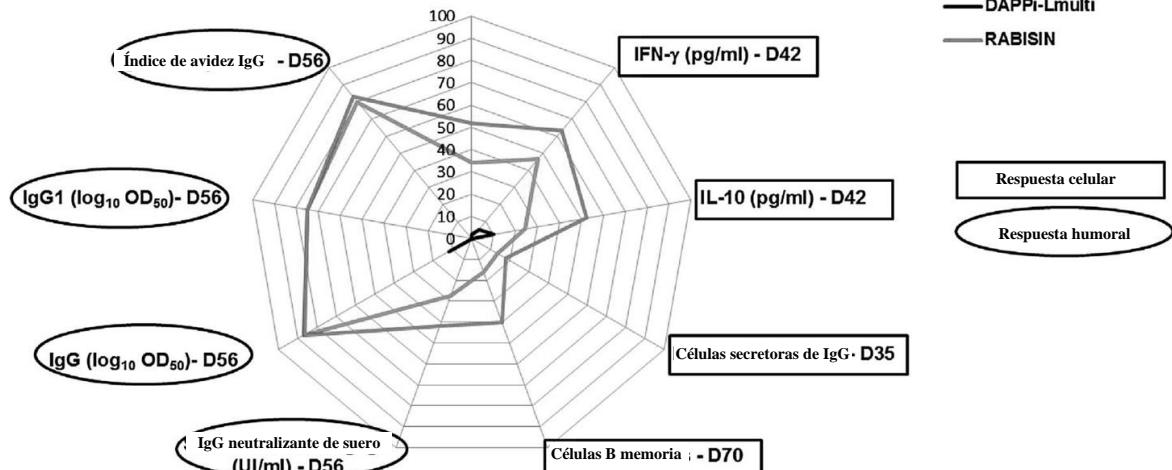


Fig. 1. Comparación de la respuesta inmunitaria específica de la rabia de los grupos vacunados. La gráfica A/Box-y-Whisker de cada parámetro ilustra la comparación de la respuesta inmune entre cada grupo vacunado. La gráfica B/Radar que resume la respuesta inmunitaria específica a la rabia después de la vacunación en los diferentes grupos. Los valores en el eje representan la mediana de cada parámetro inmunológico situado en una escala de porcentaje utilizando un intervalo predefinido (0 a un valor alto, 100%). *p = 0.007, ‡p = 0.004.

la rabia, ya que no se midió ninguna respuesta en el grupo de control que no fue vacunado con RABISIN® (solo vacuna combinada).

Como era de esperar, los perros vacunados con una sola dosis de RABISIN® (Fig. 1 A) desarrollaron anticuerpos neutralizantes (16.4 ± 7.4 UI/ml para el Grupo A y 22.7 ± 12.3 para el Grupo C en D56, es decir, 28 días después de la vacunación). La concentración de anticuerpos fue mucho mayor que el umbral de 0.5 UI/ml que está correlacionado con la protección. También se evaluaron las concentraciones totales de anticuerpos IgG, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 específicos de la rabia. No se detectaron anticuerpos antirrábicos IgG2 e IgG4 en ambos grupos vacunados. Los títulos de anticuerpos antirrábicos IgG3 (2.17 ± 0.85 para el Grupo A y 1.75 ± 0.87 para el Grupo C Log10 OD50.) fueron altamente heterogéneos en cada grupo vacunado con una desviación estándar más alta de lo esperado para dicha prueba ELISA (es decir, varios perros no produjeron anticuerpos IgG3 en cada grupo). Por lo tanto, no se pudo realizar un análisis estadístico y no se tuvieron en cuenta los resultados.

Además, los perros desarrollaron células plasmáticas circulantes y células de memoria B con especificidad del antígeno del virus de la rabia. Respuestas específicas de célula T

contra el virus de la rabia canina también se demostraron, con la producción de IL-10 e IFN-γ por las PBMC, pero no había evidencia de producción específica de la rabia de IL-2, IL-6, IL-8 y TNF-α, que fueron excluidos del estudio (no se muestran datos). El número de células productoras de IFN-γ también fue cuantificado por ELIspot.

3.2. Comparación de la respuesta inmune al virus de la rabia canina solo o cuando se combina con la vacuna DAPPi-Lmulti

Fig. 1A permite la comparación entre grupos vacunados con RABISIN® solo o cuando esta vacuna se administró simultáneamente con EURICAN® DAPPi-Lmulti para cada parámetro. No se observó ninguna diferencia significativa en las concentraciones de anticuerpos neutralizantes séricos, IgG total antirrábica e IgG1 o en los índices de avidez de anticuerpos $p \geq 0.29$. IFN-γ liberado por las PBMC, el número de células plasmáticas circulantes y células de memoria B tampoco fue significativamente diferente cuando las vacunas se combinaron o cuando los perros recibieron RABISIN® solo.

Pagan Michel
FAPAGANO
MEXICO, D.F.

($p = 0.07$, $p = 0.94$ y $p = 0.38$, respectivamente). Sólo la liberación de IL-10 por las PBMC y el número de células secretoras de IFN- γ difirieron significativamente entre los dos grupos vacunados con RABISIN® ($p = 0.004$ y $p = 0.007$, respectivamente).

Para visualizar de un vistazo los diferentes parámetros descritos anteriormente

y para evitar la necesidad de análisis parámetro por parámetro, se realizó una 'representación de radar' con los nueve parámetros inmunes seleccionados para comparar las respuestas inmunitarias contra el antígeno del virus de la rabia canina (Fig. 1B). La escala del gráfico de radar fue definida con base en la respuesta individual máxima al antígeno de la rabia (100%) obtenida en estudios independientes para realizar la comparación. Esta representación habilitó la diferenciación entre el grupo vacunado con EURICAN® DAPPi-Lmulti del grupo vacunado con o el grupo que recibe RABISIN® o el grupo que recibió RABISIN® simultáneamente con EURICAN® DAPPi-Lmulti. Los grupos que recibieron vacunas caninas contra la rabia mostraron un patrón similar de respuesta inmune incluso si la respuesta humoral fue más homogénea que la respuesta celular.

3.3. El análisis multivariado de los parámetros inmunes muestra que la respuesta inmunitaria contra el virus de la rabia fue similar entre los grupos vacunados

A continuación, se realizó un análisis multivariado utilizando un análisis de componentes principales (PCA, Fig. 2) para obtener una vista más global de la respuesta inmune, para evaluar la correlación entre parámetros y para calcular las puntuaciones para facilitar la comparación entre grupos.

Entre los nueve parámetros inmunes considerados como relevantes, el número de células B de memoria no fue seleccionado para el PCA, ya que la presencia o ausencia de este parámetro no tuvo ningún impacto en los resultados.

El primer componente principal de la respuesta inmune representó el 86.0% de la varianza total, mientras que el segundo componente obtuvo una puntuación del 6.6% de la varianza total. Cada perro se caracterizó por dos puntuaciones. El peso de cada parámetro dentro de cada puntuación se presenta en la Tabla 1. La puntuación 1 (el eje principal de variación) fue determinada principalmente por la combinación de IgG1, el IgG total y las concentraciones de anticuerpos neutralizantes séricos, el índice de avidez de anticuerpos y el número de células plasmáticas. La puntuación 2 fue principalmente definida por los siguientes parámetros: liberación de IFN- γ e IL-10 y el número de células secretoras de IFN- γ .

El PCA permitió la discriminación de las respuestas inmunitarias entre el grupo vacunado con EURICAN® DAPPi-Lmulti y los grupos vacunados contra la rabia con RABISIN® solo o inyectado en conjunto con la vacuna combinada.

Una distribución normal, modelando la distribución de valores individuales, se representa para la puntuación 1 en la Fig. 3a y para la puntuación 2 en la Fig. 3b. Las distribuciones de la puntuación 1 de los grupos que reciben RABISIN®, pero no de

Tabla 1

Variación total de la puntuación 1 y 2 y el peso de los diferentes parámetros específicos de la rabia para cada puntuación.

Variación total (%)	Puntuación 1	Puntuación 2
	86.0	6.6
Naturaleza de la respuesta	Parámetro	Peso del parámetro individual para cada puntuación
Respuesta humoral	Anticuerpo neutralizante del suero	0.636
	Índice de la avidez de Anticuerpos	0.396
	Total IgG	0.367
	IgG1	0.326
Respuesta celular	Células plasmáticas	0.282
	Células secretoras de IFN- γ	0.225
	Secrección de IFN- γ	0.199
	Secrección IL-10	0.169
		0.283
		0.124
		0.135
		0.089
		-0.170
		0.303
		0.649
		0.580

perros vacunados con EURICAN® DAPPi-Lmulti solo, fueron muy superpuestos, ilustrando la alta similitud de la respuesta inmune contra la rabia (Fig. 3a). Para la puntuación 2 (Fig. 3b), las distribuciones de nuevo diferenciaron el grupo de control (EURICAN® DAPPi-Lmulti solo) y los inyectados con RABISIN®, que fueron similares.

4. Discusión

La eficacia de las vacunas veterinarias se demuestra generalmente por su capacidad para proteger a los animales vivos contra el desafío con un agente infeccioso virulento. Si los correlatos de protección han sido previamente validados, se pueden utilizar para reemplazar los desafíos infecciosos. Sin embargo, los correlatos de protección no siempre son identificados y cuando lo son, la validación de esos correlatos requiere experimentos de vacunación/desafío. Para la mayoría de las vacunas existentes contra las principales enfermedades infecciosas de perros y gatos, la eficacia se demuestra mediante la vacunación y el desafío infeccioso al inicio de la inmunidad y varios puntos de tiempo después de la vacunación para apoyar la duración de las declaraciones de inmunidad. En el caso de las vacunas combinadas, debe demostrarse la eficacia y la duración de la inmunidad para cada componente de la formulación final. A pesar de un conjunto considerable de datos de eficacia para vacunas bien caracterizadas, estudios de eficacia se repiten a menudo cuando el fabricante quiere mejorar una vacuna. Por ejemplo, en Europa, apoyar una afirmación de que las vacunas pueden ser coadministradas, ya sea mezclándolas en la misma jeringa o administrándolas en sitios separados, puede requerir repetir estudios de eficacia, incluida la duración de la inmunidad. Del mismo modo, la adición de un antígeno a una vacuna combinada puede requerir la repetición de los estudios de eficacia para todos los componentes individuales.

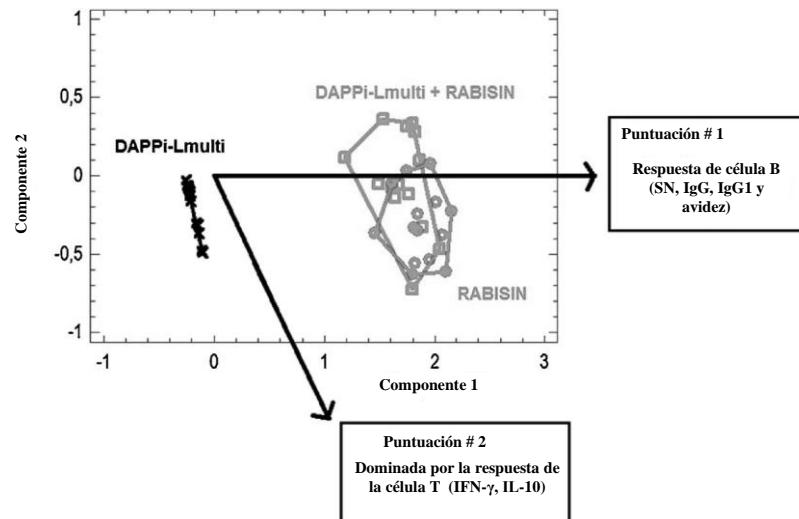


Fig. 2. Análisis de componentes principales de la respuesta inmune específica a antígenos de virus de rabia canina en los diferentes grupos de perros vacunados. Estas dos puntuaciones expresaron colectivamente las variaciones de las características intercorrelacionadas asociadas con el eje correspondiente. Cada perro de cada grupo se caracteriza por 2 puntuaciones y está representado por un punto en la figura.



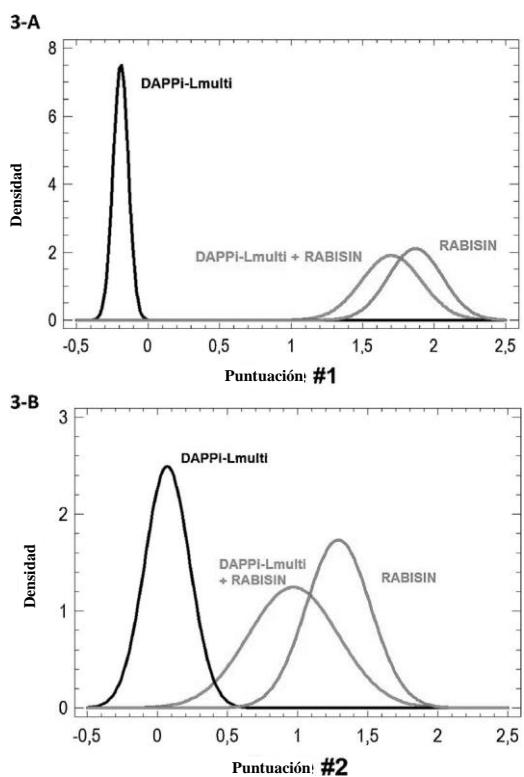


Fig. 3. Distribución normal de puntuaciones individuales para cada grupo. La distribución de cada puntuación (A- puntuación 1; B- puntuación 2) dentro de cada grupo se modeló por medio de una distribución normal. Las tres distribuciones normales se representaron a lo largo de cada eje, para comparar la respuesta inmune al antígeno del virus de la rabia canina en grupos vacunados con RABISIN®, EURICAN® DAPPI-Lmulti o RABISIN® + EURICAN® DAPPI-Lmulti.

Proponemos una alternativa para la evaluación de la inmunogenicidad de las vacunas basada en la evaluación de varios parámetros de la respuesta inmune específica al antígeno. La llamada 'huella inmune' refleja la calidad y magnitud de las respuestas inmunitarias a través del análisis de varios parámetros específicos. Ser un correlato de protección no es un requisito previo para que se seleccione un parámetro. Los parámetros pueden ser correlatos de protección o sustitutos de la protección. Plotkin (2010) definió un correlato de la protección como una respuesta inmune responsable de, y estadísticamente interrelacionado con, la protección. Por el contrario, un sustituto de la protección fue definido como una respuesta inmune que sustituye a la verdadera correlación inmunológica de la protección, que puede ser desconocida o no fácilmente medible. En situaciones en las que el verdadero correlato de la protección es desconocido o difícil de medir o es multidimensional, las pruebas sustitutas (generalmente mediciones de anticuerpos) deben ser suficiente como predictores de protección por las vacunas (Plotkin, 2008).

Para el presente estudio, las técnicas que miden las respuestas de las células B y T al virus de la rabia canina fueron desarrollados y seleccionados por su relevancia. Apoyados por la literatura disponible para evaluar este enfoque de la huella inmune, nos centramos en la respuesta inmune contra la rabia, en el marco de un estudio de compatibilidad para validar la posibilidad de coadministrar las vacunas RABISIN® y EURICAN® DAPPI-Lmulti por inyección simultánea en dos sitios diferentes. La inmunidad inducida por la vacuna contra la rabia está bien descripción en la literatura y el anticuerpo IgG neutralizante del virus contra la glicoproteína G de la rabia es un correlato bien establecido de protección en humanos (McGettigan, 2010). Sin embargo, las respuestas celulares T o NK también son componentes de la respuesta inmunitaria antirrábica (Hooper et al., 1998; Johnson et al., 2010; Horowitz et al., 2010; McGettigan, 2010). En particular, las células T CD8⁺ desempeñan un papel en el aclaramiento viral inducido por la vacuna y las células T CD4⁺ son necesarias para el desarrollo de anticuerpos antirrábicos (McGettigan, 2010). Se desarrolló un conjunto de técnicas que miden las respuestas inmunitarias celulares y humorales a la rabia y se seleccionaron nueve marcadores inmunes relevantes sobre la base

de su ciudad especificidad y la magnitud de la respuesta inmune. Tanto la magnitud como la calidad de la respuesta humoral contra la rabia se evaluaron con la neutralización del virus y las concentraciones de anticuerpos IgG, así como las concentraciones de los isótipos IgG (IgG1) específicos de la rabia y un índice de avidez de anticuerpos. Poco se sabe sobre las características funcionales de las cuatro diferentes subclases IgG en el perro. La mayoría de los estudios se han publicado en leishmaniosis canina donde el patrón de las diferentes subclases de IgG puede permitir la distinción entre animales vacunados, infectados o recuperados (Quinnell et al., 2003; Day, 2007; Oliveira et al., 2009). En un estudio, se informó que los perros infectados asintomáticamente tenían una respuesta IgG1 dominante, mientras que los perros sintomáticos tenían un patrón mixto de uso de la subclase IgG y animales vacunados tenían altas concentraciones de anticuerpo IgG2 específico de *Leishmania* (Oliveira et al., 2009). La avidez (afinidad funcional) es un parámetro de unión importante que caracteriza la fuerza de unión entre un antígeno y un anticuerpo. En diferentes enfermedades humanas, el índice de avidez puede diferenciar las infecciones recientes de las pasadas y también puede medir la eficacia de la vacunación (Goldblatt et al., 1998; Gulati et al., 2005; Denoël et al., 2007; Gaudy-Graffin et al., 2010).

La memoria, tanto efectora como central, es clave para el éxito de las vacunas en el uso práctico. En general, la memoria central es más útil en enfermedades con largos períodos de incubación, pero la memoria efectora, incluyendo la persistencia de células que producen anticuerpos, es fundamental para la protección contra la mayoría de las infecciones (Plotkin, 2013). Cuantificamos dos tipos de células B específicas de la rabia: células plasmáticas de corta duración (células secretoras IgG) y células B de memoria circulantes. Se espera que el último sea un buen reflejo del conjunto de memoria de células B del cuerpo total y puede proliferar rápidamente y diferenciarse en células de plasma después de la exposición repetida al antígeno inmunizante inicial (Nanan et al., 2001). Adaptamos las técnicas utilizadas en humanos y ratones para expandir y diferenciar las células B de memoria de cultivos PBMC enteros en el perro (Buisman et al., 2009). Se realizaron varios experimentos de validación para definir las condiciones óptimas para la activación polyclonal de las células de memoria B y probamos diferentes CpG o activadores polyclonales. En estos ensayos, las células de memoria B podrían detectarse varias semanas o meses después de la vacunación, mientras que las células secretoras de IgG podrían detectarse 2 semanas, pero no 1 mes, la vacunación post-rabia. Aunque estábamos limitados por la disponibilidad de reactivos específicos de perro, desarrollamos técnicas para evaluar la función de células T y el balance Th1/Th2 según lo determinado por la medición de diferentes citocinas. Las citocinas secretadas durante la restimulación *ex-vivo* de las PBMC fueron cuantificadas; IL-2, IFN-γ y TNF-α se consideran representativos de una respuesta Th1, mientras que IL-6 e IL-10 están más asociados con el Th2 y las respuestas antiinflamatorias, respectivamente (Baneth et al., 2008). Las respuestas específicas y cuantificables de IFN-γ e IL-10 se midieron en los perros vacunados contra la rabia.

La producción de otras citocinas no fue específica para la vacuna contra la rabia. Se demostró que las células NK eran importantes contribuyentes a la población de linfocitos efectores durante la respuesta de recuperación a la vacunación contra la rabia en humanos (Horowitz et al., 2010). Esta respuesta, que se produce muy rápidamente, dependía de células T CD4+ de memoria IL-2, así como IL-12 e IL-18 de células accesorias (Horowitz et al., 2010). Junto con las células T específicas, las células NK representan una producción significativa de IFN-γ produciendo células tras la restimulación de PBMC con antígeno de rabia inactivada en humanos vacunados (Horowitz et al., 2010). Estudiar más específicamente la producción de IFN-γ por células NK podría ser una forma indirecta de medir la respuesta de las células T de memoria específicas (Horowitz et al., 2010) y, por lo tanto, podría ser un parámetro adicional de interés para nuestro panel. Los marcadores inmunes seleccionados se analizaron utilizando un enfoque multivariado (análisis de componentes principales). PCA permite la identificación de un número menor de variables no correlacionadas, los componentes principales, de una gran colección de datos posiblemente correlacionados. El objetivo de PCA es explicar la mayor parte de la varianza observada con el menor número de componentes principales. Este análisis estadístico multivariado también se ha utilizado para estudiar la respuesta inmune efectora humana y la memoria después de la vacunación de la influenza inactivada (Bonduelle et al., 2013) o para comparar la memoria inmune adaptativa a la Influenza 1 año después de la vacunación.



una infección leve o grave o de la vacunación (Bonduelle et al., 2014). En el presente estudio, el PCA permitió el cálculo de dos puntuaciones, que caracterizaron las respuestas inmunitarias de las células B y T, respectivamente. La puntuación 1, que tiene el mayor peso en la respuesta a las vacunas contra la rabia, fue principalmente definida por IgG1, las concentraciones totales de IgG y anticuerpos neutralizantes séricos, el índice de avidez de anticuerpos y el número de células plasmáticas, representando así la respuesta de las células B. La puntuación 2 fue definida por las respuestas específicas al antígeno IFN-γ e IL-10, parámetros de la respuesta de las células T. Estas puntuaciones de PCA proporcionan otra manera de ilustrar la respuesta dominante de las células B necesarias para proporcionar protección contra la rabia. El PCA discriminaba entre el grupo de control que recibió la vacuna EURICAN® DAPPi-Lmulti de los grupos que recibieron RA- BISIN® solo o co-inyectado con la vacuna combinada. La respuesta inmunitaria del virus de la rabia canina no se diferenció en forma significativa cuando la vacuna contra la rabia se inyectó sola o en combinación con EURICAN® DAPPi-Lmulti para todos los parámetros, excepto para las respuestas IL-10 e IFN-γ. Sin embargo, la diferencia en el número de células secretoras de IFN-γ tenía una baja importancia biológica puesto que la cantidad de IFN-γ liberado no difirió significativamente entre estos grupos. Además, a pesar del papel desempeñado por IL-10 en la regulación de la respuesta inmunitaria, esta última no fue afectada por la menor secreción de esta citocina en el grupo vacunado con ambas vacunas. Es importante destacar que la relación entre IFN-γ e IL-10 no fue modificada, lo que sugiere una respuesta de célula T similar en ambos grupos. Por lo tanto, el análisis confirmó la similitud entre las respuestas inmunitarias de la rabia inducidas por RABISIN® solo o asociado con la vacuna combinada administrada en dos sitios de inyección diferentes.

La huella inmune da una imagen global de la respuesta inmune inducida por una vacuna. En el mismo espíritu que el 'enfoque de consistencia' (Hendriksen et al., 2008), la huella inmune se puede considerar como un conjunto de marcadores fiables de eficacia, siempre que se aplique a una vacuna con un proceso de producción confiable y una eficacia demostrada. El uso de un conjunto de parámetros inmunes proporciona más información sobre la calidad de la respuesta inmune específica que un único correlato de protección. Este enfoque no pretende reemplazar el desafío infeccioso por una nueva vacuna o componente en una vacuna existente. Sin embargo, podría ser un sustituto de los estudios de eficacia por desafío en el contexto específico de vacunas con un proceso de fabricación fiable y una eficacia ya demostrada. Por ejemplo, las nuevas combinaciones de vacunas existentes podrían evaluarse sin volver a demostrar la eficacia por desafío. Otra aplicación potencial es una modificación importante de un componente de una vacuna combinada, que no se espera que altere la inmunogenicidad general de sus componentes sin cambios, como una actualización de deformación unitaria para que coincida con la actual epidemiología de campo o una modificación del proceso de producción de un componente (es decir, un cambio de células o medio de cultivo, el uso de un nuevo agente de inactivación). Si la huella inmune detecta una modificación significativa de la respuesta inmune, seguirían siendo necesarios más estudios o desafíos.

Las limitaciones del enfoque de la huella inmune están relacionadas con el desarrollo de técnicas inmunológicas, la disponibilidad de reactivos para las especies animales en particular, el estado del conocimiento y la variabilidad inmunológicas y biológica. Se podrían encontrar obstáculos técnicos para algunos componentes de las vacunas y la gama de herramientas desarrolladas puede estar limitada por el estado actual de la técnica. La respuesta inmunitaria a las bacterias es menos caracterizada y hay disponibles bien validados paneles de herramientas inmunológicas para sólo un número limitado de especies animales domésticas. La variabilidad inmunológica y biológica observada en las respuestas inmunitarias individuales (que también se observa durante los desafíos) requiere la comparación de los resultados de diferentes grupos en el mismo ensayo. Sin embargo, la huella inmune de varios抗原s se puede determinar en un solo estudio, mientras que se requieren varios ensayos si la eficacia se demuestra por desafíos infecciosos. En la Unión Europea, se han actualizado recientemente las directrices de la eficacia para vacunas combinadas y para la asociación de vacunas. En esas directrices, sólo se acepta una correlación validada de la protección como sustituto de los estudios de desafío. El concepto de la huella inmune sería otra alternativa a los desafíos infecciosos siempre que sea aceptado.

por las autoridades reguladoras.

5. Conclusiones y perspectivas

Se desarrollaron parámetros inmunológicos para evaluar la vacunación contra la rabia en el perro y un enfoque estadístico innovador para permitir un análisis multiparamétrico de la respuesta inmunitaria inducida por la vacuna contra la rabia. La respuesta inmunitaria a RABISIN® después de una sola dosis de la vacuna contra la rabia se caracteriza por una respuesta específica de células B con altas concentraciones de anticuerpos neutralizantes, IgG de alta avidez, así como IgG1, células plasmáticas circulantes específicas de la rabia y células de memoria B. Respuestas de células T específicas también se observaron para la producción de IL-10 e IFN-γ por las PBMC y para el número de células secretoras de IFN-γ. El PCA identificó dos puntuaciones principales que representaban la respuesta inmune dominada por las respuestas de la célula B en la puntuación 1 y en un nivel inferior por las respuestas de la célula T en la puntuación 2.

La huella inmune analizada por un PCA demostró y confirmó la compatibilidad para el antígeno de la rabia entre RABISIN® y EURICAN® DAPPi-Lmulti. En este contexto, el enfoque de la huella inmune también podría aplicarse a otros componentes virales de la vacuna combinada y luego reemplazar los experimentos de desafío para productos bien establecidos para evaluar la compatibilidad entre dos vacunas.

Financiación

Esta investigación no recibió ninguna subvención específica de agencias de financiación en los sectores público, comercial o sin fines de lucro.

Exoneración de responsabilidad

Este documento se proporciona solo para fines científicos. Cualquier referencia a una marca o marca comercial en este documento es sólo con fines informativos y no está destinado a ningún propósito comercial o a diluir los derechos de los respectivos propietarios de la marca comercial.

Agradecimientos

Los autores desean reconocer a Merial R & D por su ayuda. Los resultados seroneutralizadores se llevaron a cabo en ANSES (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail, Technopôle Agricole et Vétérinaire B.P 40009, 54220 Malzéville) gracias al equipo DR Florence CLIQUET. Nos gustaría dar las gracias a Laure Vergne por su contribución técnica.

Referencias

- Baneth, G., Koutinas, A.F., Solano-Gallego, L., Bourdeau, P., Ferrer, L., 2008. Leishmaniosis canina: nuevos conceptos y perspectivas sobre una zoonosis en expansión: primera parte. *Trends Parasitol.* 24, 324–330.
- Bonduelle, O., Yahia, N., Siberil, S., Benhabiles, N., Carrat, F., Krivine, A., Rozenberg, F., Dimitrov, J., Kaveri, S.V., Curjol, A., Tindel, M., Louet, M., Desert, F., Launay, O., Loulergue, P., Badre, G., Katlama, C., Bricaire, F., Samri, A., Rousset, D., van der Werf, S., Jauréguierry, S., Combadiere, B., 2013. Biomodelo longitudinal e integrador de los comportamientos inmunes del efector y de la memoria después de la vacunación inactivada contra la gripe. *J. Immunol.* 191, 623–631.
- Bonduelle, O., Carrat, F., Luyt, C.E., Leport, C., Mosnier, A., Benhabiles, N., Krivine, A., Rozenberg, F., Yahia, N., Samri, A., Rousset, D., van der Werf, S., Autran, B., Combadiere, B., 2014. Caracterización de la firma de la memoria inmune de la influenza pandémica después de la vacunación o infección. *J. Clin. Invest.* 124, 3129–3136.
- Bouvet, J., Cariou, C., Valfort, W., Villard, S., Hilaire, F., Oberli, F., Cupillard, L., Guigal, P.M., 2016. Eficacia de una vacuna canina multivalente DAPPi-Lmulti contra mortalidad, signos clínicos, infección, excreción bacteriana, transporte renal y lesiones renales causadas por desafíos experimentales de Leptospira. *Vaccine* 34, 23–28.
- Buisman, A.M., de Rond, C.G., Oztürk, K., Ten Hulscher, H.I., van Binnendijk, R.S., 2009. Presencia a largo plazo de células B de memoria específicas para diferentes componentes de la vacuna. *Vaccine* 28, 179–186.
- Clquet, F., Aubert, M.F.A., Sagné, L., 1998. Desarrollo de una prueba de neutralización del virus de anticuerpos fluorescentes (prueba FAVN) para la cuantificación de anticuerpos neutralizantes de la rabia. *J. Immunol. Methods* 212, 79–87.
- Day, M.J., 1996. Subclases de IgG de autoanticuerpos anti-eritrocitos, antinucleares y anti-tirotoglobulina caninos. *Res. Vet. Sci.* 6, 129–135.

Pagan Michel



- Day, M.J., 2007. Distribución de la subclase de inmunoglobulina G en la leishmaniosis canina: una revisión y análisis de las dificultades en la interpretación. *Vet. Parasitol.* 147, 2–8.
- Day, M.J., 2012. Immunología del perro y el gato, segunda edición, revisada y actualizada. Manson Publishing Ltd., The Veterinary Press, London, UK 448 pp.
- Denoël, P.A., Goldblatt, D., de Vleeschauwer, I., Jacquet, J.M., Pichichero, M.E., Poolman, J.T., 2007. Calidad de la respuesta de anticuerpos *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) inducida por la tos ferina difterica-tétanos-acelular / Vacunas combinadas Hib. *Clin. Vaccine Immunol.* 14, 1362–1369.
- Dimitrov, J.D., Lacroix-Desmazes, S., Kaveri, S.V., 2011. Parámetros importantes para la evaluación de la avidez de anticuerpos mediante un ensayo inmunosorbente. *Anal. Biochem.* 418, 149–151.
- Agencia Europea de Medicamentos, 2013. Directriz sobre los requisitos para las vacunas combinadas y las asociaciones de medicamentos veterinarios inmunológicos (IVMP). Comité de Medicamentos de Uso Veterinario (CVMP) EMA / CVMP / IWP / 594618/2010.
- Gaudy-Graffin, C., Lesage, G., Kousignant, I., Laperche, S., Girault, A., Dubois, F., Goudeau, A., Barin, F., 2010. Uso de un ensayo de avidez de IgG del virus anti-hepatitis C (VHC) para identificar una infección reciente por VHC. *J. Clin. Microbiol.* 48, 3281–3287.
- Goldblatt, D., Pinto Vaz, A.R.J.P.M., Miller, E., 1998. La avidez de anticuerpos como un marcador sustituto del cebado exitoso por las vacunas conjugadas de *haemophilus influenzae* tipo b después de la inmunización infantil. *J. Infect. Dis.* 177, 1112–1115.
- Gulati, U., Kumari, K., Wu, W., Keitel, W.A., Air, G.M., 2005. Cantidad y avidez de los anticuerpos séricos contra las glucoproteínas nativas y el virus desnaturalizado después de la vacunación repetida contra el virus de la gripe. *Vaccine* 23, 1414–1425.
- Hendriksen, C., Arciniega, J.L., Bruckner, L., Chevalier, M., Coppens, E., Descamps, J., Duchêne, M., Dusek, D.M., Halder, M., Kreeftenberg, H., Maes, A., Redhead, K., Ravetkar, S.D., Spieser, J.M., Swam, H., 2008. El enfoque de coherencia para el control de calidad de las vacunas. *Biologicals* 36, 73–77.
- Hooper, D.C., Morimoto, K., Bette, M., Weihe, E., Koprowski, H., Dietzschold, B., 1998. Colaboración de anticuerpos e inflamación en la eliminación del virus de la rabia del sistema nervioso central. *J. Virol.* 72, 3711–3719.
- Horowitz, A., Behrens, R.H., Okell, L., Fooks, A.R., Riley, E.M., 2010. Células NK como efectores de respuestas inmunes adquiridas: activación efectora dependiente de células T CD4 + de células NK después de la vacunación. *J. Immunol.* 185, 2808–2818.
- Johnson, N., Cunningham, A.F., Fooks, A.R., 2010. La respuesta inmune a la infección por el virus de la rabia y la vacunación. *Vaccine* 28, 3896–3901.
- McGettigan, J.P., 2010. Vacunas experimentales contra la rabia para humanos. *Expert Rev. Vaccines* 9, 1177–1186.
- Minke, J.M., Bouvet, J., Cliquet, F., Wasniewski, M., Guiot, A.L., Lemaitre, L., Cariou, C., Cozette, V., Vergne, L., Guigal, P.M., 2009. Comparación de las respuestas de anticuerpos después de la vacunación con dos vacunas inactivadas contra la rabia. *Vet. Microbiol.* 133, 283–286.
- Nanan, R., Heinrich, D., Frosch, M., Kreth, H.W., 2001. Efectos agudos ya largo plazo de la inmunización de refuerzo en las frecuencias de los linfocitos B con memoria específica de antígeno. *Vaccine* 20, 498–504.
- Oliveira, T.M., Mineo, T.W., Bason, M., Day, M.J., Machado, R.Z., 2009. Perfil de subclase IgG de anticuerpos séricos contra *Leishmania chagasi* en perros infectados y vacunados de forma natural. *Vet. Parasitol.* 162, 16–22.
- Plotkin, S.A., 2008. Vacunas: correlatos de la inmunidad inducida por la vacuna. *Clin. Infect. Dis.* 47, 401–409.
- Plotkin, S.A., 2010. Correlatos de la protección inducida por la vacunación. *Clin. Vaccine Immunol.* 17, 1055–1065.
- Plotkin, S.A., 2013. Correlatos complejos de protección después de la vacunación. *Clin. Infect. Dis.* 56, 1458–1465.
- Quinnell, R.J., Courtenay, O., Garcez, L.M., Kaye, P.M., Shaw, M.A., Dye, C., Day, M.J., 2003. Respuestas de la subclase de IgG en un estudio longitudinal de leishmaniasis visceral canina. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 91, 161–168.
- Russell, W.M.S., Burch, R.L., 1959. Los principios de la técnica experimental humana. Methuen, Londres 238 pp.
- Smolander, H., Koskinen, J.O., Vainionpää, R., Meltola, N.J., Lappalainen, M., Hedman, K., Soini, A.E., 2010. Una nueva metodología de avidez de anticuerpos para el diagnóstico serológico rápido en el punto de atención. *J. Virol. Methods* 166, 86–91.

