

**Universidad de La Habana
Facultad de Ciencias Médicas.**

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología

**Inmunogenicidad y seguridad de la vacuna sintética Quimi-Hib y
de la vacuna pentavalente TRIVAC-HB + Quimi-Hib concentrada**

**Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor
en Ciencias de la Salud.**

Dania Mercedes Bacardí Fernández

La Habana
2013

**Universidad de La Habana
Facultad de Ciencias Médicas.**

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología

**Inmunogenicidad y seguridad de la vacuna sintética Quimi-Hib y
de la vacuna pentavalente TRIVAC-HB + Quimi-Hib concentrada**

**Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor
en Ciencias de la Salud.**

Autor: MSc. Dania Mercedes Bacardí Fernández

Tutores:

- Prof. Tit., Karelia Cosme Díaz, Dra C.
- Prof. Tit., Nelson Merino García, Dr C.

La Habana
2013

AGRADECIMIENTOS

En pocas líneas deseo agradecer a todas aquellas personas que de una forma u otra contribuyeron a lograr este gran éxito en mi vida y llevarlo a feliz término. Cada uno de ellos merecen mi eterna gratitud.

- A mis padres, a los que les debo la vida y por infundirme la fuerza, energía y seguridad para seguir adelante, a mis hijos y esposo por su gran amor, preocupación, impulso y apoyo incondicional brindado durante mi vida.
- A los Drs. Gustavo Sierra, Juan Francisco Infante y Jorge Luis Vega, inestimables amigos que trillaron y vencieron obstáculos que obstruían mi camino.
- A mis compañeros: Lizet, Ancizar, Dioslaida, Yutdelis Lina, Juan Carlos, Roberto, Leticia, que sin su labor, ayuda y empeño no sería posible la realización de este trabajo.
- A la Dra. Carmen Bacardí Noriega que desde niña me inculcó el amor hacia los seres humanos y a la ciencia cubana.
- A los oponentes de la predefensa la Dra Maria Antonia Torres y el Dr Reinaldo Acevedo Grogues por su seriedad e inestimable revisión.
- Finalmente y no menos importantes, mis tutores que con su experiencia, oportunos consejos y paciencia me guiaron en este difícil camino.
- Al CIGB, querida institución, que ha sido mi gran escuela.

A todos, muchas gracias.

SÍNTESIS

Numerosas enfermedades son controladas gracias al empleo de vacunas, por este motivo, su constante mejora es una de las prioridades en el ámbito de la investigación. Los avances en el conocimiento de la respuesta inmune y en las técnicas de biología molecular obtenidos en los últimos años, han permitido identificar un gran número de proteínas y polisacáridos de diferentes orígenes de interés inmunológico. Ellos en su forma natural o recombinante (proteínas) han formado parte de vacunas mundialmente establecidas. Sin embargo, lograr que estas estructuras sintéticas tengan similar actividad biológica y seguridad ha constituido el reto de las nuevas generaciones en el campo de la vaccinología. Uno de los principales obstáculos de las moléculas sintéticas, parece ser su escasa inmunogenicidad, por lo que precisan el concurso de proteínas transportadoras capaces de aumentar su antigenicidad. La Universidad de la Habana en colaboración con el CIGB logró obtener un candidato vacunal contra el *Haemophilus influenzae* tipo b con el polisacárido de interés de origen sintético. Evaluar su seguridad como vacuna monovalente y formando parte de vacunas polivalentes constituyó un desafío para el primer candidato vacunal global con principio activo sintético. Las bondades y ventajas de las vacunas polivalentes y/o combinadas las hace más atractivas para su aplicación en los programas masivos de inmunización. En el presente trabajo se exponen los resultados de estudios preclínicos realizados a la vacuna sintética Quimi-Hib y de la formulación pentavalente de este antígeno junto a otros de diferentes orígenes. Se demostró en estudios toxicológicos que la vacuna sintética Quimi-Hib era segura y tolerable, y que en la formulación pentavalente era capaz de inducir una respuesta inmunológica similar a la de cada componente independiente, sin que ocurriera interferencia e incompatibilidad entre los mismos, y se confirmó que la vacuna TRIVAC-HB+Quimi-Hib concentrada constituye una formulación balanceada, estable y atóxica. A partir de estos resultados se logró la autorización del CECMED para la realización de estudios clínicos y del registro de ambas vacunas. La posterior introducción de estas en el programa de inmunización cubano, representan un importante aporte a la salud de la población cubana y constituye un substancial renglón económico por existir gran demanda de estas a nivel mundial.

ÍNDICE	Pág.
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	7
2.1. <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b.....	7
2.1.1. Incidencia	8
2.1.2. Inmunidad activa	9
2.2. Aspectos generales de Difteria.....	10
2.3. Aspectos generales de Tétanos.....	11
2.4. Aspectos generales de Tosferina.....	12
2.5. Aspectos generales de Hepatitis B.....	13
2.6. Aspectos generales de las vacunas DPT.....	13
2.7. Vacunas Combinadas	14
2.8. Breve reseña sobre el desarrollo de adyuvantes	15
2.8.1. Sales de aluminio como adyuvantes de vacunas	17
2.8.2. Mecanismos de acción de los adyuvantes de aluminio	18
2.9 Elementos previos a la administración en humanos.....	19
2.10 Estudios Toxicológicos Preclínicos.....	19
2.10.1 Estudios de toxicidad aguda	21
2.10.2 Estudios de tolerancia local.....	21
2.10.3 Estudios de toxicidad a dosis repetidas	21
2.10.4 Estudios de la función reproductiva	22
2.10.5 Estudios de carcinogenicidad y mutagenicidad.....	22
2.10.6 Estudios de neurotoxicidad	22
2.10.7 Estudios de inmunotoxicidad	23
3. MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES.....	24
3.1. Diseño experimental de la tesis.....	24
4. INMUNOGENICIDAD	26
4.1 Materiales y métodos.....	26
4.1.1 Determinación de los títulos de anticuerpos contra Hib.....	26
4.1.2 Evaluaciones de inmunogenicidad y potencia de los antígenos de D, P, T, HB y Hib-TT. Ingredientes activos de la vacuna pentavalente Trivac-HB + Quimi-Hib concentrada	27
4.2 Resultados.....	29
4.2.1 Determinación de los títulos de anticuerpos contra Hib.....	29
4.2.2 Evaluaciones de inmunogenicidad y potencia de los antígenos de D, P, T, HB y Hib-TT. Ingredientes activos de la vacuna pentavalente Trivac-HB + Quimi-Hib concentrada	30
4.3 Discusión.....	33
5. SEGURIDAD PRECLÍNICA	36

5.1 Materiales y métodos	36
5.1.1. Sustancia de ensayo.....	36
5.1.2. Animales de experimentación	37
5.1.3. Diseño experimental.....	37
5.1.4. Observaciones clínicas, sacrificio y toma de muestras	41
5.1.5. Procesamiento de datos	41
5.1.6. Evaluación de efectos inmunotóxicológicos	42
5.2 Resultados	44
5.2.1- Toxicidad aguda de la vacuna sintética Quimi-Hib	44
5.2.2- Tolerancia local de la vacuna Quimi-Hib	46
5.2.3- Toxicidad a dosis repetidas de la vacuna Quimi-Hib	53
5.2.4- Toxicidad aguda de la vacuna pentavalente TRIVAC-HB + Quimi-Hib concentrada	60
5.2.5- Tolerancia local de la vacuna pentavalente TRIVAC-HB + Quimi-Hib concentrada.....	65
5.2.6- Toxicidad a dosis repetidas de la vacuna pentavalente TRIVAC-HB + Quimi-Hib concentrada	67
5.3 Discusión	76
6. DISCUSIÓN GENERAL	95
7. CONCLUSIONES	99
8. RECOMENDACIONES	100
9. AUTOBIBLIOGRAFÍA	101
9.1- Artículos científicos relacionados con el tema de tesis	101
9.2- Artículos científicos no relacionados con el tema de tesis	102
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107
11. ANEXOS	188

A mi família.

GLOSARIO DE TÉRMINOS

<i>Abreviatura</i>	<i>Significado</i>
Hib	<i>Haemophilus influenzae</i> tipo b
Hib-TT	conjugado de Hib sintético-T
TT	Toxoides tetánico
TRIVAC-HB	Vacuna DPT-HB
SNVMEB	Sistema Nacional de Vigilancia de Meningoencefalitis Bacterianas
DPT	Difteria, Tétanos y Pertussis
PRS	Papera, Rubéola y Sarampión
GSK	GlaxoSmithKline
DTPa	Difteria, Tétanos y Pertussis acelular
DPTe	Difteria, Tétanos y Pertussis de células enteras
VPI	Virus del papiloma
VHB	Virus Hepatitis B
TLR	Del inglés, <i>Toll like receptor</i>
LPS	Lipopolisacáridos
OECD	Del inglés, <i>Organization for the Cooperation and Economic Development</i>
ISO	Del inglés, <i>International Standardization Organization</i>
ICH	Del inglés, <i>International Conference of Harmonization</i>
USD	United States Dollar
CITMA	Ciencias Tecnología y Medio Ambiente
PRP	polisacárido de la cápsula
LCR	líquido céfalo-raquídeo
CECMED	Centro Estatal para el Control de Medicamentos, Cuba
DT	dosis terapéutica
mL	mililitros
Kg	kilogramos
µg	microgramos
mg	miligramos
♀	hembras
♂	machos
OMS	Organización Mundial de la Salud
FDA	Del inglés, <i>Food and Drug Administration</i>
SC	subcutánea
IM	intramuscular
NOAEL	Del inglés, <i>nivel de efectos adversos no observable</i>
Lf	límite de floculación
U.O	unidades de opacidad
CENPALAB	Centro para la Producción de Animales de Laboratorio, Cuba
EMA	Del inglés, <i>European Medicines Agency</i>

1. INTRODUCCIÓN

Las vacunas suponen uno de los mayores logros de la biomedicina, debido a la disminución del índice de mortalidad infantil, la incidencia de enfermedades infecciosas, e incluso la erradicación de algunas de ellas en algunos países.

El *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) es uno de los organismos causantes de meningitis, neumonía, epiglotitis, celulitis, septicemia, artritis, osteomielitis, pericarditis, colangitis, endocarditis y sinusitis (1). La meningitis causada por Hib es una enfermedad muy grave con una tasa de muertes superior al 50 % en algunas partes del mundo. Los reportes de secuelas en supervivientes son altos donde la mitad de ellos presenta daños neurológicos (2). Hasta el momento existen al menos 4 vacunas conjugadas contra el *Haemophilus influenzae* tipo b licenciadas en varios países del mundo, ninguna de producción nacional, ni de origen sintético, entre las que podemos citar: HibTITER de Wyeth Farma, Act-HIB de Aventis Pasteur MSD y HIBERIX de GlaxoSmithKline. Todas ellas constituidas por un fragmento del polisacárido capsular del microorganismo, conocido como poliribosilribitolfosfato unido por un enlace químico (conjugado) a una proteína de origen bacteriano. Estas vacunas han demostrado ser de las más eficaces y seguras de todas las existentes (3-5).

Las vacunas sintéticas consisten en la copia de la secuencia genotípica que contiene información acerca de las proteínas antigénicas procedentes de patógenos y su posterior síntesis por medio de métodos químicos. Las proteínas bacterianas o virales con capacidad antigénica presentan múltiples fragmentos (epítomos) que determinan su especificidad y actividad, pero sólo un número limitado de ellos está relacionado con una respuesta protectora eficaz, pues uno de sus principales obstáculos parece ser su escasa inmunogenicidad (4).

A partir de la disponibilidad en Cuba de vacunas conjugadas importadas eficaces contra Hib, en el año 1999 se alcanzó una cobertura del 97% de la población nacional, cuyo impacto se evaluó mediante el Sistema Nacional de Vigilancia de Meningoencefalitis Bacterianas (SNVMEB). La eficacia de la vacunación se estimó en 99% y la incidencia general de la meningoencefalitis por Hib disminuyó de 1,3 a 0,6 por cada 100 000 habitantes (46,1%), observándose la mayor reducción en niños menores de 5 años (56,1%). En los menores de 1 año se redujo 70,5% y en el resto de los grupos de menores de 5 años disminuyó entre 25,9 y 49,6%. En el grupo diana para la vacunación, la incidencia se redujo 61,1%; entre los niños de este grupo que contrajeron la meningoencefalitis por Hib solamente 8 (24,2%) estaban vacunados, 7 de ellos con una sola

dosis, aplicada un mes antes de enfermar. Se ha demostrado que la vacunación a gran escala de los niños menores de 2 años contra Hib en Cuba a través del SNVMEB ha logrado disminuir notablemente la incidencia de meningococcal meningitis por Hib (6-8).

Hasta el momento, en los programas establecidos mundialmente para combatir enfermedades de la infancia han predominado las vacunas monovalentes, aunque desde décadas anteriores existen vacunas combinadas como la triple bacteriana DPT (*Difteria, Tétanos y Pertussis*) y la triple viral PRS contra la papera, rubéola y sarampión que se introdujo en los años 70. En la actualidad han surgido tendencias a mantener los programas de inmunización con las llamadas vacunas polivalentes o combinadas, en correspondencia con el aumento de las enfermedades previsible por vacunación, unido al gran número de inmunizaciones que se proponen realizar simultáneamente en un corto período de tiempo a los niños durante los primeros meses de vida, además del alto costo de las campañas de vacunación (7-9).

La mezcla de varios antígenos en una vacuna combinada ofrece una serie de beneficios inmediatos tanto para el proveedor del producto como para el receptor del mismo (10). Son varias las bondades y ventajas de las vacunas polivalentes y/o combinadas sobre las vacunas monovalentes, lo que las hace más atractivas para su aplicación en los programas masivos de inmunización por reducir el número de inyecciones así como disminución de riesgos por mala manipulación y la posibilidad de abaratar costos de los programas de vacunación, por concepto del cumplimiento de los requerimientos de transportación, almacenamiento y cadena de frío, lo que hace posible el aumento en la cobertura en los programas de inmunización (10;11).

Debido a estas ventajas son muchos los países que prefieren el uso de estas vacunas combinadas en sus programas de inmunización por lo que han realizado su introducción. Sin embargo, el Dr. Joan Pericas Bosc (12), considera que estas no son suficientes ya que en la actualidad los suministradores fundamentales de estas vacunas se limitan a las compañías GSK y Sanofi Pasteur MSD, representando como titulares a las vacunas tetravalente DPT-HB y pentavalente DPT-HB+Hib y en el caso de la GSK la vacuna hexavalente que incluye DTPa + VPI + Hib + VHB (Infanrix Hexa), de ahí la necesidad de que surgieran otros preparados vacunales con similares características (4;11;13;14). En el año 2004 teniendo en cuenta la tendencia mundial y la necesidad de vacunas polivalentes, en el CIGB de Cuba, se trabajó para lograr el registro de la vacuna combinada tetravalente DPT-HB (TRIVAC-HB[®]) la que fue incorporada al Programa de Vacunación Nacional en el 2005 (15). En este propio año concluyó con resultados satisfactorios

la evaluación clínica de la vacuna pentavalente cubana variante 4+1 en la cual la vacuna tetravalente DPT-HB[®] se mezcla con la vacuna Quimi-Hib concentrada momentos antes de su administración, también llamada Vacuna 4+1 (TRIVAC HB + Quimi-Hib concentrada).

Para el desarrollo de la vacuna pentavalente, era necesario obtener resultados preclínicos satisfactorios de esta formulación con inmunogenicidad equivalente a la de cada antígeno por separado, los que contribuyen en forma decisoria a la fortaleza de la Vacuna 4+1, además de una sólida base científico-técnica en su desarrollo, aplicación en su forma monovalente y combinada de vacunas cubanas: Heberbiovac[®], VaxTex[®] (Anatoxina tetánica), DPT[®] (anatoxinas tetánica y diftérica y *Bordetella pertussis*), HB-Hib, Quimi-Hib y Vacuna TRIVAC-HB[®], estos resultados sustentaron este proyecto y contribuyeron en forma decisoria a la fortaleza de la vacuna pentavalente, los que constituyen un poderoso aval para su uso.

Las vacunas compuestas por varios antígenos son capaces de producir respuesta humoral como es el caso de los 5 antígenos que forman parte de esta vacuna, de ahí la presencia de un adyuvante con el objetivo de favorecer o coadyuvar la producción de anticuerpos ante estos antígenos cuando son inoculados (3;11;13). La posibilidad de contar con una vacuna anti *Haemophilus influenzae* tipo b condiciona la proyección dirigida hacia la obtención y evaluación de una vacuna pentavalente capaz de combinar los efectos seroprotectores contra estas patologías que afectan a los niños en sus primeros años de vida. A su vez la vacuna pentavalente TRIVAC-HB+Quimi-Hib concentrada constituirá la terapia preventiva contra diferentes enfermedades infecto-contagiosas, por ello es necesario realizar los estudios toxicológicos, lo cual nos proporcionará datos acerca de la seguridad del producto previo a su aplicación clínica. Como parte de esta evaluación, un dato importante para la formulación combinada lo constituye la seguridad demostrada de cada preparado vacunal por separado.

Los estudios Toxicológicos para la evaluación de vacunas se basan en criterios descritos en las Regulaciones Internacionales, emitidas estas últimas por la Agencia Europea de Evaluación de Productos Médicos (EMA, siglas en inglés) y las normas de la Conferencia Internacional de Armonización (ICH, siglas en inglés), (16;17) entre otras. Estos diseños están dirigidos a evaluar la seguridad de productos y constituyen un requisito indispensable para la aprobación y realización de estudios clínicos requeridos durante la etapa de investigación-desarrollo y se consideran aspectos claves en la aprobación del uso y comercialización de cualquier producto. Estas evaluaciones constituyen una de las fuentes principales de información para estudiar la

toxicidad de compuestos químicos, incluso los efectos menos evidentes de la exposición aguda y crónica. En estos ensayos la capacidad de manipular las condiciones experimentales permite la evaluación de variables en respuesta a sustancias tóxicas. Sobre esta base nos planteamos la siguiente **hipótesis de trabajo**:

“Las formulaciones resultantes de la adyuvación con fosfato de aluminio de un candidato vacunal sintético monovalente contra el Haemophilus influenzae tipo b o su combinación polivalente con TRIVAC-HB son seguras para su uso en infantes.”

Para demostrar la validez de esta hipótesis se definieron los siguientes **objetivos de trabajo** con sus correspondientes **tareas experimentales**

Objetivo general: Demostrar la seguridad e inmunogenicidad de la vacuna Quimi-Hib y la importancia de su uso como componente de la vacuna pentavalente TRIVAC-HB + Quimi-Hib concentrada.

Objetivos específicos

1. Determinar la respuesta inmunológica inducida por el componente antigénico conjugado Hib-TT.
 - a. Determinación de los títulos de anticuerpos inducidos por el antígeno Hib adyuvado y sin adyugar con fosfato de aluminio, en forma monovalente.
2. Demostrar que la unión de Quimi-Hib concentrada con TRIVAC-HB no interfiere en la respuesta biológica de los cinco antígenos que conforman la formulación pentavalente.
 - a. Demostrar que la inmunogenicidad del componente Hib en la vacuna pentavalente TRIVAC-HB+Quimi-Hib concentrada no es afectada por la mezcla de ambas vacunas
 - b. Demostrar que la potencia de los componentes HB, D, P y T no se afecta al mezclar ambas vacunas.
 - c. Demostrar que los títulos de anticuerpos contra Hib en conejos no se afecta por la mezcla de ambas vacunas para conformar la pentavalente TRIVAC-HB+Quimi-Hib concentrada.
 - d. Demostrar que los títulos de anticuerpos contra HB en ratones no se afecta al mezclar ambas vacunas.
3. Evaluar la seguridad preclínica del candidato vacunal Quimi-Hib, adyuvado con fosfato de aluminio.
 - a. Estudio de la toxicidad aguda del candidato vacunal Quimi-Hib, adyuvado con fosfato de aluminio.

- b. Estudio de la toxicidad a dosis repetidas del candidato vacunal Quimi-Hib, adyuvado con fosfato de aluminio.
- c. Estudio de la tolerancia local del candidato vacunal Quimi-Hib, adyuvado con fosfato de aluminio.
4. Evaluar la seguridad preclínica del candidato vacunal pentavalente TRIVAC-HB+Quimi-Hib concentrada.
 - a. Estudio de la toxicidad aguda del candidato vacunal pentavalente TRIVAC-HB+Quimi-Hib concentrada.
 - b. Estudio de la toxicidad a dosis repetidas del candidato vacunal pentavalente TRIVAC-HB+Quimi-Hib concentrada.
 - c. Estudio de la tolerancia local del candidato vacunal pentavalente TRIVAC-HB+Quimi-Hib concentrada.
5. Evidenciar efectos inmunotoxicológicos producidos tras la administración reiterada del candidato vacunal pentavalente TRIVAC-HB+Quimi-Hib concentrada.
 - a. Determinar efectos inmunotoxicológicos a través de la morfometría de los folículos linfoides del bazo y del conteo de centros germinativos en la vaina linfoide periarteriolar.

El desarrollo de las vacunas profilácticas ha contribuido a un mejoramiento sustancial de la salud humana y la prevención de enfermedades infecto-contagiosas. La **novedad científica** de este trabajo radica en que por primera vez:

- Se demuestra la inmunogenicidad y seguridad preclínica de la vacuna sintética Quimi-Hib, lo que defiende la elección de incluir este antígeno sintético en una nueva formulación vacunal pentavalente.
- Se demuestra la seguridad toxicológica e inmunogenicidad de la vacuna pentavalente TRIVAC-HB+Quimi-Hib concentrada.
- Esta investigación recoge la primera experiencia de aplicación de la morfometría de las estructuras linfoides del bazo en la práctica inmunotoxicológica cubana, con la cual se aportaron nuevos elementos que se han adicionado a los existentes en el estado del arte.
- Los diseños experimentales complejos y específicos empleados permiten contar con una metodología aplicable a la evaluación toxicológica de otros candidatos vacunales de acuerdo con los estándares internacionales.

La investigación presentada también tiene aporte práctico y social debido a que:

- Los resultados obtenidos en este trabajo permitieron lograr el registro y comercialización de ambas vacunas.
- La evaluación preclínica de la eficacia y seguridad de estas vacunas permitió su introducción en el programa de inmunización nacional cubano y representa un importante renglón económico para el país.

La tesis cuenta con un total de 99 páginas de texto, distribuidas en los siguientes acápites: Introducción (6), Revisión Bibliográfica (18), Materiales y Métodos Generales (1). A continuación se presentan dos capítulos correspondientes a cada tipo de evaluación que se abordan en esta tesis. Cada uno de estos contiene acápites de materiales y métodos, resultados y discusión: Capítulo de inmunogenicidad (11 páginas), Capítulo Seguridad preclínica (56 páginas). El documento cuenta, además, con un capítulo de Discusión General (5 páginas), uno de Conclusiones (1 página) y otro de Recomendaciones (1 página). El documento también contiene la Síntesis, el Índice, el Glosario de términos, la Autobibliografía, la lista de Referencias Bibliográficas y los Anexos.

Los resultados que conforman este trabajo forman parte de 2 publicaciones en revistas de alto impacto: *Biotecnología Aplicada* y en la *Revista Española de Toxicología*, 2 registros sanitarios, 9 informes técnicos y 8 premios otorgados por diferentes organizaciones, entre los se encuentra: Premio al mejor artículo científico publicado, Premio especial al resultado de mayor relevancia científica por el CITMA, Premio de la Academia de Ciencias de Cuba en los años 2004 y 2006, Distinción especial en el FORUM Nacional de Ciencia y Técnica, Premio al resultado de mayor trascendencia y originalidad científica y Premio relevante único de la Ciencia de “Desarrollo de la primera vacuna humana con un antígeno sintético”. Estos resultados han sido además expuestos en 6 eventos científicos internacionales y 1 nacional.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Haemophilus influenzae tipo b

El Haemophilus influenzae fue descubierto en 1892, es un cocobacilo pleomórfico, aerobio, gram negativo. Esta bacteria coloniza la mucosa superior del tracto respiratorio de la mayoría de los niños de 3 meses de edad. Aunque la mayoría de las cepas aisladas son no encapsuladas, también existen cepas con una cápsula de polisacárido como el H. influenzae, este se agrupa en seis tipos: del a al f, los que difieren en la cápsula de polisacárido (1).

Las bacterias H. influenzae del tipo b son en gran medida el organismo más virulento de este grupo, pues comúnmente causa invasión de la circulación sanguínea y meningitis en niños pequeños de hasta 2 años.

Hasta la puesta en práctica de los extensos programas de vacunación, los H. influenzae del tipo b eran la causa más común de la meningitis en niños entre las edades de 6 meses y 2 años. Cuya evolución es dolor de cabeza seguido rápidamente por el desarrollo de rigidez en el cuello (18) progresión acelerada al estado de coma, la que en ausencia de tratamiento, conlleva a la muerte.

El esquema terapéutico establecido para el tratamiento de estas infecciones reduce la incidencia, pero no la elimina, quedando secuelas tales como sordera y las inhabilidades en el aprendizaje.

El H. influenzae del tipo b, también causan celulitis y epiglotitis, una condición en la cual la epiglotis se inflama, provocando un estrechamiento de las vías aéreas superiores. Estos organismos colonizan la nasofaringe y se propagan de un ser humano a otro por el contacto directo o vía secreciones y/o aerosol (18).

Durante muchos años se pensó que el anticuerpo bactericida dirigido contra la cápsula de PRP del Haemophilus influenzae del tipo b era el responsable de la resistencia del anfitrión a la infección. Sin embargo, estudios más recientes han demostrado el papel determinante del anticuerpo y de los antígenos somáticos. De ahí que, el anticuerpo anti PRP se puede detectar a menudo en los sueros de niños en la admisión al hospital con sepsis debido al H. influenzae del tipo b. La separación de la membrana externa del Hib y otros componentes de la proteína por electroforesis en gel de poliacrilamida, combinado con el análisis de las respuestas del anticuerpo durante la infección, ha sugerido que el anticuerpo reconoce un número determinado de proteínas individuales de la membrana, asociándolas a la respuesta inmune desencadenada (6;7).

2.1.1. Incidencia

Países industrializados: La mayoría de los estudios de incidencia están enfocados a infecciones invasivas incluyendo meningitis, sepsis, neumonías bacteriémicas y otros síndromes como epiglotitis; que están acompañadas de la presencia de este organismo en sitios normalmente estériles como la sangre, el líquido céfalo-raquídeo (LCR), el líquido pleural y otros. De ellos se puede estimar que la meningitis causada por el *H. influenzae* tipo b se corresponde con alrededor de 8 y 60 casos por cada 100.000 niños menores de 5 años y en la incidencia de todas las enfermedades invasoras entre 21 y 100 casos por cada 100.000 niños menores de 5 años (5). En tiempos precedentes a la vacuna contra el Hib, todos los años unos 20,000 niños en EE.UU. menores de 5 años de edad contraían una forma grave de la enfermedad y de ellos unos 1,000 morían.

Países en vías de desarrollo: Estudios sobre la incidencia de Hib en meningitis y enfermedades invasoras en estos países son muy limitados. Para poder realizar estos cálculos se requiere que la farmacovigilancia sea realizada en poblaciones definidas, de tamaño conocido y por lo general, muchos de los resultados disponibles son puntuales de un hospital o centro de salud donde no se puede estimar la población atendida y por lo tanto tampoco determinar la incidencia de la enfermedad.

Análisis realizado por el Banco Mundial: mostró los resultados obtenidos de un estudio que incluyó más de 50 países en las 6 regiones categorizadas por esta entidad: África, Asia, Europa, América Latina y el Caribe, América del Norte y Oceanía. Esta información permite inferir que la incidencia de las afecciones causadas por Hib varía de acuerdo a las regiones. En Asia se estima en 6 casos por cada 100.000 niños menores de 5 años, en América del Sur entre 17 y 25/100.000, en el Medio Oriente entre 16 y 31/100.000 y en África entre 50 y 60/100.000 (1;2;5).

Cuba: en nuestro país existe un Programa Nacional de Inmunizaciones desde 1962, mediante el cual los niños cubanos reciben 10 vacunas simples o combinadas, para protegerlos contra 13 enfermedades inmunoprevenibles (poliomielitis, difteria, tétanos, tos ferina, sarampión, rubéola, parotiditis, hepatitis B, meningitis meningocócica tipo b y c, fiebre tifoidea y contra las infecciones causadas por el *Haemophilus influenzae* tipo b) y de una forma clínica severa de meningitis tuberculosa en niños menores de un año, por este concepto la población cubana ha recibido en los últimos 38 años más de 260 millones de dosis de estas vacunas (7;15).

A partir de la disponibilidad en Cuba de vacunas conjugadas eficaces contra Hib, provenientes del mercado internacional, se incluyó la misma en el esquema de vacunación nacional en el año 1999 administrada a la población diana, niños menores de 2 años, esta alcanzó una cobertura del 97%. El impacto se evaluó mediante el Sistema Nacional de Vigilancia de Meningoencefalitis Bacterianas (SNVMEB). La eficacia global de la vacunación se estimó en 99% y la incidencia general de la meningoencefalitis por Hib disminuyó de 1,3 a 0,6 por cada 100 000 habitantes (46,1%), observándose la mayor reducción en niños menores de 5 años (56,1%). En los menores de 1 año se redujo 70,5% y en el resto de los grupos de menores de 5 años disminuyó entre 25,9 y 49,6%. En el grupo diana para la vacunación, la incidencia se redujo 61,1%; entre los niños de este grupo que contrajeron la meningoencefalitis por Hib, solamente 8 (24,2%) estaban vacunados, 7 de ellos con una sola dosis, aplicada 1 mes antes de enfermar. Se ha demostrado que la vacunación a gran escala de los niños menores de 2 años contra Hib en Cuba a través del SNVMEB ha logrado disminuir notablemente la incidencia de meningoencefalitis por Hib (6;7;15). La inclusión de una vacuna de fabricación nacional, constituiría una fuente de importante de sustitución de inversiones (alrededor de 3 millones de dólares anuales).

Distribución por edad: A pesar que la enfermedad por Hib ocurre en los niños menores de dos años, la mayor incidencia ocurre en niños menores de 1 año en los países en desarrollo y por encima del año en los países industrializados.

2.1.2. Inmunidad activa

Las vacunas desarrolladas tradicionalmente después de acercamientos empíricos han limitado a menudo los problemas de la inmunogenicidad, probablemente debido al nivel bajo de la pureza de los componentes activos que contienen. Sobre la base de la importancia demostrada de los anticuerpos específicos contra el polisacárido de la cápsula (PRP) se desarrolló una vacuna de primera generación consistente en el polisacárido purificado (6). Esta vacuna, al igual que las otras basándose en la inclusión de polisacáridos contra neumococo y meningococo estimula la proliferación de los clones específicos de células B, que generan una respuesta pobre al no ser identificados por las células T y/o macrófagos. A estos se les conoce como antígenos T-independientes y tienen las siguientes características:

1) la respuesta de anticuerpos es dependiente de la edad, no detectándose anticuerpos por debajo de los 18 meses, respuesta variable entre los 18 y 23 meses, siendo inmunogénica por encima de los 2 años; no genera respuesta de memoria y por lo tanto no hay efecto de refuerzo.

2) un alto porcentaje de los anticuerpos generados son IgM, y en menor porcentaje se generan las IgG siendo estas las más protectoras.

Las características antigénicas de estos polisacáridos se modifican una vez que se conjugan químicamente a proteínas portadoras. Estos nuevos antígenos poseen ahora la capacidad de ser reconocidos por las células T y macrófagos generando una respuesta inmune característica de los antígenos T-dependientes. Estas son:

- inducción de anticuerpos en niños menores de 2 años,
- efecto refuerzo que permite alcanzar altas concentraciones de anticuerpo y memoria,
- respuesta inmune mucho más madura caracterizada por IgG e IgA (6).

Esta segunda generación de vacunas contra Hib ha demostrado ser más segura, más inmunogénica y altamente efectiva, según los resultados obtenidos en varios estudios en campos previos y más recientemente por el enorme impacto que ha tenido en la disminución de las enfermedades causadas por Hib, por su inclusión en los programas de inmunización.

El empleo de nuevas tecnologías en el desarrollo de vacunas conduce a la producción de antígenos recombinantes más puros que, sin embargo, tienden a tener una inmunogenicidad menor con respecto a las vacunas de generaciones anteriores. La búsqueda de adyuvantes para las nuevas vacunas implica el camino a seguir relacionado con sus límites potenciales (14;19).

2.2. Aspectos generales de Difteria

Es una enfermedad contagiosa aguda, causada por la bacteria *Corynebacterium diphtheria*, cuyo único huésped natural es el hombre.

La difteria puede prevenirse mediante la vacunación. La vacuna utilizada es un toxoide (anatoxina); contiene toxina diftérica tratada con formaldehído; no es tóxica y conserva su antigenicidad y esta es capaz de estimular la producción de anticuerpos antitoxina específicos. La inmunización masiva con una vacuna que contiene toxoide diftérico inactivado es la forma más segura de controlar la diseminación de la difteria. Durante muchos años ha estado disponible una vacuna combinada que contiene toxoides diftérico, tetánico y pertussis, y es la elección más común para la vacunación de niños. Los esquemas de vacunación para DTP incluyen en general la administración de 3 dosis de la vacuna a partir de los 2 meses de edad, con una diferencia de 1 ó 2 meses, que puede ser seguida de dosis de refuerzo a los 15–18 meses y/o 4–6 años (18;20-22).

Para mantener la inmunidad frente a la difteria en adultos, también debe administrarse cada 10 años una vacuna que contenga toxoides diftérico y tetánico (Td), después de haber completado la vacunación infantil. La cantidad de toxoide tetánico de Td varía, y puede contener hasta un 50% del contenido en toxoide de la DTP. Por el contrario, la cantidad de toxoide diftérico en la Td sólo es una décima parte de la dosis DTP. La reducción en el toxoide diftérico en la vacuna reduce al mínimo la reactividad en personas anteriormente sensibilizadas al toxoide, pero es suficiente para generar respuestas amnésicas en personas previamente vacunadas (20;21).

2.3. Aspectos generales de Tétanos

El Tétanos es una enfermedad aguda causada por la bacteria gram positiva, *Clostridium tetani*. Es única entre las enfermedades prevenibles mediante vacunación ya que no es transmisible, pero se adquiere por exposición ambiental, pues las esporas de *Clostridium tetani* se encuentran comúnmente en la tierra, particularmente si está contaminada con heces de animales o humanos. La inoculación con esporas ocurre a través de la piel en heridas o arañazos. En condiciones anaeróbicas (poco oxígeno) las esporas germinan.

Los efectos nocivos de *Clostridium tetani* se deben a una potente neurotoxina, tetanospasmina, que se produce en el lugar de la infección cuando el bacilo se multiplica. La toxina es transportada en nuestro organismo a través de la circulación y transporte axonal retrógrado en los nervios periféricos para finalmente atacar a los sistemas nervioso, motor y simpático. La toxina bloquea los impulsos inhibitorios al interferir con la liberación del neurotransmisor, ello produce contracción muscular y espasmo. El tétanos puede ser localizado o generalizado, siendo el último el más común (23;24).

La vacunación con el toxoide tetánico inactivado es el método más seguro para prevenir el tétanos.

- Los esquemas de vacunación recomendados incluyen típicamente 3 dosis de la vacuna, administrada a partir de los 2 meses de edad con una diferencia de 1 ó 2 meses que puede ser seguida de una dosis de refuerzo a los 15-18 meses y/o 4-6 años de edad.
- Para mantener una inmunidad eficaz frente al tétanos y difteria en adultos, la vacuna Td debe administrarse cada 10 años después de completar la vacunación infantil.
- Debe aplicarse una dosis de refuerzo de Td después de una herida, si el paciente no ha recibido un refuerzo en los últimos 5 años y si la herida está contaminada con tierra, con heces o saliva.

2.4. Aspectos generales de Tosferina

La tosferina es causada por *Bordetella pertussis*. Este es un cocobacilo pequeño, gram negativo aerobio que se adquiere de otras personas y que se desarrolla en la garganta (25;26), en cultivos envejecidos puede ser pleomórfico, adquiriendo forma filamentosa. Es un patógeno humano, aerobio obligado, de crecimiento lento, también causa un síndrome similar a tos ferina, aunque más leve.

La infección se transmite por vía aérea por contacto directo con las secreciones de las mucosas de las vías respiratorias de las personas infectadas o por diseminación de gotas a través del aire. El período de incubación de la enfermedad es de 7 a 14 días. Es una de las infecciones de mayor transmisibilidad; en la época pre-vacunal casi todos los niños se habían infectado entre el año y los cinco años de edad. Las tasas de infección oscilan entre el 50% en las escuelas y el 80-90% para los contactos familiares. En los años anteriores a la vacunación el número de casos nuevos de enfermedad típica al año era similar al tamaño de una cohorte de nacidos en un año (27).

La tos ferina supone un importante problema de salud pública en el mundo. La bacteria causa entre 20-40 millones de casos al año y se estima que es responsable de 200.000-400.000 defunciones cada año, la mayoría de estas en niños (28;29).

Actualmente se conoce con cierto detalle la estructura antigénica de *Bordetella pertussis*, lo que ha permitido una mejor comprensión de los mecanismos patogénicos de la enfermedad, la puesta a punto de nuevas aproximaciones diagnósticas y el desarrollo de vacunas (30;31).

Los recién nacidos adquieren pasivamente los anticuerpos maternos, transferidos a través de la placenta. La susceptibilidad de los niños pequeños a la tos ferina está bien documentada. Los niños no parece que estén protegidos frente a la enfermedad clínica durante los primeros meses de la vida, a pesar de la transferencia placentaria de anticuerpos. La alta incidencia de tos ferina en los primeros meses de la vida contrasta con la baja incidencia de enfermedades en las que los anticuerpos maternos sí protegen (30).

La tosferina, antes de la introducción de la vacuna, era una de las enfermedades más comunes de la infancia y una de las causas más importantes de mortalidad en niños. Tras introducir en los programas de vacunación (1965) la vacuna contra la tos ferina de células completas, la incidencia de la enfermedad ha ido disminuyendo hasta que hoy en día se encuentra en los niveles más bajos de su historia. Recientemente, coincidiendo con el desarrollo de las vacunas acelulares se han publicado numerosos artículos que identifican, en un porcentaje importante de

los cuadros clínicos de tos persistente en adolescentes y adultos, a la *Bordetella pertussis* como agente causante (30-32).

Las vacunas que combinan células enteras de tos ferina con toxoides diftérico y tetánico han sido altamente eficaces para evitar estas enfermedades, pero sus efectos adversos frecuentes y agobiantes han obligado a buscar alternativas más inocuas. Estas deben ser vacunas con componente pertúsico acelular que de entre todas las aprobadas poseen menor inmunogenicidad, en comparación con la vacuna de células enteras y menor reatogenicidad tanto en intensidad como en frecuencia. Así, en la actualidad, la vacuna preferida para la vacunación contra difteria, tétanos y tos ferina es la que combina toxoides tetánico y diftérico y un componente acelular contra la tos ferina (DTPa), aceptándose sólo la vacuna de células enteras si no se dispone de vacuna con el componente acelular (31).

2.5. Aspectos generales de Hepatitis B

La hepatitis B es una enfermedad del hígado causada por el virus de la hepatitis B, perteneciente a la familia *Hepadnaviridae* (virus ADN hepatotrópico). Es una enfermedad infecciosa del hígado causada por el virus y caracterizada por necrosis hepatocelular e inflamación. Puede causar un proceso agudo o un proceso crónico, que puede acabar en cirrosis (pérdida de la "arquitectura" hepática por cicatrización y surgimiento de nódulos de regeneración) del hígado, cáncer de hígado, insuficiencia hepática e incluso la muerte (33;34).

La transmisión del virus de la hepatitis B resulta de la exposición a sangre infectada o fluidos corporales que contengan sangre. Las formas posibles de transmisión incluyen contacto sexual, transfusión sanguínea, reutilización de agujas y jeringuillas, y transmisión vertical de madre a hijo durante el parto (34).

Existe una vacuna desarrollada para la prevención de una infección por hepatitis B. La vacuna se preparó originalmente del plasma sanguíneo obtenido de pacientes con infecciones crónicas de hepatitis B. Sin embargo, las vacunas en el presente se fabrican usando ADN recombinante (35). Ambas formas de la vacuna son consideradas igualmente eficaces.

2.6. Aspectos generales de las vacunas DPT

La vacuna triple bacteriana contra difteria, tétanos y tos ferina se utiliza hace más de 60 años y fue la primera vacuna combinada empleada en niños para la prevención de tres enfermedades distintas. Hasta hace pocos años sólo se disponía de una vacuna preparada con toxoides tetánico

y diftérico y una suspensión de células enteras de *Bordetella pertussis* (DTPe), pero a partir de 1981 aparecieron en Japón las primeras vacunas con componentes acelulares de *Bordetella pertussis* (DTPa) que son las que se utilizan actualmente por su menor capacidad reactiva. Posteriormente han ido apareciendo nuevas vacunas que combinan tanto la DTPe como la DTPa con la vacuna de la polio inactivada, hepatitis B y *Haemophilus influenzae* tipo b, hecho que sin duda puede facilitar el cumplimiento del calendario vacunal sistemático (31;36-39).

La vacuna DTPe, al igual que las demás combinaciones con estos tres componentes, es muy inmunógena. Se ha comprobado que la eficacia protectora tras la primo-vacunación es superior al 95% para difteria y tétanos, y algo menor (entre el 50% y 85% según diversos estudios) para la tos ferina. Para los tres componentes, la eficacia protectora disminuye con los años y es casi nula a los 10 años de la última dosis, lo que ratifica el hecho de revacunar con este intervalo de tiempo (31;40;41).

2.7. Vacunas Combinadas

En los programas establecidos mundialmente para combatir enfermedades han predominado las vacunas monovalentes. El aumento de las enfermedades previsibles por vacunación, unido al gran número de inmunizaciones que hay que realizar simultáneamente en un corto periodo de tiempo a los niños durante los primeros meses de vida, hace imprescindible el desarrollo de formulaciones donde se combinen las preparaciones vacunales existentes surgiendo así las llamadas vacunas polivalentes o combinadas (11;42-44). La mezcla de varios antígenos en una vacuna combinada ofrece una serie de beneficios inmediatos tanto para el proveedor del producto como para el receptor del mismo ya que se reducen los malestares asociados con las múltiples inyecciones, se simplifican los calendarios de vacunación, permitiendo la inclusión en los mismos de nuevas vacunas, se incrementan las oportunidades de vacunar a pacientes o poblaciones frecuentemente no atendidas y se abarata la logística de vacunación considerablemente (11;42-44).

Las vacunas polivalentes registradas están formuladas a partir de la combinación de vacunas monovalentes de amplio uso y de probada seguridad, como en el caso de TRITANRIX HB + HIBERIX, propiedad de la compañía SmithKline Beecham en la que se emplean las vacunas anti Difteria-tétano-pertussis y Hepatitis B, así como contra *Haemophilus influenzae* registradas bajo esas denominaciones (45). Otro ejemplo es la vacuna Pediarix en la cual se combinan las vacunas anti difteria, tétano, pertusis acelular, hepatitis B y polio inactivada (11;37;46).

Siguiendo esta tendencia, en nuestro país se han realizado estudios clínicos en lactantes con vacunas que combinan su efecto contra DTP y Hepatitis B (TRIVAC-HB), en los cuales se ha demostrado adecuada sero-protección y seguridad (7). La posibilidad de contar con una vacuna anti *Haemophilus influenzae* tipo b condiciona la proyección dirigida hacia la obtención y evaluación de una vacuna pentavalente capaz de combinar los efectos sero-protectores contra estas patologías que afectan a los niños en sus primeros años de vida al combinar los antígenos antes referidos.

Más vacunas combinadas se han desarrollado y otras se encuentran en fases avanzadas de ensayos clínicos, por lo que reconsidera la década del 2000 la más productiva en la historia del desarrollo de vacunas. Más niños que nunca antes han sido beneficiados con la inmunización vacunal: por encima de 100 millones de niños por año entre el 2005-2007. Estos beneficios se incrementan cada vez más y se extienden a adolescentes y adultos proporcionando protección contra diversas enfermedades (27;27).

En países en vías de desarrollo, están disponibles más vacunas y más vidas son salvadas. Para la primera vez en la historia documentada el número de niños que muere por año ha caído por debajo de los 10 millones.

Todavía a pesar del progreso extraordinario alcanzado en la inmunización de más niños durante la última década, en el año 2007, 24 millones de niños - casi 20% de los nacidos cada año - no obtuvieron el esquema de inmunizaciones completo durante su primer año de vida. Al mismo tiempo, nuevas iniciativas se han discutido para acelerar el desarrollo e inserción de nuevas vacunas (47).

La OMS estima que si todas las vacunas ahora disponibles contra las enfermedades de la niñez fueran ampliamente adoptadas y si los países pudieran cubrir un promedio global del 90%, en el año 2015 podrían prevenirse dos millones de muertes adicionales por año entre los niños menores de cinco años e incluso se reduciría la invalidez de las enfermedades evitables por vacunación, contribuiría a la salud y bienestar de estos, además de reducir los costos de hospitalización (47).

2.8. Breve reseña sobre el desarrollo de adyuvantes

Al principio las vacunas estaban formadas por microorganismos vivos atenuados o muertos, y esto traía como consecuencia que con cierta frecuencia se desarrollara la enfermedad en vez de la protección, debido a una reversión de la virulencia, fundamentalmente en personas

inmunodeprimidas. Esto propició que surgiera una nueva generación de vacunas basadas en antígenos purificados, sintéticos o recombinantes, los cuales son más específicos pero menos inmunogénicos, por lo que necesitan de componentes, denominados adyuvantes, que incrementan la potencia, la calidad y la duración (memoria) de la respuesta inmune (48). Los adyuvantes también contribuyen a lograr una respuesta inmune efectiva en edades muy tempranas, cuando el sistema inmune aún no está suficientemente maduro y es necesario vacunar contra enfermedades que afectan a niños en esas edades (49), así como también pueden mejorar el efecto protector de las vacunas en personas inmunodeprimidas y en edades avanzadas (48-50). Existen diversas razones para incorporar adyuvantes en vacunas, especialmente para uso en humanos: a) incrementar la respuesta inmune específica (seroconversión) en diversas poblaciones y lograr una efectiva protección contra diversas enfermedades, con especial interés en poblaciones con reducida capacidad de inmuno-respuesta, como ocurre en lactantes y ancianos, así como en personas inmunodeprimidas; b) facilitar el uso de menores cantidades de antígeno en una vacuna y así alcanzar una mayor cobertura de personas vacunadas, como ocurre durante pandemias como la influenza; c) también en este tipo de pandemias es importante lograr una protección más rápida de la población para reducir su propagación; d) reducir las dosis de vacunas, mejorando su aceptación por las personas, disminuyendo los requerimientos logísticos y mejorando el coste-beneficio, con un impacto de particular importancia en países subdesarrollados, y e) dirigir la respuesta inmune para lograr mecanismos más efectivos contra determinadas enfermedades (48;51).

Los efectos inmuno-estimuladores de las sales de aluminio como adyuvantes fueron descritos inicialmente en 1926 por Glenny. Otros investigadores demostraron que una inyección de toxoide diftérico precipitada con alumbre (sulfato de potasio de aluminio) indujo una respuesta de anticuerpos más fuerte que el toxoide soluble. Los estudios siguientes mostraron que también los toxoides diftérico y tetánico precipitados con alumbre refuerzan la respuesta inmune protectora en humanos (52-54).

Los adyuvantes de aluminio se usan actualmente en varias vacunas humanas contra enfermedades infecciosas, incluyendo vacunas contra la difteria, el tétano, la pertussis, las hepatitis B, el ántrax y enfermedades causadas por el *Haemophilus influenzae* y el virus del papilloma humano (55;56), también han sido evaluados en la inmunoterapia para las enfermedades alérgicas (57;58), y están evaluándose para la inmunoterapia contra diabetes

mellitus autoimmune (59). Ciertas vacunas veterinarias contra enfermedades infecciosas para protección de animales destinados al consumo humano y animales de compañía se formulan con adyuvantes de aluminio (60).

2.8.1. Sales de aluminio como adyuvantes de vacunas

Las sales de aluminio fueron introducidas como adyuvantes vacunales hace más de 80 años, como resultado de su extenso y excelente expediente que aboga por su seguridad y capacidad inmunogénica con una amplia variedad de antígenos y a un costo relativamente bajo (60;61).

Las vacunas que contienen como adyuvante las sales de aluminio inducen una respuesta inmune eficaz que es principalmente mediada por anticuerpos. A pesar de su amplio uso, el mecanismo por el cual los adyuvantes de aluminios selectivamente refuerzan la respuesta inmune aun no está bien dilucidado. Ahora se acepta generalmente que el sistema inmunológico innato juega un papel importante iniciando y dirigiendo la respuesta inmune adaptativa. Los adyuvantes refuerzan la respuesta inmune adaptativa por activación de células inmunes innatas que a su vez proporcionan las señales para la activación de linfocitos. Los estudios realizados durante la última década han aclarado la interacción de los adyuvantes de aluminio con las células presentadoras de antígeno y las células inflamatorias, ambas constituyen puntos críticos en la inducción y formación de la respuesta inmune. Los posibles mecanismos por los que los adyuvantes de aluminio refuerzan la respuesta inmune han sido objeto de diferentes revisiones (62-64). La incorporación de adyuvantes de aluminio en formulaciones vacunales incrementa la concentración y avidéz de antígenos-anticuerpos específicos (65). El nivel de inmunidad que es obtenido por vacunación varía marcadamente entre individuos debido al polimorfismo determinado genéticamente en moléculas que juegan su papel en la respuesta inmune, variación estocástica en el repertorio de antígenos-receptores específicos y factores no genéticos como la edad, estatus nutricional e influencias ambientales.

La dosis usual de aluminio permitida en vacunas para humanos en Estados Unidos 0.85 mg de aluminio por dosis y el rango establecido en vacunas licenciadas oscila entre 0,85 - 1,25 mg, de aluminio por dosis (55). Actualmente los adyuvantes constituyen una fuente insignificante de aluminio, por lo que carecen de interés toxicológico, siendo inofensivos en su mayoría (66). Recientemente se ha estimado que la concentración de aluminio en sangre derivada de vacunas administradas a niños durante el primer año de vida se mantiene por debajo del mínimo nivel de riesgo establecido por la Agencia para el registro de sustancias tóxicas y enfermedades (67).

2.8.2. Mecanismos de acción de los adyuvantes de aluminio

A pesar de que las sales de aluminio se han usado como adyuvantes durante más de 80 años, su mecanismo de acción sigue siendo un misterio. La evaluación de los sitios de inyección en modelos preclínicos inicialmente sugerían que la adsorción a hidróxido de aluminio (alúmina) incrementa la persistencia del antígeno, a este proceso se llamó efecto "depósito"; sin embargo, en los últimos veinte años el efecto depósito producido por la alúmina ha sido desafiado por varios estudios que reportaron estabilidades muy similares de antígeno formulados en el presencia y ausencia de aluminio (64;68-71).

La adsorción se considera un factor importante para el efecto inmuno-estimulador de los adyuvantes de aluminio (72). La naturaleza particulada de los antígenos adsorbidos facilita la captación por las células presentadoras de antígenos mediante fagocitosis (69;70). Los antígenos adsorbidos son liberados muy lentamente del sitio de inyección (71), también se conoce que los adyuvantes de aluminio pueden estimular la respuesta inmune de antígenos no adsorbidos (73;74).

Otros datos acumulados han demostrado la actividad inmuno-estimuladora de las sales de aluminio. Es bien conocido que la administración de sales de aluminio induce reclutamiento celular en el sitio inyección (66;75-77). La retención de antígenos en el sitio de inyección permite que un mayor tiempo de interacción entre las células inflamatorias y las células presentadoras de antígenos acumuladas en el sitio de aplicación con los antígenos vacunales (78). Más recientemente, fue descrito que el aluminio activa monocitos y macrófagos humanos *in vitro* (79).

También se ha señalado que la absorción de alúmina aumenta la captación del antígeno por las células dendríticas *in vitro*, en un proceso dependiente del tamaño de los agregados aluminio-antígeno (70;80). En otros estudios con células dendríticas derivadas de la médula ósea de ratón se ha demostrado que los adyuvantes de aluminio tienen un efecto directo sobre estas células. Estos adyuvantes incrementan la captación, la presentación y activación de antígenos específicos de células T (70;80;81) e inducen la secreción de IL-1 β y IL-18 por las células dendríticas (81;82). Los adyuvantes de aluminio también estimulan la secreción de IL-1 α por las células dendríticas en la caspasa-1 de manera dependiente (83). La IL-1 α y la IL-1 β se unen al mismo receptor IL-1 receptor y tienen funciones que se solapan. Por lo tanto la secreción de IL-1 α es parcialmente dependiente de la fagocitosis y del NLRP3 lo que sugiere que una ruta diferente

esta involucrada en la secreción de esta citocina (83). Otro posible mecanismo de activación de células dendríticas por los adyuvantes de aluminio es por unión a lípidos de la membrana plasmática (84). Se ha descrito además que la alúmina tiene un efecto sinérgico con los agonistas TLR *in vitro* al estimular la producción de IL-1 β de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humano (82). En un artículo escrito por Franchi y Nuñez en la Revista Europea de Inmunología (85) y en otro escrito por Eisenbarth et al. (75) se aclara el mecanismo molecular del alumbre y un agonista de TLR y su inter-relación con los macrófagos de ratón. Ambos grupos mostraron que el alumbre activa el receptor proteico citoplasmático NOD, que contiene el dominio 3 piridina (también conocido como Nalp3) de la proteína llamado inflamasoma (78;86).

2.9 Elementos previos a la administración en humanos

Las conclusiones de estudios médicos relevantes y literatura inmunológica con vacunas y adyuvantes, demostraron que la seguridad absoluta de estas sustancias no está totalmente garantizada. La toxicidad de los adyuvantes puede describirse en parte por la estimulación de varios mecanismos de activación de la respuesta inmune, por ello se debe lograr un máximo de estimulación del sistema inmune con la menor cantidad de efectos adversos. Según Scheibner en el 2001 (87), la seguridad y adyuvancia deben ser equilibrados para conseguir el estímulo inmune máximo con los efectos adversos mínimos. Por todo lo antes expuesto existen pasos previos a seguir durante el desarrollo de un nuevo producto previamente a su evaluación en ensayos clínicos donde el papel más importante le pertenece a los estudios preclínicos, en particular los toxicológicos, los que avalan y demuestran la seguridad de estos nuevos medicamentos.

2.10 Estudios Toxicológicos Preclínicos

Los estudios toxicológicos en animales constituyen una de las fuentes principales de información para estudiar la toxicidad de diferentes compuestos, ya que se pueden evaluar con facilidad, incluso los efectos menos evidentes de la exposición aguda y crónica, además de que la capacidad de conducir las condiciones experimentales permite la evaluación de muchas variables en respuesta a sustancias tóxicas. Los resultados de estos estudios constituyen elementos predictivos de los efectos de toxicidad en humanos y poblaciones susceptibles, e indicativos de eventos adversos, lo que los hace ser imprescindibles y muy importantes para establecer la seguridad de los nuevos medicamentos. No obstante, las limitaciones de los mismos se

concentran en dos vertientes: 1) las debidas a la incertidumbre en extrapolar de animales a humanos y 2) extrapolar datos obtenidos con dosis altas en animales a la toxicidad esperada por la administración de dosis terapéuticas mucho menores en humanos.

Debido a la creciente necesidad de armonizar las técnicas y requisitos a seguir para la realización de estos estudios La Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OECD, siglas en inglés) (88;89) y la European Medicines Agency (EMA, siglas en inglés) (16;17;90) definieron los procedimientos a seguir para la evaluación de vacunas, medicamentos y producto químicos. El tipo y diseño de estos estudios estará en dependencia de las características y la indicación clínica a la cual va destinado cada producto. Para ello es necesario realizar un análisis previo de los estudios requeridos caso a caso, antes de ser realizados, teniendo en cuenta el esquema de vacunación, los componentes del producto y el grupo etario al que se dirige, entre otros elementos. Con el objetivo de garantizar la adecuada conducción e interpretación de los estudios toxicológicos las Conferencias de Armonización han definido criterios para ser considerados en el diseño de los diferentes estudios toxicológicos, en la Tabla 1 se resumen los aspectos descritos para realizar la evaluación de vacunas monovalentes y combinadas.

Tabla 1. Elementos regulatorios descritos para la evaluación de vacunas.

Agencia	Regulaciones	Planteamiento
OMS	- WHO guidelines on Non-clinical Evaluation of Vaccines. WHO/BS/03.1969	- <i>identificar y caracterizar los efectos tóxicos potenciales de la vacuna</i>
ICH/EMA	- Notes for Guidance on Preclinical Pharmacological and Toxicological Testing of Vaccines. CPMP/SWP/465/95 - Non-clinical safety studies for the performance of human clinical trials for Pharmaceuticals. CPMP/ICH/286/95 - Note for Guidance on Preclinical safety evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals. CPMP/ICH/302/95	- <i>permitir establecer un margen de seguridad apropiado para su uso en humanos.</i> - <i>una especie animal relevante es suficiente</i> - <i>el número de dosis administradas debe ser igual o exceder el número propuesto en humanos</i> - <i>la ruta de administración debe ser igual o correspondiente a la que se usará en la clínica</i> - <i>es aceptable un estudio con escalado de dosis</i> - <i>generar información útil que describa la relación dosis efecto</i>

		<p>- la duración está relacionada con la frecuencia, indicación clínica</p> <p>- estudios de dos semanas son apropiados</p>
--	--	---

2.10.1 Estudios de toxicidad aguda

Los ensayos de Toxicidad aguda tiene como objetivos definir la toxicidad intrínseca de la sustancia, predecir el peligro para sub-poblaciones diana ó no, determinar la población/edad/sexo más susceptibles, identificar órganos diana, proveer información para la evaluación de riesgo a la exposición aguda a la sustancia y para el diseño y selección de niveles de dosis para estudios prolongados, así como suministrar información valiosa a los estudios clínicos, ya sea para predecir, diagnosticar y prescribir el tratamiento por sobre-exposición aguda a estas sustancias (91).

2.10.2 Estudios de tolerancia local

Los estudios de tolerancia local centran su atención en los cambios inducidos luego de la administración de medicamentos detectados a través de la evaluación macroscópica y microscópica del sitio de aplicación para comprobar si tanto los principios activos como los excipientes son tolerados en aquellos sitios del organismo en que puedan estar en contacto con el medicamento durante el período de aplicación en humanos, ya sea de manera accidental o propuesta como régimen de tratamiento. El diseño planteado en cada esquema debe distinguir entre los efectos traumáticos como consecuencia de la administración y aquellos que se deriven del producto de prueba (efectos toxicológicos o farmacodinámicos). En estos ensayos la frecuencia, duración y vía de la administración estarán en consonancia con el esquema propuesto en la terapéutica en humanos, no obstante el período de administración no debe exceder las cuatro semanas. La mayoría de estos ensayos son cualitativos, en ellos se emplea una técnica de inyección perfectamente definida y se valora además el aspecto macro y microscópico de la lesión tisular (91;92).

2.10.3 Estudios de toxicidad a dosis repetidas

Los estudios de evaluación de la toxicidad a dosis repetidas tienen como objetivos determinar los efectos adversos del producto de prueba a dosis suficientemente bajas que permitan la supervivencia de la mayoría de los animales, como contraposición a las dosis tóxicas agudas, registrar efectos adversos posibles como consecuencia de un período más largo de exposición

que el empleado en los estudios agudos, determinar la dosis respuesta para efectos adversos a partir de administraciones repetidas e identificar el nivel de efectos adversos no observable (NOAEL, siglas en inglés), identificar órganos diana y cualquier efecto adverso potencial a la sensibilización, proveer información inicial para la evaluación de riesgo comparativa y establecer los puntos límites especializados para el diseño de estudios a largo plazo (91;93).

2.10.4 Estudios de la función reproductiva

Los estudios de la función reproductiva según los requisitos para las solicitudes de inscripción, renovación y modificación en el registro de medicamentos de uso humano emitida por el CECMED (octubre 2000) (94), estos estudios se hacen necesarios en el caso de vacunas que se pretendan administrar a embarazadas, lo cual no es caso de este producto, que va dirigido a lactantes, los cuales, por lo tanto no están dentro del grupo correspondiente a edad reproductiva. Por otro lado, es importante señalar que ninguno de los componentes de esta vacuna (PRP y anatoxina tetánica) son componentes vivos por lo que carecen de posibilidades de causar efectos sobre la reproducción

2.10.5 Estudios de carcinogenicidad y mutagenicidad

Los estudios de carcinogenicidad y mutagenicidad se recomiendan cuando la obtención del producto no es a partir de líneas celulares continuas sino que es un fragmento del polisacárido capsular del germen *Haemophilus influenzae* tipo b polirribosilribitolfosfato (PRP) obtenido por síntesis química y después conjugado covalentemente a 20.8-31.25 µg de anatoxina tetánica. Esto justifica que esta vacuna, no posea la potencialidad de integración al DNA hospedero. Sus componentes tampoco presentan homología con el genoma humano, lo que confirma su bajo potencial mutagénico. Su estructura química y mecanismo de acción no tienen semejanzas con productos conocidos cancerígenos. El esquema de aplicación clínica propuesto para este producto es solamente una administración a los 2, 4 y 6 meses, lo cual implica una exposición mínima a este producto. Este tipo de estudio se realiza a sustancias que se administren regularmente por un período de 6 meses o más.

2.10.6 Estudios de neurotoxicidad

Los estudios neurotóxicos se realizan teniendo en cuenta la naturaleza de los componentes de Quimi-Hib y la evaluación farmacológica realizada a este producto, no se considera a esta vacuna como un producto con potencialidad de afectar el sistema nervioso, lo cual constituye la primera causa para realizar estudios más específicos en este sentido. Según las regulaciones

dictadas por OECD y EPA al respecto, los datos aportados por estudios agudos y a dosis repetidas, son la base para la realización de posteriores estudios específicos relativos al efecto de una sustancia sobre el sistema nervioso. En los estudios realizados no se reportaron hallazgos que indicaran la necesidad de estudios neurotoxicológicos, toda vez que los animales mantuvieron adecuada actividad somatomotora y su respuesta ante estímulos fue normal, acorde a la característica de animales sanos de su especie. No se presentaron alteraciones en la marcha, ni temblor, convulsiones, ataxia ni cambios histopatológicos que sugirieran la necesidad de estudios específicos de este tipo. Otro aspecto que nos indica la no necesidad de ejecución de estudios neurotoxicológicos es la concentración de tiomersal empleada (25 µg por dosis) la que no excede la recomendada para fármacos de uso pediátrico.

2.10.7 Estudios de inmunotoxicidad

En los estudios inmunotoxicológicos han ocurrido avances acelerados durante los últimos 20 años con respecto a la detección de inmunotoxicidad (75;95-98). Las formas principales de inmunotoxicidad son inmunosupresión e hiperactividad del sistema inmune. La inmunosupresión resulta en la reducción de la resistencia animal ante infecciones y el incremento de la susceptibilidad a la formación de tumores. La hiperactividad de sistema inmune puede resultar en enfermedades autoinmunes e incrementar la sensibilidad a enfermedades alérgicas. La determinación de los mecanismos asociados con estas enfermedades puede ser extremadamente compleja porque estos pueden verse afectados por un gran número de factores bioquímicos, celulares y fisiológicos que pueden afectar las interacciones celulares necesarias para efectuar la defensa inmunológica. La detección de cambios potenciales inmunológicos es menos compleja y existen estudios que pueden proporcionar datos acerca de estos (97).

Los procedimientos para evaluar los efectos sobre el sistema inmune se dividen en dos categorías: Tipo I, estos son ensayos que no requieren que los animales sean tratados con un agente que constituya un reto inmunológico. Los ensayos Tipo II requieren de este reto con un agente que puede ser un antígeno, una vacuna, un agente infeccioso o células tumorales.

Estas evaluaciones pueden ser realizadas en roedores y los del tipo I pueden formar parte de los estudios de dosis repetidas, pues no se requiere de la manipulación de los animales.

3. MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES

3.1. Diseño experimental de la tesis

Para el cumplimiento de los objetivos específicos en este trabajo de tesis se desarrollaron diferentes esquemas experimentales que permiten evaluar la Inmunogenicidad (Capítulo 4) y Seguridad preclínica (Capítulo 5), cada uno de estos capítulos contiene materiales y métodos, resultados, resumen de resultados y discusión, cada uno de estos a su vez, están divididos por acápite que responden a cada vacuna por separado (Tabla 2).

Los estudios para la determinación de inmunogenicidad y potencia de los componentes D, T, P y HB se realizaron según se establece en la Serie de reportes técnicos de la OMS (99) y las Farmacopeas USP y BP, según el tipo de determinación y la calidad del producto a evaluar, teniendo en cuenta para ello aspectos relevantes como modelo animal, diseño e interpretación de los resultados. En todos los casos se siguió el cumplimiento de las Buenas Prácticas y el uso ético en los animales de laboratorio, en cuanto a manipulación, condiciones ambientales, alimentación y uso apropiado de las instalaciones, por personal capacitado y motivado a sus efectos.

Los ensayos toxicológicos preclínicos realizados fueron realizados bajo el cumplimiento estricto de las Buenas Prácticas de Laboratorio y Buenas Prácticas Preclínicas (99-103), así como las concernientes a seguridad biológica de las instalaciones en que se realizaron los estudios

En los diseños realizados se siguieron criterios referidos en las guías internacionales ICH/EMA (International Conference on Harmonization/European Agency for the Evaluation of Medicinal Products referidas a vacunas, CPMP/SWP/465/95) (17) como la CPMP/SWP/1042/99 (104) referida a estudios de toxicidad a dosis repetidas y para la evaluación toxicológica con vistas a lograr la aprobación del estudio clínico, CPMP/ICH/286/95 (90), dictadas para cada tipo de vacuna ya sean monovalentes ó combinadas, así como de aquellas dictadas para químicos en particular y para cada tipo de estudio realizado.

Los animales empleados en los estudios fueron aleatorizados siguiendo una lista generada por el Programa Marsman FR (RIVM, Bilthoven, The Netherlands), versión 94-1. Estos fueron observados diariamente a fin de registrar cualquier variación en el comportamiento o signo de toxicidad, cambios en la piel y en el pelo, en los ojos y membranas mucosas, en los sistemas respiratorio, circulatorio, nervioso central y autónomo, así como la actividad somatomotora. Se realizó pesaje corporal con una frecuencia semanal.

Tabla 2. Diseño Experimental de la Tesis

Capítulo	Acápite	Objetivo a demostrar	Evaluaciones
Inmunogenicidad	Quimi-Hib	Determinar la respuesta inmunológica inducida por el componente antigénico conjugado Hib-TT	-Determinación de títulos de anticuerpos contra Hib en conejos F1 (Semi-Gigante blanco por Nueva Zelanda).
	TRIVAC-HB+ Quimi-Hib concentrada	Demostrar que la unión de Quimi-Hib concentrada con TRIVAC-HB no interfiere en la respuesta biológica de los cinco antígenos que conforman la formulación pentavalente	-Inmunogenicidad contra Hib en conejos F1 (Semi-Gigante blanco por Nueva Zelanda). -Inmunogenicidad y potencia del componente HB. -Potencia de los componentes D, P y T.
Seguridad Preclínica	Quimi-Hib	Evaluación de la Toxicidad aguda	-Peso corporal -Consumo de alimentos -Observaciones clínicas -Observaciones macroscópicas -Evaluación histopatológica
		Evaluación de la Tolerancia local	-Observaciones clínicas -Observaciones macroscópicas -Evaluación histopatológica
		Evaluación de la Toxicidad a dosis repetidas	-Peso corporal -Consumo de alimentos -Observaciones clínicas -Observaciones macroscópicas -Evaluación histopatológica
	Vacuna pentavalente TRIVAC-HB + Quimi-Hib concentrada	Evaluación de la Toxicidad aguda	-Peso corporal -Consumo de alimentos -Observaciones clínicas -Observaciones macroscópicas -Evaluación histopatológica
		Evaluación de la Tolerancia local	-Observaciones clínicas -Observaciones macroscópicas -Evaluación histopatológica
		Evaluación de la Toxicidad a dosis repetidas	-Peso corporal -Consumo de alimentos -Observaciones clínicas -Observaciones macroscópicas -Evaluación histopatológica
		Inmunotoxicidad	-Evaluación morfométrica del bazo

4. INMUNOGENICIDAD

4.1 Materiales y métodos

4.1.1 Determinación de los títulos de anticuerpos contra Hib

4.1.1.1 Sustancia de ensayo

La vacuna Hib adyuvada se presenta en un vial 2R correspondiente a la presentación en monodosis. En cada dosis de 0.5 mL existe 10 µg del antígeno Hib, se probaron dosis de 5 y 10 µg. También se usó otras preparaciones de vacunas monovalentes de Hib adsorbido a fosfato de aluminio donde se variaron las cantidades desde 2 µg hasta 20 µg de Hib. Todos estos ensayos fueron realizados de forma paralela con una vacuna comercial Vaxem Hib, Chiron S.p.a, lote 3204.

4.1.1.2. Animales de experimentación

Para realizar este estudio se utilizaron 5 conejos F1 (Nueva Zelanda x Semi-Gigante Blanco), sexo hembra con peso corporal > de 1.8 kg por concentración, por cada variante de vacuna estudiada. El experimento se realizó en el área de animales en condiciones convencionales teniendo en cuenta el estado zootécnico de los animales.

4.1.1.3. Diseño Experimental

Se comparó el resultado de los títulos de anticuerpos anti-Hib en los diferentes grupos de tratamiento o experimentales, en la vacuna Hib adyuvada y sin adyugar.

Se inmunizaron los animales a tiempo 0 y a los 14 días, por vía subcutánea. La extracción se realizó 21 días después de la primera dosis

Se realizó mediante un sistema ELISA específico para la evaluación de la respuesta anti-Hib y el mismo consiste en recubrir la placa con 1µg de un oligosacárido de origen natural (Hib-O) suministrado por el NIBSC de Londres, con la posterior adición de las muestras en estudios y controles del ensayo. Un conjugado anti-ratón o anti-conejo peroxidasa (según la especie en estudio) fue añadido. La presencia de anticuerpos en el sistema se realizó mediante el uso de ortofenilendiamina como cromógeno de la reacción y H₂O₂ como sustrato. A la aparición de la coloración amarilla–naranja indica la presencia de anticuerpos en la muestra.

Para declarar muestras positivas de anticuerpos anti-Hib se empleo como valor de corte la media de los controles negativos mas 2DS, toda muestra que su densidad óptica sea igual o superior al valor de corte de la placa es positiva de anticuerpos.

4.1.2 Evaluaciones de inmunogenicidad y potencia de los antígenos de D, P, T, HB y Hib-TT. Ingredientes activos de la vacuna pentavalente TRIVAC-HB + Quimi-Hib concentrada

4.1.2.1 Sustancia de ensayo

La vacuna pentavalente TRIVAC-HB + Quimi-Hib se conforma por la mezcla de dos formulaciones que se unen en el momento de su uso, ver Figura 1.



Figura 1. Presentación de las vacunas independientes que conforman la vacuna pentavalente TRIVAC-HB + Quimi-Hib concentrada.

A partir de este procedimiento fue conformado un lote de vacuna pentavalente 4+1 ó TRIVAC-HB + Quimi-Hib concentrada (el cual está constituido por el lote de TRIVAC HB 4T0201 y un lote de Hib concentrado a 0,35 mL EH2009, donde los componentes por separado o sea los que dan lugar al lote de vacuna pentavalente fueron utilizados como controles en los ensayos realizados.

4.1.2.2. Diseño Experimental

a) Estudio de inmunogenicidad del componente Hib-TT

El objetivo del estudio fue comparar el comportamiento del porcentaje de seroconversión y títulos de anticuerpos anti-Hib en los diferentes grupos de tratamiento o experimentales, en la vacuna pentavalente con respecto al lote de Quimi-Hib como vacuna monovalente que le dio origen al lote de pentavalente 4+1, el lote de referencia de la vacuna de Hib y el placebo. La respuesta de anticuerpos fue evaluada según el procedimiento descrito en el acápite 3.1.1.1.3.

b) Determinación de títulos de anticuerpos contra HB en ratones de la línea Balb/c

El objetivo del estudio fue comparar el resultado de la potencia e inmunogenicidad del componente HB en la vacuna pentavalente con respecto al lote de TRIVAC-HB que le dio origen.

Para realizar el estudio se utilizaron ratones Balb/c, sexo hembra, de 5 a 6 semanas de edad y peso corporal de 16- 18g amparados por certificado sanitario y genético, procedentes del CENPALAB, con los cuales se conformaron cuatro grupos experimentales, administrados con vacuna pentavalente 4 + 1, vacuna de TRIVAC-HB, el lote de referencia de la vacuna de HB y el Placebo.

Los ratones fueron inmunizados con diferentes dosis de las vacunas (1,25, 0,312, 0,078, 0,039, 0,09 µg) por vía intraperitoneal con dosis única y los animales fueron desangrados a los 28 días. Para el cálculo de la potencia se utilizó el ensayo de líneas paralelas de pendiente común, aplicando método Probit para el cálculo de la dosis efectiva 50.

c) Potencia de los componentes D, P y T

Estos ensayos se realizan para determinar el grado de protección que confiere la vacuna, expresada en UI de antitoxina diftérica, tetánica y contra pertussis presentes en el suero de los animales que han recibido los estímulos antigénicos correspondientes con la vacuna que se ensaya.

Potencia de las anatoxinas diftérica y tetánica: El procedimiento se basa en la capacidad de neutralización que tiene la antitoxina diftérica y tetánica presente en el suero de los animales previamente inmunizados con la vacuna de estudio frente a una toxina de referencia, según metodología descrita en la Farmacopea Británica. Para la Anatoxina diftérica se utilizan curieles albinos de 500 - 700 g, con una diferencia menor a 50 gramos y como criterio de aceptación se debe obtener como mínimo 2 UI/ mL de antitoxina diftérica. Para la Anatoxina tetánica se utilizan curieles de la línea Hartley de 250 a 350 g de peso (inmunización inicial) y ratones del mismo sexo de 16 a 18 g de peso (para la titulación de la antitoxina tetánica), como criterio de aceptación se debe obtener como mínimo 2 UI/ mL de la antitoxina.

Potencia de la *Bordetella pertussis*: Este ensayo de potencia se basa en la capacidad de la vacuna en ensayo de proteger ratones previamente inmunizados, los cuales son desafiados intracerebralmente con la cepa de reto de *Bordetella pertussis* 18323, utilizada internacionalmente para estos fines y que se caracteriza por su alta virulencia. Se utilizaron ratones albinos OF-1 de 10 -18g de peso, preferiblemente deben ser del mismo sexo; no deben diferir en peso en más de 4 g. Para el criterio de aceptación se considera satisfactoria la prueba si la potencia es ≥ 4 UI/dosis. Para realizar este ensayo se sigue la metodología descrita en la Farmacopea Británica.

4.2 Resultados

4.2.1 Determinación de los títulos de anticuerpos contra Hib

La respuesta inmunológica que induce el antígeno Hib adsorbido al adyuvante fosfato de aluminio supera varias veces la respuesta del antígeno sin adyuvante y esta es dependiente de la cantidad de antígeno adsorbido, Figura 2. En los resultados obtenidos se observó una fuerte respuesta de anticuerpos para los dos lotes de vacuna en estudio y en ambos casos hubo un 100% de seroconversión en ensayos independientes, Tabla 3.

Tabla 3. Niveles de seroconversión por lote y dosis evaluada

Lote	Dosis (μg)	% seroconversión extracción 21 días
EH1006E	5	100
	10	100
Vaxem Hib	10	100
EH1007E	5	100

Los resultados presentados anteriormente evidencian un importante incremento en los niveles de respuesta inmune humoral del antígeno Hib cuando es adyuvado a fosfato de aluminio, solo o en presencia de otros antígenos. Además existe una relación entre la magnitud de la respuesta y la cantidad de antígeno adsorbido.

En los lotes evaluados se observó respuesta de anticuerpos anti-*Haemophilus*, la presentación líquida por sí sola, es capaz de estimular el sistema inmunológico de los animales para producir una adecuada respuesta de anticuerpos, donde el porcentaje de seroconversión es igual o mayor al 50%, Tabla 4, Figura 3.

Tabla 4. Seroconversión de diferentes lotes de vacuna para la dosis de 10 μg

Lotes	% de seroconversión
EH1016E	100
EH1017E	87.5
EH1019E	50
EH2001E	100
EH2002E	100
EH2003E	100

En las muestras vacunales ensayadas sero-convirtieron el 100% de los animales por lo que se cumple con la especificación establecida. Se obtuvo igual porcentaje de seroconversión para los lotes en estudio y la vacuna comercial con las diferentes dosis ensayadas, Tabla 5, Figura 4.

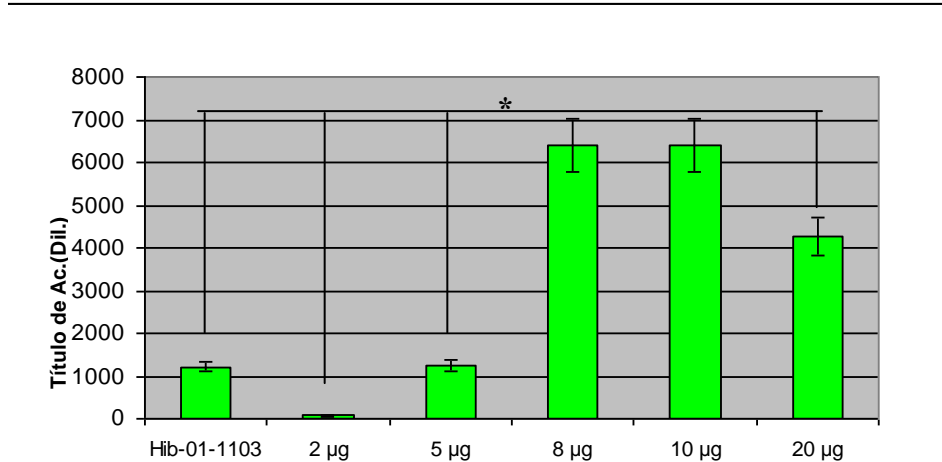


Figura 2. Títulos de anticuerpos anti-Hib expresados como el inverso de la dilución. Hib-01-1103: Lote de vacuna de referencia sin adsorber (10 µg). Las barras representan las vacunas con el antígeno Hib adyuvado en fosfato de aluminio a diferentes concentraciones, cantidad de antígeno adsorbido (2, 5, 8, 10 y 20 µg respectivamente). Prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de Dunn. El asterisco indica diferencias significativas

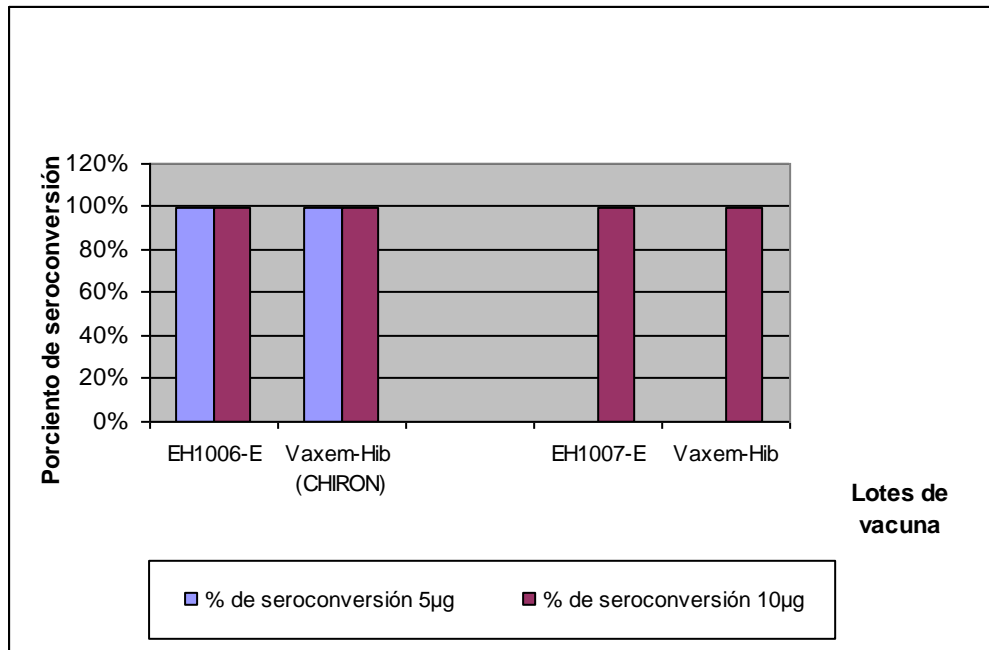


Figura 3. Porcentaje de seroconversión (%) de la formulación vacunal con adyuvante a diferentes dosis de ensayo

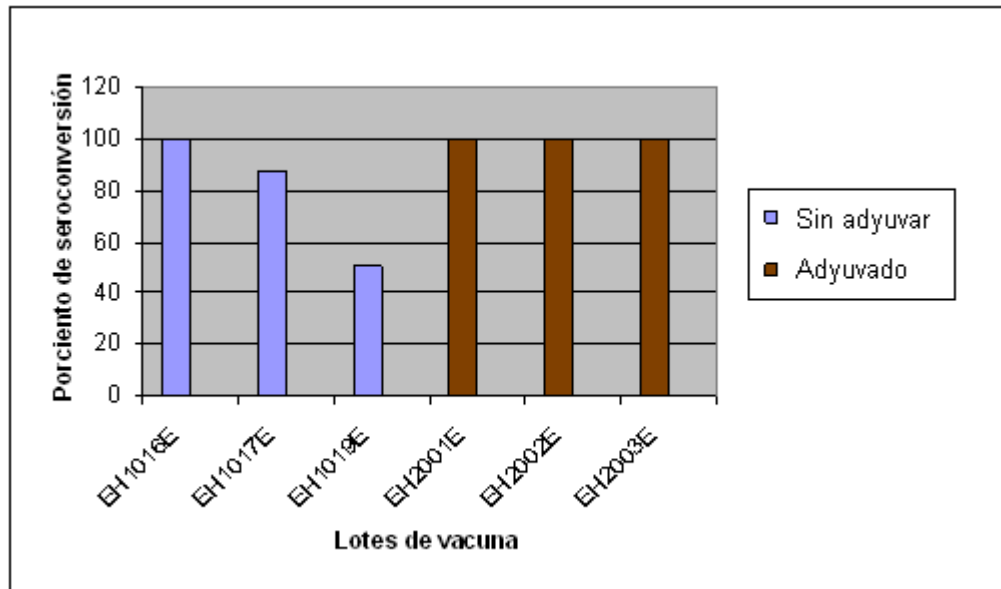


Figura 4. Inmunogenicidad (%) de diferentes lotes de vacuna, seroconversión de diferentes formulaciones de la vacuna con y sin adyuvante para dosis de 10 μ g

Tabla 5. Resultados del % de seroconversión de la vacuna con adyuvante a diferentes dosis comparada con la vacuna comercial

Lotes	% de seroconversión	
	5 µg	10 µg
EH1006-E	100%	100%
Vaxem-Hib (CHIRON)	100%	100%
EH1007-E	---	100%
Vaxem-Hib	---	100%

Otro aspecto fue la demostración de los títulos de anticuerpos IgG anti-Hib en conejos respecto a la vacuna comercial como se muestra en Tabla 6, lo cual demostró que la vacuna Quimi-Hib induce títulos de anticuerpos comparables a los inducidos por la vacuna comercial Vaxem Hib, lo que permitió la evaluación farmacológica que caracteriza la respuesta inmune de la vacuna Quimi-Hib[®], en los diferentes ensayos realizados en animales.

Tabla 6. Títulos anti-Hib de tipo IgG inducidos en el conejo

Grupos de estudio	Media de los Ln (título)	DS (ln)	Límite inferior MGT	MGT	Límite superior MGT
Quimi-Hib	4.6	0.7	43.4	96.5	214.7
CONTROL+	4.6	0.0	100.2	100.2	100.2
CONTROL-	2.9	0.3	11.7	17.5	26.1

4.2.2 Evaluaciones de inmunogenicidad y potencia de los antígenos de D, P, T, HB y HIB-TT. Ingredientes activos de la vacuna pentavalente TRIVAC-HB + Quimi-Hib concentrada

Como puede observarse en la Tabla 7, ambos lotes pasan el ensayo de inmunogenicidad de Hib, pues en ambos se logra que más del 50% de los animales inmunizados sero-conviertan, en el caso del componente Hib presente en la vacuna pentavalente se logra que todos los animales respondan ante el estímulo antigénico, este resultado es superior al logrado con el componente Hib de la vacuna monovalente, por lo que la mezcla de TRIVAC-HB y la vacuna de Hib concentrada no afecta en nada la respuesta de este componente en la vacuna pentavalente.

Tabla 7. Resultados del porcentaje de seroconversión para el componente Hib

Lotes	% de seroconversión
Pentavalente TRIVAC-HB+ Quimi-Hib concentrada	100
EH2009E (Control)	60

En el caso de los resultados de la media geométrica de los títulos anti-Hib como puede observarse en la Tabla 8, se evidencia una mejor respuesta del componente Hib en la vacuna pentavalente respecto al lote de la vacuna monovalente de Hib (EH2009E), este valor está en correspondencia con el resultado obtenido en el porcentaje de seroconversión de los animales.

Tabla 8. Títulos de anticuerpos anti-Hib obtenidos en conejos

Lotes	Títulos de anticuerpos
Pentavalente TRIVAC-HB+ Quimi-Hib concentrada	562
EH2009E (Control)	437

Los resultados de la potencia del componente de HB, pueden observarse en la Tabla 9. Es importante señalar que para que un lote se considere aprobado por este ensayo el mismo debe dar una respuesta de potencia relativa igual o superior a 0,5. En ambos lotes los resultados estuvieron por encima de lo exigido para este ensayo y fueron muy similares.

Tabla 9. Resultados del ensayo de potencia para HB

Lotes	Potencia Relativa
Pentavalente TRIVAC-HB+ Quimi-Hib concentrada 4T0201+ EH2009E	0.78
4T0201	0.86

Referente a los títulos anti-HB obtenidos en ratones se puede observar en la Tabla 10 un comportamiento en el cual los títulos para ambas vacunas combinadas son superiores a los obtenidos en el lote de referencia, este fenómeno de la potenciación de la respuesta contra HB puede estar fundamentado por la presencia de otros antígenos en la formulación, observe como este fenómeno no se expresa en el lote de referencia donde solo está presente el antígeno de superficie del virus de la HB. Los resultados obtenidos en las vacunas tetra y pentavalente son superiores al lote de vacuna HB monovalente, además se evidencia una mejor respuesta para el componente HB en el lote de vacuna tetravalente que en el de pentavalente, este valor pudiera estar influenciado por la presencia del componente Hib en las formulaciones combinadas.

Tabla 10. Títulos de anticuerpos anti-HB

Lotes	Título de anti-HB (UI/mL)
07-0902 referencia	20
4T0101	80
Pentavalente TRIVAC-HB+ Quimi-Hib concentrada	40

Los resultados de las potencias de D, P y T obtenidos para el lote de pentavalente se pueden observar en la Tabla 11. Se considera que los resultados de las potencias de los componentes de

D, P y T pasan la prueba si cumplen con: Anatoxinas diftérica y tetánica: ≥ 2.0 UI/mL y *Bordetella pertussis*: ≥ 4.0 UI/dosis

Tabla 11. Potencias de D, P y T en la vacuna pentavalente

Lote	Difteria (UI/mL)	Tétanos (UI/mL)	Pertussis (UI/dosis)
Pentavalente TRIVAC-HB+ Quimi-Hib concentrada	2,0	11,0	9,6

Las potencias de los 3 componentes presentes en la vacuna pentavalente cumplieron con los requerimientos establecidos para estos ensayos. Hay evidencia de que no se afectan estos parámetros durante la mezcla y aplicación de la vacuna pentavalente, este elemento si bien es necesario demostrarlo como hemos hecho, era de esperar, pues la única vacuna pentavalente existente en el mercado donde se involucran estos antígenos y los de HB y PRP-T ha tenido resultados satisfactorios.

RESUMEN: los títulos de anticuerpos que induce el antígeno Hib adsorbido al adyuvante fosfato de aluminio supera en 6 veces la respuesta del antígeno sin adyugar. El incremento de la respuesta inmune humoral del antígeno Hib adyuvado con respecto al no adyuvado. Los antígenos HB y Hib, que conforman la vacuna TRIVAC-HB + Quimi-Hib concentrada, fueron capaces de inducir los títulos de anticuerpos esperados.

La determinación de la potencia de los antígenos D, P, T y HB, cumplieron con las especificaciones establecidas para este tipo de ensayo ya que los resultados obtenidos mostraron que los valores de potencia obtenidos se encontraban por encima de los límites establecidos para estos antígenos. La respuesta inmunológica humoral que generan los antígenos D, P, T y HB, dentro de la nueva formulación pentavalente, mantienen el mismo comportamiento que el observado en la vacuna tetravalente TRIVAC-HB, además demuestran que la incorporación de Hib como nuevo antígeno no interfiere en la respuesta inmune humoral de estos antígenos antes mencionados. En su conjunto, los resultados mostrados indican que no existe interferencia en la respuesta de anticuerpos de los 5 antígenos presentes en la formulación pentavalente y que cada uno de ellos tienen un comportamiento similar a la respuesta de las unidades de vacunas monovalentes o las combinaciones intermedias, como bivalente, trivalente y tetravalente, demostrándose que: los antígenos D, P, T y HB son capaces de inducir una respuesta de anticuerpos similar a la previamente observada en la vacuna TRIVAC-HB, sin que la incorporación del nuevo antígeno Hib interfiera en la misma.

4.3 Discusión

Los resultados presentados anteriormente evidencian un importante incremento en los niveles de anticuerpos del antígeno Hib cuando es adyuvado a fosfato de aluminio, solo o en presencia de otros antígenos. La respuesta de anticuerpos del antígeno Hib se incrementa significativamente cuando está adyuvado a fosfato de aluminio en comparación con el no adyuvado. Existe una relación entre la magnitud de la respuesta y la cantidad de antígeno adsorbida, a diferencia de lo descrito Mawas en el año 2005, en un estudio desarrollado empleando la rata como modelo animal en el que demostró la reducción en la respuesta anti-PRP como consecuencia de la interferencia del toxoide tetánico (105), lo que constituye un dato a favor de nuestro candidato vacunal. Esta interferencia es de particular interés ya que TT esta también presente en la vacuna como portador de la proteína conjugada al polisacárido capsular. Otros experimentos realizados por este mismo autor en ratas con Hib sin adyugar han evidenciado reducciones de 5 a 11 veces los niveles de anticuerpos anti-PRP cuando son absorbidos a hidróxido de aluminio como adyuvante (105). Entre las proteínas que actualmente se usan como portadoras para vacunas anti Hib son la proteína de membrana de la *Neisseria meningitides*, toxoide tetánico, toroide diftérico y CRM197 (6). Los resultados obtenidos con la conjugación a los dos primeros portadores antes citados fue similar y entre estos el TT resultó ser el más fácilmente disponible. La primera y más importante diferencia fue encontrada en roedores. Estos experimentos iniciales demostraron que el antígeno sintético conjugado con portadores adecuados (TT) era capaz de inducir anticuerpos anti-Hib (6).

La vacuna Quimi-Hib sin adyugar ha sido evaluada en la clínica con resultados satisfactorios, donde los títulos de anticuerpos inducidos se encuentran dentro de los niveles requeridos para brindar protección (106), lo que concuerda con los resultados encontrados en este estudio indican que el antígeno Hib adyuvado induce una respuesta superior al no adyuvado, existe una alta probabilidad de lograr una respuesta inmunológica humoral superior con esta nueva formulación de la vacuna Quimi-Hib, con un mayor nivel de protección a largo plazo.

El título de anticuerpos del antígeno Hib adsorbido a fosfato de aluminio junto con el antígeno de HB fue varias veces superior que la del antígeno sin adsorber, aun en presencia de otro antígeno. Estos resultados indican, que el antígeno de HB no interfiere en los niveles de respuesta inmunológica humoral inducida por Hib. Los resultados de la potencia del componente de HB estuvieron por encima de lo exigido para este ensayo y fueron muy similares a los obtenidos por

otros autores, a pesar de ser un ensayo con una elevada variabilidad provocada principalmente por la utilización de sistemas biológicos (107;108). Este resultado es muy importante ya que el antígeno de HB es uno de los más afectados en las formulaciones de vacunas combinadas tanto por la naturaleza del adyuvante como por la presencia de otros antígenos en la formulación los cuales disminuyen la inmunogenicidad de este antígeno (109;110).

Las vacunas combinadas no son simples mezclas, sino nuevos productos. La eficacia de una vacuna combinada de DPT-Hib ha sido evaluada en varios ensayos clínicos, donde se ha evidenciado una respuesta inmune humoral para el componente Hib, similar o inclusive superior a la obtenida cuando se administran las vacunas de DPT y Hib por separado (111). Las combinaciones con DPTa, en algunos casos, disminuyen ligeramente la inmunogenicidad de sus componentes aunque ellos no interfiere en su eficacia clínica (10). Este constituye el ejemplo mas comúnmente descrito de interferencia inmunológica en vacunas combinadas con DPT.

También se ha evidenciado una respuesta de Ac para el componente Hib, similar o inclusive superior a la obtenida cuando se administran las vacunas de DPT y Hib por separado (112).

Es importante señalar que en el mercado existen diferentes vacunas combinadas donde están presentes DPT y Hib ha demostrado que el componente Hib ha funcionado en presencia de estos y otros antígenos, solo se ha notado en otros estudios clínicos de compañías foráneas un decrecimiento en los títulos anti-Hib (113).

La vacuna Quimi-Hib[®] basada en el antígeno Hib obtenido por vía sintética ha demostrado su efectividad en la clínica donde se ha observado una respuesta inmunológica de anticuepos adecuada para la protección en humanos. En los estudios donde se combina la vacuna Hib, con la tetravalente TRIVAC-HB[®] momentos antes del uso, para conformar una vacuna pentavalente variante 4+1, también se encontraron resultados satisfactorios en cuanto a la inmunogenicidad, en las evaluaciones clínicas (7), en contraposición con lo descrito por la OMS que ha certificado varias vacunas combinadas que contienen a Hib, incluyendo una vacuna pentavalente DPT-HB-Hib de las cuales aun no existe suficiente evidencia de cuan efectiva es esta combinación pentavalente en relación a las vacunas individuales (11).

Incluso la vacuna pentavalente existente de GSK la cual hacemos referencia en la introducción de este trabajo constituye una interferencia identificada en vacunas polivalentes y que no coincide con nuestros resultados en los ensayos de inmunogenicidad de la combinación TRIVAC-HB+Quimi-Hib concentrada lo constituye la vacuna Infanrix[™]-hexa la cual es

licenciada en Europa (114) pero aún no se ha registrado en Estados Unidos debido a los reportes emitidos por las autoridades internacionales en los que se describe una reducción en los títulos de anticuerpos contra Hib en niños inmunizados cuando el antígeno de Hib ha estado en presencia del componente pertussis acelular (39;45;115). En correspondencia con estos datos clínicos, la reducción en la inmunogenicidad de Hib incluso ha sido demostrada en estudios preclínicos empleando la rata como modelo animal (116). El uso de nuevos adyuvantes puede mejorar la inmunogenicidad y la reducción de la respuesta observada con Hib y HB en combinaciones con DTPa (117).

Otros datos clínicos descritos por Dillon en el 2008, concuerdan con nuestros resultados al describir que el Infarix hexa como vacunación primaria y como dosis de refuerzo resultó ser segura y altamente inmunogénica para todos sus componentes en niños menores de dos años de edad, estos fueron generalmente similares a las vacunas disponibles actualmente: DPTa + HBV ó Hib (13;118;119).

La demostración de la inmunogenicidad del antígeno Hib-TT reforzó la posibilidad de formular un candidato vacunal contra el *Haemophilus influenzae* tipo b. Lo que motivó su introducción en una formulación pentavalente, capaz de inducir una respuesta inmunológica similar a la de cada componente independiente, sin observar interferencias ni incompatibilidad entre los mismos. Una vez obtenidas las formulaciones de dos candidatos vacunales, uno monovalente (Quimi-Hib) y otro pentavalente (TRIVAC-HB+Quimi-Hib concentrada), resultó imprescindible emprender la evaluación de seguridad de ambos candidatos previamente a su aplicación en ensayos clínicos.

5. SEGURIDAD PRECLÍNICA

5.1 Materiales y métodos

5.1.1. Sustancia de ensayo

En las tablas 12 y 13 se resumen las características de las vacunas empleadas, en las Figuras de la I-VIII del Anexo se muestran los informes de análisis de cada lote.

Tabla 12. Características y composición de la vacuna Quimi-Hib, por dosis de 0.5 mL

Vacuna	No de lote	Composición	
Quimi-Hib	EH1023E	PRP conjugado Anatoxina tetánica Timerosal Buffer fosfato csp.	10 µg 20.8-31.25 µg 0.05 mg/mL 0.25 mL
Adyuvante	AmpFA1001T	Una ampolleta: Fosfato de aluminio Timerosal	7.0272mg/mL 0.05 mg/mL
Placebo	EH1001P	Timerosal Buffer fosfato csp.	0.05 mg/mL 0.25 mL

Tabla 13. Características y composición de la Vacuna pentavalente TRIVAC-HB + Quimi-Hib concentrada

Vacuna	No de lote	Composición	
Trivac-HB	3T0101	<u>Por dosis (0.5 mL)</u> Anatoxina diftérica Anatoxina tetánica Bordetella pertussis Ag de superficie ADN-r del VHB Gel de hidróxido de Aluminio (Al3+) Tiomersal Cloruro de sodio Fosfato de sodio dibásico (anhidro) Fosfato de monobásico disodio dihidratado Agua para inyección csp	25 Lf 10 Lf 16 U.O. 10 µg 0.5 mg 0.025 mg 4.0 mg 0.28 mg 0.31 mg 0.50 mL
Quimi-Hib	EH2003E EH2002E EH2009E	<u>Por dosis (0,25 mL)</u> Poliribosilribitol fosfato + Anatoxina tetánica (PRP-AT) Tiomersal Cloruro de sodio Fosfato de sodio dibásico (anhidro) Fosfato de sodio monobásico dihidratado	10 µg 0.0125 mg 0.975 mg 0.28 mg 0.31 mg
Placebo TRIVAC-HB	P031	<u>Por dosis (0.5 mL):</u> Compuesto por los mismos componentes y cantidades de la vacuna TRIVAC-HB menos los antígenos de la misma	
Placebo Quimi- Hib	PH3001E	<u>Por dosis (0,25 mL):</u> Compuesto por los mismos componentes y cantidades de lavacuna Quimi-Hib menos el PRP-AT	

5.1.2. Animales de experimentación

Se utilizaron ratas de la línea Sprague Dawley, de ambos sexos procedentes del Centro para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, Cuba), con un peso de 80-100 g y acompañados de sus respectivos certificados de salud, ver figuras de la IX a la XIV del Anexo. Estos fueron examinados clínicamente, pesados, alojados en cajas de makrolón con lecho de viruta de madera (SOURALIT, España) y mantenidos en observación durante 7 días en condiciones ambientales controladas (temperatura entre 19 y 21°C, humedad relativa promedio de 68 % y ciclos luz-oscuridad de 12 horas). El alimento (*ALY co*, CENPALAB) fue suministrado diariamente a razón de 25 g por animal y el consumo diario fue cuantificado. El agua fue suministrada a libre demanda.

5.1.3. Diseño experimental

Los estudios toxicológicos preclínicos en vacunas son complejos y requieren evaluaciones específicas considerando las características del candidato vacunal y su propósito clínico, debajo se citan aspectos novedosos considerados en el diseño experimental de cada estudio, teniendo en cuenta los objetivos de estos, las particularidades de las formulaciones vacunales y el esquema clínico propuesto, ver Tabla 14.

Tabla 14. Elementos novedosos aplicados en cada diseño experimental

Tipo de estudio	Elementos novedosos
Toxicidad aguda	<ul style="list-style-type: none"> - Cantidad de animales por grupo - Niveles de dosis empleados - Evaluación de vacunas independientes* - Estudio histopatológicos de hígado, bazo, ganglios mesentéricos, timo y sitio de administración
Toxicidad a dosis repetidas	<ul style="list-style-type: none"> - Cantidad de animales por grupo - Niveles de dosis empleados - Frecuencia de administración - Evaluación de vacunas independientes* - Tiempos de sacrificios - Parámetros hematológicos y bioquímicos seleccionados - Pesaje de órganos - Inclusión de un grupo satélite - Evaluación morfométrica de las estructuras linfoides del bazo**
Tolerancia local	<ul style="list-style-type: none"> - Cantidad de animales por grupo y sexo - Niveles de dosis empleados - Inclusión de un grupo tratado con Solución salina - Frecuencia de administración - Evaluación de vacunas independientes* - Tiempos de sacrificios - Parámetros hematológicos y bioquímicos seleccionados - Medición del peso corporal - Medición del consumo de alimentos - Inclusión de un grupo satélite - Estudio histopatológicos de hígado, bazo, ganglios mesentéricos, timo y sitio de administración

Leyenda:

* punto considerado en los estudios realizados a la vacuna combinada, ** evaluación realizada en el estudio de Toxicidad a dosis repetidas de la vacuna pentavalente TRIVAC-HB+Quimi-Hib.

Los diseños experimentales para los ensayos toxicológicos establecidos para la evaluación de la vacuna sintética Quimi-Hib y de la vacuna pentavalente TRIVAC-HB + Quimi-Hib concentrada concibe la administración de la sustancia de prueba por la vía propuesta para uso clínico, en su formulación farmacéutica definitiva y el volumen máximo permisible por la especie animal por la vía elegida, siguiendo el esquema descrito en las Tablas 15 y 16.

Para el cálculo de los niveles de dosis en animales con un valor medio de peso corporal entre 80-100 g, se fijó 6 Kg. como promedio de un lactante de 8 semanas y la dosis terapéutica recomendada para cada antígeno en los estudios clínicos previstos. La sustancia de ensayo se aplicó en el cuádriceps femoral de las extremidades posteriores (120).

Tabla 15. Diseños experimentales para la evaluación de la Vacuna cubana sintética: Quimi-Hib

Estudio	Grupo	Dosis/ Tratamiento/ volumen aplicación	Frecuencia de administración/ sacrificio
Toxicidad aguda	I	(5 animales de cada sexo / grupo), 2 mL/Kg - Placebo	Dosis única día 1 del estudio Sacrificio día 15 del estudio
	II	- 3 µg (15 veces la dosis terapéutica)	
	III	- 6 µg (30 veces la dosis terapéutica)	
	IV	- 9 µg (45 veces la dosis terapéutica)	
Tolerancia local	I	(6 animales de cada sexo / grupo), 1.5 mL/Kg. - No tratado	Dos administraciones semanales durante 14 días Sacrificio a las 24 horas, los días 7, 14 y 28 del estudio
	II	- Placebo	
	III	- 0.16 µg (dosis terapéutica)	
	IV	- 1.6 µg (10 veces la dosis terapéutica)	
	V	- 3.2 µg (20 veces la dosis terapéutica)	
	VI/satélite	-3.2 µg (20 veces la dosis terapéutica)	
Toxicidad a dosis repetidas	I	(5 animales de cada sexo / grupo), 1 mL/Kg. - Solución salina al 0.9 %	Dosis repetidas una inoculación diaria hasta completar 14. Sacrificio 15 y día 30 del estudio
	II	- Placebo	
	III	- 1 µg (10 veces la dosis terapéutica)	
	IV	- 3 µg (20 veces la dosis terapéutica)	
	V	- 4 µg (30 veces la dosis terapéutica)	
	VI/satélite	- 4 µg (30 veces la dosis terapéutica)	

Tabla 16. Diseños experimentales para la evaluación de Vacuna Pentavalente TRIVAC-HB + Quimi-HIB concentrada

E	G	Tratamiento	Dosis de cada antígeno					Frecuencia de administración/ sacrificio
			AD (L.f)	AT (L.f)	BP (U.O)	HBsAg (µg)	PRP-T (µg)	
Toxicidad aguda		(5 animales de cada sexo/grupo),	volumen aplicación: 2 mL/Kg					Dosis única día 1 del estudio Sacrificio día 15 del estudio
	I	- Solución salina al 0.9 %	-	-	-	-	-	
	II	- Placebo	0	0	0	0	0	
	III	- 8 veces la DT/ TRIVAC-HB+Quimi-Hib concentrada	2.9	1.2	1.9	1.2	1.2	
	IV	- 15 veces la DT/TRIVAC-HB+Quimi-Hib concentrada	5.5	2.25	3.6	2.25	2.25	
	V	-30 veces la DT/ TRIVAC-HB+Quimi-Hib concentrada	11.1	4.5	7.2	4.5	4.5	
	VI	- 30 veces la DT/TRIVAC-HB	11.1	4.5	7.2	4.5	-	
VII	- 30 veces la DT/Quimi-Hib	-	-	-	-	4.5		
Tolerancia local		(5/10 animales machos/grupo),	volumen aplicación: 1.5 mL/Kg.					Cuatro administraciones en días alternos Sacrificio los días 8 y 14 del estudio
	I	- Solución salina al 0.9 %	-	-	-	-	-	
	II	- Placebo	0	0	0	0	0	
	III	- DT/ TRIVAC-HB+Quimi-Hib concentrada	0,34	0,13	0,22	0,13	0,13	
	IV	- 5 veces la DT/ TRIVAC-HB+Quimi-Hib concentrada	1,70	0,69	1,1	0,69	0,69	
	V	- 10 veces la DT/ TRIVAC-HB+Quimi-Hib concentrada	3,4	1,38	2,2	1,38	1,38	
	VIi	- 10 veces DT/TRIVAC-HB	3.4	1,38	2,2	1,38	-	
VIId	- 10 veces la DT/Quimi-Hib	-	-	-	-	1.38		
Toxicidad a dosis repetidas		(20 animales 10 de cada sexo/grupo),	volumen aplicación: 1 mL/Kg.					Dosis repetidas una inoculación diaria hasta completar 14. Sacrificio 15 y día 30 del estudio
	I	- Solución salina al 0.9 %	-	-	-	-	-	
	II	- Placebo	0	0	0	0	0	
	III	- 3 veces la DT/TRIVAC-HB+Quimi-Hib concentrada	1.06	0.42	0.68	0.42	0.42	
	IV	- 6 veces la DT/ TRIVAC-HB+Quimi-Hib concentrada	2.13	0,85	1,36	0,85	0,85	
	V	- 9 veces la DT/ TRIVAC-HB+Quimi-Hib Concentrada	3,20	1.28	2.05	1.28	1.28	
	VI	- 9 veces la DT/TRIVAC-HB	3.20	1.28	2.05	1.28	-	
	VII	- 9 veces la DT/Quimi-Hib	-	-	-	-	1.28	
VIII	- 9 veces la DT/ TRIVAC-HB+Quimi-Hib concentrada	3,20	1.28	2.05	1.28	1.28		

Leyenda:

E: estudio, G: grupos, i: extremidad izquierda, d: extremidad derecha

5.1.4. Observaciones clínicas, sacrificio y toma de muestras

Los animales fueron observados diariamente a fin de registrar cualquier variación en el comportamiento o signo de toxicidad, cambios en la piel y en el pelo, en los ojos y membranas mucosas, en los sistemas respiratorio, circulatorio, nervioso central y autónomo, así como la actividad somatomotora. Se realizó pesaje con una frecuencia semanal y el sacrificio se efectuó mediante dislocación cervical, previo tratamiento anestésico en cámara de gases (CO₂)(103) y exanguinación de cada animal. Durante la necropsia fueron observados macroscópicamente todos los órganos y se tomaron muestras de hígado, bazo, ganglios mesentéricos, timo y sitio de administración para estudios histopatológicos. Las muestras se fijaron en formol neutro al 10 % y se procesaron por el método de inclusión en parafina. Se tiñeron con Hematoxilina-Eosina, y fueron cortadas entre 2-3 micras. El diagnóstico histopatológico se realizó empleando un microscopio simple Carl Zeiss con aumentos 5X, 10X y 40X. Las microfotografías se tomaron usando una cámara digital Canon Power Shot.

En los estudios de dosis reiteradas se determinaron parámetros hematológicos como eosinófilos (E), hematocrito (ETO), hemoglobina (HG), hemoglobina corpuscular media (HCM), volumen corpuscular medio (VCM), concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM), leucocitos (LEU), plaquetas (PLAQ), neutrófilos (N), linfocitos (L), monocitos (M) y eosinófilos (E), también se realizó el pesaje de órganos diana: bazo, glándulas adrenales, riñón izquierdo, riñón derecho, hígado y timo.

5.1.5. Procesamiento de datos

Las variables usadas para el tratamiento estadístico fueron el peso corporal (PC), el consumo promedio semanal de alimento (CA), resultados hematológicos y bioquímicos (HQ), peso de órganos (PO) y los hallazgos histopatológicos (HH). En todos los casos se estimaron las medidas de tendencia central y dispersión (media, desviación estándar, valores máximos y mínimos). Se estimaron en todos los casos como características descriptivas las medidas de tendencia central y dispersión (media, desviación estándar y valores máximos y mínimos). Para el análisis de los PC, CA, HQ y PO se verificaron en cada sexo, los supuestos de normalidad (pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk) y homogeneidad de varianzas (prueba de Levene). Cuando los mismos eran satisfechos, se aplicó un Análisis de varianza (ANOVA) paramétrico. Si no cumplían con estos criterios, se usó la alternativa no paramétrica (prueba de Kruskal-Wallis).

En PC y CA se realizaron comparaciones pareadas en los intervalos consecutivos de tiempo, utilizando la prueba t pareada o la prueba de Wilcoxon, en función del cumplimiento del supuesto de aproximación por una distribución normal. En los casos en que se detectaron diferencias entre los grupos de manera global, se aplicó la prueba de comparaciones múltiples de LSD o prueba de Dunn, en dependencia del cumplimiento de los supuestos distribucionales.

Para el Consumo de Alimentos se crearon nuevas variables que recogían la información del consumo promedio semanal y con estas se realizaron los análisis.

Los datos resultantes del estudio histopatológico fueron analizados a través de la construcción de las tablas de clasificación cruzadas, con la prueba de independencia asociada (prueba exacta de Fisher).

Las interpretaciones fueron realizadas considerando diferencias estadísticamente significativas en los dos primeros casos (PC y CA) la corrección del error de Bonferroni ($\alpha \leq 0.01$) y en las restantes variables se consideró $p \leq 0.05$. En lo adelante, cuando se plantea que hay diferencia, aumento, disminución, etc., es porque cumple el criterio de que es estadísticamente significativo.

Para realizar todos los análisis matemáticos se empleó el paquete estadístico Statistical Package Scientific System, versión 11.5, Windows.

5.1.6. Evaluación de efectos inmunotóxicológicos

En el estudio de Toxicidad a dosis repetidas de la vacuna pentavalente TRIVAC-HB+ Quimi-Hib se realizó la evaluación de los efectos sobre el sistema inmune, siguiendo algunos criterios de la FDA, para estudios inmunotóxicológicos del Tipo I (91), Tabla 17:

Tabla 17. Recomendaciones para evaluar efectos inmunotóxicológicos Tipo I

Ensayos Tipo I	Hematología	Histopatología	Bioquímica
	Conteo total de células blancas	Tejido linfoide	Transaminasa séricas
	Diferencial de células blancas	Bazo	
	Linfocitosis	Linfonodos	
	Linfopenia	Timo	
	Eosinofilia		

La valoración de estos efectos en los órganos linfoides, se complementó con la morfometría de los folículos linfoides del bazo, en los que se calculó el área total esplénica, el área de la vaina linfoide periarteriolar (PALS, linfocitos T dependiente) y de la zona del manto (linfocitos B dependiente). Además se evaluó la respuesta inmune en este órgano a partir del conteo de centros

germinativos en la vaina linfóide periarteriolar. Para ello, se usó el software ImageJ (Rasband, 2006). Se comparó el resultado obtenido de las medias entre los grupos y con respecto al grupo control tratado con solución salina. Se utilizó el paquete estadístico SPSS, a través de la versión 11.5 sobre Windows. Las comparaciones se realizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de Dunn, se consideraron diferencias estadísticamente significativas aquellos valores de $p \leq 0.05$.

5.2 Resultados

5.2.1- Toxicidad aguda de la vacuna sintética Quimi-Hib

5.2.1.1- Peso corporal

El comportamiento del parámetro peso corporal fue homogéneo para todos los grupos en estudio. Se determinó el valor promedio y la desviación estándar del peso para cada grupo en el tiempo (Tabla 18) y se realizó el análisis estadístico de los datos obtenidos de cada grupo para el mismo tiempo de evaluación. No existieron diferencias estadísticas en el mismo tiempo de evaluación entre el peso de animales inoculados con el placebo en relación con los que fueron tratados con dosis elevadas de la vacuna. El día 14 de la evaluación, los animales hembras del grupo I (placebo) presentaron pesos significativamente mayores que el grupo IV (45 veces la DT). Con respecto al comportamiento de éste parámetro en el tiempo, en ambos sexos y para todos los grupos se detectaron incrementos significativos durante la fase experimental del estudio, observación confirmada al realizar el análisis estadístico de los datos, sin embargo al analizar los datos entre los grupos de tratamiento, empleando el test ANOVA no se detectaron diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 18. Valores promedios de peso corporal ($g \pm DS$) y valores de p entre grupos en cada tiempo de pesaje

Grupo	Día 1	Día 7	Día 14
I-♀	90.60 ± 4.72	135.40 ± 5.03	158.80 ± 4.44
II-♀	90.40 ± 5.64	137.60 ± 3.21	155.40 ± 8.38
III-♀	90.40 ± 4.04	132.80 ± 9.71	149.60 ± 5.77
IV-♀	90.60 ± 5.64	132.80 ± 8.23	147.80 ± 3.42
I-♂	100.60 ± 2.88	156.20 ± 7.98	203.20 ± 14.43
II-♂	100.20 ± 3.27	154.40 ± 3.78	193.80 ± 16.50
III-♂	100.60 ± 2.61	159.00 ± 4.47	204.20 ± 7.76
IV-♂	100.40 ± 3.13	165.00 ± 6.40	215.00 ± 8.86

5.2.1.2- Consumo de alimentos

El consumo de alimentos se comportó de manera homogénea entre los grupos para cada día de evaluación, (Tabla I del Anexo, figuras 5 y 6). Desde el punto de vista estadístico, se utilizó un ANOVA con el que se definió que no se existían diferencias significativas entre los grupos.

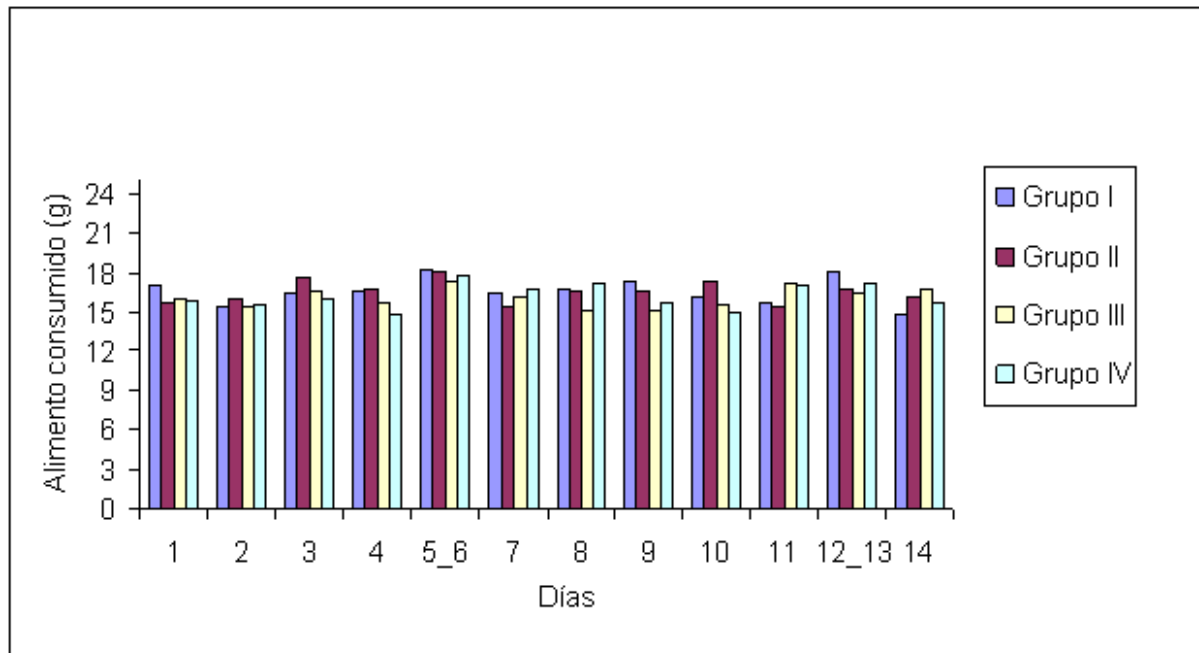


Figura 5. Comportamiento del consumo de alimentos (g), animales hembras. Prueba de Anova seguida T pareada de comparaciones múltiples

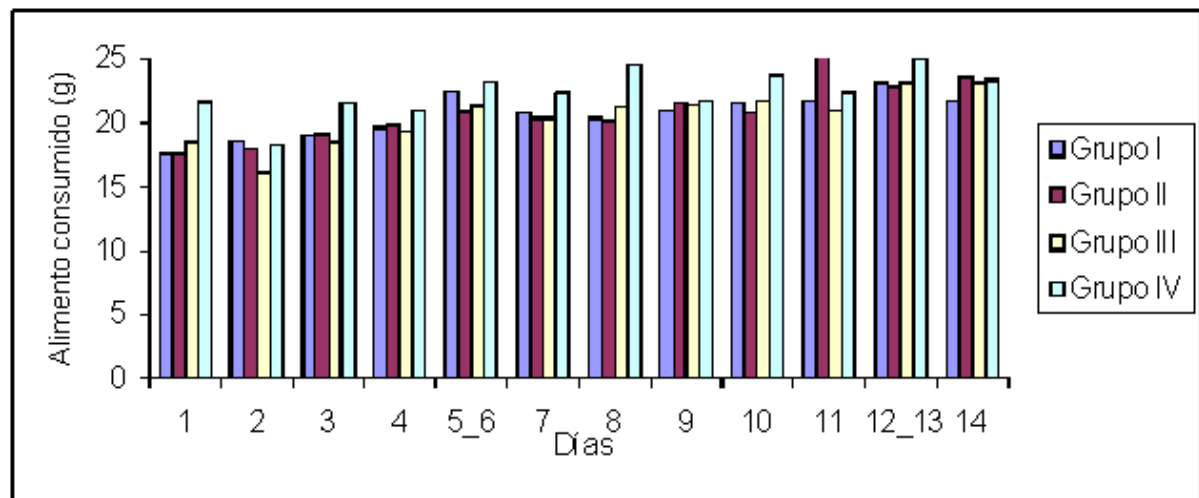


Figura 6. Comportamiento del consumo de alimentos (g), animales machos. Prueba de Anova seguida T pareada de comparaciones múltiples

En los animales machos se evidencian valores estables de consumo de alimentos a lo largo de todo el estudio, con un valor promedio de 24.59 g de alimento consumido diariamente. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas en el análisis de los datos obtenidos.

5.2.1.3- Observaciones clínicas y macroscópicas

En las observaciones clínicas realizadas diariamente en los animales se observó un comportamiento normal de los animales durante el período evaluado, estos no presentaron signos tóxicos como cambios en la piel y en el pelo, en los ojos y membranas mucosas, actividad somatomotora y comportamiento. Al observar el sitio de inyección no se evidenció ningún signo de reacción local; ni alteraciones de otro tipo. No se registraron muertes en el estudio.

No se observó ningún signo indicativo de alteraciones en los órganos y tejidos inspeccionados.

5.2.1.4- Hallazgos microscópicos

El estudio histopatológico de las muestras se centró en los siguientes signos histológicos: granuloma focal, presencia de polimorfonucleares, granuloma múltiple y necrosis, en el sitio de inoculación, así como hematopoyesis extramedular en bazo e hígado, ver Tabla 19.

Tabla 19. Frecuencia de aparición de alteraciones microscópicas por grupos

Grupo	Sitio de administración				Bazo y Hígado
	GF	GM	N	NAS	HE
I/ Placebo	7/10	1/10	6/10	2/10	10/10
II/ 15 veces la DT	6/10	0/10	4/10	3/10	10/10
III/ 30 veces la DT	4/10	4/10	7/10	2/10	10/10
IV/ 45 veces la DT	3/10	1/10	4/10	6/10	10/10

Leyenda:

GF- granuloma focal, *GM-* granuloma múltiple, *HE-* hematopoyesis extramedular, *N-* necrosis, *NAS-* nada a señalar

Los signos reportados se concentran en aquellos referidos al sitio de inoculación cuya mayor incidencia es reportada en granuloma focal, que alterna con granuloma múltiple en todos los grupos por igual, incluyendo el placebo de la formulación. La necrosis observada no constituye un signo de interés al ser observada en la parte central de estos granulomas.

Como puede observarse, no existen diferencias apreciables entre el grupo placebo y los tratados, siendo incluso el grupo IV (45 veces la DT) el de menos afectación en el sitio de inoculación. Los órganos hígado, bazo y ganglios linfáticos mesentéricos no mostraron alteraciones

vinculadas a una posible toxicidad. Se evidenció signos de hematopoyesis extramedular en hígado se forma similar entre los grupos con independencia del tratamiento. Al analizar estos resultados desde el punto de vista estadístico en ningún caso los resultados de la prueba chi-cuadrado son válidos al incumplirse el supuesto sobre las frecuencias esperadas. En la comparación para cada grupo con respecto al grupo I, la prueba usada fue la exacta de Fisher y en ningún caso se detectaron diferencias entre los grupos, en ninguno de los parámetros evaluados.

RESUMEN: Los resultados obtenidos en este estudio evidenciaron la no toxicidad del producto debido a que no se presentaron signos de toxicidad ni alteraciones en el comportamiento durante las observaciones clínicas realizadas diariamente, el incremento de peso fue progresivo durante el período evaluado, lo cual consideramos corroboró la ausencia de efectos tóxicos. Por otro lado, en las observaciones macroscópicas en los órganos estudiados no evidenciaron alteraciones, ni tampoco se presentaron alteraciones morfológicas en dichos órganos en el procesamiento histopatológico.

5.2.2- Tolerancia local de la vacuna Quimi-Hib

5.2.2.1- Observaciones clínicas

En las observaciones clínicas realizadas diariamente y durante los primeros 20 minutos posteriores a cada administración no se evidenciaron signos de toxicidad. No se reportaron cambios en la piel, en el pelo, en los ojos y membranas mucosas, los animales mantuvieron adecuada actividad somatomotora, el comportamiento y respuesta ante estímulos fue el normal para la especie (91;121;122). No se produjeron muertes. Los animales administrados con la dosis terapéutica no presentaron durante el estudio ningún tipo de afectación y fueron reportados sin signos aparentes. El único signo clínico observado durante el estudio fue la induración encontrada en el sitio de administración de la vacuna conjugada Hib sintético T adyuvada en los grupos II (Placebo), IV (10 veces la DT), V (20 veces la DT) y V (Satélite). Durante los primeros 4 días del estudio no se observó reacción local, se observó a partir del día 5 en forma de induraciones clasificadas como ligeras en la totalidad de los animales de los grupos II (placebo), V (20 veces la DT) y VI (Satélite), con la excepción de un animal del Grupo VI (satélite).

Día 5 del estudio: Transcurridas 24 horas de la segunda administración aparecen en todos los animales del grupo II (placebo), V (DT) y VI (satélite) induraciones catalogadas de ligeras, solo

un animal del grupo VI se mantuvo sin signos aparentes. Los animales de los grupos I (No tratado), III (DT) y IV (10 veces la DT) no presentaron afectaciones, con la excepción de un animal del grupo IV que fue reportado con induración ligera. A partir de este día la intensidad de la induración observada varió (ligera, moderada y muy ligera), mostrándose como respuesta específica a estimulaciones repetida.

Días 6-8 del estudio: En el Grupo II (placebo) se observaron induraciones de diferente intensidad que oscilaron entre ligeras 6/12, moderadas 5/12 y muy ligeras 2/12. En el grupo IV (10 veces la DT) aparecen las induraciones reportadas como ligeras en 5/12, el resto (7/12) mantienen la observación sin signos aparente. En cuanto a los grupos V (20 veces la DT) y VI (satélite) en casi la totalidad de los animales se mantuvieron induraciones ligeras, con la excepción de un animal del grupo VI (satélite), cuya observación reportó induración muy ligera.

Día 9, 10 y 11 del estudio: 24 horas después de la tercera administración (Día 9) todos los animales de los grupos II (placebo), IV (10 veces la DT), V (20 veces la DT) y VI (satélite) presentaban induración en el sitio, con diversos grados de intensidad, con la excepción de un animal de grupo IV (10 veces la DT) que se reportó sin signos aparentes. Debe destacarse que los animales del grupo III (DT) administrados con la dosis terapéutica no presentaban ningún signo clínico en el sitio aún después de 3 administraciones. A las 48 y 72 horas posteriores a la tercera administración (Días 10 y 11), las induraciones en el sitio de administración de los animales se mantuvieron en idéntica situación el día anterior.

Día 12 del estudio: Transcurridas 24 horas posteriores a la cuarta administración se observó en la totalidad de los animales hembras de los grupos II (placebo), V (20 veces la DT) y VI (satélite) las induraciones cursaron de ligeras a moderadas, solo en un animal (hembra) del grupo IV presentó induración moderada, el resto se mantuvo con intensidad ligera.

Día 13 y 14 del estudio: A partir del día 13 del estudio, luego del total de las aplicaciones previstas, las variaciones en las observaciones clínicas fueron mínimas, manteniéndose idénticas para los animales de los grupos V (20 veces la DT) y VI (satélite). Por otra parte en los grupos II (placebo) y IV (10 veces la DT) solo se observaron variaciones en los machos donde las induraciones cursaron hacia moderadas en un animal de cada grupo mencionado (II y IV).

5.2.2.2- Hallazgos macroscópicos

Se realizó la observación macroscópica sin que se reportara ningún signo tóxico. En el caso del sitio de administración, las observaciones macroscópicas corroboran las observaciones clínicas

realizadas. Se realizaron 4 sacrificios (24 horas, 7, 14 y 28 días) en los que se realizó la observación macroscópica de todos los órganos, sin que se evidenciara daño en ninguno de ellos. Se hizo especial énfasis en la observación de hígado, bazo, ganglios linfáticos mesentéricos y timo por ser órganos primarios de aparición de efectos adversos (91;121;122). En el caso del sitio de administración se evidenció, como único signo la presencia de nódulos blancos cuya magnitud e intensidad estuvo en dependencia de la dosis y volumen administrado. Este signo estuvo directamente relacionado con la induración descrita en la observación clínica y evidentemente responde a la misma causa. En las Tablas 20-22 aparecen registradas la frecuencia de aparición de los nódulos reportados en cada momento de sacrificio.

A las 24 horas de la primera administración del producto, solamente en el grupo tratado con la solución salina (grupo I) no se reportó ninguna observación.

Tabla 20. Registro de la frecuencia de aparición de nódulos en los animales sacrificados a las 24 horas

Nódulos	Grupos de tratamiento				
	I	II	III	IV	V
	0/2	1/2	1/2	2/2	1/2

En el sacrificio realizado a los 7 días (Tabla 21), en el grupo placebo el 50 % de los animales presentaron nódulos de aspecto blanquecino, lo que coincide con las observaciones clínicas realizadas.

Tabla 21. Registro de la frecuencia de aparición de nódulos en los animales sacrificados a los 7 días

Nódulos	Grupos de tratamiento				
	I	II	III	IV	V
	0/6	6/6	1/6	6/6	5/6

En el sacrificio realizado a los 14 días, en el cual los animales tenían 4 administraciones del producto de ensayo, la observación más relevante fue que los animales administrados con la dosis terapéutica (Grupo III/DT) no presentaron alteración morfológica, con la excepción de un animal de este grupo.

Tabla 22. Registro de la frecuencia de aparición de nódulos en los animales sacrificados a los 14 días

Nódulos	Grupos de tratamiento				
	I	II	III	IV	V
	0/6	3/6	0/6	2/6	1/6

En el resto de los animales administrados con la sustancia de ensayo de los grupos III/ DT, IV/ 10 veces la DT, V/ 20 veces la DT y II/ placebo, el hallazgo fundamental fueron las formaciones blanquecinas de aspecto nodular, aunque debe señalarse que la misma no se tradujo en un signo clínico detectable. En el resto de los grupos, la frecuencia de aparición de los mencionados nódulos fue baja y de poca intensidad (Tabla 22).

El grupo satélite fue observado 14 días después de concluir las administraciones, el día 28 del estudio. El elemento relevante lo constituye el hecho de que, si bien no hubo reversión total de las formaciones nodulares observadas, se evidenció la desaparición de este signo en 2 del total de 3 animales machos y en las 3 hembras. En general, las formaciones nodulares blanquecinas en el sitio de administración se reportaron con mayor frecuencia en los animales tratados con las mayores dosis (grupos IV/ 10 veces la DT y V/ 20 veces la DT) y con el mayor volumen (grupos II/ placebo, IV/ 10 veces la DT y V/ 20 veces la DT), por lo que podemos asumir que su presencia guarda una estrecha relación con el mecanismo de acción del adyuvante utilizado en la formulación de la vacuna Quimi-Hib.

En los sacrificios realizados se reportó alteración en los órganos analizados (hígado, bazo, timo y ganglios linfáticos mesentéricos) en los grupos de estudio.

5.2.2.3- Hallazgos microscópicos

En el estudio histopatológico fueron analizadas muestras de hígado, bazo, timo, ganglios mesentéricos y sitio de inoculación. No existió daño en ningún órgano evaluado, mientras que los órganos linfoides no muestran signos de inmunotoxicidad, apreciándose una respuesta celular proliferativa, presente en todos los grupos de tratamiento.

Sacrificio 24 horas**Tabla 23. Frecuencia de aparición de hallazgos histopatológicos en los animales sacrificados a las 24 horas**

Grupo/Tratamiento	Sitio de Inoculación			Hígado	Bazo	Ganglios linfáticos mesentéricos	Timo
	Intensidad de la reacción			TG	HE		
	Discreta	Moderada	Severa				
II/ Placebo	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2	1/2	0/2
III/ DT	1/2	0/2	0/2	0/2	2/2	2/2	0/2
IV/ 10 veces la DT	1/2	0/2	0/2	0/2	0/2	2/2	0/2
V/ 20 veces la DT	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2	2/2	0/2

Leyenda:

TG- Tejido de granulación, HE- Hematopoyesis extramedular

Transcurridas 24 horas de la primera administración, en el sitio se observó movilización y concentración de macrófagos y la aparición de depósitos líquidos del inóculo. Esta observación se repitió en los sacrificios realizados los días 7, 14 y 28, con intensidad variable relacionada en consonancia con el número de aplicaciones sucesivas y dosis/volúmenes de vacuna evaluados. Se observó además hematopoyesis extramedular de hígado y bazo, en este último caso se presentó en todos los animales observados. En el análisis microscópico de los ganglios linfáticos mesentéricos y el timo no fue observada alguna afectación como se puede verificar en la Tabla 23.

Sacrificio 7 días**Tabla 24. Frecuencia de aparición de hallazgos histopatológicos, animales sacrificados a los 7 días**

Grupo/Tratamiento	Sitio de Inoculación			Hígado	Bazo	Ganglios linfáticos mesentéricos	Timo
	Intensidad de la reacción			TG	HE		
	Discreta	Moderada	Severa				
I/ No tratado	0/6	0/6	0/6	0/6	2/6	5/6	0/6
II/ Placebo	0/6	1/6	5/6	0/6	2/6	6/6	0/6
III/ DT	3/6	0/6	0/6	0/6	0/6	6/6	0/6
IV/ 10 veces la DT	2/6	4/6	0/6	0/6	2/6	5/6	0/6
V/ 20 veces la DT	1/6	5/6	0/6	0/6	1/6	6/6	0/6

Leyenda:

TG- Tejido de granulación, HE- Hematopoyesis extramedular

En el sacrificio realizado a los 7 días post-administración, después de dos inoculaciones del producto, la reacción local cursó hacia la aparición de granulomas macrofágicos difusos con

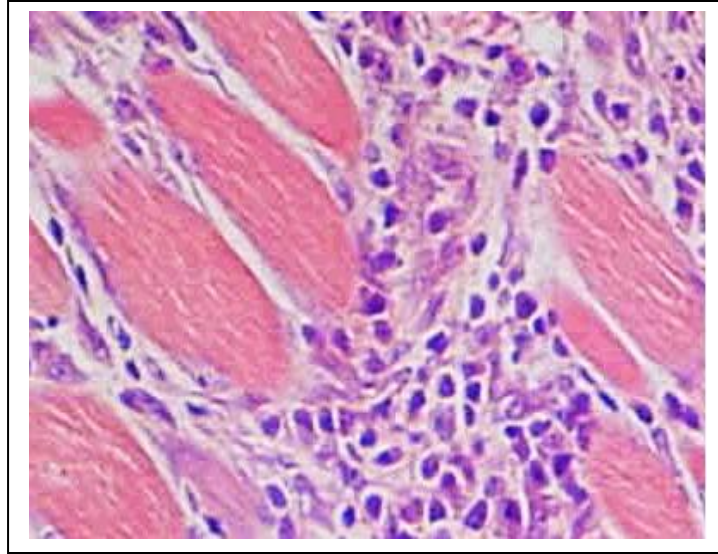


Figura 7. Granuloma macrofágico discreto con regeneración del sarcolema de la fibra muscular (40 X), animal del grupo administrado con la dosis terapéutica

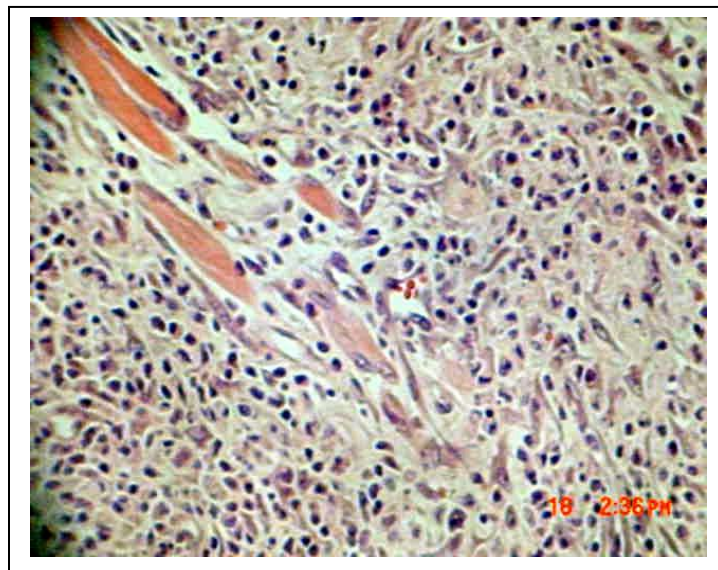


Figura 8. Granuloma y tejido de cicatrización en animales del grupo satélite (40X)

depósitos eventuales de líquido, discreta respuesta de cicatrización en el seno de la reacción e infiltración linfocitaria preferentemente en la periferia, lo cual fue observado con diferentes grados de intensidad. En el grupo III (DT) la intensidad de la reacción granulomatosa fue discreta en la mayoría de los animales, ver Tabla 24. Esta reacción se caracterizó por la ausencia de depósitos de sustancia y por una evidente regeneración del sarcolema de las fibras musculares (Figura 7), que fue indetectable en las observaciones clínicas, al no producir induración en el sitio observado. No se reportaron diferencias significativas entre los grupos en cuanto a la aparición de los hallazgos observados en bazo e hígado. Al igual que en el sacrificio anterior no fueron reportadas afectaciones en los ganglios linfáticos mesentéricos y timo. Con respecto al sitio de inoculación, se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo I (no tratado) con respecto a los grupos II (placebo), IV (10 veces la DT) y V (20 veces la DT).

Sacrificio 14 días

Tabla 25. Frecuencia de aparición de hallazgos histopatológicos, animales sacrificados a los 14 días

Grupos	Sitio de Inoculación			TG	Hígado	Bazo	Ganglios linfáticos mesentéricos	Timo
	Intensidad de la reacción				HE	HE		
	Discreta	Moderada	Severa					
I/ No tratado	0/6	0/6	0/6	0/6	4/6	5/6	0/6	0/6
II/ Placebo	0/6	0/6	6/6	0/6	1/6	6/6	0/6	0/6
III/ DT	3/6	1/6	0/6	2/6	2/6	5/6	0/6	0/6
IV/ 10 veces la DT	1/6	3/6	2/6	0/6	3/6	5/6	0/6	0/6
V/ 20 veces la DT	0/6	6/6	0/6	0/6	0/6	6/6	0/6	0/6

Leyenda:

TG- Tejido de granulación, HE- Hematopoyesis extramedular

En el sacrificio realizado a los 14 días post-administración (Tabla 25), en 3 de los animales del grupo III (DT), se observó la presencia de granulomas de intensidad discreta y en uno de ellos intensidad moderada de este signo, el cual no alcanzó a traducirse en induración durante la observación clínica. En los dos animales restantes de este grupo no fue reportada ninguna observación en el sitio de administración. Los animales del Grupo IV (10 veces la DT) presentaron una intensidad de la reacción variable que osciló desde un 1 animal con granuloma de intensidad discreta, 3 animales con granulomas calificados de moderados hasta 2 animales con reporte de granuloma de severa intensidad. En la totalidad de los animales del Grupo V (20

veces la DT) la reacción granulomatosa observada fue agrupada en intensidad de moderada y los del grupo II (placebo) mostraron en su totalidad granulomas de intensidad severa. Los resultados estadísticos obtenidos para este tiempo fueron igualmente similares a los reportados en el sacrificio del día 7, donde no fue posible la comparación entre el grupo II (placebo) y los grupos IV y V (10 y 20 veces la DT, respectivamente) al presentar idénticos comportamientos en el sitio de administración. Una vez realizada la corrección del error de Bonferroni ($\alpha = 0.007$), se detectan diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.001$) de los grupos II (placebo), IV (10 veces la DT) y V (20 veces la DT) (100% de los casos alterados) con respecto al grupo I/ no tratado (100% de los casos sin alteración). No se reportaron diferencias significativas entre el grupo III (DT) y el grupo I (no tratado).

Sacrificio 28 días

Tabla 26. Frecuencia de aparición de hallazgos histopatológicos en los animales sacrificados del Grupo satélite

Grupo	Sitio de Inoculación			Hígado	Bazo	Ganglios	Timo
	Intensidad de la reacción			TG	HE		
	Discreta	Moderada	Severa				
VI/Satélite	4/6	2/6	0/6	0/6	1/6	0/6	0/6

Leyenda:

TG- Tejido de granulación, HE- Hematopoyesis extramedular

En el caso de las observaciones microscópicas realizadas en el sitio de administración durante el estudio histopatológico a los animales del grupo satélite, podemos deducir que aunque no hubo reversión total del hallazgo (granulomas macrofágicos), sí se observó una tendencia a la disminución del grado de intensidad de la reacción granulomatosa, lo cual se refleja en la Tabla 26, si se compara la reacción referida para el grupo V (20 veces la DT) a los 14 días con la reportada para el grupo satélite a los 28 días (administrados en la misma frecuencia y dosis), se observa que el grado de intensidad varía desde reacción moderada para la totalidad de los animales (Grupo V/ 20 veces la DT) a moderada (en 2 animales) y discreta (en 4 animales). Histológicamente también se observan diferencias que confirman esta tendencia, ya que la reacción granulomatosa reportada a los 28 días del estudio se caracterizó por ser propiamente celular, sin depósitos líquidos y con tejido de granulación incipiente en el seno de los granulomas (índice de mecanismos de reparación), con infiltración linfocitaria y de células plasmáticas en el seno de la reacción, como se puede observar en la Figura 8.

En bazo, se reportó hematopoyesis extramedular en un animal puntual de este grupo, lo que nos indica una evidente recuperación. Al igual que en los sacrificios anteriores no fue observada afectación en los ganglios linfáticos mesentéricos y el timo.

RESUMEN: En las observaciones clínicas realizadas en el sitio de administración diariamente, el único signo detectado fue la presencia de induraciones clasificadas como ligeras y moderadas en el sitio de administración. En el grupo administrado con la DT estas fueron clasificadas como discretas o ligeras y revirtieron al segundo día de su aparición sin que se volvieran a observar. Consideramos que la presencia de dichas induraciones no revisten importancia desde el punto de vista toxicológico debido al proceso de reversión planteado anteriormente.

La aparición de induraciones en el sitio administrado con la vacuna Quimi-Hib adyuvada con fosfato de aluminio se corresponde con lo reportado en la literatura, en cuanto a la aparición de granulomas macrofágicos como signo clásico causante de induración en el sitio de administración de vacunas adyuvadas con sales de aluminio. Lo que coincide con los hallazgos histopatológicos, en los cuales solo se reportaron formaciones nodulares, las que consideramos están íntimamente relacionadas con la presencia del adyuvante teniendo en cuenta lo expresado anteriormente y los resultados obtenidos, tanto en las observaciones clínicas como en las macroscópicas y microscópicas, del grupo administrado con el placebo.

5.2.3- Toxicidad a dosis repetidas de la vacuna Quimi-Hib

5.2.3.1- Peso corporal

En ambos sexos, los grupos fueron homogéneos en cuanto a los pesos corporales en todos los tiempos de registro del peso corporal. En ambos sexos y para cada grupo se detectaron diferencias significativas en el tiempo, que se muestran como incrementos del peso corporal con respecto a la media del peso inicial de cada grupo (Figuras 9 y 10, ver Tablas II y III del Anexo). Se realizaron los respectivos Anovas para cada tiempo de pesaje y se determinó que no existieron diferencias significativas entre los grupos de tratamiento.

Los animales mantuvieron un incremento progresivo de peso durante el período de experimentación. Al analizar el comportamiento del peso en el grupo VI (Satélite) se detectaron diferencias significativas en el tiempo, lo que se tradujo como un incremento progresivo del peso en cada semana en todos los animales de ambos sexos.

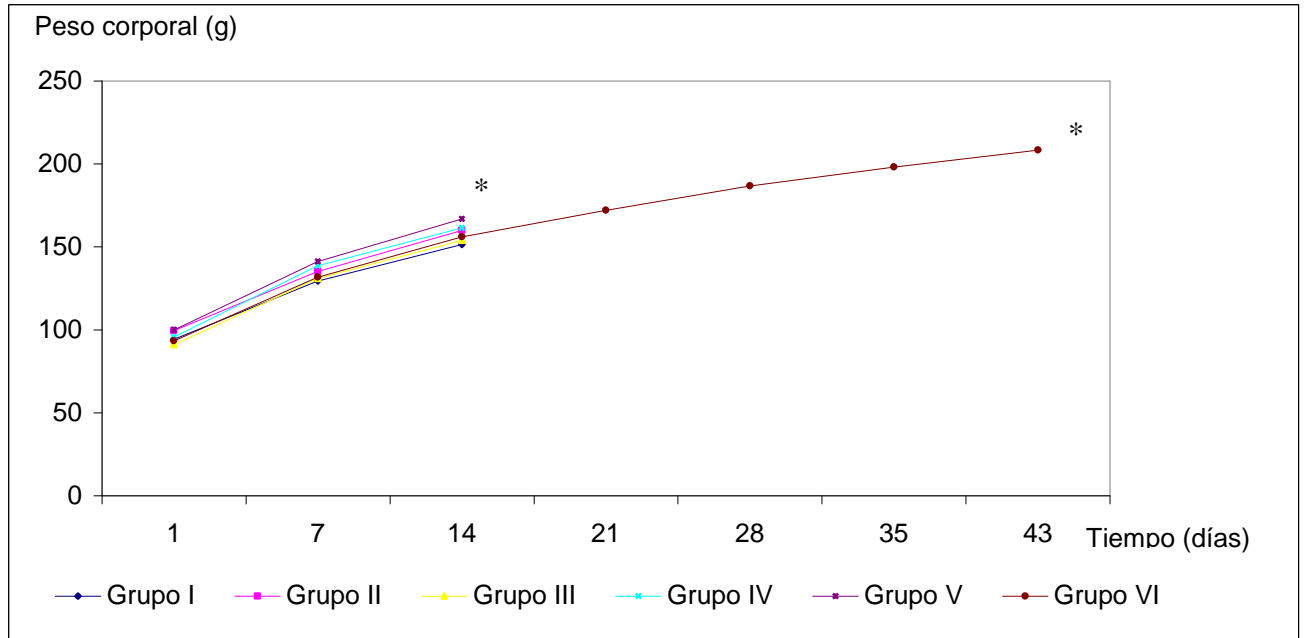


Figura 9. Comportamiento del peso corporal, Animales hembras. Prueba T de Comparaciones múltiples. Los asteriscos representan diferencias significativas en el tiempo

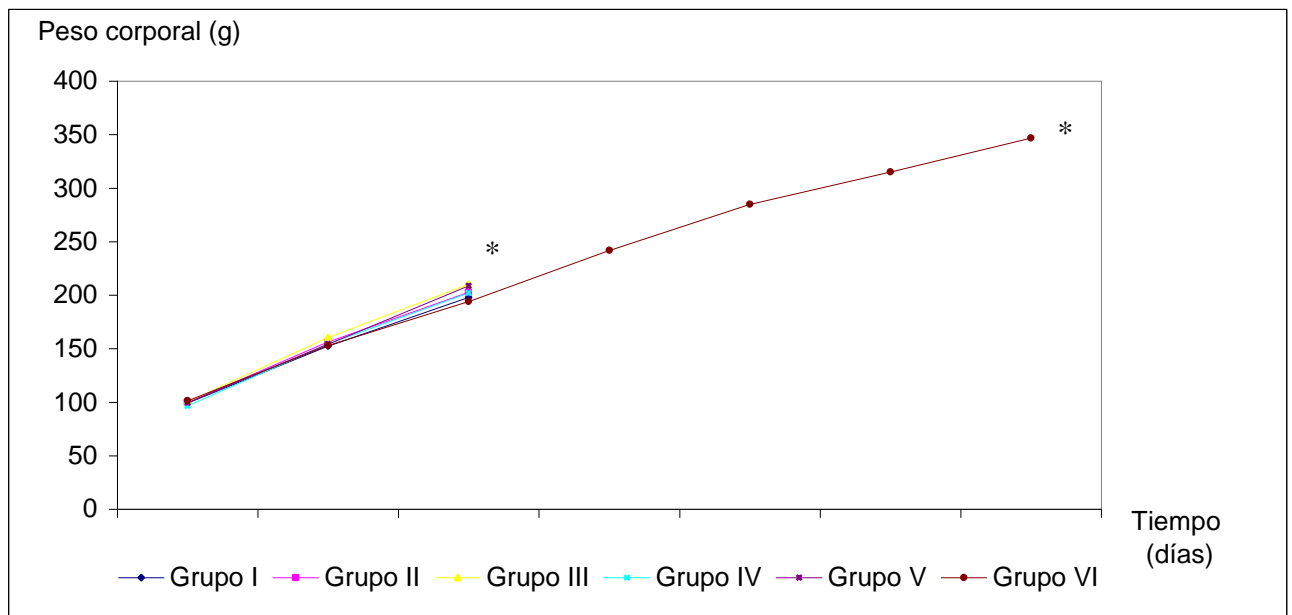


Figura 10. Comportamiento del peso corporal, Animales machos. Prueba T de Comparaciones múltiples. Los asteriscos representan diferencias significativas en el tiempo

5.2.3.2- Consumo de alimentos

El consumo de alimentos en los animales hembras se comportó de manera homogénea entre los grupos para cada día de evaluación (entre 15 y 18 g diarios). Como se observa en la Figura 11 (Tablas IV y V del Anexo).

Sólo se evidenció disminución significativa del consumo de alimentos el día 7 del ensayo en el grupo I (solución salina), registro que fue corroborado desde el punto de vista estadístico, no obstante constituye un evento puntual. La disminución en el consumo de alimento en este grupo, no tuvo incidencia en la ganancia de peso de los animales.

En los machos se evidenció un aumento progresivo en el consumo de alimentos a lo largo del estudio (entre 18 a 24 g), como se puede observar en el Figura 12. Este incremento se tradujo en un aumento normal del peso de los animales de este sexo.

Evento que continuó con un ligero incremento en los valores del alimento consumido por cada animal a partir de esta fecha.

En los machos se evidenció un consumo de alimentos con rangos por encima de los valores reportados para hembras, hecho que es reflejado en el aumento de peso progresivo de los animales y por las diferencias significativas en el tiempo. El aumento en el consumo en este sexo se hizo más evidente a partir del día 14 del estudio.

5.2.3.3- Observaciones clínicas

En las observaciones clínicas realizadas diariamente los animales no presentaron signos tóxicos. No se reportaron cambios en la piel, el pelo, en los ojos en las membranas mucosas, mantuvieron una adecuada actividad somatomotora y el comportamiento y respuesta ante estímulos fue el normal para la especie. En los primeros 4 días posteriores al comienzo del estudio, al observar el sitio de inyección no se evidenció signo de reacción local; ni alteraciones de otro tipo. Los signos observados en cada grupo en el estudio fueron los siguientes:

Días 1 a 4: 1 animal del grupo VI (satélite) con induración y un pequeño nódulo en la extremidad derecha, signo que se mantuvo durante todo el estudio.

Día 5: 1 animal del grupo II (placebo) un punto de fibrina en la extremidad izquierda.

Día 7: 2 animales del grupo II (placebo), 1 animal del grupo III (10 veces la DT), 2 animales del grupo IV (20 veces la DT). En todos estos animales se observó la aparición de induración del sitio de aplicación en las extremidades en unos casos e inflamación en otros.

Día 8: se duplicó el número de animales con induración en los grupos antes descritos, además se

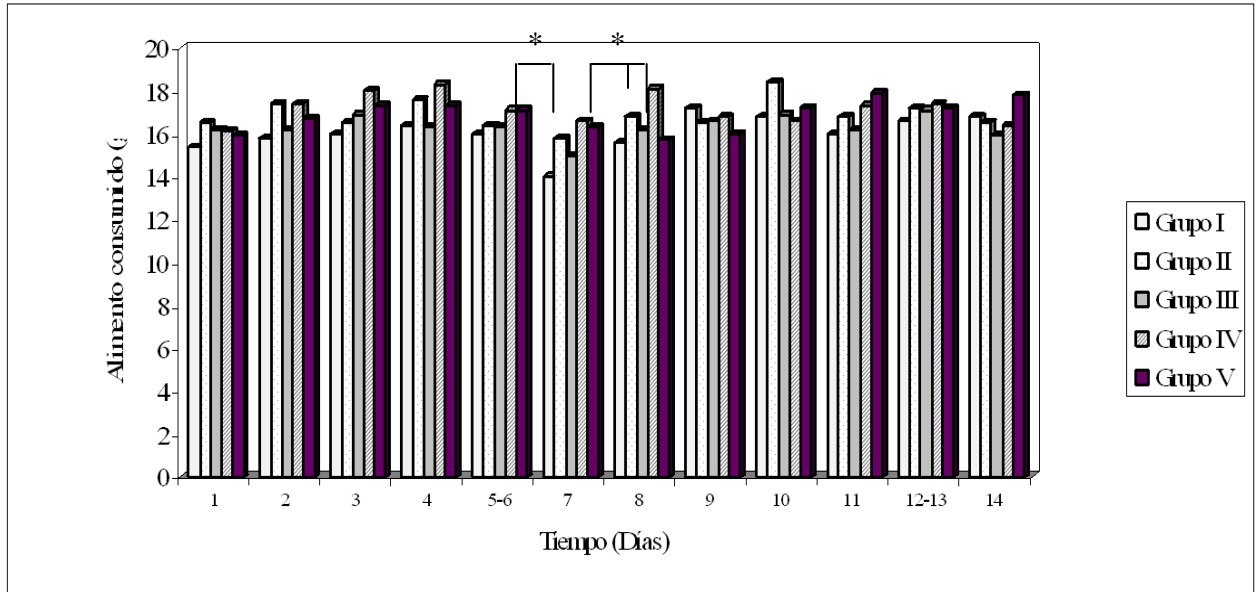


Figura 11. Consumo de alimentos por grupos. Animales hembras. Prueba de Kruskal Wallis seguida de la prueba de Dunn. Los asteriscos representan diferencias significativas en el tiempo

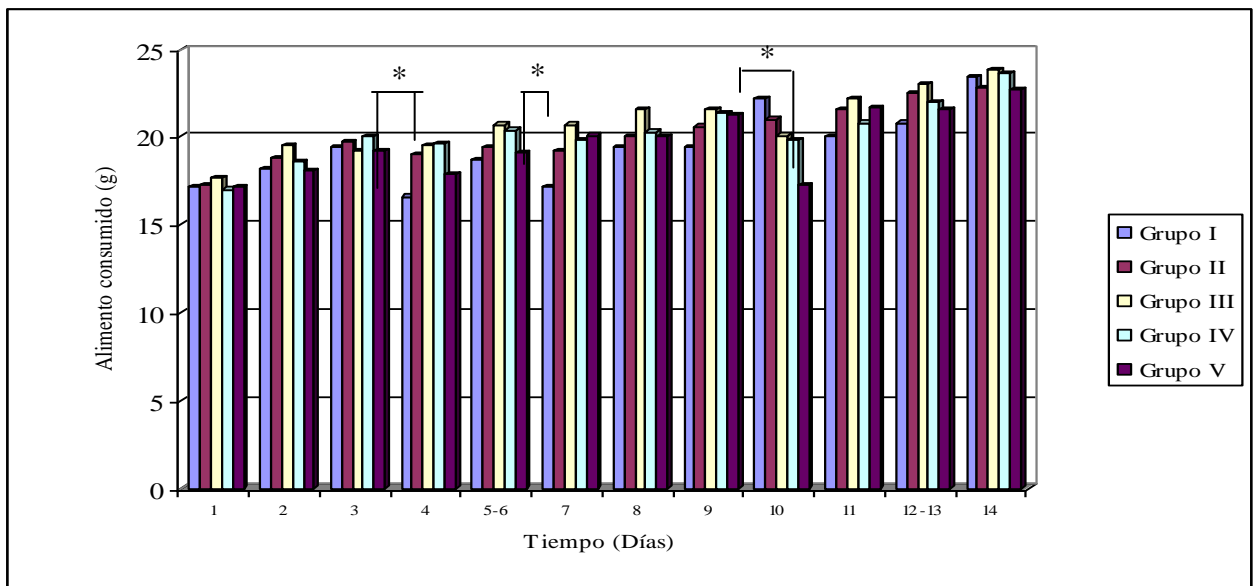


Figura 12. Consumo de alimentos por grupos. Animales machos. Prueba de Kruskal Wallis seguida de la prueba de Dunn. Los asteriscos representan diferencias significativas en el tiempo

reportó la aparición de 3 animales con este signo en el grupo V (30 veces la dosis terapéutica), 1 animal del grupo VI (satélite) con un ligero hematoma en el sitio derecho,

Día 9: solamente se observan 2 animales del grupo II (placebo), 1 animal del grupo IV (20 veces la DT) y 3 animales de los grupos V y VI (30 veces la DT). sin alteraciones aparentes en el sitio de administración. Debe señalarse que para los animales del grupo III (10 veces la DT) no se reporta ningún signo clínico hasta el día 11 de iniciado el estudio.

La induración en el sitio de administración se mantuvo en los días subsiguientes del estudio, llegando a encontrarse en la totalidad de los animales por grupo, se clasificó como induración severa y se hizo evidente la presencia de nódulos en todos los animales de los grupos placebo, dosis alta y satélite. En el grupo administrado con dosis 10 veces la dosis terapéutica, la induración reportada fue ligera.

5.2.3.4- Determinaciones hematológicas y bioquímicas

- **Hematología**

En cuanto a las determinaciones hematológicas realizadas se observaron diferencias mínimas estadísticamente significativas entre grupos son y se mueven dentro del rango de valores normales para la especie (123), como puede ser constatado con los valores reportados por la Charles River Company (124) (Tabla VI del Anexo). Las variaciones puntuales encontradas se especifican a continuación:

HG: en el caso de las hembras sólo se detectan diferencias entre los grupos I (solución salina) y V (30 veces la DT), y para los machos entre los grupos II (placebo) y IV (20 veces la DT), donde la magnitud de la diferencia es de aproximadamente 3 unidades.

ETO: de igual manera se detectan diferencias entre los grupos basal y III (10 veces la DT) con respecto al grupo V (30 veces la DT); y los machos entre los grupos II (placebo) y IV (20 veces la DT).

HTO: en las hembras no se detectan diferencias entre los grupos, sin embargo en los machos se detectan diferencias entre los grupos II (placebo) y IV (20 veces la DT).

CHCM: en este caso se detectan diferencias entre los grupos (placebo) y III (10 veces la DT) con respecto al basal, a diferencia de los machos donde no se detectaron diferencias.

En los parámetros siguientes: HCM, Plaquetas, N y L no se detectaron diferencias entre los grupos ni por sexo.

Leucocitos: Los grupos entre los cuales se detectan diferencias son el (placebo) y III (10 veces la DT) (de alrededor de 2.5 unidades)

M, E: En este caso no es posible la realización de la prueba de independencia confirmatoria, pues todas las casillas tienen frecuencias esperadas menores que 5, la interpretación debe basarse en los resultados descriptivos.

- **Bioquímica sanguínea**

De forma general, las enzimas mostraron un comportamiento dentro del rango de referencia calculado para este estudio e igualmente dentro del rango establecido para las ratas Sprague-Dawley (Tabla VII del Anexo).

La creatinina mostró valores por encima del límite superior solo en los animales hembras de los grupos IV (20 veces la DT) y V (30 veces la DT), pero fueron estas diferencias tan pequeñas que consideramos que se deben más bien a un efecto producido por la *n* del estudio (3 animales) que a un aumento real de la concentración sérica de esta enzima. Esto se ve reforzado por el hecho de que en los animales machos, a excepción de los pertenecientes al grupo III (10 veces la DT), los valores se encontraron en el rango de referencia determinado para este estudio. Tanto los animales hembras como machos de este último grupo mostraron valores ligeramente por debajo del límite inferior, lo cual no tiene implicaciones biológicas. En todos los casos, la concentración sérica de creatinina estuvo dentro del rango de valores históricos referidos para la especie empleada.

Al realizar comparaciones múltiples entre los grupos utilizando el test de Dunn se pudo observar que en los animales hembras no hubo diferencias significativas entre ninguno de los grupos en estudio y el grupo basal, mientras que en los machos solo aparecieron entre éste y el III (10 veces la DT), inoculado con el placebo de la formulación lo que, como ya vimos anteriormente, carece de importancia biológica. Entre los grupos de tratamiento inoculados con la vacuna no existieron diferencias significativas, lo que corrobora el hecho de que no hay relación entre las dosis administradas y los niveles de creatinina determinados.

Estos resultados resultan importantes para evaluar la seguridad de la vacuna Quimi-Hib, ya que indican que su administración reiterada no altera este parámetro y confirma que los riñones no evidenciaron signos de toxicidad a pesar de que los animales fueron inoculados 14 veces consecutivas con dosis de hasta 30 veces la DT.

ALAT, al ser comparada con las concentraciones de referencia mostró valores promedio ligeramente más elevados en los animales hembras de los grupos I (solución salina), II (placebo), IV (20 veces la DT) y V (30 veces la DT) y en los machos pertenecientes a los grupos I (solución salina), II (placebo) y V (30 veces la DT). El hecho de que este valor por encima del límite máximo establecido para este estudio haya sido observado en los grupos no tratado y en el control administrado con solución salina independiza este hallazgo de la administración de la vacuna.

A esto se suma el hecho de que en todos los grupos las concentraciones séricas de esta enzima estuvieron dentro del rango establecido históricamente para ratas SD sanas o por debajo de él, que no correlaciona con efectos toxicológicamente significativos en el hígado.

La concentración sérica de ASAT mostró estar en todos los casos por debajo de los valores de referencia para este estudio (lo cual como se ha explicado anteriormente carece de importancia desde el punto de vista toxicológico) y dentro del rango de valores históricos establecido para la especie, indicando la ausencia de daños capaces de liberar esta enzima de las mitocondrias de los hepatocitos ni de alterar la permeabilidad de la membrana de estas células. Estadísticamente no se presentaron diferencias significativas entre los grupos tratados con la vacuna, lo que indica que los resultados de concentración sérica obtenidos no dependen de la dosis administrada.

En el caso de ALP, puede observarse que los animales hembras mostraron un comportamiento no relacionado con la dosis, apareciendo incrementos en la concentración enzimática por encima del valor de referencia de este estudio en los grupos tratados con solución salina y placebo, mayores que los que se reportaron para los grupos IV y V inoculados con 20 y 30 veces la DT. En los machos, en todos los grupos se mantuvo la concentración sérica de ALP dentro del rango normal, con excepción del I (solución salina), donde se reportaron valores inferiores. Comparando los resultados obtenidos con los reportados para la línea SD puede observarse que en todos los casos los valores de concentración sérica de los animales utilizados están dentro del rango establecido para ratas sanas de esta línea, lo cual tiene una importancia significativa para analizar la seguridad de la vacuna en estudio. El incremento de la concentración sérica de ALP es un índice aceptado de colestasis por lesiones periportales y centrilobulares del hígado, y es además un indicador de colestasis extrahepática etiológicamente determinada por pancreatitis, complicaciones en la canulación del conducto biliar o, en general, daños hepáticos como resultado de hepatotoxicidad provocada por sustancias exógenas (123).

5.2.3.5- Peso relativo de los órganos

Como análisis complementario se realizó el pesaje de los siguientes órganos: hígado, bazo y timo. Se realizó la comparación de todos los grupos contra la media del peso relativo del grupo control ± 2 , estableciendo de esta manera los límites del rango del peso de cada órgano evaluado, (Tabla VIII del Anexo). Los resultados obtenidos carecían de significación biológica al encontrarse dentro del rango establecido para la especie reportado por la Charles River (124) y Taconic Company (125) y dentro del rango establecido a partir del grupo control.

5.2.3.6- Hallazgos macroscópicos

Se realizó la observación macroscópica de todos los órganos sin que se evidenciara daño en ninguno de ellos. Se hizo especial énfasis en la observación del hígado, bazo, ganglios linfáticos mesentéricos y timo, por ser órganos primarios de aparición de efectos adversos, sin que se reportara signo tóxico alguno. En el caso del sitio de administración el hallazgo fundamental lo constituyó la presencia de formaciones blanquecinas de aspecto nodular, el cual se repite en todos los grupos con ligeras variaciones en el número de animales reportados en cada caso: grupo I, 2 animales de 20; grupo II (placebo), 19 de 20. Es importante señalar que en el caso del grupo III (10 veces la DT) los hallazgos tuvieron menor incidencia en comparación con los restantes grupos expuestos anteriormente: 8 animales con áreas blanquecinas de menor tamaño y 1 animal con nódulos en ambas extremidades. Además de este signo, fueron reportados hematoquistes y puntos de fibrina.

Con respecto al grupo Satélite en todos los animales se observaron pequeños nódulos de color blanquecino en ambos sitios de aplicación. Estas observaciones macroscópicas coinciden con los signos clínicos antes explicados por lo que consideramos que responden a la misma causa.

5.2.3.7- Hallazgos microscópicos

En el estudio histopatológico se analizaron muestras del sitio de administración, de los órganos: hígado, bazo, timo y ganglios mesentéricos. La observación se basó en los siguientes signos histológicos: granuloma difuso con necrosis de liquefacción, tejido cicatrizal, apoptosis de la corteza del timo, estimulación antigénica en bazo y ganglios mesentéricos, así como daño hepático, ver Tabla 27.

Tabla 27. Frecuencia de aparición de alteraciones microscópicas por grupos

Grupo/Tratamiento	GDL	TC	H	AT	B y G
I/ solución salina	0/10	3/10	0/10	10/10	10/10
II/ placebo	20/20	20/20	0/20	20/20	20/20
III/ 10 veces la DT	20/20	20/20	0/20	20/20	20/20
IV/ 20 veces la DT	20/20	20/20	0/20	20/20	20/20
V/ 30 veces la DT	20/20	20/20	0/20	20/20	20/20

Leyenda:

GDN- granuloma difuso con centros de liquefacción, *TC-* Tejido cicatrizal, *AT-* Apoptosis de la corteza del timo, *H-* Daño Hepático, *B* Estimulación antigénica en bazo, *G-* Estimulación antigénica ganglios linfáticos mesentéricos

La incidencia de los hallazgos histológicos reportados fue similar en cada uno de los grupos tratados (la totalidad de los animales en cada uno).

En el grupo satélite, los hallazgos histológicos coinciden con los observados con antelación, a los que se sumó infiltración linfoide, presencia de tejido cicatrizal y de células plasmáticas, todos se resumen en la Tabla 28.

Tabla 28. Frecuencia de aparición de alteraciones microscópicas observadas en el grupo Satélite

Grupo	G	IL	CP	C	TC	H	T	GL
V/Satélite	20/20	20/20	18/20	0/20	20/20	0/20	0/20	0/20

Leyenda:

G- Granuloma, *IL-* Infiltración linfoide, *C-* Encapsulación, *H-* Hígado, *T-* Timo, *CP-* Células plasmáticas, *TC-* Tejido cicatrizal, *GL-* Ganglios linfáticos mesentéricos.

En sentido general se mantienen las alteraciones morfológicas en el sitio de inoculación, donde la amplitud e intensidad tiende a ser mayor en los animales del 1 al 10, (hembras) semejantes a las observadas en el resto de los grupos sacrificados a los 14 días del estudio; granulomas macrofágicos donde persisten eventualmente centros de liquefacción pero ahora predominantemente productivos, es decir, sólidamente celulares, no encapsulados y con el tejido cicatrizal supliendo antiguos focos de necrosis. Esto parece significar cierta inercia en la reabsorción del bioproducto por la naturaleza del adyuvante.

Vale resaltar la ocurrencia en todos los animales de cada grupo, de infiltración linfocitaria con predominio en la periferia de los granulomas, acompañadas de grupos aislados de células plasmáticas (Figura 13), y dando a entender una posible secreción local de inmunoglobulinas.

En los animales 15, 16, 19 y 20 se observaron folículos linfoides con actividad linfoblástica en el seno de los granulomas. No existió daño hepático en el total de los animales de los grupos de ensayo. Con respecto a los órganos linfoides, la actividad de estimulación antigénica fue observada en todos los grupos, incluyendo el control administrado con solución salina. En el timo se observó una imagen de plena funcionalidad, con figuras de apoptosis en la corteza, como signo de maduración y selección por afinidad en la presentación de los antígenos.

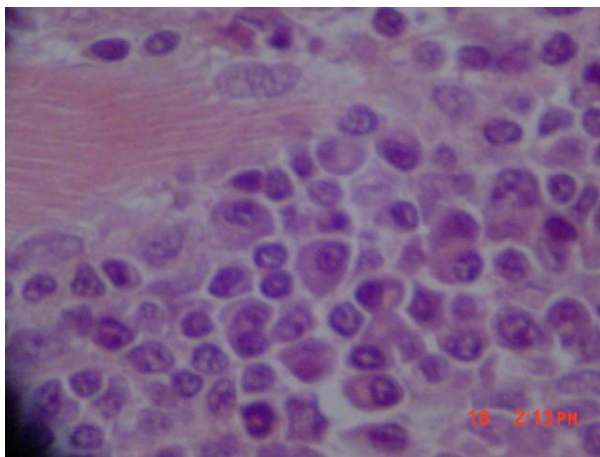


Figura 13. *Presencia de infiltrado de células plasmáticas (40 X), observada en el grupo placebo*

RESUMEN: La observación clínica diaria realizada, la medición semanal del peso corporal, reporte diario del consumo de alimento y el estudio macroscópico y microscópico de todos los órganos, así como las determinaciones hematológicas y de bioquímica sanguínea realizada en diferentes momentos del estudio y el análisis complementario del pesaje de los órganos (hígado, bazo y timo) no evidenciaron diferencias con respecto a los valores normales reportados para animales sanos, lo que confirma que no hay efectos sistémicos adversos debidos a la administración del producto, objetivo fundamental del estudio.

Los resultados obtenidos demostraron fehacientemente que la vacuna Quimi-Hib aunque adyuvada, no causa efectos tóxicos ni adversos significativos a nivel sistémico.

5.2.4- Toxicidad aguda de la vacuna pentavalente TRIVAC-HB + Quimi-Hib concentrada

5.2.2.1- Peso corporal

Como puede observarse en las Tabla 29, en ambos sexos los valores de peso corporal fueron similares para cada momento de evaluación (días 0, 7 y 14), lo que indica que los diferentes tratamientos empleados no tuvieron influencia sobre este parámetro. Al realizar el análisis

estadístico correspondiente se pudo observar que no existieron diferencias significativas entre los grupos.

Tabla 29. Comportamiento del peso corporal (g) \pm DS

Grupo/Tratamiento	Sexo	Día 0	Día 7	Día 14
I/ solución salina	♀	86,2 \pm 6,4	134,8 \pm 5,0	157,0 \pm 9,5
II/ placebo		89,8 \pm 2,6	136,0 \pm 10,6	158,2 \pm 13,6
III/ 8 veces la DT, vacuna 4+1		85,2 \pm 5,1	138,2 \pm 15,4	162,2 \pm 20,8
IV/ 15 veces la DT, vacuna 4+1		87,0 \pm 4,6	130,2 \pm 8,8	150,3 \pm 10,5
V/ 30 veces la DT TRIVAC-HB		87,6 \pm 3,5	133,4 \pm 2,3	154,4 \pm 3,5
VI/ 30 veces la DT Quimi-Hib		83,0 \pm 5,1	128,6 \pm 12,4	149,4 \pm 17,5
VII/ 30 veces la DT, vacuna 4+1		91,4 \pm 5,5	144,4 \pm 14,0	171,2 \pm 16,6
I/ solución salina	♂	91,6 \pm 5,0	163,8 \pm 5,9	209,8 \pm 8,8
II/ placebo		95,2 \pm 1,9	166,0 \pm 10,4	210,6 \pm 12,7
III/ 8 veces la DT, vacuna 4+1		95,2 \pm 3,6	170,6 \pm 9,4	218,2 \pm 10,6
IV/ 15 veces la DT, vacuna 4+1		93,6 \pm 4,9	171,2 \pm 5,3	217,8 \pm 7,0
V/ 30 veces la DT TRIVAC-HB		90,8 \pm 4,2	165,6 \pm 9,9	209,4 \pm 8,4
VI/ 30 veces la DT Quimi-Hib concentrada		95,0 \pm 7,7	168,2 \pm 18,5	208,4 \pm 17,8
VII/ 30 veces la DT, vacuna 4+1		91,2 \pm 3,6	163,8 \pm 10,7	209,0 \pm 10,2

Se produjo aumento sostenido de peso en todos los grupos de tratamiento. Incluso en los grupos V, VI y VII, administrados con las dosis más altas, se evidenció además que los animales de ambos sexos aumentaron de peso de manera significativa en el tiempo

5.2.2.2- Consumo de alimentos

Como puede observarse en las Figuras 14 y 15 (Tabla IX del Anexo), el consumo de alimentos no presentó diferencias significativas entre los grupos de tratamiento para un mismo tiempo de evaluación, lo cual fue comprobado en el análisis estadístico realizado.

5.2.2.3- Observaciones clínicas

En las observaciones clínicas realizadas diariamente no se observaron signos que indicaran efectos tóxicos del producto. El único signo clínico relevante detectado fue la presencia de induraciones en el sitio de administración, que eventualmente cursaron hacia la aparición de pequeños nódulos en los animales administrados con la dosis más elevada (30 veces la DT). Estos signos observados no produjeron alteraciones en la marcha ni daños en la epidermis de los animales.

Otro aspecto de interés reportado en el estudio fue la presencia de excoriación periocular, y diarrea. El primero estuvo caracterizado por la presencia de una ligera capa de fibrina alrededor

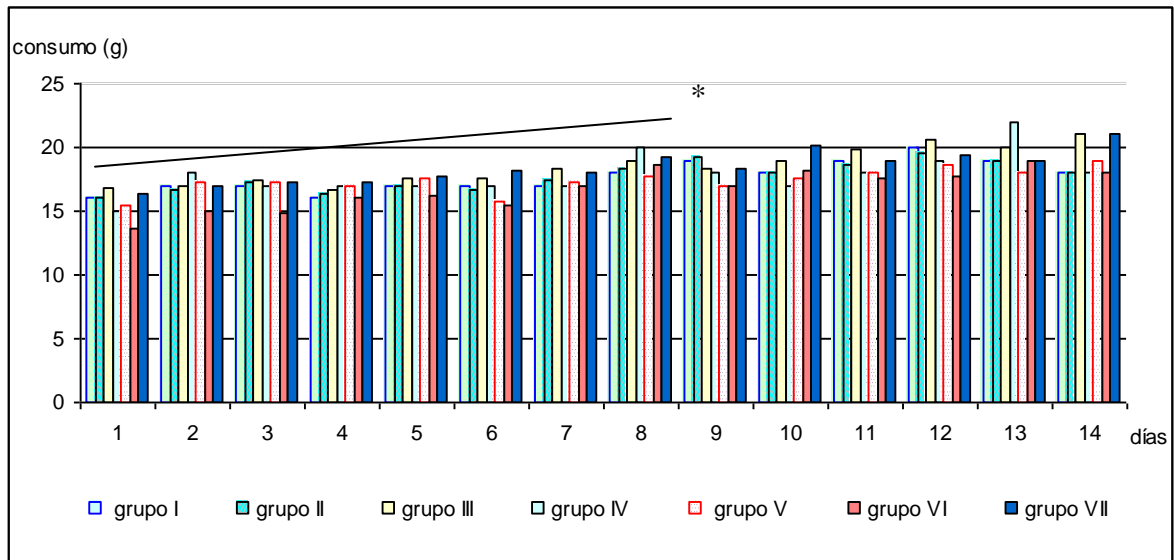


Figura 14. Comportamiento del consumo de alimentos (g). A: hembras. Prueba de Kruskal Wallis seguida Wilcoxon. El asterisco representa diferencias significativas en el tiempo

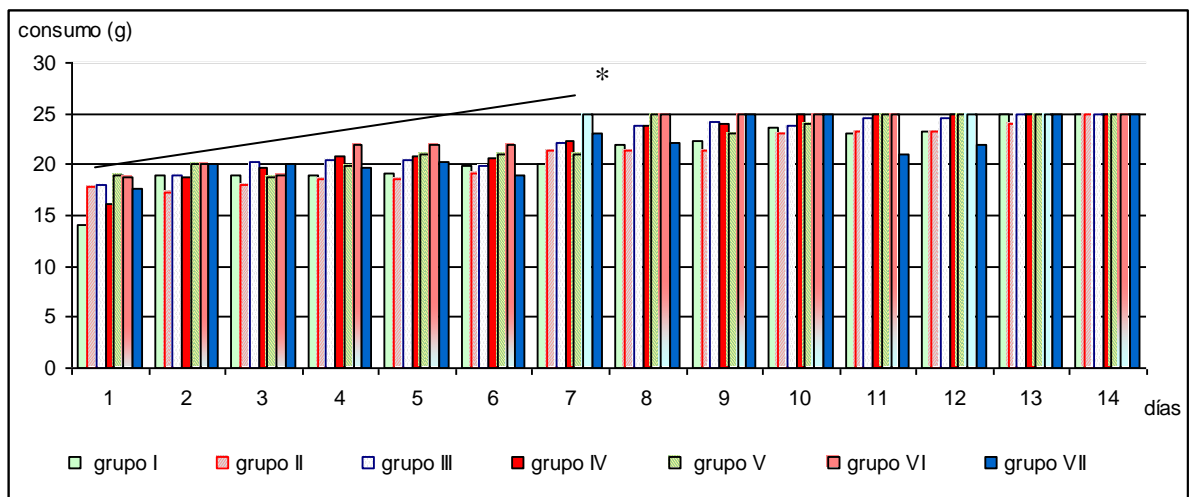


Figura 15. Comportamiento del consumo de alimentos (g). B: machos. Prueba de Kruskal Wallis seguida Wilcoxon. El asterisco representa diferencias significativas en el tiempo

del seno orbital, constituyendo una pequeña lesión sin evidencias de inflamación., se presentó con frecuencia muy baja (2 animales de 70), uno perteneciente al grupo placebo y el otro al grupo IV (6 veces la DT). También se reportó diarrea, signo solamente observado en dos animales, uno del grupo administrado con solución salina y otro perteneciente al grupo placebo. Este signo desapareció 24 horas después, por lo que teniendo en cuenta su baja incidencia, rápida reversión e independencia de las dosis administradas, no constituye un hallazgo de importancia en nuestro estudio.

5.2.2.4- Hallazgos macroscópicos

Concluida la fase experimental del estudio se realizó el sacrificio y necropsia de los animales, en esta última no se reportaron alteraciones en los órganos inspeccionados, excepto algunos hallazgos relativos al sitio de administración. Se observó la presencia de áreas y nódulos blanquecinos, en animales de todos los grupos, con excepción del grupo administrado con solución salina y con el control Quimi-Hib. En el grupo placebo, el efecto reportado se redujo a pequeñas zonas de color blanco lechoso, ligeramente induradas (Figura 16-A), mientras que en los grupos administrados con diferentes dosis de la vacuna pentavalente y con el control TRIVAC-HB, fue claramente observable la presencia de formaciones nodulares que aumentaron ligeramente de tamaño en los animales pertenecientes a los grupos VI (30 veces la DT de TRIVAC-HB) y VII (30 veces la DT de Quimi-Hib) (Figura 16- A, B y C, respectivamente).

5.2.2.5- Hallazgos microscópicos

Tabla 30. Frecuencia de aparición de los hallazgos microscópicos

Grupo/Tratamiento	Sitio de Administración				Hígado		Bazo
	GM	GI	N	TG	HE	Mg	HE
I/solución salina	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	7/10
II/placebo	6/10	0/10	0/10	0/10	1/10	0/10	10/10
III/8 veces DT, vacuna 4+1	0/10	9/10	4/10	1/10	1/10	0/10	8/10
IV/15 veces DT, vacuna 4+1	0/10	7/10	3/10	1/10	1/10	0/10	8/10
V/30 veces DT, vacuna 4+1	0/10	10/10	1/10	0/10	2/10	1/10	6/10
VI/30 veces DT Trivac-HB	0/10	10/10	2/10	0/10	3/10	2/10	8/10
VII/30 veces DT Quimi –Hib concentrada	0/10	0/10	0/10	0/10	3/10	1/10	8/10

Leyenda:

GM- granuloma macrófago; GI- granuloma inmunogénico; N- necrosis; TG- tejido de granulación; HE- hematopoyesis extramedular; Mg- microgranuloma.

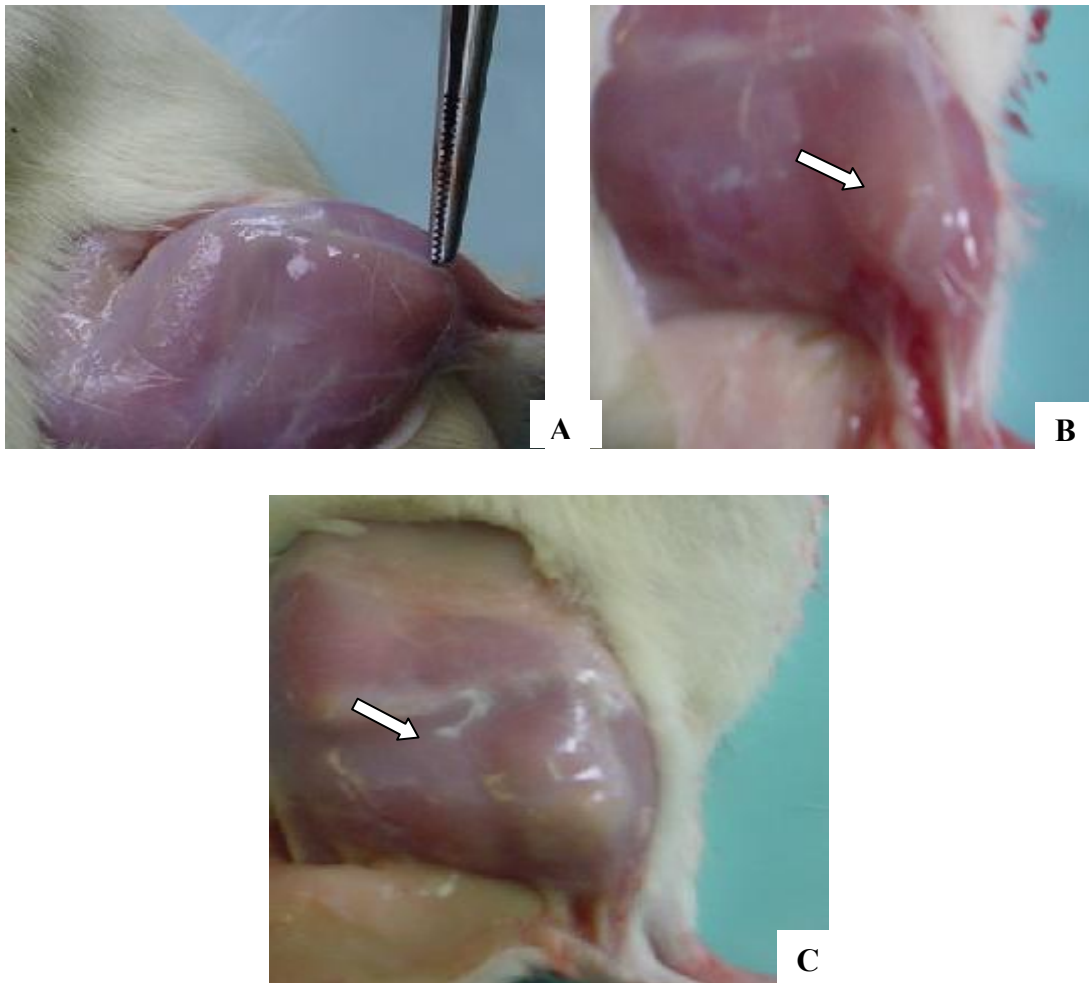


Figura 16. Aspecto del sitio de administración. A: zona blanquecina de un animal del grupo placebo, B: formación nodular en el músculo (flecha) de un animal del grupo III tratado con 8 veces la DT; C: formación nodular en el músculo (flecha) de un animal del grupo VI tratado con 30 veces la DT

Como puede observarse en la Tabla 30 los principales efectos adversos reportados corresponden al sitio de administración. Excepto en los grupos I (solución salina) y VII (30 veces DT de la TRIVAC-HB + Quimi-Hib concentrada), en los restantes grupos se reportaron granulomas inmunogénicos que alternaban con áreas de necrosis, específicamente en los grupos III (8 veces la DT) y IV (15 veces la DT), que se corresponden con las menores dosis y volúmenes de esta vacuna, y donde se observaron indicios de la formación de tejido de granulación, como mecanismo de reparación.

En los grupos tratados con el placebo, con las diferentes dosis del producto, y con la vacuna TRIVAC-HB la mayoría de los animales presentaron granulomas, que fueron clasificados como macrofágicos ó inmunogénicos, para señalar en este último caso la presencia de infiltrados linfoides y células plasmáticas, además de macrófagos, como evidencia de una activa respuesta inmune local.

La presencia de adyuvantes como el fosfato de aluminio en las preparaciones vacunales demostró ser un eficaz potenciador de respuestas inflamatorias efectoras, caracterizadas fundamentalmente por la presencia de macrófagos y leucocitos neutrófilos. En nuestro estudio se evidencia la presencia de estas características histológicas en la mayoría de los animales, (excepto en los grupos I/ solución salina y VII/30 veces la DT Quimi-Hib, como se refirió anteriormente), incluso aquellos tratados solo con el placebo, en los cuáles no existe el componente antigénico de la vacuna y si el fosfato de aluminio el principal responsable de este efecto. En la figura 17 se muestra un ejemplo de este hallazgo en un animal del grupo placebo.

También se observó, en los animales inoculados con la vacuna pentavalente y con TRIVAC-HB, la presencia de granulomas sólidos e infiltrados profusos con linfocitos y células plasmáticas (figura 18), en animales aislados de estos grupos, centros necróticos en el endomisio de la fibra muscular y tejido de granulación. En los animales del grupo control Quimi-Hib, no se evidenció alteraciones en el sitio de administración, coincidiendo con los restantes estudios toxicológicos realizados a este producto, lo que se corrobora por el aspecto normal del músculo, sin daño en el tejido.

El estudio realizado a muestras de hígado evidenció la presencia de hematopoyesis extramedular y de microgranulomas, hallazgos no relacionados con el producto en estudio. La hematopoyesis extramedular es un evento comúnmente encontrado en animales jóvenes de esta especie y se considera una respuesta fisiológica normal ante el estrés causado por la manipulación, mientras

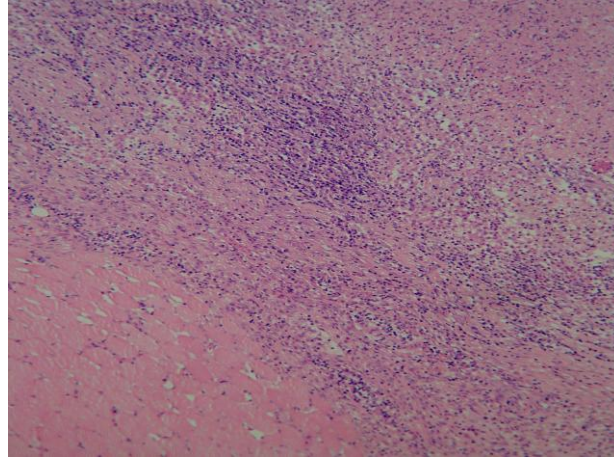


Figura 17. Granuloma macrofágico focal en el tejido muscular de un animal del grupo placebo (10X)

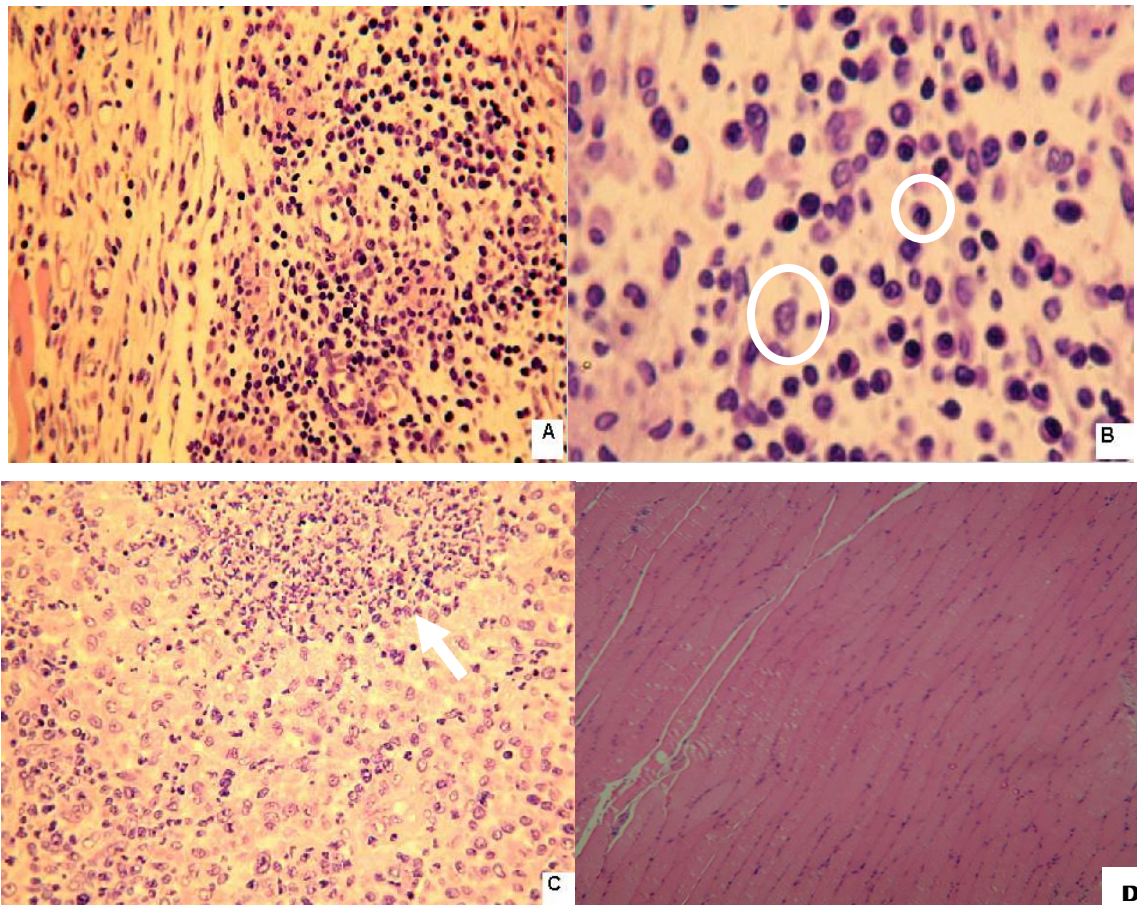


Figura 18. Hallazgos microscópicos en el sitio de administración. A-Granuloma inmunogénico, sólido, con presencia de linfocitos y células plasmáticas, animal del grupo III (8 veces la DT) (40X). B- Células plasmáticas y linfocitos (elipse) en el sitio de administración, animal del grupo V (30 veces la DT) (100X). C- Granuloma inmunogénico con centro necrótico (flecha), animal del grupo V (30 veces la DT)(10X). D- Aspecto normal del tejido muscular, animal del grupo I (Solución Salina) (10X)

que los microgranulomas, cuya frecuencia de aparición fue muy baja (4 animales de 70) (126), lo que consideramos no es un hallazgo de significación en nuestro estudio (Figura 19).

Los órganos del sistema inmune no presentaron alteraciones. El bazo, timo y ganglios linfáticos mesentéricos evidenciaron morfología de hiperplasia linfoide, como resultado de la respuesta de éste sistema ante la administración de los antígenos incluidos en la formulación (Figura 20). No fue reportado depleción de células ni ningún otro efecto que indicara daño sobre éstos órganos. En el bazo, además de la presencia de folículos linfoides hiperplásicos (Figura 20-A), resultó significativa la aparición de hematopoyesis, reportada para la mayoría de los animales, incluidos los del grupo tratado con solución salina, lo que como explicamos anteriormente, no se relaciona con la administración de la vacuna pentavalente o sus componentes TRIVAC-HB y Quimi-Hib concentrada. En la Figura 20-B se puede observar la presencia de megacariocitos en el bazo de un animal del grupo tratado con solución salina.

Estadísticamente los datos fueron analizados a través de la construcción de tablas de clasificación cruzada, donde se comparó la aparición o no de hallazgos entre los grupos. En la mayoría de los casos se presentaron diferencias significativas entre los grupos I (solución salina) y VII (30 veces la DT Quimi-Hib) con respecto a los grupos tratados con la vacuna pentavalente y no se presentaron diferencias entre el placebo y los grupos administrados con la vacuna.

RESUMEN:

El peso corporal de los animales en estudio resulta una herramienta importante para evaluar la toxicidad potencial de sustancias exógenas dada la sensibilidad de este parámetro de variar ante la influencia de las mismas, aun de aquellas de muy baja toxicidad. En los resultados obtenidos se demostró que la administración de dosis hasta 30 veces la dosis terapéutica de la vacuna pentavalente, no produjeron efectos capaces de alterar la ganancia de peso normal de la especie utilizada, resultados similares a los descritos para las vacunas TRIVAC-HB® y pentavalente 4 + 1. Este elemento, lo consideramos importante al permitir el análisis del potencial de toxicidad de la vacuna, lo cual resulta un indicativo de que la unión de los cinco antígenos en una formulación pentavalente líquida, no produce variaciones significativas en el peso corporal, por lo que se puede inferir la no presencia de alteraciones metabólicas que afecten este parámetro después de combinar ambos productos. En cuanto a las observaciones macroscópicas las mismas corroboraron las observaciones clínicas, mostrando efectos adversos locales en el sitio de administración, coincidimos con los autores en que estos no constituyen signos de toxicidad que

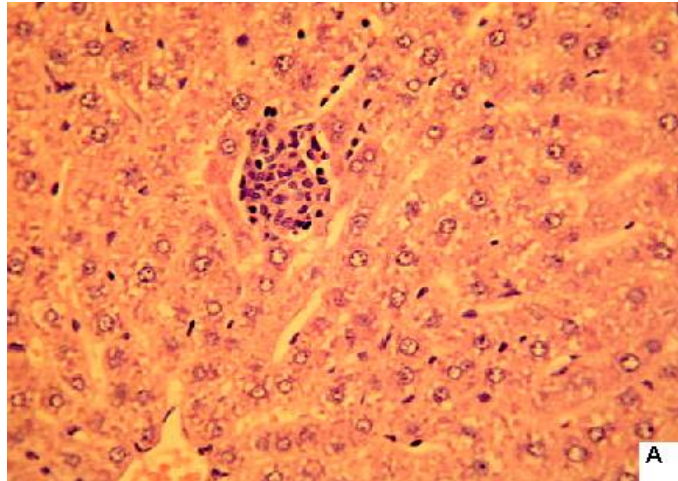


Figura 19. Hallazgos histológicos en el hígado. Microgranuloma en un animal del grupo VI (30 veces la DT TRIVAC-HB (10X))

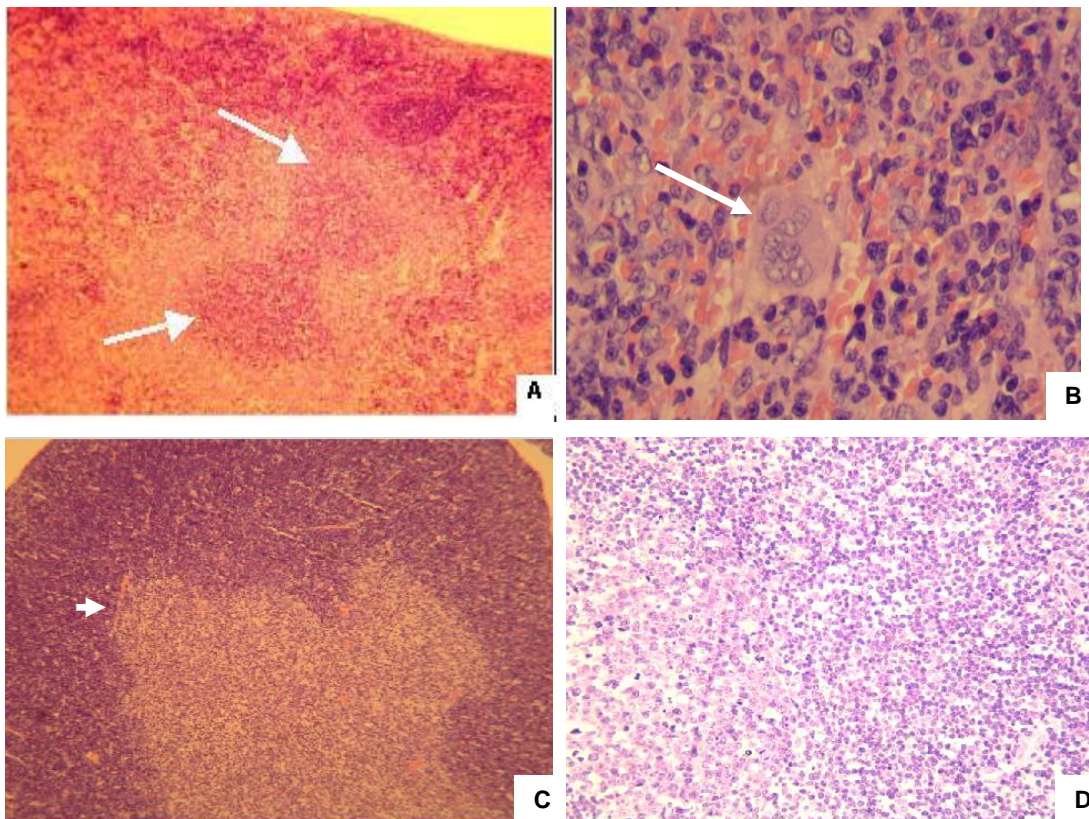


Figura 20. Bazo de un animal del grupo V (30 veces la DT). A: Se evidencia plena funcionalidad, con la presencia de folículos prominentes (10 X), B: hematopoyesis, se observa la presencia de megacariocitos en un animal tratado con solución salina (40 X). C: Timo normal de un animal del grupo IV (15 veces la DT) (5 X), médula (flecha) y corteza (cabeza de flecha D: Ganglio linfático mesentérico inguinal hiperplasia folicular del ganglio, animal del grupo V (30 veces la DT), (10 X)

invaliden el uso de este producto. De igual forma también se pudo constatar, acorde a los resultados y hallazgos obtenidos en la evaluación histopatológica se demostró, la no presencia de alteraciones en los órganos estudiados, especialmente los relacionados con el sistema inmune en los que se apreció morfológicamente plena funcionalidad, dada la ausencia de signos que indicaran alteraciones estructurales o funcionales capaces de comprometer su actividad. Consideramos que los hallazgos clínicos y macroscópicos en el sitio de administración están directamente relacionados con el mecanismo de acción de la vacuna pentavalente y con los componentes de su formulación.

5.2.5- Tolerancia local de la vacuna pentavalente TRIVAC-HB + Quimi-Hib concentrada

5.2.2.1- Observaciones clínicas

Como se ha podido observar hasta el momento en los datos mostrados en los estudios previos, el único signo clínico relevante o fue la presencia de induraciones y quistes en el sitio de administración, presumiblemente relacionados con la administración reiterada y con los componentes de la formulación. Debe destacarse que estos efectos observados en el sitio no produjeron alteraciones en la marcha ni daños en la epidermis de los animales. Vale resaltar, el hecho de que en el grupo administrado con la dosis terapéutica de la vacuna pentavalente no se observó el daño local.

Un aspecto a tener en cuenta por su importancia resulta la similitud en las observaciones registradas en el sitio de inyección entre el grupo V (10 veces la DT del producto pentavalente) y las reportadas para la extremidad derecha de los animales del grupo VI, inoculado con la vacuna TRIVAC-HB. En ambas extremidades se presentaron induraciones en contraste con la extremidad izquierda, inoculada con Quimi-Hib, lo que sugiere que la vacuna tetravalente es la responsable de los efectos adversos encontrados.

5.2.2.2- Hallazgos macroscópicos

El sacrificio de los animales se realizó en dos momentos, el día 8 del estudio, luego de 4 administraciones en días alternos y el día 14, luego de 7 días en que los animales permanecieron sin inocular. A ambos tiempos se realizó la observación macroscópica de todos los órganos durante la necropsia, sin que se evidenciaran daños en los mismos. Al igual que en las observaciones clínicas, los únicos hallazgos reportados están relacionados con el sitio de administración. Los que estuvieron limitados a la aparición de áreas blanquecinas, pequeños nódulos y quistes, en la mayoría de los grupos de tratamiento y en ambos tiempos de sacrificio,

excepto en los grupos inoculados con solución salina y con la vacuna Quimi-Hib concentrada. En la Figura 21 se observa la morfología de estos hallazgos.

5.2.2.3- Hallazgos microscópicos

La incidencia de los diferentes hallazgos observados fue similar para ambos tiempos de sacrificio, como puede observarse en las tablas 24 y 25 donde, de manera resumida se muestran estos resultados.

Tanto el día 8 como el día 14 constituyeron hallazgos relevantes en esta evaluación los correspondientes al sitio de administración. 24 horas después de concluidas las 4 inoculaciones, los animales presentaron granulomas macrofágicos difusos, infiltrados de neutrófilos, linfocitos y células plasmáticas. En ciertos casos se evidenciaron además, áreas necróticas, abscesos estériles y tejido de granulación. Los signos mencionados fueron reportados en su mayoría en el estudio realizado el día 14, lo cual resulta un hallazgo esperado a partir de la pobre reversión que han mostrado los efectos locales en numerosos estudios realizados con vacunas adyuvadas y polivalentes (77;127-130).

Los principales hallazgos de órganos parenquimatosos y del sistema inmune están relacionados con la estimulación antigénica evidenciada en los ganglios linfáticos mesentéricos, en el timo y en el bazo. En todos se observó plena funcionalidad, con la presencia de folículos linfoides y centros germinales, (Figura 22).

En el hígado y bazo se observó hematopoyesis extramedular, en la totalidad de los animales de cada grupo. En el hígado la presencia de pequeños focos necroinflamatorios fue reportada en un total de 12 animales de los 130 que integraron el estudio, demostrando una escasa incidencia.

RESUMEN:

La vacuna pentavalente TRIVAC-HB + Quimi-Hib concentrada es bien tolerada ya que los eventos adversos encontrados no constituyeron signos de toxicidad, si tenemos en cuenta que el patrón de respuesta local observado es una manifestación evidente de la consecuencia de la estimulación antigénica generada por el producto lo que constituye un efecto clásico para este tipo de vacuna. Un elemento importante a destacar es el que tras la administración reiterada del producto de estudio, no se evidenciaron trastornos ni cambios en la marcha ni daños en la epidermis, resultados similares a los obtenidos en el estudio referido anteriormente, de Toxicidad Aguda. Por otro lado, en todos los grupos de tratamiento se observó incremento de peso corporal y consumo normal de alimento, lo que indica o presupone una adecuada actividad metabólica del

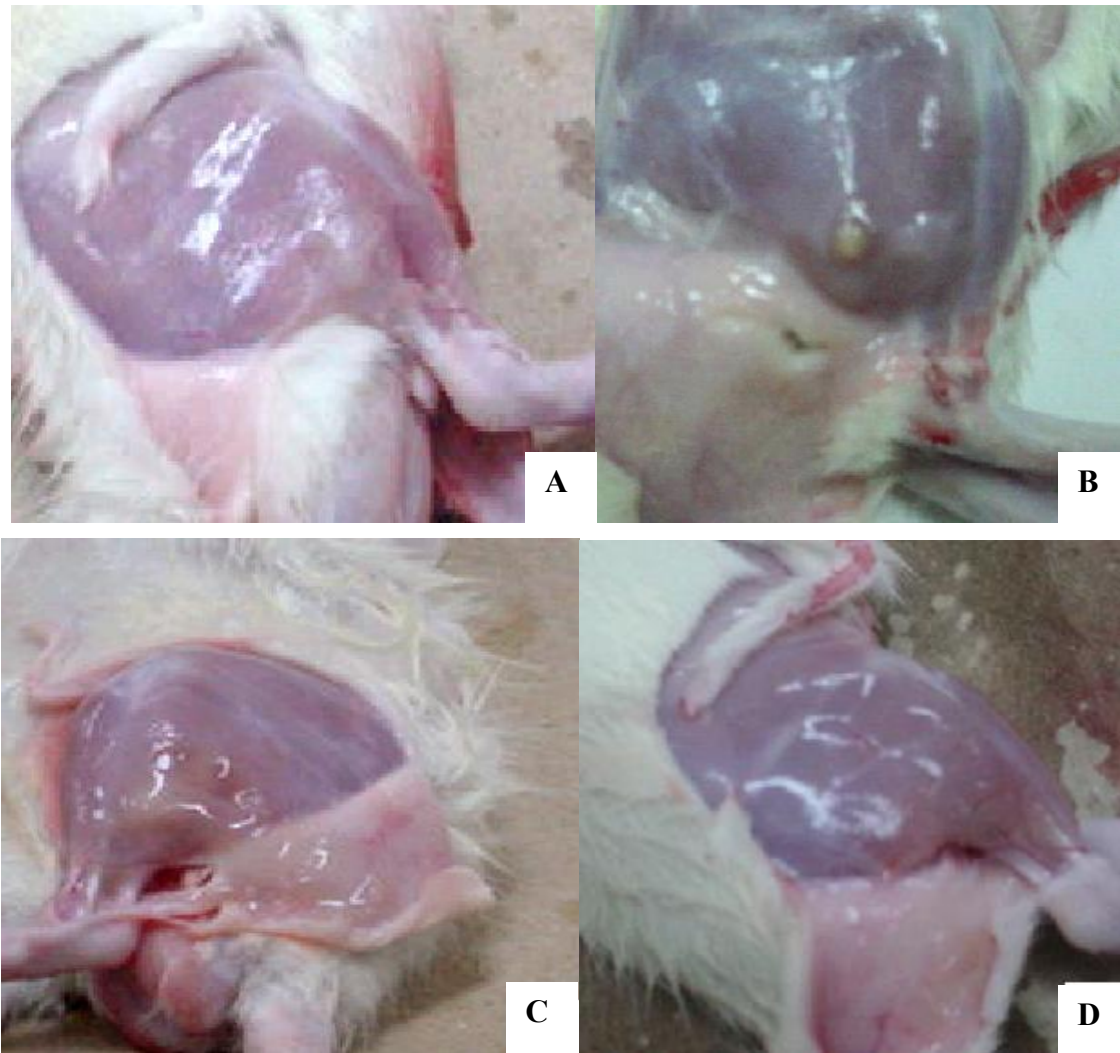


Figura 21. Observaciones en el sitio de administración. A: Nódulo blanquecino en un animal del grupo placebo. B: Quiste en un animal del grupo V (30 veces la DT). C: Nódulo en la extremidad izquierda de un animal del grupo V, inoculado con la vacuna TRIVAC-HB. D: Extremidad con aspecto normal en un animal del grupo VI inoculado con la vacuna Quimi-Hib concentrada.

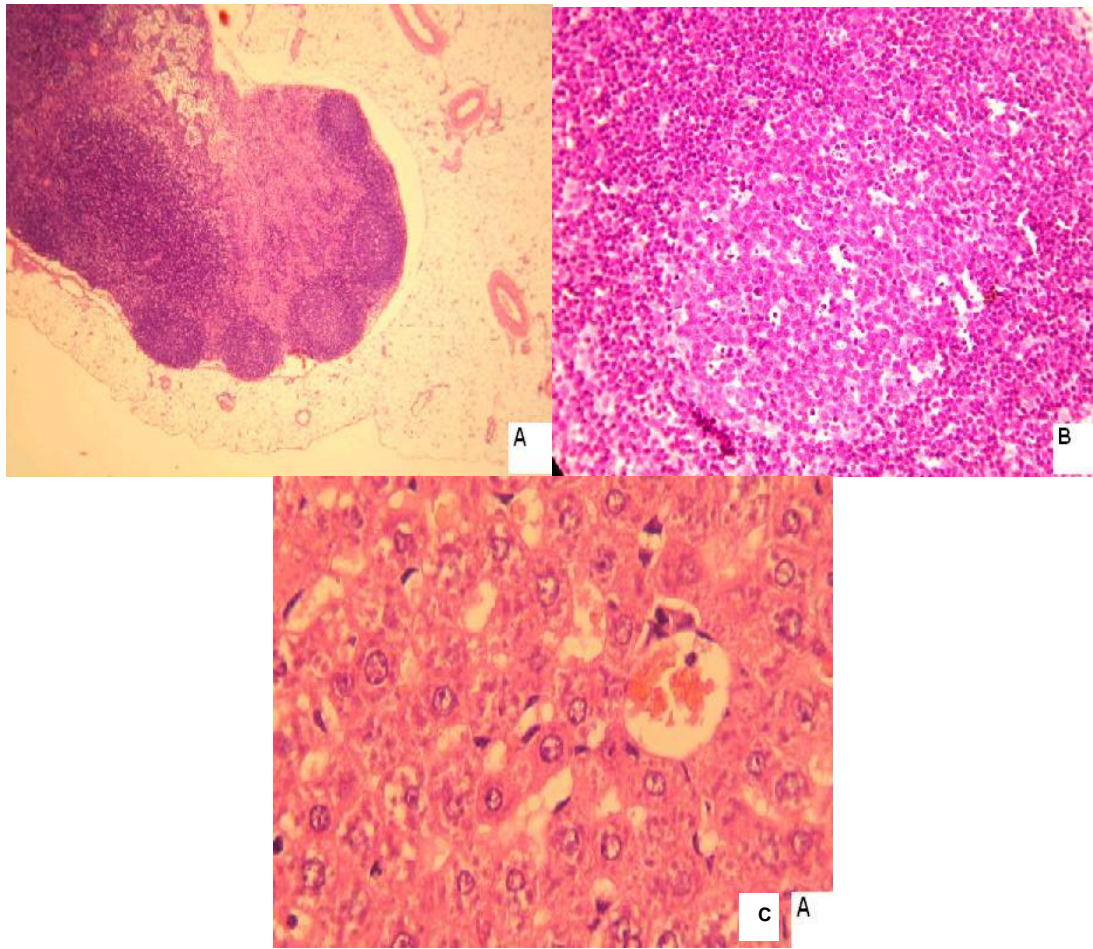


Figura 22. Hallazgos histológicos., A: ganglio linfático mesentérico inguinal evidenciando plena funcionalidad, se observan folículos linfoides (5 X), B: mayor aumento de los ganglios linfáticos mesentéricos, se observa la presencia de un centro germinal (10 X), C: Hígado mostrando una morfología normal (40 X).

organismo y permite inferir que este producto no produce efectos tóxicos capaces de alterar la homeostasis del animal. Otro elemento que consideramos le confiere un alto valor al resultado obtenido en este estudio, es la inclusión, se evidenció que la vacuna no produjo daños sistémicos atribuibles a las diferentes dosis ensayadas y que los hallazgos reportados en los órganos del sistema inmune indican plena funcionalidad del mismo, de acuerdo al efecto esperado para este producto.

5.2.6- Toxicidad a dosis repetidas de la vacuna pentavalente TRIVAC-HB + Quimi-Hib concentrada

5.2.3.1- Peso corporal

Como puede observarse en las figuras 23 y 24 (Tabla X y XI del Anexo), en ambos sexos los valores de peso corporal fueron similares en cada tiempo de evaluación, lo que se vio confirmado al realizar el análisis estadístico correspondiente, donde no se reportaron diferencias significativas entre los grupos. Se demostró que no existió influencia de la dosis administrada sobre este parámetro. Los animales tratados con las vacunas TRIVAC-HB y Quimi-Hib concentrada por separado mostraron igual comportamiento, sin evidenciar diferencias estadísticamente significativas con los grupos de dosis en que fueron combinadas en una formulación pentavalente.

En ambos sexos se evidencia un incremento sostenido de peso a lo largo de todo el estudio, independientemente de la dosis y a pesar de que los animales fueron administrados diariamente durante 14 días. Al realizar comparaciones pareadas a los datos, se observó que existieron diferencias estadísticamente significativas que confirman este hecho, las que se mantuvieron en el análisis realizado al grupo satélite.

5.2.3.2- Consumo de alimentos

En las Figuras 25-A y B (Tabla XII del Anexo), se refleja el comportamiento del consumo diario de alimento en ambos sexos el que se mantuvo dentro de los parámetros considerados normales para esta especie (10g/100g de peso corporal/día), sin que se presentaran diferencias marcadas entre los grupos de tratamiento para un mismo tiempo de evaluación, lo cual fue comprobado en el análisis estadístico realizado.

Al analizar este parámetro es importante señalar que no existieron diferencias significativas en el consumo de alimento reportado para los animales administrados con las vacunas TRIVAC-HB y

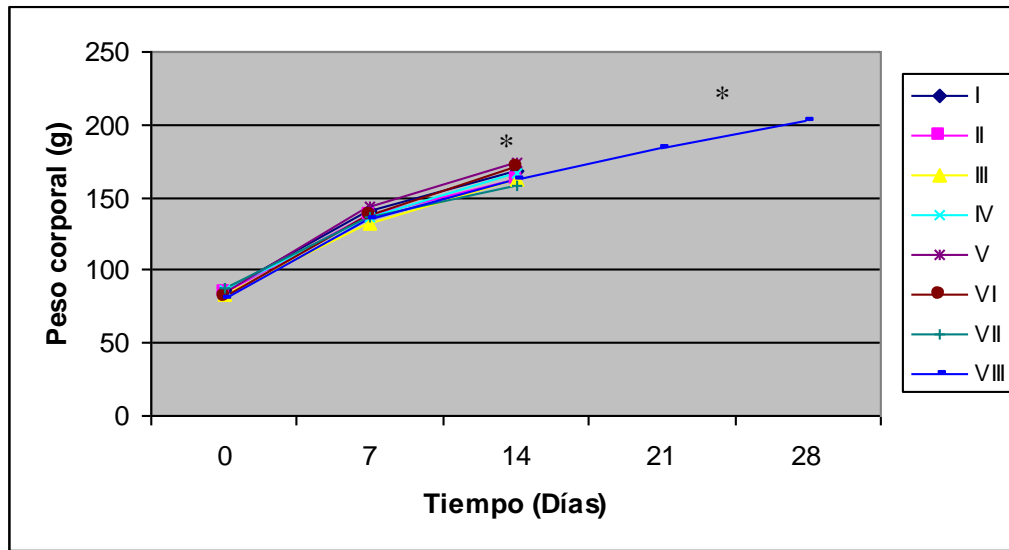


Figura 23. Comportamiento del peso corporal (g). Animales hembras. Prueba Anova seguida de la prueba LSD y de T pareada de comparaciones múltiples. Los asteriscos representan diferencias significativas en el tiempo

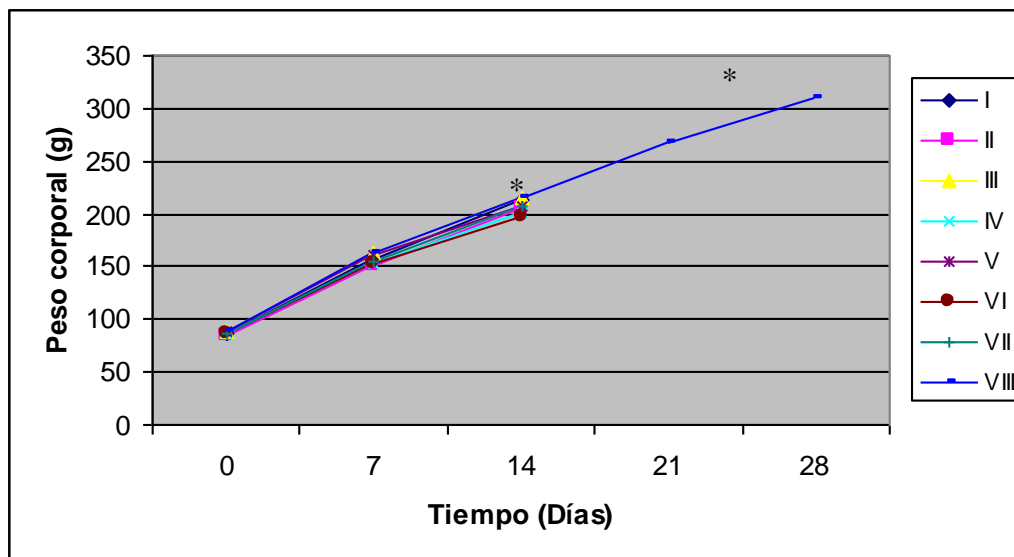


Figura 24. Comportamiento del peso corporal (g). Animales machos. Prueba Anova seguida de la prueba LSD y de T pareada de comparaciones múltiples. Los asteriscos representan diferencias significativas en el tiempo

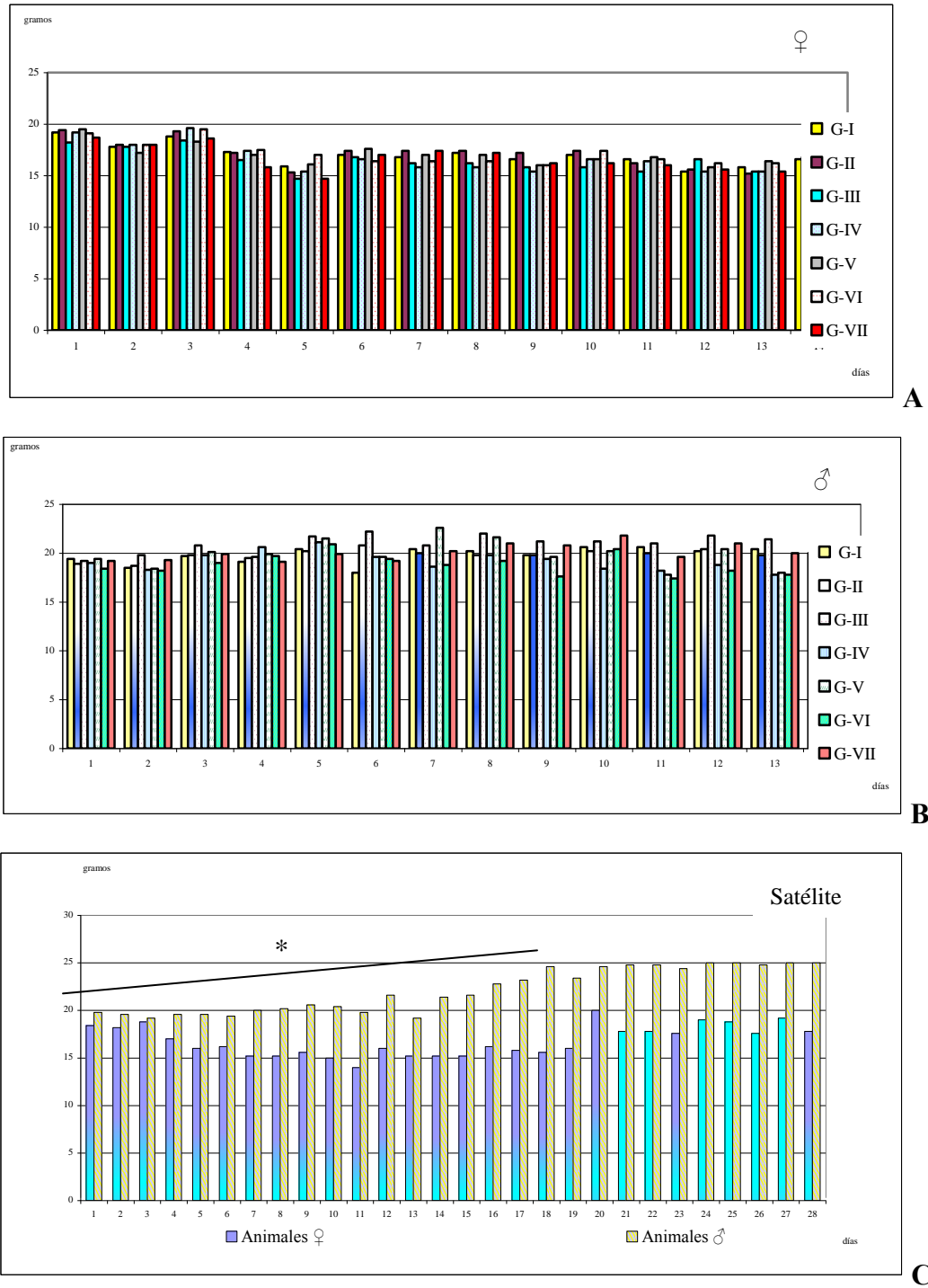


Figura 25. Consumo de alimentos (g) por grupos. A- animales hembras, B- animales machos y C- grupo satélite. Prueba Kruskal Wallis seguida de la prueba Dunn y de Wilcoxon. El asterisco representa diferencias significativas en el tiempo

Quimi-Hib concentrada por separado, con respecto a aquellos que fueron tratados con la combinación pentavalente.

El grupo satélite se muestra en la Figura 25-C puede observarse que hubo un ligero incremento en estos valores, evento estadísticamente significativo y más notorio en los animales machos de cada grupo.

5.2.3.3- Observaciones clínicas

En las observaciones clínicas realizadas diariamente no se observaron signos que indicaran efectos tóxicos del producto. Los animales no presentaron cambios en el pelaje; la coloración y la apariencia de ojos y membranas mucosas se mantuvo normal, así como el comportamiento, manifestando en todo momento una adecuada respuesta ante los estímulos. No se registraron muertes durante el estudio. El único signo clínico relevante detectado fue la presencia de induraciones y nódulos en el sitio de administración (cuadriceps femoral), sin evidenciarse alteraciones en la marcha ni daños en la epidermis de los animales tratados con las diferentes dosis de la vacuna pentavalente y la dosis alta de TRIVAC-HB.

Después de 5 administraciones consecutivas de las diferentes dosis, las induraciones reportadas fueron mínimas, las que fueron aumentando en severidad a medida que se sucedieron las mismas, en estrecha relación con el nivel de dosis inoculado. Hacia el final del período de administración se hicieron evidentes la presencia de formaciones nodulares y quistes en ambas extremidades en los mismos grupos antes citados.

5.2.3.4- Determinaciones hematológicas y bioquímicas

- **Hematología**

Los hallazgos hematológicos más significativos se refieren a la ligera disminución observada en la determinación de hemoglobina y hematocrito en los animales de los grupos IV, V y VI (tratados con 6 y 9 veces la dosis terapéutica de las vacunas pentavalente y TRIVAC-HB, respectivamente) tomado como referencia los valores obtenidos en el grupo no tratado (basal) (Tablas XIII y XIV del Anexo). Aún cuando estas determinaciones están ligeramente por debajo del rango calculado para este estudio, se encontraron dentro de los valores normales reportados para esta sublínea a partir de un análisis histórico (131).

Otro aspecto de interés resultó la detección de un ligero incremento en el porcentaje de polimorfonucleares reportado para los grupos V, VI y VII, tratados con 9 veces la DT de la formulación pentavalente, control TRIVAC-HB y control Quimi-Hib concentrada,

respectivamente. También se registró ligeras variaciones en el % de linfocitos (decrementos de 59 %, 62 % y 62 %, respectivamente, en los grupos antes mencionados), linfocitos (62 % de linfocitos en comparación con un rango entre 71 y 81 %) y eosinófilos con un valor de 2 en los animales machos correspondientes al grupo IV, 6 veces la DT de la vacuna pentavalente, en ambos casos.

- **Bioquímica sanguínea**

El análisis estadístico mostró diferencias entre los valores obtenidos en los animales del grupo basal respecto a los valores individuales de animales de cada grupo de tratamiento, no obstante, la interpretación biológica de estos resultados al compararlos con los rangos antes mencionados nos indican un comportamiento normal de estas enzimas, que mostraron un patrón que las ubica dentro del rango de referencia calculado para este estudio e igualmente dentro del rango establecido para las ratas Sprague-Dawley de las sublíneas *Cenp: SD* y *Tac:N(SD)fBR* producidas por CENPALAB y la compañía Taconic, respectivamente (125) (Tablas XV y XVI del Anexo).

Los resultados obtenidos en la determinación de creatinina y ASAT, mostraron valores dentro de los rangos normales en todos los casos analizados. ALAT, al ser comparada con las concentraciones de referencia mostró valores promedio ligeramente más elevados en los animales de los grupos III, IV, V, VI y VII (tratados con los diferentes niveles de dosis de la vacuna pentavalente, con las vacunas Quimi-Hib y TRIVAC-HB). En el caso de ALP, todos los grupos mostraron un comportamiento no relacionado con la dosis, apareciendo incrementos en la concentración enzimática por encima del valor de referencia de este estudio.

5.2.3.5- Hallazgos macroscópicos

En los registros no se evidenciaron alteraciones en los órganos inspeccionados en ningún momento de sacrificio. Los signos más significativos están relacionados con el sitio de administración, en el cual se observó la presencia de nódulos blanquecinos en correspondencia con lo reportado en las observaciones clínicas, así como quistes en las dosis más elevadas (Figura 26). Es significativa la diferencia en la frecuencia de aparición de estos signos locales entre los animales sacrificados tras 4 administraciones y los que fueron tratados durante 14 días (Tabla 31), así como la ausencia de alteraciones en el grupo tratado con Quimi-Hib por separado (grupo VII).

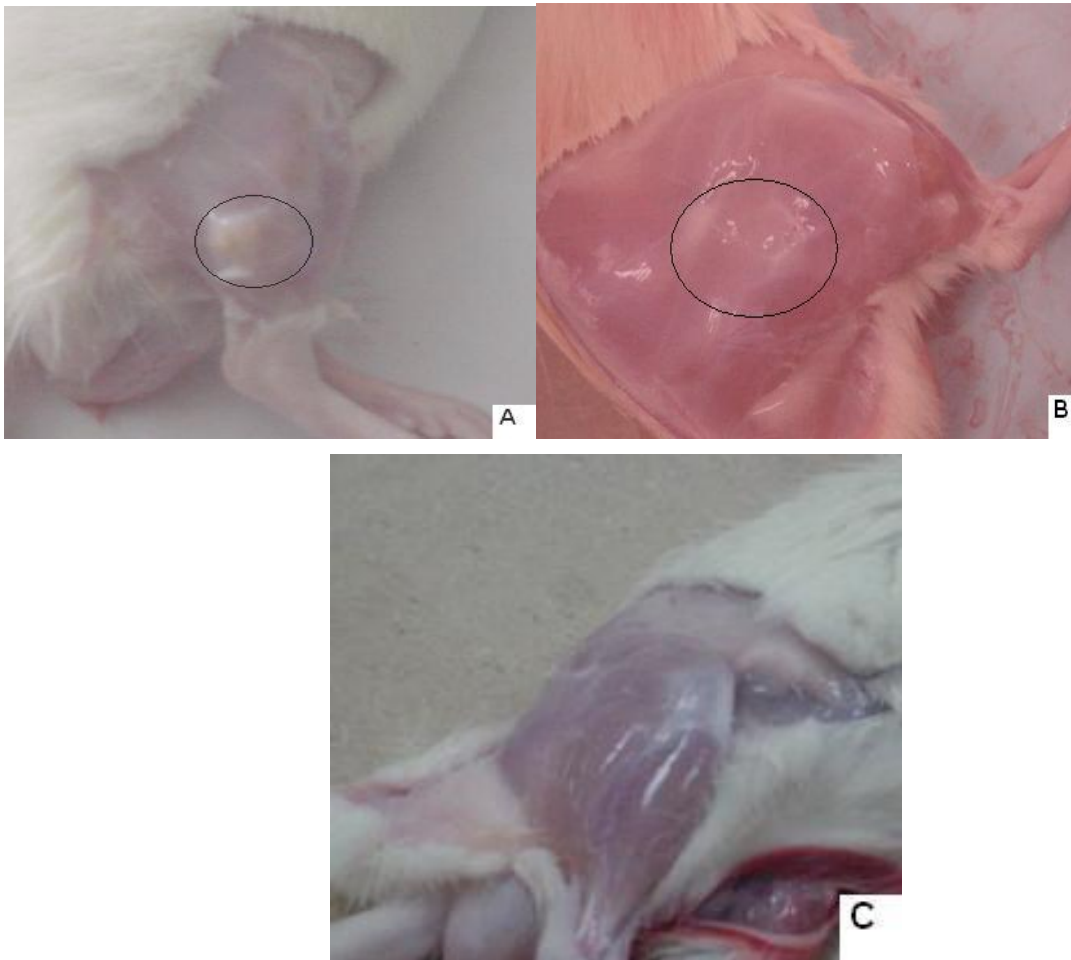


Figura 26. Observaciones macroscópicas en el sitio de administración. A: formación nodular con absceso en un animal del grupo V (30 veces la DT). B: nódulo blanquecino en la extremidad de un animal del grupo IV (15 veces la DT). C: aspecto normal de la extremidad de un animal del grupo VII (30 veces la DT Quimi-Hib concentrada)

Tabla 31. Frecuencia de aparición de alteraciones macroscópicas en el sitio de administración por tiempo de sacrificio

Grupo/Tratamiento	Sacrificio tras 4 administraciones		Sacrificio tras 14 administraciones	
	♀	♂	♀	♂
I /Solución salina al 0.9 %	0/10	0/10	0/10	0/10
II/ Placebo	1/10	0/10	5/10	4/10
III/3 veces la DT/ vacuna 4+1	1/10	1/10	5/10	5/10
IV/6 veces la DT/ vacuna 4+1	3/10	3/10	5/10	5/10
V/9 veces la DT/ vacuna 4+1	1/10	1/10	5/10	5/10
VI/9 veces la DT/TRIVAC-HB	4/10	3/10	5/10	5/10
VII/9 veces la DT/Quimi-Hib concentrada	0/10	0/10	0/10	0/10

Esta agrupación de hallazgos en función de la cantidad de animales afectados resulta descriptiva, sin embargo nos permitió observar que luego de ser administrados 4 días sucesivos con la vacuna pentavalente y con TRIVAC-HB por separado, los eventos son menores desde el punto de vista cualitativo y cuantitativo que luego de 14 días consecutivos de tratamiento, como era de esperar. El grupo satélite se analizó el día 28 del estudio, en él se evidenció alteraciones macroscópicas en el sitio de administración, donde no se observó reversión de estos hallazgos.

Además de estas observaciones locales, se reportó hiperplasia del bazo en un animal del grupo VI, inoculado con el control TRIVAC-HB.

5.2.3.6- Peso relativo de los órganos

En ninguno de los momentos de sacrificio el peso relativo de los órganos promedio mostró diferencias de consideración entre los grupos de tratamiento, ya que en la mayoría de los casos se mantuvieron dentro del rango normal calculado. Las variaciones por encima de estos rangos calculados (como en el caso del peso del pulmón de los animales hembras sacrificados posteriores a las 14 administraciones) son ligeras y aparecen también en el grupo tratado con el placebo de la formulación (Tablas XVII – XX del Anexo).

Aunque en el análisis estadístico se observaron diferencias significativas en el peso de alguno de estos órganos, al realizar las comparaciones múltiples, no fue posible detectar entre qué grupos éstas se presentaron, lo cual confirma la escasa magnitud de estas diferencias.

Si bien el análisis matemático de los datos resulta válido, la interpretación de éste parámetro debe realizarse fundamentalmente a partir de la evaluación de su comportamiento con respecto al rango normal de referencia establecido para el estudio, del rango normal histórico referido para la especie y el resultado debe integrarse a los datos aportados por el estudio histopatológico, la patología clínica y las observaciones clínicas antes de emitir una evaluación concluyente (123). De manera general, el peso relativo de los órganos no se vio alterado en ninguno de los grupos incluidos en el estudio, mostró un comportamiento similar en cada uno independientemente de los diferentes tratamientos inoculados.

5.2.3.7- Hallazgos microscópicos

Este procedimiento se realizó en dos momentos, los correspondientes a cada tiempo de sacrificio (luego de 4 administraciones, el día 14 y el día 28, en particular para los animales del grupo satélite. La frecuencia en que se presentaron se resume en la Tabla 32.

Sacrificio tras 4 administraciones sucesivas

Tabla 32. Hallazgos microscópicos y su frecuencia de aparición

Sitio de administración (animales reportados/ total de animales)						
Grupo/Tratamiento	INM	GMD+N	GMF	GMF+CC	TG	Ab
I/ solución salina	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
II/ placebo	1/10	3/10	4/10	0/10	0/10	1/10
III/ 3 veces la DT, vacuna 4+1	0/10	5/10	0/10	3/10	1/10	0/10
IV/6 veces la DT, vacuna 4+1	0/10	9/10	1/10	0/10	1/10	0/10
V/ 9 veces la DT, vacuna 4+1	0/10	4/10	4/10	0/10	2/10	0/10
VI/ 9 veces la DT TRIVAC-HB	1/10	5/10	2/10	0/10	2/10	0/10
VII/ 9 veces la DT Quimi-Hib	3/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10

Grupo/Tratamiento	Bazo	Hígado	
	HE	HE	FN
I/ solución salina	10/10	0/10	1/10
II/ placebo	9/10	1/10	1/10
III/ 3 veces la DT, vacuna 4+1	10/10	2/10	2/10
IV/6 veces la DT, vacuna 4+1	10/10	2/10	3/10
V/ 9 veces la DT, vacuna 4+1	10/10	0/10	2/10
VI/ 9 veces la DT TRIVAC-HB	9/10	1/10	2/10
VII/ 9 veces la DT Quimi-Hib	9/10	0/10	0/10

Leyenda:

INM- infiltrado de neutrófilos y macrófagos; GMD+N- granuloma macrofágico difuso con necrosis y tejido de granulación; GMF- granuloma macrofágico focal, con tejido de granulación e infiltrados de neutrófilos; GMF+CC- Granuloma macrofágico focal a nivel del perimisio, con presencia de células cebadas y algunos linfocitos; TG- Tejido de granulación con infiltrado de macrófagos y linfocitos; Ab- Absceso estéril y tejido de granulación HE- hematopoyesis extramedular, FN- pequeño foco necroinflamatorio, NS- área de necrosis focal.

Como puede observarse, en este momento de sacrificio los principales hallazgos reportados fueron la presencia de hematopoyesis extramedular de bazo, acompañado en algunos casos de centros germinales a nivel de la pulpa blanca, pequeños focos necroinflamatorios en el hígado y granulomas en el sitio de administración. En el resto de los órganos evaluados que no aparecen en la tabla (médula ósea, encéfalo, timo, adrenales, pulmón) no se reportaron cambios morfológicos. La hematopoyesis extramedular encontrada en bazo fue observada en la mayoría de los animales de cada grupo, mientras que en hígado la frecuencia de aparición fue mucho menor y no sobrepasó los 2 animales de 10 en los grupos III, IV tratados con 3 y 6 veces la DT, así como incidencia puntual en los grupos II y VI, inoculados con el placebo y control TRIVAC-HB. Al observarse este evento en la mayoría de los animales, incluso en los pertenecientes a los grupo no tratado, administrado con solución salina y el placebo de la formulación nos sugiere la independencia de este hallazgo con los tratamientos empleados (Figura 27).

En hígado también se observó la presencia de pequeños focos necroinflamatorios con muy baja incidencia en algunos grupos, excepto en el grupo VII, control Quimi-Hib. Excepto en el grupo I (administrado con solución salina y en el VII, tratado con el componente Quimi-Hib), los restantes grupos al ser analizados matemáticamente, mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto a los grupos I y VII.

Al evaluar el sitio de inoculación, en los grupos tratados con el placebo y con las diferentes dosis del producto, la mayoría de los animales presentaron granulomas macrofágicos, focales o dispersos, con presencia de infiltrados de neutrófilos, macrófagos y células cebadas (Figura 28). En algunos casos se presentaron pequeñas áreas de necrosis. En los grupos III (3 veces la DT), IV (6 veces la DT), V (9 veces la DT) y VI (9 veces la DT TRIVAC-HB se reportó además la presencia de tejido de granulación subcutáneo como índice de inicio de los procesos de reparación tisular.

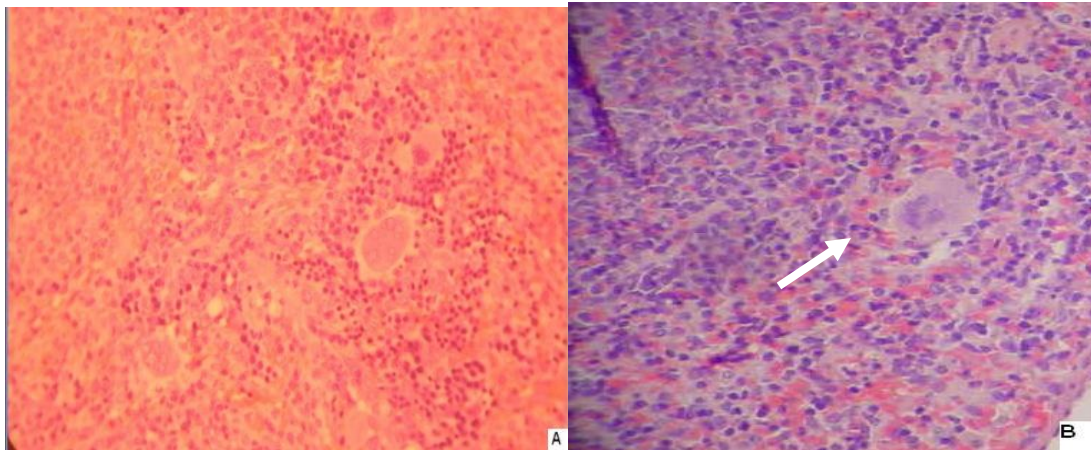


Figura 27. A-Hematopoyesis de bazo en un animal del grupo I (solución salina) (10 X), B-Hematopoyesis de bazo, animal del grupo V (30 veces la DT) (10 X), megariocito (flecha).

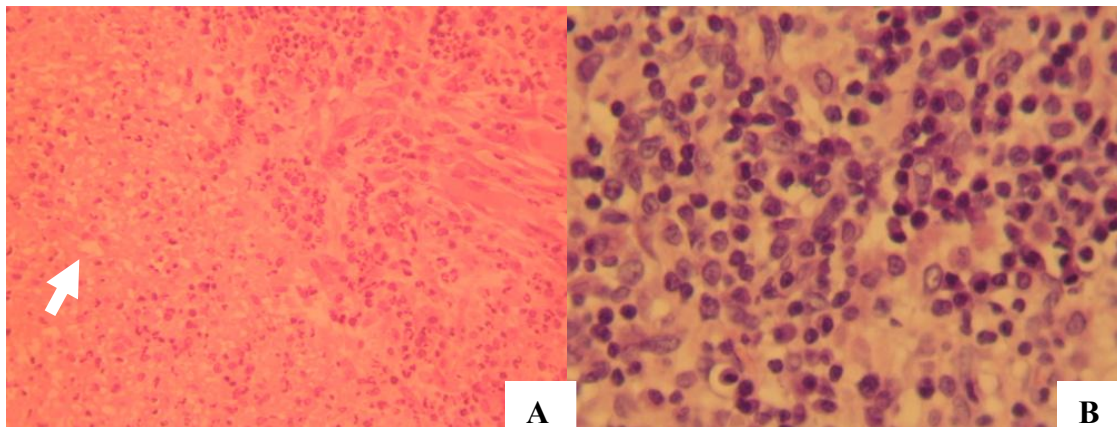


Figura 28. Hallazgos en sitio de administración. A. Granuloma macrofágico focal, con áreas de necrosis (flecha) en un animal del grupo III (3 veces la DT) (10 X), B. Infiltrado de linfocitos y células plasmáticas en un animal del grupo V (9 veces la DT)(40 X).

Sacrificio tras 14 administraciones sucesivas**Tabla 33. Hallazgos microscópicos y su frecuencia de aparición**

Hallazgos (animales reportados/total de animales sacrificados)							
Grupo/Tratamiento	Bazo	Ganglios poplíteos	Hígado		Pulmón	Sitio de administración	
	HE +CG	FS	HE	FN	NI	GMD+N	GMF
I/ solución salina	10/10	0/10	1/10	1/10	0/10	0/10	0/10
II/ placebo	8/10	0/10	0/10	1/10	0/10	7/10	2/10
III/ 3 veces la DT, vacuna 4+1	10/10	5/10	3/10	5/10	0/10	10/10	0/10
IV/ 6 veces la DT, vacuna 4+1	10/10	9/10	4/10	5/10	1/10	9/10	1/10
V/ 9 veces la DT, vacuna 4+1	10/10	2/10	5/10	4/10	1/10	8/10	2/10
VI/ 9 veces la DT TRIVAC-HB	10/10	8/10	7/10	5/10	2/10	10/10	0/10
VII/ 9 veces la DT Quimi-Hib concentrada	10/10	0/10	0/10	2/10	0/10	0/10	0/10

Leyenda:

HE- hematopoyesis extramedular, CG- centro germinativo, FS- folículo secundario, FN- pequeño foco necroinflamatorio, NI- foco necroinflamatorio; GMD+N- granuloma macrófago difuso con áreas de necrosis y tejido de granulación; GMF- granuloma macrófago focal, con tejido de granulación e infiltrados de neutrófilos

Los hallazgos de mayor incidencia en los órganos parenquimatosos fue la presencia de hematopoyesis de bazo, observada en los grupos tratados con las diferentes formulaciones vacunales, verificándose en estos la mayor incidencia de aparición (10/10), excepto 2 animales del grupo II (Placebo) y en hígado, con menor incidencia por grupo, menos los grupos II y VII, donde no se reportó este hallazgo. También se observó la presencia de pequeños focos necroinflamatorios en todos los grupos incluidos en el estudio, cuya mayor frecuencia de aparición (5/10) fue descrita en los grupos tratados con 3 y 6 veces la DT de la combinación pentavalente y el control TRIVAC-HB. Se observó además, neumonía intersticial periarterial y peribronquial, caracterizada por infiltrados de células mononucleadas, la cual se presentó en algunos animales puntuales de los grupos IV, V y VI. Los órganos del sistema inmune no presentaron alteraciones: bazo, timo y ganglios poplíteos evidenciaron morfología de plena funcionalidad (Figuras 29A-C). No se reportó depleción de células ni otro efecto que indicara daño sobre éstos órganos. En el bazo fue significativa la presencia de centros germinales en la pulpa blanca y en los ganglios se reportó una alta incidencia de folículos secundarios como índice de actividad proliferativa en estos órganos.

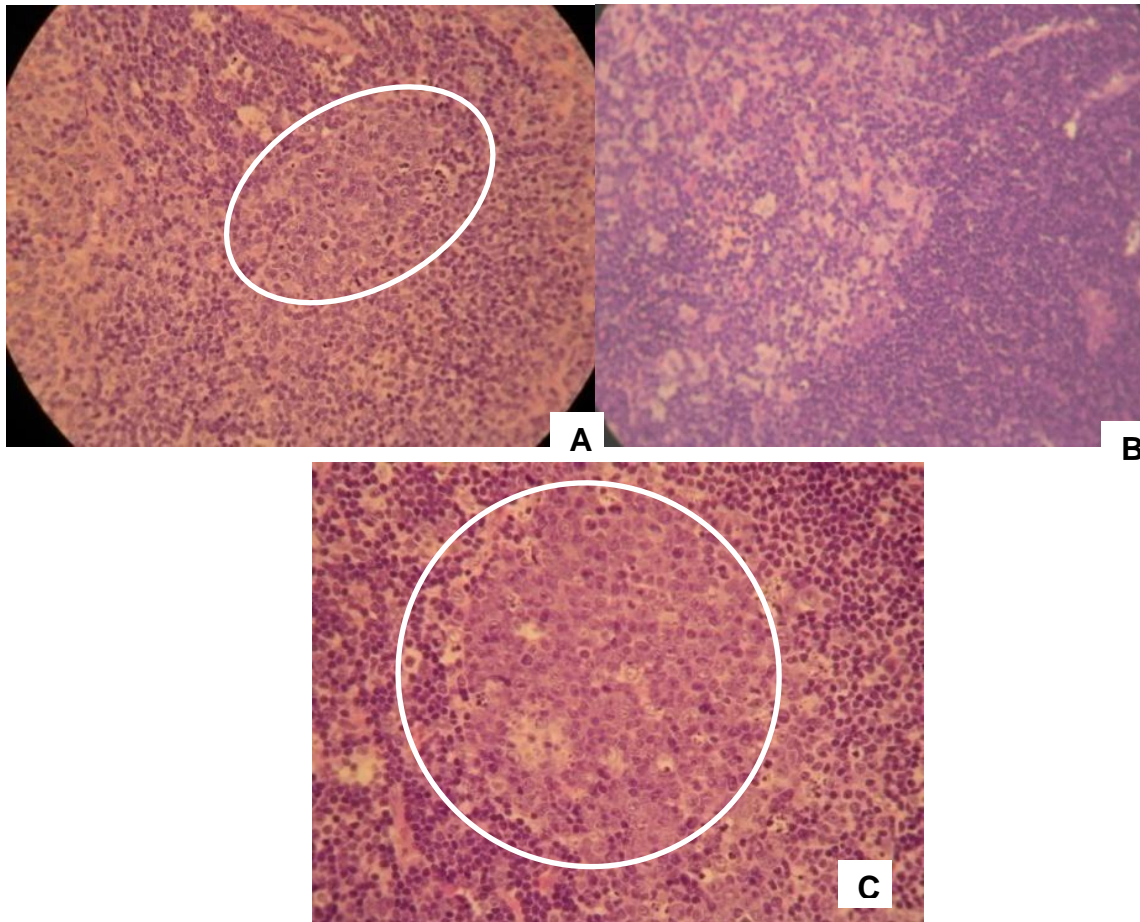


Figura 29. Hallazgos histológicos. A: Centro germinal (elipse) en la pulpa blanca del bazo de un animal del grupo V (9 veces la DT) (10 X), B: Timo de un animal del grupo IV (6 veces la DT), presencia de a zona medular y cortical (10 X), C: Centro germinal en el ganglio linfático mesentérico (círculo) de un animal del grupo V (9 veces la DT) (40 X).

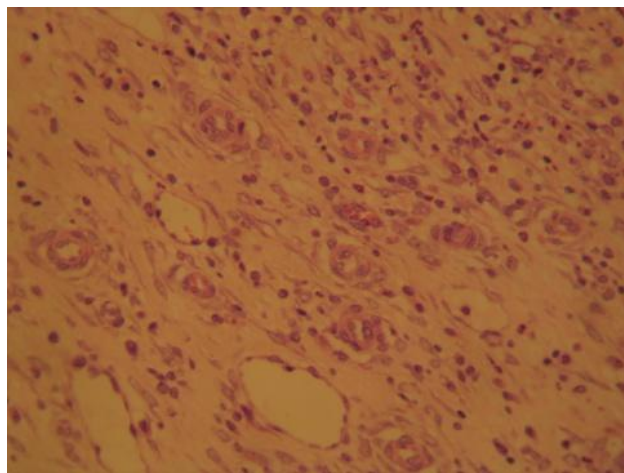


Figura 30. Granuloma macrófágico difuso con tejido de granulación (40 X).

En el sitio de administración se hizo evidente la respuesta inmune local, caracterizada por la presencia de granulomas macrofágicos, que alternan entre difusos y focales, con áreas de necrosis y tejido de granulación, de manera similar a lo reportado en el sacrificio anterior.

Estadísticamente los datos fueron analizados a través de la construcción de tablas de clasificación cruzada, donde se comparó la aparición o no de hallazgos entre los grupos. En la generalidad de los casos se presentaron diferencias significativas entre los grupos I (solución salina) y VII (9 veces la DT Quimi-Hib) con respecto a los grupos tratados y no se presentaron diferencias entre el placebo y los grupos administrados con la vacuna. Los animales del grupo satélite mostraron poca variación al analizar los órganos de interés, como puede observarse en la tabla 34.

Tabla 34. Hallazgos microscópicos y su frecuencia de aparición. Grupo satélite

Hallazgos (animales reportados/total de animales sacrificados)					
Grupo	Bazo	Ganglios poplíteos	Hígado		Pulmón
	HE+CG	FS	HE	FN	NI
VIII/Satélite	10/10	3/10	4/10	5/10	4/10

Leyenda:

HE- hematopoyesis extramedular, CG- centro germinativo, FS- folículo secundario, FN- pequeño foco necroinflamatorio, NI- neumonía intersticial peri-arteriolar y peri bronquial con presencia de linfocitos, células plasmáticas y macrófagos espumosos

Los hallazgos encontrados coinciden con los expresados con anterioridad, presencia de hematopoyesis extramedular en bazo e hígado, focos necroinflamatorios en este último y neumonía intersticial en pulmón.

En el sitio de administración, se mantuvo como hallazgos de interés la presencia de granulomas macrofágicos difusos a nivel del endomisio de las fibras musculares, con áreas de necrosis, tejido de granulación e infiltrado de linfocitos y células plasmáticas, tal y como se observó en los análisis realizados tras 4 y 14 administraciones (Figura 30)

5.2.3.8- Evaluación de efectos inmunotoxicológicos

El resumen de los resultados obtenidos por grupo se muestra en las Tablas de la XXI a la XXIII del Anexo. En estos se evidencia que la presencia de folículos secundarios y centros germinativos en los animales machos fue superior a la obtenida en los animales hembras. La estimulación de linfocitos T aumentó en correspondencia con la elevación de los niveles de dosis probados, figuras 31 y 32. En la evaluación de los centros germinativos por sexo se observó un

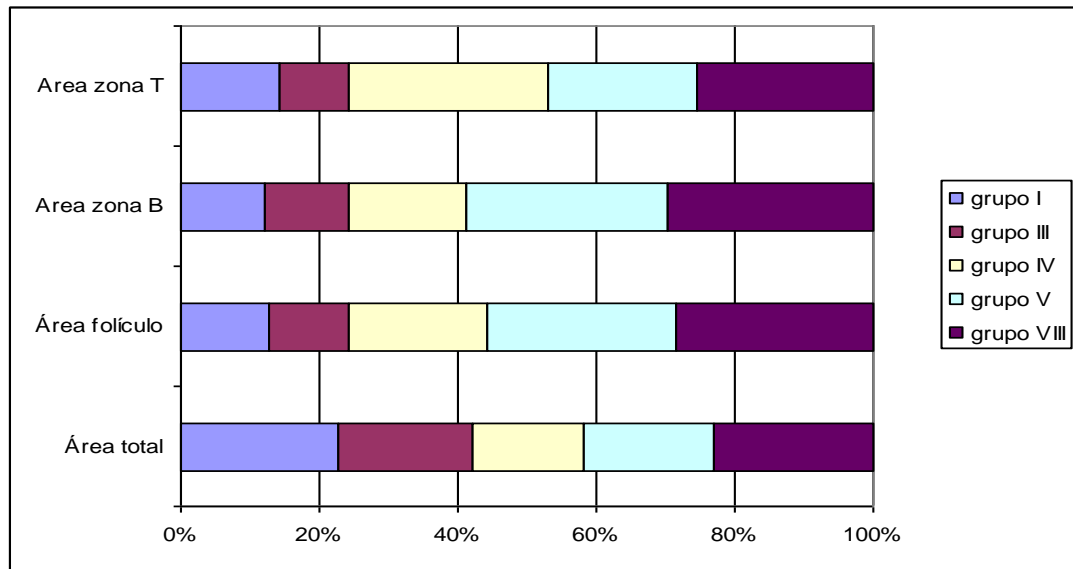


Figura 31. Resumen valores de áreas de diferentes zonas del bazo por grupo de tratamiento, animales hembras. Prueba Kruskal Wallis seguida de la prueba Dunn.

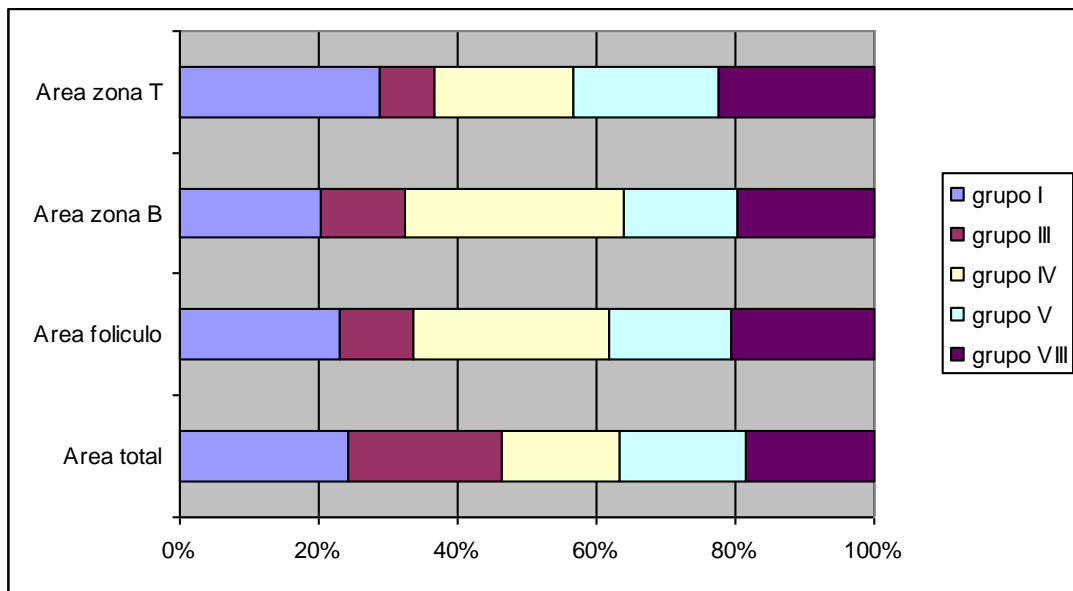


Figura 32. Resumen valores de áreas de diferentes zonas del bazo por grupo de tratamiento, animales machos. Prueba Kruskal Wallis seguida de la prueba Dunn.

comportamiento similar al antes descrito, con disminución de estos 15 días después de concluido el tratamiento, figuras 33 y 34. En ninguno de estos dos análisis se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para los test aplicados.

RESUMEN: Los animales empleados en este estudio mostraron un patrón de comportamiento normal, con índices de consumo de alimento, ganancia de peso corporal y comportamiento correspondiente a animales sanos de la especie. Esto indica que la administración reiterada del producto no causó alteraciones metabólicas o conductuales que puedan ser traducidas como efectos adversos. En las observaciones clínicas realizadas solo se reportaron como signos de importancia los referidos al sitio de administración, en el cual se presentaron induraciones y nódulos, efecto que clínicamente ya ha sido reportado para numerosas vacunas que se encuentran registradas y con amplio uso comercial. Las determinaciones de patología clínica (hematología y bioquímica sanguínea) demostraron que no existieron alteraciones funcionales y/o estructurales en de los órganos evaluados, indicando que la administración reiterada del producto ensayado no provoca toxicidad en ninguno de ellos. La evaluación histopatológica demostró que la administración reiterada del producto o sus componentes no induce alteraciones en los órganos estudiados, mostrando los del sistema inmune morfología de plena funcionalidad. El sitio inoculado mostró evidencias de respuesta inmune local, atribuible al efecto del adyuvante y al mecanismo de acción de la vacuna. Los hallazgos microscópicos mostraron la presencia de granulomas de diferentes grados en el sitio de administración y estimulación antigénica en bazo y ganglios mesentéricos. La evaluación de efectos inmunotoxicológicos evidenció que la aplicación de la vacuna pentavalente TRIVAC-HB + Quimi-Hib concentrada no indujo eventos adversos sobre el sistema inmune de los animales, se observó una respuesta en correspondencia con los niveles de dosis aplicados en cada caso la que descendió una vez concluido el tratamiento. Estos resultados obtenidos en este estudio nos aseguran que la vacuna pentavalente TRIVAC-HB + Quimi-Hib concentrada muestra un adecuado marco de seguridad para su empleo en estudios clínicos en lactantes.

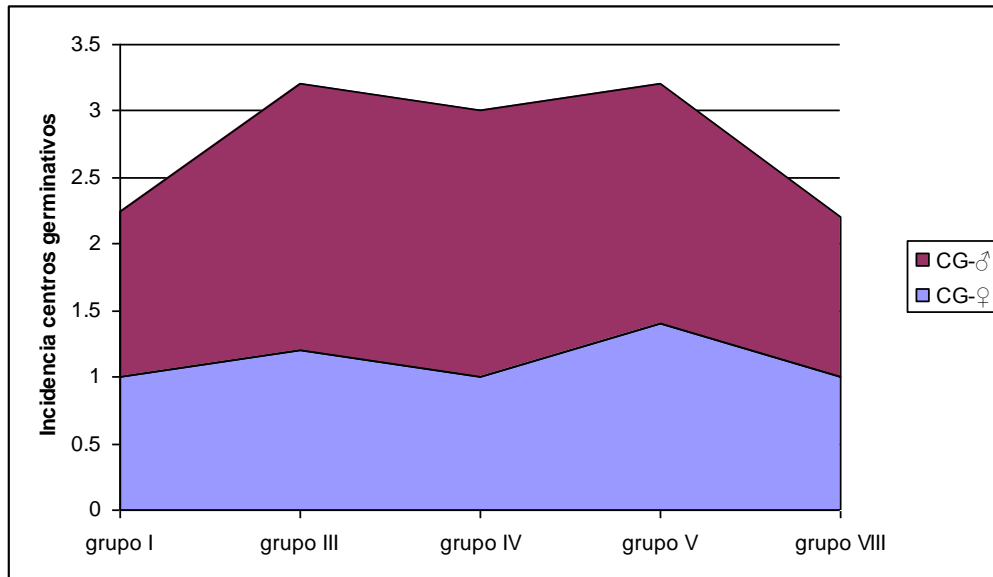


Figura 33. Frecuencia de aparición de centros germinativos (CG) por grupo de tratamiento y por sexo. Prueba Kruskal Wallis seguida de la prueba Dunn.

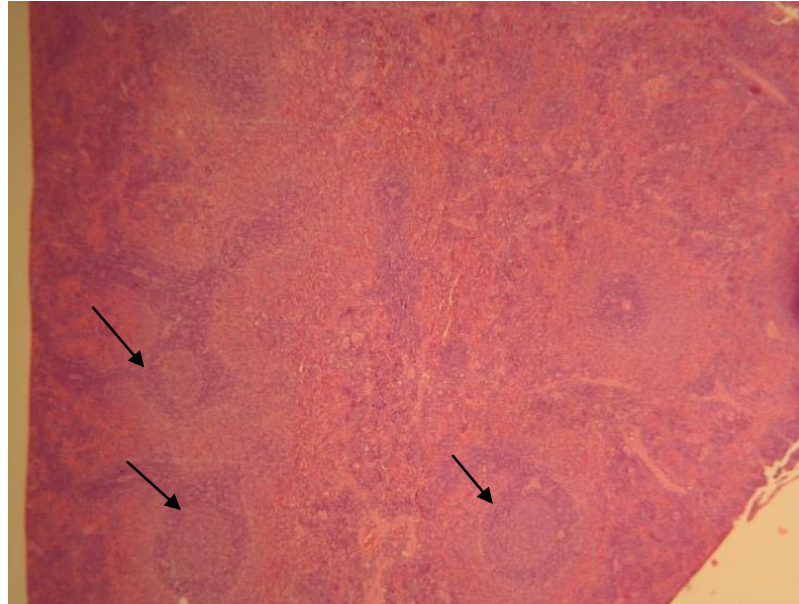


Figura 34. Animal 6 del grupo V tratado con la dosis alta de la vacuna pentavalente. Bazo. Centro Germinativo (Flecha negra). 5X. HE.

5.3 Discusión

El peso corporal es uno de los indicadores más sensibles en la condición de un animal y de efectos adversos, por ello es monitoreado frecuente y cuidadosamente durante cada estudio toxicológico. Una pérdida marcada o rápida del peso corporal usualmente es el anuncio de una enfermedad o de muerte, esta puede ser consecuencia del decremento del consumo de agua y alimentos, enfermedades o efectos tóxicos específicos (91).

La reducción en la ganancia del peso corporal puede ser el reflejo de una amplia variedad de respuestas, incluyendo reducción de la palatabilidad, así como la inducción de anorexia o toxicidad sistémica por el tratamiento, por lo que el efecto contrario se considera signo de bienestar (91;121;122). A diferencia de lo anteriormente planteado, en los esquemas toxicológicos desarrollados a cada candidato vacunal, los animales aumentaron progresivamente el peso en cada período evaluado, independientemente del número de inoculaciones y de los tratamientos probados, lo que constituyó un índice indirecto de la ausencia de efectos tóxicos y de la preservación del bienestar, como asevera Hayes en su edición del 2008.

En la evaluación de toxicidad aguda de la vacuna Quimi-Hib, los animales de cada grupo mantuvieron un incremento progresivo de peso corporal durante el período de experimentación, como índice indicativo del efecto beneficioso de la sustancia en estudio. Se demostró que no existió influencia de la inoculación de altas dosis/volumen (hasta 45 veces la DT) de esta vacuna sobre la ganancia de peso corporal de los animales; lo que indirectamente evidencia la ausencia de toxicidad de la misma. Los animales administrados tanto en aplicación única, así como con inoculaciones reiteradas de la vacuna monovalente, mostraron incrementos del peso corporal en todos los grupos que se corresponden con las curvas de crecimiento de animales sanos en ambos sexos (124), lo que indica que la sustancia de ensayo no causó alteraciones en el metabolismo del animal. Este resultado está en concordancia con el comportamiento normal de los valores obtenidos diariamente en el alimento consumido en cada grupo.

En los estudios antes citados, el comportamiento del parámetro consumo de alimentos fue positivo y constituyó un indicativo del mantenimiento de buenas condiciones de salud de los animales durante cada ensayo y de la inocuidad de la vacuna de prueba, incluso en el esquema de inoculaciones reiteradas se confirma esta afirmación, la que coincide con lo planteado por Wiley-Blackweel en el año 2012. En los puntos de tiempo evaluados se destaca un incremento

significativo del consumo de alimentos en el tiempo, independientemente del sexo, los niveles de dosis y frecuencia de inoculación evaluada.

Los registros de alimento consumido se tradujeron en un incremento normal del peso corporal de los animales, como se discutió anteriormente. Este dato también constituyó un elemento importante para sustentar la no toxicidad de la vacuna sintética en estudio ya que este parámetro es otro de las cuantificaciones fundamentales a seguir durante el monitoreo del comportamiento animal en un estudio toxicológico y considerando además, lo planteado por Wilson en el 2008 en relación a animales que sufran eventos adversos producidos por la exposición a un producto en estudio, los que frecuentemente muestran decrementos importantes del alimento consumido (91), antecedente en contraposición con los resultados obtenidos.

De manera similar, en el análisis de la seguridad de la vacuna combinada pentavalente TRIVAC-HB + Quimi-Hib concentrada se observó un incremento sostenido del peso corporal a lo largo del estudio a dosis repetidas en todos los grupos de tratamiento. En los grupos tratados con las dosis más altas, se evidenció que los animales de ambos sexos aumentaron de peso corporal de manera significativa en el tiempo, lo cual es un elemento importante al evaluar la seguridad de la vacuna pentavalente debido a la presencia de antígenos de diferentes orígenes, que pudieran afectar este parámetro e incidir en el metabolismo animal, en correspondencia con lo planteado por Wilson en el año 2008 (91). Es importante destacar que los grupos administrados con la vacuna combinada tuvieron igual comportamiento que aquellos que fueron administrados con las vacunas TRIVAC-HB y con Quimi-Hib por separado. Este elemento nos indica que aún cuando estos componentes se mezclan en una formulación pentavalente, no se producen variaciones significativas en el peso corporal, o lo que es igual, que no hay alteraciones metabólicas que afecten este parámetro después de combinar ambos productos. En correspondencia con este resultado se registraron valores promedios semanales de alimentos consumido dentro de los rangos considerados normales para esta especie (100mg/Kg./día)(103), lo cual correlaciona con el incremento de peso observado.

En las observaciones clínicas realizadas en cada estudio, los signos clínicos relevantes se localizaron en el sitio de inoculación, como la presencia de induración con diferentes grados de intensidad en la fibra muscular, a excepción de la toxicidad aguda donde no se observó este evento, lo que consideramos que este relacionado con la aplicación de la vacuna en dosis única. En el ensayo de tolerancia local las induraciones clasificadas de ligeras y moderadas fueron

evidentes en los grupos administrados con las dosis de 10 y 20 veces la terapéutica y al grupo placebo, las que fueron palpables a partir del día 3 de este ensayo, luego de 2 inoculaciones, a los cuales correspondió el mayor volumen de administración y por consiguiente mayor concentración de adyuvante mientras que en grupo tratado con la DT no se palpó este signo local. La aparición de induraciones en el sitio administrado con la vacuna Quimi-Hib, adyuvada con fosfato de aluminio coincide con lo descrito por diferentes autores (77;128;130;132) los que describen microscópicamente la aparición de granulomas macrofágicos causantes de induración en el sitio de administración, como signo clásico, a partir de la aplicación de vacunas adyuvadas con sales de aluminio. Este evento clínico adverso guarda estrecha relación con el mecanismo de acción de estos adyuvantes, tanto el fosfato e hidróxido de aluminio, que como se refiere en la literatura revisada, contemplan la formación de depósitos en el sitio de aplicación, posibilitando la liberación lenta del antígeno produciendo una mayor respuesta inmune en el organismo (68;71;133;134). En correspondencia con este análisis, en el estudio de dosis repetidas este evento fue detectable a partir del día 4 del estudio, en que se incrementó la intensidad y frecuencia de aparición del mismo en relación con las dosis, volúmenes aplicados y número de inoculaciones.

El comportamiento de las vacunas estudiadas fue similar lo descrito en la experiencia clínica con los adyuvantes de aluminio, estos inducen una reacción inflamatoria local que ha sido asociada con dolor, inflamación, y enrojecimiento del sitio de administración (61;63;135;136). Estas reacciones localizadas son usualmente de mediana y corta duración (61;78;136).

En resumen, los adyuvantes de aluminio reducen la prevalencia y severidad de reacciones adversas mediante la liberación lenta de moléculas reduciendo así la toxicidad (78). Esto fue demostrado por Gherardi en el año 2012 empleando lipopolisacáridos unidos a hidróxido de aluminio vía ligando involucrando el intercambio de dos grupos fosfato neutralizando de esta actividad (137;138). Incluso la prevalencia y severidad de la reacción inflamatoria local es afectada por el sitio de inyección. Las reacciones locales son mayores empleando la vía subcutánea que con la inmunización intramuscular de vacunas de DT y ántrax adyuvadas con sales de aluminio (139;140). Esto pudiera ser atribuido a la localización superficial de las reacciones subcutáneas e incluso pudiera relacionarse con las diferencias fisiológicas entre estos tejidos (71).

También se ha referido la aparición de miofascitis macrofágica en la clínica con la aplicación de las sales de aluminio como adyuvante (141-143). Biopsias del músculo deltoide demostraron la relación entre la acumulación de macrófagos con la acumulación intracelular de hidróxido de aluminio. Tales lesiones han sido observadas en primates no humanos a los 12 meses luego de la inyección (144). Estas evidencias antes descritas concuerdan con lo observado en el grupo VI (satélite), evaluado durante 14 días adicionales, luego de la última administración, en el cual no se observó reversión total de estos hallazgos.

Los reportes clínicos diarios pusieron de manifiesto la disminución paulatina del grado de severidad de la induración, hasta alcanzar clasificación de induración ligera. Seguidamente, a partir del día 25 del estudio se evidenció la presencia de pequeños nódulos en los sitios de administración, en los que no hubo reversión total de estos signos en ninguno de los animales. Otras bibliografías (71;72;133;134) coinciden con nuestros resultados ya que se observaron signos similares en estudios realizados en otras especies (conejos y ratas), en los que se concluyó que la induración aparecida en el sitio de administración de vacunas adyuvadas con sales de aluminio tardaba entre 9 meses y un año en revertir.

La observación macroscópica coincidió con las observaciones clínicas realizadas a los animales, ya que se registraron formaciones nodulares blanquecinas en los sitios de administración, en estrecha relación con el mecanismo de acción del adyuvante utilizado en la formulación de la vacuna Quimi-Hib.

En los estudios con más de una aplicación, transcurridas 24 horas de la primera administración, se observó movilización y concentración de macrófagos y la aparición de depósitos líquidos del inóculo, como respuesta típica a la administración de una sustancia antigénica. Estos hallazgos microscópicos observados fueron similares a las descritas en el sitio de inyección en humanos y animales de experimentación que fueron administrados intramuscularmente con adyuvantes de aluminio (144-146). Esta observación se repitió en los sacrificios de los días 7, 14 y 28, con intensidad variable relacionada con las administraciones sucesivas del producto.

En los sacrificios a los 7 y 14 días, los resultados nos permiten confirmar el hecho de que la aparición de granulomas macrofágicos con depósitos centrales y presencia de tejido de granulación, hallazgos que responden a las características de la formulación, dígase adyuvante empleado y no del ingrediente farmacéutico activo presente en la misma, tal como aseveró Chong en el año 2006 y más recientemente Gherardi en su artículo del 2012 (143;147). Al

comparar los datos en los grupos I (solución salina) y III (dosis terapéutica), se verificó la no existencia entre ellos de diferencias estadísticamente significativas, elemento importante al evaluar la seguridad de esta vacuna monovalente, ya que este punto demuestra que, aplicada en dosis terapéutica la vacuna Quimi-Hib adyuvada no produce alteraciones microscópicas de importancia biológica y que sus efectos son comparables con los que causa la administración de una sustancia fisiológica como la solución salina.

La intensidad de la reacción granulomatosa fue mayor en el grupo administrado con el placebo (II), la que se caracteriza por la aparición de granulomas difusos con depósitos centrales de liquefacción, que se localizan preferentemente en el endomisio de las fibras musculares (143;148-150), lo que sugiere que sean producto del mecanismo de acción del adyuvante incluido en la formulación, similar a lo reportado por diferentes autores (72;80;96;151;152). No existieron diferencias en cuanto a la magnitud y estructura de la reacción local entre el grupo placebo y los grupos con tres niveles de sobredosis respecto a la dosis terapéutica, lo cual demuestra que la mencionada reacción tisular es preferentemente provocada por el adyuvante empleado y muy especialmente a la concentración aplicada coincidiendo con Chong y colaboradores en el año 2006 (147) que adicionalmente demostraron la presencia de aluminio en el centro de los granulomas macrofágicos observados en el sitio de administración.

Existen numerosos artículos referentes a ensayos clínicos y otros relativos a la experiencia clínica lograda con vacunas contra tetanus, diphtheria, Bordetella pertussis, poliovirus, entre otras que emplean sales de aluminio como adyuvante, comercialmente registradas, con las que se observan estos eventos locales (11;13;14;19;153). Es importante destacar que no se observaron signos morfológicos de irritación o necrosis del tejido muscular en ninguno de los grupos estudiados con la vacuna Quimi-Hib. La intensidad de la reacción fue diversa y estuvo relacionada con la dosis y volumen administrados, siendo un aspecto relevante el hecho de que los animales tratados con la dosis terapéutica mostraron el menor grado de intensidad de la reacción. En estudios realizados por otros autores (147;154;155) los granulomas macrofágicos observados en el sitio de administración se han caracterizado por infiltración de neutrófilos, micro-abscesos y presencia de células gigantes como índice de efecto adverso de adyuvantes de sales de aluminio a diferencia de los hallazgos descritos en nuestro experimento, donde ocasionalmente han sido observados eosinófilos y otras células. Fueron identificadas además

células B, evaluadas por la formación de folículos linfoides ó por la presencia de células plasmáticas (142;156).

Gherardi en el año 2001, señaló que vacunas contra la Hepatitis B con hidróxido de aluminio como adyuvante, administradas repetidamente por vía intramuscular en ratas Sprague-Dawley, inducían una extensa área necrótica en la que se observó fibras musculares dañadas y neutrófilos rodeados de abundantes linfocitos y macrófagos, hallazgo muy similar al infiltrado de macrófagos antes descrito en el evento llamado Miofascitis Macrofágica (141). Más adelante se constató que los macrófagos contenían aluminio (55;117). La compañía SmithKline Beecham (SKB) estudió el impacto biológico del aluminio en animales (157-164), pues existen varias vacunas que contienen como adyuvantes las sales de aluminio: DTPa, DTPw, DTP-Hib, HB, HB-Hib, Polio (61;165-169).

Goto en el año 1997 refiere en un artículo aspectos importantes sobre la toxicidad de los compuestos del aluminio y describe hallazgos similares a los que fueron detallados previamente en los estudios objeto de nuestro documento (77). Muchos de estos estudios fueron conducidos en roedores, en ellos se demostró que la presencia del aluminio en una vacuna puede provocar nódulos pequeños debajo de la piel, como hemos descrito previamente en nuestros resultados. Estos nódulos, generalmente fueron de naturaleza transitoria y desaparecieron espontáneamente después de algunas semanas y en algunos casos hasta un año, en dependencia de la cantidad propuesta, aseveración que coincide con los resultados obtenidos en los grupos satélites evaluados en nuestros esquemas, en los que no se evidenció reversión de los nódulos locales descritos durante la fase experimental. Goto observó además, que en casos raros la hipersensibilidad extrema al aluminio da lugar a nódulos persistentes. Este adyuvante es responsable además, en alta incidencia a las reacciones locales, tales como eritemas, dolor, hinchazón, absceso estéril, e induración (87;170). Otros estudios más recientes y de diferentes autores, también sugirieron una relación entre compuestos del aluminio y una incidencia creciente de reacciones alérgicas (171-173).

Goto divulgó sobre problemas sin resolver con respecto a la ruta de administración preferida para el aluminio en vacunas (77). En otros artículos se describe un menor número de reacciones empleando en su lugar la ruta subcutánea (s.c) de administración (127;151;174). Mientras que otros autores demostraron que la ruta más aceptable fue la intramuscular (87;144;175) (i.m) al ser menos reactogénica. Basándose en evaluaciones preclínicas Goto concluyó que la vía s.c es

probablemente preferible a la i.m, particularmente para las vacunas del toxoide del tétanos, a pesar de las reacciones locales más severas (176). Incluso la prevalencia y severidad de la reacción inflamatoria local es afectada por el sitio de inyección. Las reacciones locales son mayores empleando la vía subcutánea que con la inmunización intramuscular de vacunas de DT y ántrax adyuvadas con sales de aluminio (140;177). Estas pudieran estar relacionadas además con la localización superficial de las reacciones subcutáneas e incluso con las diferencias fisiológicas entre estos tejidos (71).

La prevalencia de efectos adversos sistémicos fue mayor en niños inmunizados con la vacuna DPT convencional que en aquellos que recibieron la vacuna con hidróxido de aluminio (178;179). En inmunoterapia con alérgenos, inyecciones subcutáneas del alérgeno adsorbido en hidróxido de aluminio inducen reacciones locales a diferencia del alérgeno en solución (180).

Un análisis integral de los resultados de las determinaciones de bioquímica sanguínea nos permite asumir que la administración reiterada de la vacuna Quimi-Hib no causa efectos adversos ni tóxicos en riñones e hígado, principales órganos blanco de toxicidad dada su función en los procesos metabólicos y de excreción. Este planteamiento tiene un elevado valor predictivo si se analizan los resultados de los estudios clínicos realizados con los componentes individuales y combinados de esta vacuna cubana o de similares como la producida por la compañía Merck, Sharp and Dohme (Convax™) (181-183).

A nivel sistémico, no se evidenció ningún signo de toxicidad ni efecto adverso luego de la administración durante 14 días de la vacuna Quimi-Hib adyuvada, al no encontrarse signos de toxicidad en ninguno de los órganos estudiados. Sólo se observó presencia de hematopoyesis extramedular en hígado y bazo, la que no parece estar relacionada con la sustancia de ensayo, si no a un posible factor de estrés, pues aparece en la totalidad de los grupos, incluyendo los animales sacrificados a las 24 horas de administración en el estudio de tolerancia local y los pertenecientes al grupo control administrado con solución salina, tanto en los sacrificados a los 7 días como a los 14. Es significativo destacar que en los animales del grupo satélite que permanecieron 14 días después de la última administración sin inocular, la frecuencia de aparición se redujo a 1 animal de 6. No existió daño hepático en la totalidad de los animales. En el timo y en los ganglios linfáticos mesentéricos no se observó afectación, ambos órganos mostraron evidencia morfológica de plena funcionalidad ante el estímulo antigénico, lo cual habla a favor de la inocuidad a nivel sistémico del producto en estudio.

La vacuna Quimi-Hib, administrado por vía intramuscular en ratas Sprague-Dawley es bien tolerada, no es tóxica a nivel sistémico ya que no se evidenciaron alteraciones morfológicas en ninguno de los órganos estudiados, sumado al comportamiento del peso corporal, el consumo de alimentos para la especie empleada, los estudios complementarios hematológicos y el pesaje de los órganos los que no arrojaron ninguna diferencia con respecto a los valores normales reportados para animales sanos y por el hecho de que las observaciones clínicas y macroscópicas se concentran en lesiones locales en el sitio de administración (induraciones causadas por granulomas macrofágicos), siendo estas reportadas para productos en los que se emplean sales de aluminio como adyuvante y constituyen efectos adversos.

La evaluación clínica realizada en los estudios desarrollados a la formulación pentavalente fue similar en cada uno de ellos. En la toxicidad aguda, resultó significativo constatar la similitud entre las observaciones reportadas en los animales tratados con 30 veces la DT de la vacuna pentavalente y en los animales pertenecientes al grupo control TRIVAC-HB. En ambos grupos se presentaron induraciones en el sitio de administración en ambas extremidades, así como la presencia de pequeños nódulos, efectos no observados en el grupo VII, control tratado con 30 veces la DT del componente Quimi-Hib, evento que coincide con lo observado en la evaluación a dosis única de esta vacuna monovalente y discutido con anterioridad, así como con lo descrito por otros autores en ensayos clínicos, en los que relacionan la prevalencia de mayores efectos adversos sistémicos en niños inmunizados con la vacuna DPT más hidróxido de aluminio (178). Otro resultado coincidente con los descritos en nuestro trabajo se detalla en la inmunoterapia con alérgenos, pues las inyecciones subcutáneas de estos adsorbidos en hidróxido de aluminio inducen reacciones locales a diferencia del alérgeno en solución (180).

Este hallazgo sugiere que los efectos locales observados en la vacuna combinada están directamente relacionados con el componente TRIVAC-HB y con las sales de aluminio presentes en la formulación pentavalente, como refiere Barn-On en sus artículos sobre vacunas combinadas (11;184).

Otro elemento que consideramos relevante por su importancia en el análisis de la seguridad de esta vacuna, es el tiempo de reversión de los hallazgos clínicos reportados. En la mayor parte de los animales, tratados con la dosis baja (8 animales de 10, inoculados con 8 veces la DT) las induraciones dejaron de ser palpables a partir del cuarto día posterior a la administración, en los de la dosis intermedia (15 veces la DT) solo se observaron hasta el día 12 del estudio. El hecho

de que éste signo sea indetectable no significa necesariamente que no existieron alteraciones histológicas en el músculo inoculado, pero evidencia que el efecto local provocado por dosis superiores a la terapéutica es capaz de transitar hasta magnitudes clínicamente indetectables en un breve plazo, observación presumiblemente predictiva en lo que respecta al comportamiento de esta vacuna en estudios clínicos, en los cuales fue administrada a dosis terapéuticas con una frecuencia mensual.

Las observaciones macroscópicas correlacionan con las realizadas durante la inspección clínica de los animales, pudiendo observarse que en la mayoría de los casos las induraciones y nódulos reportados correspondieron con formaciones nodulares y quísticas en el tejido muscular. En el caso del grupo III, tratado con la dosis terapéutica, en el estudio de tolerancia local, los daños en este tejido fueron de tan escasa magnitud que no fueron perceptibles durante la evaluación clínica diaria realizada. Resulta interesante constatar que en el grupo administrado con 30 veces la DT de Quimi-Hib, en este mismo esquema, no se evidenciaron alteraciones macroscópicas, concordando con las observaciones clínicas, donde tampoco se observó ningún daño en el sitio de administración, lo cual está condicionado por el hecho de que esta vacuna no se encuentra adyuvada y que su composición condiciona su rápida absorción, lo que corrobora lo planteado por numerosos autores en relación a los efectos adversos que causan las sales de aluminio como adyuvantes en diferentes vacunas (55;185;186).

En nuestro criterio, los hallazgos clínicos y macroscópicos en el sitio de administración están directamente relacionados con el mecanismo de acción de la vacuna pentavalente y con los componentes de su formulación, dígame fosfato de aluminio como adyuvante, cuyas características (efecto depósito y su potencialidad de amplificar la respuesta inmune) son causantes de alteraciones en el tejido muscular, que frecuentemente se traducen, desde el punto de vista clínico, en induraciones y formaciones nodulares como las observadas en este estudio y que han sido reportadas en la literatura, incluso en los estudios previos realizados a cada vacuna por separado (187;188). La administración parenteral, sobre todo si es reiterada condiciona una respuesta inflamatoria local inespecífica (78;134;171;173), más el reclutamiento y activación local de granulocitos y macrófagos debido a la acción sobre el sistema inmune de los antígenos que constituyen esta vacuna. La suma de todas estas respuestas se traduce en formaciones nodulares similares a las observadas en este estudio y que coinciden con otros autores (127;149;151;174;189-192).

Por otra parte, la presencia de células completas de *Bordetella pertussis* (wP) en la formulación es causa conocida de daño local luego de la administración de este componente de forma individual o combinado con otros antígenos, limitando su uso en las vacunas de amplio uso pediátrico que lo contienen y que están registradas en gran parte del mundo (193-200). A estas razones se suma el reclutamiento y activación local de granulocitos y macrófagos debido a la acción sobre el sistema inmune de los antígenos que conforman la vacuna, lo cual es también un efecto esperado, considerado farmacológicamente normal y que ha sido descrito en numerosos estudios realizados con vacunas combinadas (39;114;179;193;201;202).

En estudios preclínicos y clínicos realizados a vacunas contra DPT de diferentes compañías, combinadas con otros antígenos o no, el principal efecto reportado ha sido en todos los casos el daño local, atribuible fundamentalmente al componente celular de la vacuna anti-*Bordetella pertussis* (203-209) y al adyuvante presente en la formulación (51;60;63;66;68;96;128;149;150;210). Fue precisamente ésta la razón que motivó la investigación y desarrollo de vacunas acelulares anti-DPT. Es, por tanto, una observación esperada en nuestro estudio el hallazgo de signos de daño local relacionados con la vacuna TRIVAC-HB, sobre todo si se tiene en cuenta que coincide con lo observado en otros estudios realizados con esta formulación.

Las respuestas inmunitarias dependientes de células T frente a antígenos proteicos necesitan que éstos sean administrados con adyuvantes, como el fosfato de aluminio, que inducen inflamación local y estimulan la función de presentación antigénica de los macrófagos, induciendo su activación y expresión de coestimuladores para las células T. En ausencia de adyuvantes, como en el caso de la vacuna Quimi-Hib la respuesta inmune celular y de anticuerpos dependientes de células T es menos eficiente, y se traduce en este estudio como ausencia de signos locales de inmunidad primaria (11;211-214).

Desde el punto de vista histológico, es importante destacar la diferencia encontrada en los animales tratados con la dosis terapéutica y con ambos componentes de la vacuna pentavalente por separado, aun cuando son inoculados consecutivamente durante 14 días.

Como puede observarse, y de manera coincidente con lo obtenido en las observaciones clínicas y macroscópicas, el daño local observado en el endomisio de la fibra muscular de los animales tratados con la dosis terapéutica de la vacuna pentavalente es cualitativamente inferior a el observado en los inoculados con el resto de las dosis y así ha sido reportado en el informe de esta

especialidad. Los hallazgos histológicos no se tradujeron en daños apreciables durante la observación clínica diaria, lo que como se ha dicho anteriormente reviste gran importancia a la hora de predecir el posible efecto local de esta vacuna.

En el tejido muscular tratado con la vacuna TRIVAC-HB se observó la presencia de los granulomas macrofágicos típicos, con infiltrados de células linfoides e incipiente tejido de granulación, mientras que en el tejido tratado con la vacuna Quimi-Hib concentrada no se reportó daño alguno en la mayoría de los casos.

Enfocando el análisis de los resultados del estudio histopatológico, los granulomas observados, bien sea los clasificados como macrofágicos o inmunogénicos, son eventos que aparecen como resultado del mecanismo de acción del producto y de la composición de la formulación, y no parecen estar relacionados con el volumen de administración de la vacuna, lo cual resulta un hallazgo importante sobre todo si se tiene en cuenta que este producto será administrado en la clínica a un volumen algo superior (0,75 mL) a lo que habitualmente se emplea en vacunas pediátricas (0,5 mL) (46;215-217).

Los resultados obtenidos en las observaciones macro y microscópicas del sitio de administración de nuestros estudios coinciden con aseveraciones descritas en artículos publicados por numerosos investigadores que han explorado el efecto local de vacunas adyuvadas con sales de aluminio (48;72;128;136;143;149;150;152;169;185;186;218). Estos hallazgos constituyen efectos adversos y son similares a los obtenidos en evaluaciones a vacunas individuales o combinadas registradas en gran parte del mundo como Hexaxim, Infanrix™, Pediarix™, Infanrix-hexa™, Pediacel™, Boostrix™, Tritanrix-HB™, Hiberix™ (GSK), Hexavac™, (Aventis Pasteur) y HeberBiovac™, (HeberBiotec) (219-223), entre otras de amplio uso internacional, lo que permite asumir que la utilización clínica de la vacuna pentavalente no mostrará un patrón de respuesta local diferente al de estos productos ya empleados en lactantes.

En relación con los efectos sistémicos observados, los mismos son, o bien producidos por causas inespecíficas no relacionadas con la vacuna o son el resultado de la estimulación antigénica como respuesta esperada a la administración, lo cual lejos de ser un efecto adverso, corrobora la acción farmacológica del producto y demuestra que no produce alteraciones sobre el sistema inmune.

La evaluación histológica realizada arrojó como principal hallazgo la presencia de una activa respuesta inmune local generada por la administración de diferentes dosis de la vacuna

pentavalente, repuesta que se tradujo en alteraciones y cambios morfológicos en el tejido muscular, reportados con anterioridad por otros autores y considerados efectos adversos por las principales agencias regulatorias del mundo (EMA y FDA), que han otorgado autorización para estudios clínicos y registro sanitario a numerosas vacunas de este tipo.

Este resultado demuestra que el componente TRIVAC-HB de la vacuna pentavalente es el responsable de la reacción local que ésta provoca, hallazgo descrito por numerosos autores antes citados (11;61;206;224;225), que coinciden en señalar al componente celular anti-*pertussis* y al adyuvante de esta formulación como responsables de estos daños, que constituyen eventos adversos que no han impedido que numerosas vacunas formuladas con el componente DPT hayan sido registradas en todo el mundo y administradas a millones de lactantes (219-221;223).

La administración reiterada no evidenció signos de alteración en el sistema inmune, contrariamente, los órganos linfoides mostraron morfología clásica de los eventos de activación y linfoproliferación característica de la respuesta ante la estimulación antigénica. En los diferentes sacrificios realizados en cada evaluación con administración reiterada de la vacuna pentavalente, los hallazgos fueron similares, lo que indica escaso nivel de reversión de los mismos, aspecto éste que también ha sido descrito en los restantes estudios y publicado en la literatura. En contraposición la vacuna Quimi-Hib concentrada, administrada como control individual, produce muy escaso daño local, presumiblemente porque en su formulación no se incluyen adyuvantes ni ningún componente que desencadene reacciones de tipo inflamatorio en el sitio de administración. Se demostró así mismo, que el componente TRIVAC-HB es responsable de los efectos locales detectados en la vacuna pentavalente, coincidentemente con los hallazgos de otros autores (226-230). Esta es precisamente la razón que ha condicionado la investigación y el desarrollo de vacunas acelulares anti-*pertussis*.

Las variables de patología clínica tales como: hematología y bioquímica son importantes indicadores de salud general y de toxicidad.

En las determinaciones hematológicas se evidenciaron valores ligeramente por debajo del rango calculado para el estudio, pero estas se encontraron dentro de los valores normales reportados para esta sublínea a partir de un análisis histórico emitido por CENPALAB, en el cual se refiere que los valores normales de hemoglobina se encuentran entre 10,9 - 15,8 y entre 11,2 - 16,1 g/dL para animales hembras y machos respectivamente y los de hematocrito entre 29,6 – 47,1 y 30,6-49,0 v/L para estos sexos. Otro aspecto de interés resultó el ligero incremento en el porcentaje de

polimorfonucleares reportado para los grupos V, VI y VII, tratados con 9 veces la DT de la vacuna pentavalente, TRIVAC-HB y Quimi-Hib concentrada, respectivamente). Estas células del sistema inmune son la principal población en las respuestas inflamatorias agudas, siendo las primeras en activarse y proliferar durante la administración de sustancias inmunogénicas que desarrollan respuestas locales, incluso subclínicas como en el caso de la vacuna Quimi-Hib (97;231;232), por lo que el aumento en el conteo de neutrófilos pudiera estar relacionado a esta causa. No obstante, los valores históricos reportados para ambos sexos de esta especie sitúan los resultados obtenidos en el conteo de estas células dentro del rango normal, lo que nos permite asumir que estas pequeñas diferencias, no son atribuibles a causas fisiológicas inherentes a los tratamientos empleados.

Igual razonamiento puede ser aplicado a las variaciones reportadas en el % de linfocitos, monocitos y eosinófilos. La magnitud de variación entre dichos resultados con respecto al rango normal obtenido a partir del grupo basal es muy pequeña, debiéndose más bien, en nuestro criterio, a un efecto producido por la n del estudio (3 animales) que a una variación en el conteo de estas células. Si bien la interpretación matemática realizada en el análisis estadístico arroja diferencias individuales entre los animales tratados y los del grupo basal, la interpretación biológica de estos hallazgos nos conduce a reconocer, por ejemplo, que un valor del 2% de eosinófilos reportados para el grupo IV (tratado con 6 veces la DT de la vacuna pentavalente) de los animales machos no implica la presencia de procesos alérgicos ni que un hallazgo del 62 % de linfocitos en comparación con un rango entre 71 y 81 % indiquen leucopenia inducida por la sustancia de ensayo, máxime cuando estos valores están dentro del rango normal histórico determinado para esta especie.

Otras consideraciones a tener en cuenta son los hallazgos derivados del estudio histopatológico, donde se apreció morfología normal de la médula ósea de los animales y la ausencia de alteraciones patológicas en los restantes órganos del sistema inmune, con evidencias de plena funcionalidad, lo que refuerza la conclusión de que la administración de este producto no altera la eritropoyesis eficaz ni produce efectos adversos relacionados con la producción de precursores de la serie blanca de la sangre.

La evaluación de efectos inmunotoxicológicos evidenció que la aplicación de la vacuna pentavalente TRIVAC-HB+Quimi-Hib concentrada no indujo eventos adversos sobre el sistema inmune de los animales, se observó una respuesta en correspondencia con los niveles de dosis

aplicados en cada caso, la que descendió una vez concluido el tratamiento. Al igual que en análisis anteriores, la valoración del efecto de los grupos de tratamiento sobre el comportamiento de las enzimas cuantificadas debe realizarse a partir de la comparación entre los valores obtenidos y el rango de referencia calculado con respecto al grupo basal y de ser necesario, con los obtenidos históricamente para la especie en cuestión (131).

La creatinina es un producto final del metabolismo muscular y se elimina casi exclusivamente a través de la filtración glomerular, siendo un importante índice del funcionamiento de los riñones. Incrementos en la concentración sérica de creatinina son indicadores a tomar en cuenta, pues sugieren alteraciones en el flujo sanguíneo renal, en el flujo de orina y en general, disfunción renal (123;233). Por lo que resultan importantes los resultados obtenidos en nuestro trabajo donde la creatinina mostró valores dentro de los rangos normales en todos los casos analizados, resultados que resultan importantes para evaluar la seguridad de la vacuna pentavalente, ya que indican que su administración reiterada no altera este parámetro y confirma que los riñones no evidenciaron signos de toxicidad a pesar de que los animales fueron inoculados 14 veces consecutivas con dosis de hasta 9 veces la DT.

Por otro lado, el hígado es uno de los órganos más importantes involucrados en la detoxificación del organismo, dada sus funciones metabólicas, de síntesis y excreción en las que participa una amplia maquinaria enzimática. Muchas de estas enzimas exhiben incrementos importantes en suero ante daños hepatocelulares, por lo que su cuantificación resulta de gran utilidad para evaluar el potencial hepatotóxico de un xenobiótico. Con este objetivo, en nuestro estudio realizamos la determinación de la concentración sérica de las enzimas Alanino aminotransferasa, Aspartato aminotransferasa, y Fosfatasa alcalina. ALAT, al ser comparada con las concentraciones de referencia mostró valores promedio ligeramente más elevados en los animales hembras de los grupos III, IV, V, VI y VII, tratados con los diferentes niveles de dosis de la vacuna pentavalente, y las vacunas independientes, respectivamente, así como en todos los grupos de animales machos. El hecho de que este valor por encima del límite máximo establecido para este estudio haya sido observado en el control administrado con solución salina independiza este hallazgo de la administración de la vacuna, sumado al hecho de que la magnitud de esta diferencia es muy pequeña, y puede ser atribuible con mayor certeza a la *n* de animales empleada en el estudio (*n*=3 por sexo) que a verdaderas alteraciones en las concentraciones séricas de esta enzima. Los valores obtenidos al analizar ASAT mostraron estar en todos los

casos dentro del rango normal de valores determinado por el análisis de datos históricos de esta especie, indicando la ausencia de daños capaces de liberar esta enzima de las mitocondrias de los hepatocitos ni de alterar la permeabilidad de la membrana de estas células. En el caso de ALP, puede observarse que todos los grupos mostraron un comportamiento no relacionado con la dosis, apareciendo incrementos en la concentración enzimática por encima del valor de referencia de este estudio en los grupos tratados con solución salina y placebo, de igual forma que en los tratados con la vacuna pentavalente y con sus componentes por separado.

Comparando los resultados obtenidos con los establecidos para la línea Sprague Dawley (131) puede observarse que los valores de concentración sérica están dentro del rango establecido para ratas sanas de esta línea, lo cual tiene una importancia significativa para analizar la seguridad de la vacuna en estudio. El incremento de la concentración sérica de ALP es un índice aceptado de colestasis por lesiones periportales y centrilobulares del hígado, y es además un indicador de colestasis extrahepática etiológicamente determinada por pancreatitis, complicaciones en la canulación del conducto biliar o, en general, daños hepáticos como resultado de hepatotoxicidad provocada por sustancias exógenas (123;126).

Un análisis integral de los resultados de las determinaciones de bioquímica sanguínea nos permite asumir que la administración reiterada de la vacuna pentavalente y de sus componentes no causa efectos adversos ni tóxicos en riñones e hígado, principales órganos blanco de toxicidad dada su función en los procesos metabólicos y de excreción. Esta conclusión tiene un elevado valor predictivo si se analizan los resultados de los estudios clínicos realizados con los componentes individuales y combinados de esta vacuna cubana o de similares como la producida por la compañía GSK (Infarix™). Ni en los estudios clínicos realizados con las vacunas TRIVAC-HB y Quimi-Hib concentrada, componentes individuales de la vacuna pentavalente ni en los que se han llevado a cabo utilizando el similar comercial antes mencionado se ha referido hepato o nefrotoxicidad como consecuencia de su administración. En todos estos estudios se han obtenido parámetros de seguridad que han permitido el registro de estos fármacos en numerosos países y su uso en la vacunación masiva de miles de lactantes. Si bien esta agrupación de hallazgos en función de la cantidad de animales afectados resulta descriptiva, permite observar que luego de ser administrados 4 días sucesivos con la vacuna pentavalente y con TRIVAC-HB por separado, los hallazgos son menores cualitativa y cuantitativamente que tras 14 días consecutivos de tratamiento.

El peso relativo de los órganos de los animales no se vio alterado ni por el tratamiento, ni por la frecuencia de administración, mostrando un comportamiento homogéneo por grupo, solamente varió en función de la variabilidad intrínseca entre los animales. Este resultado reviste gran significación, ya que normalmente los cambios en el peso relativo de los órganos son índices de daño que con frecuencia se traducen en toxicidad específica de la sustancia de ensayo sobre los mismos (91). El hecho de que en nuestra evaluación ningún órgano analizado haya resultado alterado ni por el grupo de tratamiento ni por la frecuencia de administración confiere amplio marco de seguridad para el empleo de la vacuna pentavalente en futuros estudios clínicos.

Independientemente de los datos antes mencionados que sustentan la no necesidad de realizar estudios inmunotoxicológicos funcionales, se decidió evaluar los posibles efectos inmunotoxicológicos y la respuesta inmune en este órgano, a partir de la morfometría de los folículos linfoides del bazo y el conteo de centros germinativos en la vaina linfoide periarterioalar, lo que constituye una novedad en nuestro trabajo. Según reportes de otros autores, una vez que se realizan inmunizaciones con antígenos células T-dependientes, junto a un microambiente linfoide favorable se induce la formación de centros germinales (activación de las células B) (234), por otra parte, la estimulación de la formación de centros germinales (CG) es indicativo que la combinación nutricional-inmunológica puede ser un medio efectivo para producir una potente respuesta inmune (234;235), induciendo la diferenciación y maduración de células de B antígeno-activadas en clases y células B de memoria a largo plazo, todo esto permite lograr una vacunación exitosa a partir de antígenos proteicos (236). La activación de las células B en los procesos de inmunización, ocurre cuando estas reconocen un antígeno y activan las células T auxiliaadoras que diferencian directamente el anticuerpo en el plasma, proporcionando un nivel de protección inicial. Otras células B antígeno-activadas migran dentro de los folículos secundarios formados en los órganos linfoides y participan en la reacción de GC que comprende la formación de un microambiente dinámico, en que las células B se pueden diferenciar y madurar (234;236-240).

Nuestros resultados coinciden con lo anteriormente planteado ya que la estimulación de linfocitos T aumentó en correspondencia con la elevación de los niveles de dosis probados, siendo esta superior en los animales machos a la registrada en los animales hembras. En la evaluación de los centros germinativos por sexo se observó un comportamiento similar al antes descrito, con disminución de estos 15 días después de concluido el tratamiento. Resultado

positivo a favor de la eficacia de nuestra vacuna, ya que las poblaciones de células de memoria o su descendencia permanecen de por vida (234;237). La evaluación de efectos inmunotxicológicos evidenció que la aplicación de la vacuna pentavalente TRIVAC-HB + Quimi-Hib concentrada no indujo eventos adversos sobre el sistema inmune de los animales, se observó una respuesta en correspondencia con los niveles de dosis aplicados en cada caso la que descendió una vez concluido el tratamiento.

De manera general, en los estudios realizados se demostró la no toxicidad de la vacuna Quimi-Hib y de la combinada TRIVAC-HB + Quimi-Hib concentrada, en ellos los animales mostraron un patrón de comportamiento normal, con índices de consumo de alimento, ganancia de peso y comportamiento correspondientes a animales sanos de la especie. Esto indica que la administración de la vacuna simple o combinada no causó alteraciones metabólicas o conductuales que pudieran ser traducidas como efectos adversos.

En las observaciones clínicas registradas de la evaluación realizada a la vacuna pentavalente, solo se reportaron como signos de importancia los referidos al sitio de administración en correspondencia con la composición de la vacuna administrada en cada caso, en el cual se presentaron induraciones y nódulos, estos constituyen efectos adversos clásicos encontrados en estudios clínicos realizados a numerosas vacunas combinadas similares a ésta, y que se encuentran registradas y con amplio uso comercial.

Los antígenos proteícos necesitan ser administrados con adyuvantes para lograr una respuesta inmunitarias dependientes de células T, como el fosfato de aluminio, que inducen inflamación local y estimulan la función de presentación antigénica de los macrófagos, induciendo su activación y expresión de coestimuladores para las células T (78;134;157). En ausencia de adyuvantes, como en el caso de la vacuna Quimi-Hib concentrada la respuesta inmune celular y de anticuerpos dependientes de células T es menos eficiente, y se traduce en el estudio de toxicidad aguda de la vacuna simple como ausencia de signos locales de inmunidad primaria (241).

El sitio inoculado con la vacuna pentavalente TRIVAC-HB + Quimi-Hib concentrada mostró evidencias de respuesta inmune local, atribuible al efecto del adyuvante y al mecanismo de acción de la vacuna. Se determinó como principal responsable de estos efectos el componente TRIVAC-HB teniendo como base los resultados comparativos obtenidos en el estudio

toxicológico realizado a la vacuna Quimi-Hib adyuvada con fosfato de aluminio y las revisiones de la literatura acerca del efecto local de sus componentes.

La presencia del adyuvante fosfato de aluminio en la formulación condiciona la aparición de induraciones causadas por granulomas macrófagos (78;134;157), los cuales fueron menos evidentes en el grupo administrado con la dosis baja del producto (10 veces la dosis terapéutica). Esta reacción local ha sido reportada para otras vacunas y no constituye un signo tóxico. Consideramos que el efecto adverso encontrado es de menor intensidad con respecto a lo reportado por otros autores, por haber sido administrada una mayor concentración de adyuvante que la prevista. El patrón de respuesta local encontrado en estos estudios es evidente consecuencia de la estimulación antigénica generada por el producto y constituye un efecto clásico para este tipo de vacuna, reportado por numerosos autores. Estos hallazgos no han impedido el registro y uso en lactantes de vacunas similares a la pentavalente objeto de nuestro estudio, por lo que la administración reiterada de la vacuna pentavalente TRIVAC-HB es bien tolerada y que los eventos adversos encontrados no constituyen signos de toxicidad.

La evaluación histopatológica demostró que la administración reiterada de cada vacuna o sus componentes no induce alteraciones en los tejidos estudiados y los órganos del sistema inmune mostraron morfología de plena funcionalidad. La decisión de evaluar la inmunotoxicidad de cualquier producto se realiza tras el análisis caso a caso, teniendo en cuenta el mecanismo de acción y los resultados obtenidos en los estudios toxicológicos no funcionales. La evaluación farmacológica realizada a Quimi-Hib y de su combinación pentavalente con otros antígenos, presentada previamente, caracteriza la respuesta inmune obtenida en cada caso.

En los estudios toxicológicos realizados a la vacuna simple, adyuvada y sin adyugar, no se evidenciaron alteraciones relacionadas con el sistema inmune, que indicaran la necesidad de realizar estudios más específicos. La observación macroscópica realizada durante la necropsia, no evidenció alteraciones morfológicas en ninguno de los órganos ni estructuras del sistema hemolinfopoyético, mientras que el estudio histológico arrojó plena funcionalidad de bazo y ganglios al no encontrarse lesiones en ellos. De manera similar, no fueron observados signos clínicos de hipersensibilidad en ninguna de las dosis aplicadas, lo que corrobora el hecho de que no sea necesario realizar este tipo de estudios a la vacuna en cuestión. Nuestros resultados coinciden con los datos emitidos por la compañía Chiron para su producto Vaxem Hib, los que no refieren riesgo específico de inmunotoxicidad dentro de los efectos adversos que declaran, de

igual manera, otras vacunas combinadas no causan efectos inmunotóxicos (219-222;226-230;242;243).

Coincidiendo con lo referido en la literatura (8;43;218;244;245), toda nueva vacuna combinada debe ser estudiada individualmente de modo que queden demostradas su calidad, estabilidad, seguridad, tolerabilidad y eficacia (o inmunogenicidad), teniendo en cuenta todos sus componentes.

En general, los fabricantes de nuevas vacunas deben tener siempre presentes los requerimientos regulatorios que exigen las autoridades sanitarias para aprobar su uso en humanos y posterior comercialización establecidos por las agencias de medicamentos de cada país en particular (entre los que, sin duda, los de la Agencia de los EE.UU. [FDA] son los de mayor relevancia), o bien los de la Agencia Europea (EMA). En la Unión Europea, los requerimientos de una nueva vacuna combinada se encuentran disponibles, para cada vacuna (o para cada componente individual), en las monografías de la Farmacopea Europea y en las recomendaciones de la OMS. Estos requerimientos pretenden asegurar la calidad, seguridad y eficacia de cada componente de la nueva vacuna, los que hemos tenido en cuenta en los estudios realizados.

6. DISCUSIÓN GENERAL

Las vacunas constituyen uno de los logros más importantes en la historia de la medicina, pues gracias a su empleo se han controlado varias enfermedades infectocontagiosas (132;246-250). El principal objetivo de la vacunación preventiva es la inducción de una respuesta inmune específica contra un microorganismo patógeno que conduzca a la protección contra la infección o la enfermedad causada por este y que pueda lograrse su total erradicación (251).

En un principio las vacunas estaban formadas por microorganismos vivos atenuados o muertos y esto traía como consecuencia que con cierta frecuencia se desarrollara la enfermedad en vez de la protección, debido a una reversión de la virulencia, fundamentalmente en personas inmunodeprimidas (252;253). Esto propició que surgiera una nueva generación de vacunas basadas en antígenos purificados, sintéticos o recombinantes, los cuales son más específicos pero menos inmunogénicos, por lo que necesitan de adyuvantes, que incrementan la potencia, la calidad y la duración (memoria) de la respuesta inmune (48). Por tal motivo el éxito en demostrar la seguridad e inmunogenicidad de una vacuna de origen sintético constituye un reto importante, ya que exige diseños experimentales novedosos y más específicos en los que se incluyan puntos finales determinantes y que a su vez contemplen el empleo de animales de laboratorio teniendo en cuenta las regulaciones existentes con vistas a un adecuado uso de los mismos, según los requerimientos del estudio y tomando en cuenta los principios éticos señalados en el trabajo con estos (99;101-103).

Los adyuvantes también contribuyen a lograr una respuesta inmunológica efectiva en edades muy tempranas, cuando el sistema inmune aún no está suficientemente maduro y es necesario vacunar contra enfermedades que afectan a niños en esas edades (49), así como también pueden mejorar el efecto protector de las vacunas en personas inmunodeprimidas y en edades avanzadas (48-50).

Los adyuvantes de aluminio tienen un amplio margen de seguridad. Billones de dosis de aluminio son adsorbidas en vacunas, particularmente DPT, vacuna contra la polio con y sin inactivar, que han sido empleadas para inmunizar a niños. Ocasionalmente, a estas vacunas han sido asociadas algunas reacciones como: eritemas (135;254;255), nódulos subcutáneos (189;191;256), hipersensibilidad (58;173;256) e inflamación por granulomatosis (117). Pero en determinadas condiciones, vacunas de DPT adsorbidas en aluminio producen menos reacciones

que las vacunas sin adsorber (117;257;258), debido al grado de adsorción y a la liberación lenta del material reactogénico del adyuvante.

En animales, al igual que en humanos los adyuvantes de aluminio aumentan los niveles de antígenos específicos y el total de anticuerpos IgE y pueden promover reacciones alérgicas mediadas por IgE (68;75;150). Las limitaciones antes descritas apoyan la necesidad de continuar las investigaciones con adyuvantes que sean más potentes y puedan modular selectivamente la respuesta inmune al tipo deseado.

Los adyuvantes que contienen aluminio son ampliamente usados en vacunas preventivas contra enfermedades infecciosas y en la inmunoterapia de alergias. Estudios recientes han permitido mejorar la comprensión de los mecanismos involucrados en la adsorción de antígenos en los adyuvantes de aluminio y en la respuesta inmune (71;79;80;84;259;260). Estos adyuvantes mejoran la respuesta inmune por diferentes vías moleculares pero es necesario trabajar en este sentido para entender las interacciones e importancia de estas vías. Este conocimiento permitirá obtener vacunas ayudadas más efectivas y seguras.

En este sentido, las vacunas combinadas tienen ventaja pues pueden dirigirse y proteger contra diferentes dianas terapéuticas según describen numerosos autores (10;109;204;231;261).

Los estudios de inmunogenicidad realizados permitieron establecer un modelo animal relevante para evaluar la seguridad toxicológica de ambos candidatos vacunales, ya que en ellos se demostró que la rata desarrolla una respuesta inmune similar a la respuesta esperada en humanos luego de la aplicación de cada vacuna, como describe (262), a lo que podemos adicionar que nuestros estudios permitieron demostrar la no interferencia de la inclusión del componente Hib-TT en la respuesta obtenida de los diferentes antígenos incluidos en la formulación pentavalente, lo que constituye un requerimiento imprescindible en estas formulaciones combinadas (262;263).

Los estudios toxicológicos preclínicos desarrollados a ambas formulaciones vacunales permitieron obtener la mayor evidencia experimental posible, esclarecer órganos diana, definir los niveles de exposición a partir de los cuales aparecen efectos tóxicos y esclarecer el mayor nivel de dosis al cual no se producen efectos adversos. La evaluación toxicológica realizada donde se combinaron procedimientos de experimentación animal convencionales y bien conocidos con ajustes y nuevos métodos en armónica integración, permitió ofrecer un mayor y más confiable margen de seguridad para reducir al mínimo el riesgo potencial y con la mayor evidencia posible, tal como plantea Gámez, en su artículo del año 2007 (264).

Las autoridades sanitarias generalmente aprueban para su comercialización las nuevas vacunas combinadas en las que se demuestre que la respuesta inmunológica inducida (o eficacia) y su perfil de seguridad son equivalentes (o similares) a los de las vacunas combinadas y a los de las vacunas monovalentes ya autorizadas (265).

Estas han permitido el cumplimiento de los calendarios de vacunaciones sistemáticas con un menor número de inyecciones del requerido si se empleasen vacunas monovalentes. El desarrollo y comercialización de nuevas vacunas combinadas en la década de los años noventa ha sido significativo. Para que una nueva vacuna llegue a estar disponible, los fabricantes deben cumplir con los requisitos que las agencias de regulación exigen. En este sentido, la FDA y la EMA cumplen un papel primordial. En estudios preclínicos y clínicos se debe estudiar en profundidad la posibilidad de la aparición de interferencia inmunológica, problema relativamente frecuente en el desarrollo de nuevas vacunas combinadas. Los ensayos clínicos se comparan la seguridad y eficacia (ó inmunogenicidad) de la nueva vacuna combinada con la administración simultánea, pero en sitios separados, de los componentes individuales o de aquellas que se combinen y ya hayan sido registradas (265-271)(10, 137-140). La existencia de marcadores serológicos de protección simplifica mucho la realización e interpretación de los resultados de los ensayos clínicos. Las evaluaciones económicas y epidemiológicas desempeñan un papel fundamental en la eventual incorporación de una nueva vacunas combinadas en el calendario de vacunaciones sistemáticas, la que permitirá la reducción del número de inyecciones y, con ello, incluso la prevención de enfermedades infecciosas contra las que en la actualidad no existen vacunas adecuadas.

Comparativamente la compañía GlaxoSmithKline Biologicals lanzó al mercado una nueva vacuna pentavalente, constituida por la combinación de la vacuna contra la difteria (D), el tétanos (T) y la tos ferina (P) (con antígeno tosferínico a base de células completas) y las vacunas contra la hepatitis B (HB) y contra *Haemophilus influenzae* tipo B (Hib) (DTPw-HB/Hib), con un total de 5 µg de fosfato de polirribosilribitol (FPR) (45). A la que se le realizaron estudios similares a los nuestros en los que se demostró que la vacuna combinada DTPw-HB/Hib no dio resultados inferiores a los obtenidos con las vacunas autorizadas en términos de los porcentajes de seroprotección, seropositividad y respuesta frente a todos los componentes antigénicos de la vacuna (39;45;46;114;231;268;269;272). La persistencia de anticuerpos contra todos los antígenos contenidos en ella hasta el momento en que se administró la dosis de refuerzo fue

parecida en ambos grupos, y se observó un marcado aumento de las concentraciones de todos los anticuerpos después del refuerzo. La reactogenia general observada con ambos regímenes de vacunación fue parecida. En resumen ambas vacunas, en su forma simple o pentavalente muestran un adecuado marco de seguridad para su empleo en estudios clínicos en lactantes, cada resultado es avalado por el hecho de que los animales no presentaron signos de toxicidad ni alteraciones en el comportamiento durante las observaciones clínicas diarias, como índice indirecto de la ausencia de efectos tóxicos y de la preservación de su bienestar. En consonancia con nuestros resultados, los que indican que la nueva vacuna combinada pentavalente cubana TRIVAC-HB + Quimi-Hib concentrada ofrece una alternativa eficiente y confiable de poner en práctica las recomendaciones de la OMS para el control de la hepatitis B y de las infecciones por Hib en el mundo.

7. CONCLUSIONES

1. La respuesta inmunológica humoral que induce el antígeno Hib adsorbido al adyuvante fosfato de aluminio es significativamente superior a la respuesta del antígeno sin adyugar. La mezcla de la vacuna TRIVAC-HB + Quimi-Hib concentrada, no interfiere en la respuesta biológica de los 5 antígenos involucrados en la formulación, a diferencia de otras vacunas combinadas existentes en el mercado.
2. La Vacuna sintética Quimi-Hib es segura y tolerable, no mostró alteraciones morfológicas de toxicidad aguda en los órganos diana estudiados
3. La Vacuna pentavalente TRIVAC-HB + Quimi-Hib concentrada constituye una formulación balanceada, estable y atóxica y tiene un adecuado margen de seguridad, lo que permite sea aplicada en humanos (niños lactantes).
4. La aplicación reiterada de ambas vacunas produce granulomas macrofágicos en el sitio de inoculación, resultantes del mecanismo de acción del adyuvante fosfato de aluminio, cuya incidencia está en correspondencia con los niveles de dosis explorados.
5. No existen alteraciones morfológicas del bazo y se demuestra una adecuada estimulación de los órganos del sistema inmune luego de la administración reiterada de la vacuna pentavalente TRIVAC-HB+ Quimi-Hib concentrada.

8. RECOMENDACIONES

Algunas de las tareas a realizar para concluir la carpeta de experimentos preclínicos con vistas a registros en otras regiones del mundo serían:

1. Realizar estudios de Seguridad Farmacológica: Efectos sobre el Sistema Nervioso Central, Efectos de la función cardiovascular y respiratoria de las vacunas en su formulación monovalente y pentavalente.
2. Optimizar la evaluación de toxicidad sistémica de la vacuna Quimi-Hib donde se incluyan determinaciones urinarias, bioquímica sanguínea y la evaluación histopatológica de todos los órganos.
3. Aplicar la estrategia de diseños experimentales presentes en la tesis a la evaluación toxicológica preclínica de nuevas formulaciones de novedosos candidatos vacunales mono o multivalentes que se produzcan en el país.

9. AUTOBIBLIOGRAFÍA

9.1- Artículos científicos relacionados con el tema de tesis

- Demostración de la seguridad de la Vacuna cubana pentavalente (DPT-HB+Hib), administrada por vía intramuscular en ratas Sprague-Dawley. Revista Española de Toxicología Vol. 22 Número 2. (2005)
- Informe técnico. Evaluación de la Toxicidad Aguda en ratas Sprague-Dawley de la Vacuna conjugada Hib sintético-T. (2002)
- Informe técnico. Tolerancia Local en ratas Sprague-Dawley de la vacuna conjugada Hib sintético-T. Administración intramuscular. (2002)
- Informe técnico. Expediente de solicitud de autorizo de Estudio Clínico Fase I en adultos sanos con la formulación líquida del candidato vacunal cubano contra el *Haemophilus Influenzae* tipo b. (2004)
- Informe técnico. Expediente de solicitud de autorizo de Estudio Clínico Fase I en adultos sanos con la formulación adyuvada del candidato vacunal cubano contra el *Haemophilus Influenzae* tipo b. (2004)
- Informe técnico. Expediente de solicitud de autorizo de Estudio Clínico Fase I en lactantes sanos con la formulación líquida del candidato vacunal cubano contra el *Haemophilus Influenzae* tipo b. (2004)
- Informe técnico. Expediente de solicitud de autorizo de Estudio Clínico Fase I en niños sanos de 4 y 5 años con la formulación líquida del candidato vacunal cubano contra el *Haemophilus Influenzae* tipo b. (2004)
- Informe técnico. Expediente de solicitud de autorizo de Estudio Clínico Fase I en lactantes sanos con las dos formulaciones del candidato vacunal cubano contra el *Haemophilus Influenzae* tipo b. (2004)
- Informe técnico. Expediente de solicitud de autorizo de Estudio Clínico Fase II en lactantes sanos con las dos formulaciones del candidato vacunal cubano contra el *Haemophilus Influenzae* tipo b. (2004)
- Informe técnico. Expediente de solicitud de registro de la vacuna Quimi-Hib en Cuba. (2006)

Logro de la Academia de Ciencias de Cuba

- Desarrollo de una vacuna conjugada contra el *Haemophilus Influenzae* tipo b, a partir de un antígeno sintético. (2004)
- Vacuna Tetravalente cubana TRIVAC HB. (2005)

Logros institucionales

- Seguridad de la vacuna conjugada Hib sintético T comprobada en estudios no clínicos realizados a este producto. (2001)
- Vacuna Quimi-Hib: Demostración clínica, transferencia a producción y obtención del registro sanitario. (2003)
- Obtención del Registro Sanitario de la vacuna tetravalente cubana TRIVAC HB®. (2004)

- Vacuna Quimi-Hib: Demostración clínica, transferencia a producción y obtención del registro sanitario. (2004)
- Vacuna Tetravalente cubana TRIVAC HB. (2005)
- Diseño de una vacuna pentavalente DPT-HB-Hib líquida en un solo vial. (2005).

Premio al resultado de mayor trascendencia y originalidad. Vacuna contra *Haemophilus influenzae* tipo b de un nuevo antígeno sintético conjugado a la anatoxina tetánica. Desarrollo exitoso hasta las fases iniciales de ensayo clínico. (2002)

XV Forum Provincial Distinción especial “Vacuna conjugada contra el *Haemophilus Influenzae* tipo b. Desarrollo de la primera vacuna con un antígeno sintético para uso humano”.

9.2- Artículos científicos no relacionados con el tema de tesis

- Desarrollo de Técnicas Analíticas para el Control de Calidad de Microcápsulas de Bisacodyl. Validación. Revista Cubana de Farmacia. 1996
- Parte III: Solución Viscosa de EGF. Registro Sanitario. 1999
- Diseño y Aplicación de un Sistema de Calidad para Estudios Preclínicos. Revista Biotecnología Aplicada. vol.17, no.1, p.23-29. 2000
- Opciones a la práctica preclínica bajo principios éticos. Cuadernos de bioética. Vol. 11, N° 41, pág. 121. 2000.
- Parte II del Registro Sanitario del Ungüento Oleoso de EGF. 2002
- Modelo experimental de ratón quemado en investigaciones biomédicas. Revista Cubana de Medicina Militar. Vol. 32, No 2. 2003
- Terapia angiogénica, nuevo enfoque desde el punto de vista toxicológico. Revista Española de Toxicología Vol. 20, No 2. 2003
- Registro Quimi-Hib. B-03-150-J07. 2003
- Evaluación de la toxicidad subcrónica del Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos. Revista CENIC de Ciencias Biológicas (Volumen 35, 3, 203-209). 2004
- Ensayo de primera ola del Factor de Transferencia. Revista CENIC de Ciencias Biológicas (Volumen 35, 3, 197-201). 2004
- Evaluación preclínica de IL-2hr y el candidato vacunal FPCR₃ contra el VIH, terapia combinada en pacientes con SIDA. Revista de Toxicología, revista oficial de la Sociedad española de Toxicología (Volumen 21: 1). 2004

- Evaluación de la seguridad del factor estimulador de colonias de granulocitos producido por el CIGB. *Revista Biotecnología Aplicada* (Vol. 22, No 1,50-53). 2004
- Determinación del Potencial irritante de un candidato vacunal nasal que combina al antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg) con el antígeno del Core (HBcAg) *Revista Biotecnología Aplicada* (Volumen 21, N° 3). 2004
- Uso de animales de laboratorio en el control de vacunas recombinantes y otras biomoléculas de uso humano y veterinario. Aplicación de las Buenas Prácticas Preclínicas *Revista Universidad Rural. Ser. Ci. Vida seropédica RJ. EDUR. V 24. 2004*
- Seguridad Preclínica de la Eritropoyetina recombinante humana HEBERITRO®. *Biotecnología Aplicada* en el volumen 22 número 4. 2005
- Criterios preclínicos que sustentan la seguridad en el uso de la eritropoyetina recombinante humana (EPOrH) *Biotecnología Aplicada* en el volumen 22 número 4. 2005
- Principios éticos aplicados al trabajo con animales de laboratorio. *Revista electrónica MEDISAN* en el volumen 9 número 4. 2005
- CIGB-300, a novel proapoptotic peptide that impairs the CK2 phosphorylation and exhibits anticancer properties both in vitro and in vivo. *Mol Cell Biochem* 316: 163-167. 2008
- Immunization with CIGB-230, a therapeutic DNA vaccine preparation, is safe and well tolerated in VHC-chronically infected individuals. *Hepatology Research Journal. HEPRES-08-0307*. 2008
- Safety demonstration of multivalent antibody fragment anti-CEA M3 as biomarker. *Toxicology Letters* 180S, S32-246. 2008
- Non clinical toxicological studies carried out of a new biomolecule with anti-tumoral effect. *Toxicology Letters* 180S, S32-246. 2008
- Safety evaluation of CIGB-500, therapeutic option in the treatment of acute toxicity myocardium infarct. *Toxicology Letters* 180S, S32-246. 2008
- Toxicology and biodistribution study of CIGB-230, a DNA vaccine against hepatitis C virus. *Human & Experimental Toxicology*, 28: 479-491. 2009

- Evaluation of Drug Toxicity for DNA Vaccine Candidates Against Infectious Diseases: Hepatitis C as Experimental Model" Un capítulo completo del libro: Toxicity and Drug Testing, ISBN 978-953-51-0004-1, de la Editorial Intech. 2011
- Vacunas Cuba 1959-2008. Editorial Ciencias Médicas. La Habana. 2011
- Study of oral acute toxicity/pathogenicity of the *Tsukamurella paurometabola* active agent of the biological nematicide C-924 (HEBERNEM®). Adv Pharmacoepidem Drug Safety 2012, 1:1. <http://dx.doi.org/10.4172/apds.1000106>. 2012
- Informe técnico. Evaluación de la Toxicidad Aguda en ratas Sprague-Dawley de la Eritropoyetina humana recombinante. 2002
- Informe técnico. Evaluación de la Tolerancia Local en Ratas Sprague-Dawley de la Eritropoyetina humana recombinante. 2002
- Informe técnico. Evaluación de la Toxicidad Aguda en ratas Sprague-Dawley de la Vacuna conjugada Hib sintético-T. 2002
- Informe técnico. Tolerancia Local en ratas Sprague-Dawley de la vacuna conjugada Hib sintético-T. Administración intramuscular. 2002
- Informe técnico. Toxicidad aguda comparada de los factores estimuladores de colonias de granulocitos humanos recombinantes G-CSF^{CIGB} y NEUPOGEN® en ratas Sprague-Dawley. Administración subcutánea. 2002
- Tolerancia Local del factor estimulador de colonias de granulocitos humano recombinante G-CSF^{CIGB} en ratas Sprague-Dawley. Administración subcutánea. 2002
- Informe técnico. Toxicidad aguda del Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF) en ratas Sprague-Dawley. Administración intramuscular. 2002
- Informe técnico. Toxicidad aguda comparada en ratas Sprague-Dawley de la vacuna contra la Hepatitis B. Administración intranasal. 2002
- Informe técnico. Determinación del potencial irritante sobre la mucosa nasal de la Vacuna contra la Hepatitis B. 2002
- Informe técnico. Ensayo de Toxicidad Aguda, a dosis única del Factor de Transferencia en ratas Sprague-Dawley. Administración intramuscular. 2002
- Informe técnico. Expediente de solicitud de autorizo de Estudio Clínico Fase I en adultos sanos con la formulación líquida del candidato vacunal cubano contra el *Haemophilus Influenzae* tipo b. 2004
- Informe técnico. Expediente de solicitud de autorizo de Estudio Clínico Fase I en adultos sanos

con la formulación adyuvada del candidato vacunal cubano contra el *Haemophilus Influenzae* tipo b. 2004

- Informe técnico. Expediente de solicitud de autorizo de Estudio Clínico Fase I en lactantes sanos con la formulación líquida del candidato vacunal cubano contra el *Haemophilus Influenzae* tipo b. 2004
- Informe técnico. Expediente de solicitud de autorizo de Estudio Clínico Fase I en niños sanos de 4 y 5 años con la formulación líquida del candidato vacunal cubano contra el *Haemophilus Influenzae* tipo b. 2004
- Informe técnico. Expediente de solicitud de autorizo de Estudio Clínico Fase I en lactantes sanos con las dos formulaciones del candidato vacunal cubano contra el *Haemophilus Influenzae* tipo b. 2004
- Informe técnico. Expediente de solicitud de autorizo de Estudio Clínico Fase II en lactantes sanos con las dos formulaciones del candidato vacunal cubano contra el *Haemophilus Influenzae* tipo b. 2004
- Informe técnico. Expediente de solicitud de autorizo de Estudio Clínico Fase I en adultos sanos con el candidato a vacuna antimeningocócica conjugada MenC-P64K contra Neisseria meningitidis serogrupo b. 2004
- Informe técnico. Expediente de solicitud de autorizo de Estudio Clínico Fase I en adultos sanos con el candidato a vacuna antimeningocócica conjugada MenC-P64K contra Neisseria meningitidis serogrupo c. 2004
- Informe técnico. Expediente de solicitud de autorización de estudio clínico fase II en adultos sanos con el candidato vacunal combinado HB-Hib contra la infección por el virus de la Hepatitis B y la bacteria *Haemophilus Influenzae* tipo b. 2006
- Informe técnico. Expediente de solicitud de autorización de estudio clínico fase I en adultos sanos con el candidato vacunal combinado HB-Hib contra la infección por el virus de la hepatitis b y la bacteria *Haemophilus Influenzae* tipo b. 2006
- Informe técnico. Expediente de solicitud de registro de la vacuna Quimi-Hib en Cuba. 2006
- Informe técnico. Expediente de solicitud de autorización de estudio clínico fase I en adultos sanos con el candidato vacunal combinado HB-Hib contra la infección por el virus de la hepatitis b y la bacteria *Haemophilus Influenzae* tipo b. 2006
- Informe técnico en revisión. Determinación del límite de sobrevivencia, puntos finales y toxicidad general de diferentes formulaciones de GCSF en ratones OF1. 2006
- Informe técnico en revisión. Evaluación de la toxicidad del TFA en ratas SD. 2006

- Informe técnico. Hallazgos histopatológicos de la toxicidad a dosis repetida de la vacuna combinada DPT+HB-Hib (3+2) Cuba-Venezuela en ratas Sprague Dawley. Administración intramuscular. 2007
- Informe técnico. Hallazgos histopatológicos de dos formulaciones de pVEGF121 en rata. 2007
- Informe técnico. Expediente de Registro Sanitario para la solicitud de aprobación de la vacuna Heberpenta en Cuba. 2009
- Informe técnico. Expediente de Registro Sanitario para la solicitud de aprobación de la vacuna TRIVAC-HB en Cuba. . 2009
- Informe técnico. Expediente para Registro sanitario de la vacuna Quimi-Hib en Venezuela. 2009
- Informe técnico. Expediente de Registro Sanitario para la solicitud de aprobación de la vacuna Heberpenta en Cuba. 2009
- Informe técnico. Expediente de Registro Sanitario para la Renovación de la vacuna Quimi-Hib en Cuba. 2009

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Hajjeh R. Accelerating introduction of new vaccines: barriers to introduction and lessons learned from the recent *Haemophilus influenzae* type B vaccine experience. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2011 Oct 12;366(1579):2827-32.
- (2) Osterholm MT, Kelley NS, Sommer A, Belongia EA. Efficacy and effectiveness of influenza vaccines: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2012 Jan;12(1):36-44.
- (3) Recommendation of the Advisory Committee Immunization Practices (ACIP) Polysaccharide Vaccine for Prevention of *Haemophilus Influenzae* Type b Disease. *MMWR Recomm Rep* 2008;34(15):201-5.
- (4) Ahmed N, Gottschalk S. How to design effective vaccines: lessons from an old success story. *Expert Rev Vaccines* 2009 May;8(5):543-6.
- (5) Fitzwater SP, Watt JP, Levine OS, Santosham M. *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines: considerations for vaccination schedules and implications for developing countries. *Hum Vaccin* 2010 Oct;6(10):810-8.
- (6) Verez-Bencomo V, Fernandez-Santana V, Hardy E, Toledo ME, Rodriguez MC, Heynngnezz L, et al. A synthetic conjugate polysaccharide vaccine against *Haemophilus influenzae* type b. *Science* 2004 Jul 23;305(5683):522-5.
- (7) Expósito N, Cardoso D, Martínez E, Herrera Y, Cosme K, Díaz P. TRIVAC-HB: Cuban polyvalent vaccine. *Biotecnología Aplicada* 2006;23(2):165-70.
- (8) Folb PI, Bernatowska E, Chen R, Clemens J, Doodoo AN, Ellenberg SS, et al. A global perspective on vaccine safety and public health: the Global Advisory Committee on Vaccine Safety. *Am J Public Health* 2004 Nov;94(11):1926-31.
- (9) Lee BY, McGlone SM. Pricing of new vaccines. *Hum Vaccin* 2010 Aug;6(8):619-26.
- (10) Skibinski DA, Baudner BC, Singh M, O'Hagan DT. Combination vaccines. *J Glob Infect Dis* 2011 Jan;3(1):63-72.
- (11) Bar-On ES, Goldberg E, Hellmann S, Leibovici L. Combined DTP-HBV-HIB vaccine versus separately administered DTP-HBV and HIB vaccines for primary prevention of diphtheria, tetanus, pertussis, hepatitis B and *Haemophilus influenzae* B (HIB). *Cochrane Database Syst Rev* 2012 Apr 18;4:CD005530. doi: 10.1002/14651858.CD005530.pub3.:CD005530.
- (12) Bosch P. Vacunas en la infancia y la adolescencia. *Recomendaciones PrevInfad/PAPPS* . 2008.

Ref Type: Magazine Article

-
- (13) Dhillon S. DTPa-HBV-IPV/Hib Vaccine (Infanrix hexa): A Review of its Use as Primary and Booster Vaccination. *Drugs* 2010 May 28;70(8):1021-58.
- (14) Harandi AM, Medagliani D, Shattock RJ. Vaccine adjuvants: a priority for vaccine research. *Vaccine* 2010 Mar 11;28(12):2363-6.
- (15) Dickinson FO, Perez AE, Galindo MA, Quintana I. [Impact of vaccination against *Haemophilus influenzae* type b in Cuba]. *Rev Panam Salud Publica* 2001 Sep;10(3):169-73.
- (16) Requirements for Registration of Pharmaceuticals for human Use. Preclinical Safety evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals. CPMP/ICH/302/95 1997.
- (17) Note for Guidance on Preclinical Pharmacological and Toxicological testing of vaccines. CPMP/SWP/465/95 1997.
- (18) Ladhani S, Slack MP, Heath PT, von GA, Chandra M, Ramsay ME. Invasive *Haemophilus influenzae* Disease, Europe, 1996-2006. *Emerg Infect Dis* 2010 Mar;16(3):455-63.
- (19) Harandi AM, Davies G, Olesen OF. Vaccine adjuvants: scientific challenges and strategic initiatives. *Expert Rev Vaccines* 2009 Mar;8(3):293-8.
- (20) Aithal A, Sharma A, Joshi S, Raghava GP, Varshney GC. PolysacDB: a database of microbial polysaccharide antigens and their antibodies. *PLoS One* 2012;7(4):e34613.
- (21) Fadnes LT, Jackson D, Engebretsen IM, Zembe W, Sanders D, Sommerfelt H, et al. Vaccination coverage and timeliness in three South African areas: a prospective study. *BMC Public Health* 2011 May 27;11:404. doi: 10.1186/1471-2458-11-404.:404-11.
- (22) Peltola H. Worldwide *Haemophilus influenzae* type b disease at the beginning of the 21st century: global analysis of the disease burden 25 years after the use of the polysaccharide vaccine and a decade after the advent of conjugates. *Clin Microbiol Rev* 2000 Apr;13(2):302-17.
- (23) Enciclopedia médica. Medline Plus . 2007. Biblioteca Nacional de Medicina de los EE.UU y los Institutos Nacionales de Salud.
Ref Type: Online Source
- (24) Hitchcock WP. Rationale for use of Tdap booster vaccines for adolescent immunization: overview of efficacy, safety, and clinical use. *Clin Pediatr (Phila)* 2006 Nov;45(9):785-94.
- (25) Mattoo S, Foreman-Wykert AK, Cotter PA, Miller JF. Mechanisms of *Bordetella* pathogenesis. *Front Biosci* 2001 Nov 1;6:E168-86.:E168-E186.
- (26) Mattoo S, Cherry JD. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clin Microbiol Rev* 2005 Apr;18(2):326-82.

- (27) Burton A, Monasch R, Lautenbach B, Gacic-Dobo M, Neill M, Karimov R, et al. WHO and UNICEF estimates of national infant immunization coverage: methods and processes. *Bull World Health Organ* 2009 Jul;87(7):535-41.
- (28) Schuchat A. The state of immunization 2013: we are the world. *S D Med* 2013;Spec no:27-32.:27-32.
- (29) Global Infectious Disease Surveillance and Detection. Assessing the Challenges-Finding Solutions. Workshop Summary 2007.
- (30) Mortimer EA. Pertussis. In: Evans AS, Brachman PS, editors. *Bacterial infections of humans .Epidemiology and control.*New York: Plenum Publishing Corporation; 1991. p. 499-523.
- (31) Pines E, Barrand M, Fabre P, Salomon H, Blondeau C, Wood SC, et al. New acellular pertussis-containing paediatric combined vaccines. *Vaccine* 1999 Mar 26;17(13-14):1650-6.
- (32) Yeh SH. PEDIARIX: clinical trials. *Expert Rev Vaccines* 2005 Apr;4(2):139-45.
- (33) Ramón G. Sur l' augmentation anormale de l' antitoxine chez les chevaux producteurs de serum antidiphtherique. *Bull Soc Centr Med Vent* 1925;101:227-34.
- (34) Elamin S, Abu-Aisha H. Prevention of hepatitis B virus and hepatitis C virus transmission in hemodialysis centers: review of current international recommendations. *Arab J Nephrol Transplant* 2011 Jan;4(1):35-47.
- (35) Jacobson SH, Sewell EC, Karnani T. Engineering the economic value of two pediatric combination vaccines. *Health Care Manag Sci* 2005 Feb;8(1):29-40.
- (36) Curran MP, Goa KL. DTPa-HBV-IPV/Hib vaccine (Infanrix hexa). *Drugs* 2003;63(7):673-82.
- (37) Pediarix--a combined vaccine for infants. *Med Lett Drugs Ther* 2003 May 12;45(1156):37-8.
- (38) Johns TL, Hutter GE. New combination vaccines: DTaP-IPV (Kinrix) and DTaP-IPV/Hib (Pentacel). *Ann Pharmacother* 2010 Mar;44(3):515-23.
- (39) White C, Halperin SA, Scheifele DW. Pediatric combined formulation DTaP-IPV/Hib vaccine. *Expert Rev Vaccines* 2009 Jul;8(7):831-40.
- (40) Aristegui J, Dal-Re R, Diez-Delgado J, Mares J, Casanovas JM, Garcia-Corbeira P, et al. Comparison of the reactogenicity and immunogenicity of a combined diphtheria, tetanus, acellular pertussis, hepatitis B, inactivated polio (DTPa-HBV-IPV) vaccine, mixed with the *Haemophilus influenzae* type b (Hib) conjugate vaccine and administered as a single injection, with the DTPa-IPV/Hib and hepatitis B vaccines administered in two

- simultaneous injections to infants at 2, 4 and 6 months of age. *Vaccine* 2003 Sep 8;21(25-26):3593-600.
- (41) Bracco NH, Colucci A, Puccini RF, Farhat CK. Immunogenicity of a combined DTPa-HB vaccine co-administered with *Haemophilus influenzae* type B conjugate vaccine (PRP-T) for primary and booster vaccinations. *Braz J Infect Dis* 2005 Oct;9(5):363-73.
- (42) McPhillips H, Marcuse EK. Vaccine safety. *Curr Probl Pediatr* 2001 Apr;31(4):91-121.
- (43) Jacobson RM, Zabel KS, Poland GA. The challenge of vaccine safety. *Semin Pediatr Infect Dis* 2002 Jul;13(3):215-20.
- (44) Dal-Re R. [Parenteral combined vaccines in the planning of systematic vaccination]. *Med Clin (Barc)* 2000 Feb 26;114(7):264-70.
- (45) Zepp F, Schmitt HJ, Cleerbout J, Verstraeten T, Schuerman L, Jacquet JM. Review of 8 years of experience with Infanrix hexa (DTPa-HBV-IPV/Hib hexavalent vaccine). *Expert Rev Vaccines* 2009 Jun;8(6):663-78.
- (46) FDA licensure of diphtheria and tetanus toxoids and acellular pertussis adsorbed, hepatitis B (recombinant), and poliovirus vaccine combined, (PEDIARIX) for use in infants. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2003 Mar 14;52(10):203-4.
- (47) Global vaccine action plan 2011-2020. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data 2013.
- (48) Coffman RL, Sher A, Seder RA. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity* 2010 Oct 29;33(4):492-503.
- (49) Vesikari T, Knuf M, Wutzler P, Karvonen A, Kieninger-Baum D, Schmitt HJ, et al. Oil-in-water emulsion adjuvant with influenza vaccine in young children. *N Engl J Med* 2011 Oct 13;365(15):1406-16.
- (50) Behzad H, Huckriede AL, Haynes L, Gentleman B, Coyle K, Wilschut JC, et al. GLA-SE, a synthetic toll-like receptor 4 agonist, enhances T-cell responses to influenza vaccine in older adults. *J Infect Dis* 2012 Feb 1;205(3):466-73.
- (51) Batista-Duharte A, Lastre M, Perez O. [Immunological adjuvants. Determinant factors in the efficacy-toxicity ratio of the contemporary vaccines.]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2013 Jan 16;12(12):10.
- (52) Jones FG, Jamieson WA. Studies on Tetanus Toxoid: III. Antitoxic Response in Guinea Pigs Immunized with Tetanus Alum-precipitated Toxoid Followed by Tetanus Spores. *J Bacteriol* 1936 Jul;32(1):33-40.
- (53) Volk VK, Bunney WE. Reimmunization Against Diphtheria of Previously Immunized Children. *Am J Public Health Nations Health* 1942 Jul;32(7):700-8.

- (54) Volk VK, Bunney WE. Diphtheria Immunization with Fluid Toxoid and Alum-Precipitated Toxoid. *Am J Public Health Nations Health* 1942 Jul;32(7):690-9.
- (55) Baylor NW, Egan W, Richman P. Aluminum salts in vaccines--US perspective. *Vaccine* 2002 May 31;20 Suppl 3:S18-23.:S18-S23.
- (56) Frazer IH, Leggatt GR, Mattarollo SR. Prevention and treatment of papillomavirus-related cancers through immunization. *Annu Rev Immunol* 2011;29:111-38. doi: 10.1146/annurev-immunol-031210-101308.:111-38.
- (57) Eifan AO, Shamji MH, Durham SR. Long-term clinical and immunological effects of allergen immunotherapy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2011 Dec;11(6):586-93.
- (58) Francis JN, Durham SR. Adjuvants for allergen immunotherapy: experimental results and clinical perspectives. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2004 Dec;4(6):543-8.
- (59) Wherrett DK, Bundy B, Becker DJ, DiMeglio LA, Gitelman SE, Goland R, et al. Antigen-based therapy with glutamic acid decarboxylase (GAD) vaccine in patients with recent-onset type 1 diabetes: a randomised double-blind trial. *Lancet* 2011 Jul 23;378(9788):319-27.
- (60) Lindblad EB. Aluminium adjuvants--in retrospect and prospect. *Vaccine* 2004 Sep 9;22(27-28):3658-68.
- (61) Jefferson T, Rudin M, Di PC. Adverse events after immunisation with aluminium-containing DTP vaccines: systematic review of the evidence. *Lancet Infect Dis* 2004 Feb;4(2):84-90.
- (62) Amanianda V, Haensler J, Lacroix-Desmazes S, Kaveri SV, Bayry J. Novel cellular and molecular mechanisms of induction of immune responses by aluminum adjuvants. *Trends Pharmacol Sci* 2009 Jun;30(6):287-95.
- (63) Kool M, Fierens K, Lambrecht BN. Alum adjuvant: some of the tricks of the oldest adjuvant. *J Med Microbiol* 2012 Jul;61(Pt 7):927-34.
- (64) Marrack P, McKee AS, Munks MW. Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. *Nat Rev Immunol* 2009 Apr;9(4):287-93.
- (65) Lefeber DJ, Benaissa-Trouw B, Vliegenthart JF, Kamerling JP, Jansen WT, Kraaijeveld K, et al. Th1-directing adjuvants increase the immunogenicity of oligosaccharide-protein conjugate vaccines related to *Streptococcus pneumoniae* type 3. *Infect Immun* 2003 Dec;71(12):6915-20.
- (66) Cox JC, Coulter AR. Adjuvants--a classification and review of their modes of action. *Vaccine* 1997 Feb;15(3):248-56.

- (67) Mitkus RJ, King DB, Hess MA, Forshee RA, Walderhaug MO. Updated aluminum pharmacokinetics following infant exposures through diet and vaccination. *Vaccine* 2011 Nov 28;29(51):9538-43.
- (68) Brewer JM. (How) do aluminium adjuvants work? *Immunol Lett* 2006 Jan 15;102(1):10-5.
- (69) Mannhalter JW, Neychev HO, Zlabinger GJ, Ahmad R, Eibl MM. Modulation of the human immune response by the non-toxic and non-pyrogenic adjuvant aluminium hydroxide: effect on antigen uptake and antigen presentation. *Clin Exp Immunol* 1985 Jul;61(1):143-51.
- (70) Morefield GL, Sokolovska A, Jiang D, HogenEsch H, Robinson JP, Hem SL. Role of aluminum-containing adjuvants in antigen internalization by dendritic cells in vitro. *Vaccine* 2005 Feb 18;23(13):1588-95.
- (71) Noe SM, Green MA, HogenEsch H, Hem SL. Mechanism of immunopotentiality by aluminum-containing adjuvants elucidated by the relationship between antigen retention at the inoculation site and the immune response. *Vaccine* 2010 Apr 30;28(20):3588-94.
- (72) Gupta RK. Aluminum compounds as vaccine adjuvants. *Adv Drug Deliv Rev* 1998 Jul 6;32(3):155-72.
- (73) Berthold I, Pombo ML, Wagner L, Arciniega JL. Immunogenicity in mice of anthrax recombinant protective antigen in the presence of aluminum adjuvants. *Vaccine* 2005 Mar 14;23(16):1993-9.
- (74) Romero Mendez IZ, Shi Y, HogenEsch H, Hem SL. Potentiation of the immune response to non-adsorbed antigens by aluminum-containing adjuvants. *Vaccine* 2007 Jan 15;25(5):825-33.
- (75) Eisenbarth SC, Colegio OR, O'Connor W, Sutterwala FS, Flavell RA. Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature* 2008 Jun;453(7198):1122-6.
- (76) Goto N, Akama K. Histopathological studies of reactions in mice injected with aluminum-adsorbed tetanus toxoid. *Microbiol Immunol* 1982;26(12):1121-32.
- (77) Goto N, Kato H, Maeyama J, Shibano M, Saito T, Yamaguchi J, et al. Local tissue irritating effects and adjuvant activities of calcium phosphate and aluminium hydroxide with different physical properties. *Vaccine* 1997 Aug;15(12-13):1364-71.
- (78) HogenEsch H. Mechanism of immunopotentiality and safety of aluminum adjuvants. *Front Immunol* 2012;3:406. doi: 10.3389/fimmu.2012.00406. Epub@2013 Jan 10.:406.
- (79) Calabro S, Tortoli M, Baudner BC, Pacitto A, Cortese M, O'Hagan DT, et al. Vaccine adjuvants alum and MF59 induce rapid recruitment of neutrophils and monocytes that participate in antigen transport to draining lymph nodes. *Vaccine* 2011 Feb 17;29(9):1812-23.

- (80) Ghimire TR, Benson RA, Garside P, Brewer JM. Alum increases antigen uptake, reduces antigen degradation and sustains antigen presentation by DCs in vitro. *Immunol Lett* 2012 Sep;147(1-2):55-62.
- (81) Sokolovska A, Hem SL, HogenEsch H. Activation of dendritic cells and induction of CD4(+) T cell differentiation by aluminum-containing adjuvants. *Vaccine* 2007 Jun 6;25(23):4575-85.
- (82) Li H, Nookala S, Re F. Aluminum hydroxide adjuvants activate caspase-1 and induce IL-1beta and IL-18 release. *J Immunol* 2007 Apr 15;178(8):5271-6.
- (83) Sharp FA, Ruane D, Claass B, Creagh E, Harris J, Malyala P, et al. Uptake of particulate vaccine adjuvants by dendritic cells activates the NALP3 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009 Jan;106(3):870-5.
- (84) Flach TL, Ng G, Hari A, Desrosiers MD, Zhang P, Ward SM, et al. Alum interaction with dendritic cell membrane lipids is essential for its adjuvanticity. *Nat Med* 2011 Apr;17(4):479-87.
- (85) Franchi L, Nunez G. The Nlrp3 inflammasome is critical for aluminium hydroxide-mediated IL-1beta secretion but dispensable for adjuvant activity. *Eur J Immunol* 2008 Aug;38(8):2085-9.
- (86) Petrilli V, Dostert C, Muruve DA, Tschopp J. The inflammasome: a danger sensing complex triggering innate immunity. *Curr Opin Immunol* 2007 Dec;19(6):615-22.
- (87) Scheibner V. Adverse effects of adjuvants in vaccines. *Nexus* 8[2]. 2001. *Nexus*.
Ref Type: Magazine Article
- (88) OECD. Guidelines for testing of chemicals. Acute Oral Toxicity. Section 4 Health Effects 1993;401.
- (89) OECD. Guidelines for testing of chemicals. Acute Dermal Toxicity. Section 4 Health Effects 1993;402.
- (90) Non-clinical safety studies for the performance of human clinical trials for Pharmaceuticals. CPMP/ICH/286/95 1997.
- (91) Wilson NH, Hardisty JF, ayes JR. Short-term, subchronic, chronic toxicology studies. In: Hayes W, editor. *Principles and Methods of Toxicology*. Fifth ed. New York: Raven Press, Ltd; 2008. p. 917-57.
- (92) Non-clinical local tolerance testing of medicinal products. CPMP/ICH/286/95 1992;III(Addendum 2.):137-48.
- (93) OECD. Guidelines for testing of chemicals. Repeated dose 28-day Oral Toxicity Studies in rodents. Section 4 Health Effects 1993;407.

-
- (94) CECMED. Requisitos para las solicitudes de inscripción, renovación y modificación en el registro de medicamentos de uso humano. Section 4 Health Effects 2000;402.
- (95) Batista-Duharte A, Lindblad EB, Oviedo-Orta E. Progress in understanding adjuvant immunotoxicity mechanisms. *Toxicol Lett* 2011 Jun 10;203(2):97-105.
- (96) Exley C, Siesjo P, Eriksson H. The immunobiology of aluminium adjuvants: how do they really work? *Trends Immunol* 2010 Mar;31(3):103-9.
- (97) Luster MI, Gerberick GF. Immunotoxicology Testing Past and Future. In: Dieter RR, editor. *Immunotoxicity Testing*. Humana Press, Springer; 2010. p. 3-13.
- (98) Shoenfeld Y, Agmon-Levin N. [Autoimmune or autoinflammatory syndromes induced by adjuvants]. *Harefuah* 2012 Jan;151(1):9-11.
- (99) Sauer UG. The revision of European housing guidelines for laboratory animals: expectations from the point of view of animal welfare. *Altern Lab Anim* 2004 Jun;32 Suppl 1A:187-90.:187-90.
- (100) Newcomer CE. The evolution and adoption of standards used by AAALAC. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2012 May;51(3):293-7.
- (101) Anderson D. Revision of Council of Europe Convention ETS 123 guidelines for the accommodation and care of animals used for experimental and other scientific purposes. *Altern Lab Anim* 2004 Jun;32 Suppl 1A:183-5.:183-5.
- (102) National Research Council. *Animal Alternatives, Welfare and Ethics*. Elsevier; 1997.
- (103) *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. National Institute of Health; 2011.
- (104) Note for Guidance on Repeated Dose Toxicity. CPMP/SWP/1042/99 2001.
- (105) Mawas F, Newman G, Burns S, Corbel MJ. Suppression and modulation of cellular and humoral immune responses to Haemophilus influenzae type B (Hib) conjugate vaccine in hib-diphtheria-tetanus toxoids-acellular pertussis combination vaccines: a study in a rat model. *J Infect Dis* 2005 Jan 1;191(1):58-64.
- (106) Verez-Bencomo V, Fernandez-Santana V, Hardy E, Toledo ME, Rodriguez MC, Heynngnezz L, et al. A synthetic conjugate polysaccharide vaccine against Haemophilus influenzae type b. *Science* 2004 Jul 23;305(5683):522-5.
- (107) Ferguson M, Heath A, Minor PD. Report of a collaborative study for assessing the potency of hepatitis B vaccines. *Biologicals* 1990 Oct;18(4):345-50.
- (108) Izquierdo M, Vega J, Cortés M, Expósito N, Vega M, Rodríguez O, et al. Comportamiento inmunológico del HBsAg como componente de una vacuna combinada DPTc-HB . *Biotecnología Aplicada* 2000;17:112-4.

- (109) Edwards KM. Development, acceptance, and use of immunologic correlates of protection in monitoring the effectiveness of combination vaccines. *Clin Infect Dis* 2001 Dec 15;33 Suppl 4:S274-7.:S274-S277.
- (110) Papaevangelou G. Current combined vaccines with hepatitis B. *Vaccine* 1998 Nov;16 Suppl:S69-72.:S69-S72.
- (111) Corbel MJ. Control testing of combined vaccines: a consideration of potential problems and approaches. *Biologicals* 1994 Dec;22(4):353-60.
- (112) Parra M, Weber R, Simenal S. *Inmunizaciones, Vacuna contra Haemophilus influenzae tipo b*. 5 ed. 1996. p. 28-31.
- (113) Vidor E, Hoffenbach A, Fletcher MA. Haemophilus influenzae type b vaccine: reconstitution of lyophilised PRP-T vaccine with a pertussis-containing paediatric combination vaccine, or a change in the primary series immunisation schedule, may modify the serum anti-PRP antibody responses. *Curr Med Res Opin* 2001;17(3):197-209.
- (114) Bogaerts H. The future of childhood immunizations: examining the European experience. *Am J Manag Care* 2003 Jan;9(1 Suppl):S30-S36.
- (115) White KE, Pabst LJ, Cullen KA. Up-to-date Haemophilus influenzae type b vaccination coverage during a vaccine shortage. *Pediatrics* 2011 Mar;127(3):e707-e712.
- (116) Mawas F, Dickinson R, Douglas-Bardsley A, Xing DK, Sesardic D, Corbel MJ. Immune interaction between components of acellular pertussis-diphtheria-tetanus (DTaP) vaccine and Haemophilus influenzae b (Hib) conjugate vaccine in a rat model. *Vaccine* 2006 Apr 24;24(17):3505-12.
- (117) O'Hagan DT, De GE. The path to a successful vaccine adjuvant--'the long and winding road'. *Drug Discov Today* 2009 Jun;14(11-12):541-51.
- (118) Dhillon S, Keam SJ. DTaP-IPV/Hib vaccine (Pentacel). *Paediatr Drugs* 2008;10(6):405-16.
- (119) Dhillon S. Spotlight on DTPa-HBV-IPV/Hib Vaccine (Infanrix hexa). *BioDrugs* 2010 Oct 1;24(5):299-302.
- (120) Karl-Heinz D, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, et al. A good Practice Guide to the administration of substances and removal of blood. *J Appl Toxicol* 2001;21(1):15-23.
- (121) *Animal Models in Toxicology (Drug and Chemical Toxicology)* . Second ed. CRC/Taylor & Francis; 2007.
- (122) Wiley-Blackwell. *Animal Models*. New York Academy of Sciences; 2012.

- (123) Hall RL. Principles of Clinical Pathology for Toxicology Studies. In: Hayes W, editor. Principles and Methods of Toxicology. Fifth ed. New York: Raven Press, Ltd; 2007. p. 1001-38.
- (124) Charles River Report. Monography of IFFA CREDO. Products and Services. 2008.
- (125) Taconic Technical Library. Haematological and clinical chemistry values of Sprague-Dawley rats. 2004.
- (126) Greaves P. Histopathology of Preclinical Toxicity Studies. Fourth ed. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science Publisher B.V.; 2011.
- (127) Bordet AL, Michenet P, Cohen C, Arbion F, Ekindi N, Bonneau C, et al. [Post-vaccination granuloma due to aluminium hydroxide]. *Ann Pathol* 2001 Apr;21(2):149-52.
- (128) Del GG, Podda A, Rappuoli R. What are the limits of adjuvanticity? *Vaccine* 2001 Oct 15;20 Suppl 1:S38-41.:S38-S41.
- (129) Goto N, Kato H, Maeyama J, Eto K, Yoshihara S. Studies on the toxicities of aluminium hydroxide and calcium phosphate as immunological adjuvants for vaccines. *Vaccine* 1993;11(9):914-8.
- (130) Van Der Laan N, de LL, ten Duis HJ. Local cellular inflammation as a result of elective standardized vascular surgery. *Acta Histochem* 2001 Apr;103(2):139-49.
- (131) León A, Blanco D, Peña A, Ronda M, González B, Arteaga M, et al. Hematological and biochemical parameters in Sprague Dawley laboratory rats breed in CENPALAB, Cenp: SPRD. *REDVET Rev.electrón.vet.* 12 N° 11. 2011.
Ref Type: Online Source
- (132) Del GG. Vaccination strategies. An overview. *Vaccine* 2003 Jun 1;21 Suppl 2:S83-8.:S83-S88.
- (133) Hutchison S, Benson RA, Gibson VB, Pollock AH, Garside P, Brewer JM. Antigen depot is not required for alum adjuvanticity. *FASEB J* 2012 Mar;26(3):1272-9.
- (134) HogenEsch H. Mechanisms of stimulation of the immune response by aluminum adjuvants. *Vaccine* 2002 May 31;20 Suppl 3:S34-S39.
- (135) Ovetchkine P. [Secondary effects of vaccinations]. *Arch Pediatr* 2001 Mar;8(3):316-20.
- (136) Cerpa-Cruz S, Paredes-Casillas P, Landeros NE, Bernard-Medina AG, Martinez-Bonilla G, Gutierrez-Urena S. Adverse events following immunization with vaccines containing adjuvants. *Immunol Res* 2013 Apr 11.
- (137) Norimatsu M, Ogikubo Y, Aoki A, Takahashi T, Watanabe G, Taya K, et al. Effects of aluminum adjuvant on systemic reactions of lipopolysaccharides in swine. *Vaccine* 1995 Oct;13(14):1325-9.

- (138) Shi Y, HogenEsch H, Regnier FE, Hem SL. Detoxification of endotoxin by aluminum hydroxide adjuvant. *Vaccine* 2001 Feb 8;19(13-14):1747-52.
- (139) Mark A, Carlsson RM, Granstrom M. Subcutaneous versus intramuscular injection for booster DT vaccination of adolescents. *Vaccine* 1999 Apr 9;17(15-16):2067-72.
- (140) Splino M, Patocka J, Prymula R, Chlibek R. Anthrax vaccines. *Ann Saudi Med* 2005 Mar;25(2):143-9.
- (141) Gherardi RK, Coquet M, Cherin P, Belec L, Moretto P, Dreyfus PA, et al. Macrophagic myofasciitis lesions assess long-term persistence of vaccine-derived aluminium hydroxide in muscle. *Brain* 2001 Sep;124(Pt 9):1821-31.
- (142) Gherardi RK, Authier FJ. Aluminum inclusion macrophagic myofasciitis: a recently identified condition. *Immunol Allergy Clin North Am* 2003 Nov;23(4):699-712.
- (143) Gherardi RK, Authier FJ. Macrophagic myofasciitis: characterization and pathophysiology. *Lupus* 2012 Feb;21(2):184-9.
- (144) Verdier F, Burnett R, Michelet-Habchi C, Moretto P, Fievet-Groyne F, Sauzeat E. Aluminium assay and evaluation of the local reaction at several time points after intramuscular administration of aluminium containing vaccines in the Cynomolgus monkey. *Vaccine* 2005 Feb 3;23(11):1359-67.
- (145) Lach B, Cupler EJ. Macrophagic myofasciitis in children is a localized reaction to vaccination. *J Child Neurol* 2008 Jun;23(6):614-9.
- (146) Mrak RE. Muscle granulomas following intramuscular injection. *Muscle Nerve* 1982 Oct;5(8):637-9.
- (147) Chong H, Brady K, Metze D, Calonje E. Persistent nodules at injection sites (aluminium granuloma) -- clinicopathological study of 14 cases with a diverse range of histological reaction patterns. *Histopathology* 2006 Jan;48(2):182-8.
- (148) Guillard O, Fauconneau B, Pineau A, Marraud A, Bellocq JP, Chenard MP. Aluminium overload after 5 years in skin biopsy following post-vaccination with subcutaneous pseudolymphoma. *J Trace Elem Med Biol* 2012 Oct;26(4):291-3.
- (149) Fiejka M, Aleksandrowicz J. [Aluminum as an adjuvant in vaccines and post-vaccine reactions]. *Rocz Panstw Zakl Hig* 1993;44(1):73-80.
- (150) De GE, Tritto E, Rappuoli R. Alum adjuvanticity: unraveling a century old mystery. *Eur J Immunol* 2008 Aug;38(8):2068-71.
- (151) Netterlid E, Hindsen M, Bjork J, Ekqvist S, Guner N, Henricson KA, et al. There is an association between contact allergy to aluminium and persistent subcutaneous nodules in children undergoing hyposensitization therapy. *Contact Dermatitis* 2009 Jan;60(1):41-9.

- (152) Tomljenovic L, Shaw CA. Aluminum vaccine adjuvants: are they safe? *Curr Med Chem* 2011;18(17):2630-7.
- (153) Bruce M, Singleton R, Lem M, Zulz T, Wenger J, Hennessy T. Haemophilus disease in Alaskan and Canadian children. *Pediatr Infect Dis J* 2010 Feb;29(2):186-7.
- (154) Baz M, Samant M, Zekki H, Tribout-Jover P, Plante M, Lanteigne AM, et al. Effects of different adjuvants in the context of intramuscular and intranasal routes on humoral and cellular immune responses induced by detergent-split A/H3N2 influenza vaccines in mice. *Clin Vaccine Immunol* 2012 Feb;19(2):209-18.
- (155) Cooper PJ, Chico ME, Guadalupe I, Sandoval CA, Mitre E, Platts-Mills TA, et al. Impact of early life exposures to geohelminth infections on the development of vaccine immunity, allergic sensitization, and allergic inflammatory diseases in children living in tropical Ecuador: the ECUAVIDA birth cohort study. *BMC Infect Dis* 2011 Jun 29;11:184. doi: 10.1186/1471-2334-11-184.:184-11.
- (156) Gherardi RK. [Lessons from macrophagic myofasciitis: towards definition of a vaccine adjuvant-related syndrome]. *Rev Neurol (Paris)* 2003 Feb;159(2):162-4.
- (157) Zhu YZ, Liu DW, Liu ZY, Li YF. impact of aluminum exposure on the immune system: a mini review. *Environ Toxicol Pharmacol* 2013 Jan;35(1):82-7.
- (158) Cui X, Wang B, Zong Z, Liu S, Xing W. The effects of chronic aluminum exposure on learning and memory of rats by observing the changes of Ras/Raf/ERK signal transduction pathway. *Food Chem Toxicol* 2012 Feb;50(2):315-9.
- (159) Li XB, Zhang ZY, Yin LH, Schluesener HJ. The profile of beta-amyloid precursor protein expression of rats induced by aluminum. *Environ Toxicol Pharmacol* 2012 Mar;33(2):135-40.
- (160) Senger MR, Seibt KJ, Ghisleni GC, Dias RD, Bogo MR, Bonan CD. Aluminum exposure alters behavioral parameters and increases acetylcholinesterase activity in zebrafish (*Danio rerio*) brain. *Cell Biol Toxicol* 2011 Jun;27(3):199-205.
- (161) Nday CM, Drever BD, Salifoglou T, Platt B. Aluminum does not enhance beta-amyloid toxicity in rat hippocampal cultures. *Brain Res* 2010 Sep 17;1352:265-76. doi: 10.1016/j.brainres.2010.07.008. Epub@2010 Aug 1.:265-76.
- (162) Lindblad EB, Schonberg NE. Aluminum adjuvants: preparation, application, dosage, and formulation with antigen. *Methods Mol Biol* 2010;626:41-58. doi: 10.1007/978-1-60761-585-9_4.:41-58.
- (163) Calejo AI, Rodriguez E, Silva VS, Jorgacevski J, Stenovec M, Kreft M, et al. Life and death in aluminium-exposed cultures of rat lactotrophs studied by flow cytometry. *Cell Biol Toxicol* 2010 Aug;26(4):341-53.

- (164) Kumar V, Gill KD. Aluminium neurotoxicity: neurobehavioural and oxidative aspects. *Arch Toxicol* 2009 Nov;83(11):965-78.
- (165) Clemens J, Jodar L. Hib vaccines for all the world's children? *Lancet* 2005 Jul 9;366(9480):101-3.
- (166) Clemens SC, Azevedo T, Homma A. Feasibility study of the immunogenicity and safety of a novel DTPw/Hib (PRP-T) Brazilian combination compared to a licensed vaccine in healthy children at 2, 4, and 6 months of age. *Rev Soc Bras Med Trop* 2003 May;36(3):321-30.
- (167) Hawken J, Troy SB. Adjuvants and inactivated polio vaccine: a systematic review. *Vaccine* 2012 Nov;30(49):6971-9.
- (168) Montomoli E, Piccirella S, Khadang B, Mennitto E, Camerini R, De RA. Current adjuvants and new perspectives in vaccine formulation. *Expert Rev Vaccines* 2011 Jul;10(7):1053-61.
- (169) Vecchi S, Bufali S, Skibinski DA, O'Hagan DT, Singh M. Aluminum adjuvant dose guidelines in vaccine formulation for preclinical evaluations. *J Pharm Sci* 2012 Jan;101(1):17-20.
- (170) Prlic M, Bevan MJ. Immunology. An antibody paradox, resolved. *Science* 2006 Mar 31;311(5769):1875-6.
- (171) Barbaud A, Deschildre A, Waton J, Raison-Peyron N, Trechot P. Hypersensitivity and vaccines: an update. *Eur J Dermatol* 2013 Apr 1;23(2):135-41.
- (172) Leventhal JS, Berger EM, Brauer JA, Cohen DE. Hypersensitivity reactions to vaccine constituents: a case series and review of the literature. *Dermatitis* 2012 May;23(3):102-9.
- (173) Fritsche PJ, Helbling A, Ballmer-Weber BK. Vaccine hypersensitivity--update and overview. *Swiss Med Wkly* 2010 May 1;140(17-18):238-46.
- (174) Bergfors E, Trollfors B, Inerot A. Unexpectedly high incidence of persistent itching nodules and delayed hypersensitivity to aluminium in children after the use of adsorbed vaccines from a single manufacturer. *Vaccine* 2003 Dec 8;22(1):64-9.
- (175) Knutsson N, Trollfors B, Taranger J, Bergfors E, Sundh V, Lagergard T, et al. Immunogenicity and reactogenicity of diphtheria, tetanus and pertussis toxoids combined with inactivated polio vaccine, when administered concomitantly with or as a diluent for a Hib conjugate vaccine. *Vaccine* 2001 Aug 14;19(31):4396-403.
- (176) Goto N. Toxicity of Aluminium Compounds as an Adjuvant for Vaccines. In: Zatta PF, Alfrey AC, editors. *Aluminium Toxicity in Infants' Health and Disease*. World Scientific Publishing; 1997.

-
- (177) Pittman PR, Kim-Ahn G, Pifat DY, Coonan K, Gibbs P, Little S, et al. Anthrax vaccine: immunogenicity and safety of a dose-reduction, route-change comparison study in humans. *Vaccine* 2002 Jan 31;20(9-10):1412-20.
- (178) Butler NR, Voyce MA, Burland WL, Hilton ML. Advantages of aluminium hydroxide adsorbed combined diphtheria, tetanus, and pertussis vaccines for the immunization of infants. *Br Med J* 1969 Mar 15;1(5645):663-6.
- (179) Capiou C, Poolman J, Hoet B, Bogaerts H, Andre F. Development and clinical testing of multivalent vaccines based on a diphtheria-tetanus-acellular pertussis vaccine: difficulties encountered and lessons learned. *Vaccine* 2003 Jun 2;21(19-20):2273-87.
- (180) Rueff F, Wolf H, Schnitker J, Ring J, Przybilla B. Specific immunotherapy in honeybee venom allergy: a comparative study using aqueous and aluminium hydroxide adsorbed preparations. *Allergy* 2004 Jun;59(6):589-95.
- (181) Agrawal A, Murphy TF. Haemophilus influenzae infections in the H. influenzae type b conjugate vaccine era. *J Clin Microbiol* 2011 Nov;49(11):3728-32.
- (182) Licensure of a Haemophilus influenzae type b (Hib) vaccine (Hiberix) and updated recommendations for use of Hib vaccine. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2009 Sep 18;58(36):1008-9.
- (183) Progress toward introduction of Haemophilus influenzae type b vaccine in low-income countries--worldwide, 2004-2007. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2008 Feb 15;57(6):148-51.
- (184) Bar-On ES, Goldberg E, Fraser A, Vidal L, Hellmann S, Leibovici L. Combined DTP-HBV-HIB vaccine versus separately administered DTP-HBV and HIB vaccines for primary prevention of diphtheria, tetanus, pertussis, hepatitis B and Haemophilus influenzae B (HIB). *Cochrane Database Syst Rev* 2009 Jul 8;(3):CD005530.
- (185) Ahmed SS, Plotkin SA, Black S, Coffman RL. Assessing the safety of adjuvanted vaccines. *Sci Transl Med* 2011 Jul 27;3(93):93rv2.
- (186) Audibert F. Adjuvants for vaccines, a quest. *Int Immunopharmacol* 2003 Aug;3(8):1187-93.
- (187) Thierry-Carstensen B, Stellfeld M. Itching nodules and hypersensitivity to aluminium after the use of adsorbed vaccines from SSI. *Vaccine* 2004 May 7;22(15-16):1845.
- (188) Pineau A, Durand C, Guillard O, Bureau B, Stalder JF. Role of aluminium in skin reactions after diphtheria-tetanus-pertussis-poliomyelitis vaccination: an experimental study in rabbits. *Toxicology* 1992;73(1):117-25.
- (189) Frost L, Johansen P, Pedersen S, Veien N, Ostergaard PA, Nielsen MH. Persistent subcutaneous nodules in children hyposensitized with aluminium-containing allergen extracts. *Allergy* 1985 Jul;40(5):368-72.

- (190) Netterlid E, Hindsen M, Siemund I, Bjork J, Werner S, Jacobsson H, et al. Does allergen-specific immunotherapy induce contact allergy to aluminium? *Acta Derm Venereol* 2013 Jan;93(1):50-6.
- (191) Netterlid E, Bruze M, Hindsen M, Isaksson M, Olin P. Persistent itching nodules after the fourth dose of diphtheria-tetanus toxoid vaccines without evidence of delayed hypersensitivity to aluminium. *Vaccine* 2004 Sep 9;22(27-28):3698-706.
- (192) Pineau A, Durand C, Guillard O, Bureau B, Stalder JF. Role of aluminium in skin reactions after diphtheria-tetanus-pertussis-poliomyelitis vaccination: an experimental study in rabbits. *Toxicology* 1992;73(1):117-25.
- (193) Aristegui J, Usonis V, Coovadia H, Riedemann S, Win KM, Gatchalian S, et al. Facilitating the WHO expanded program of immunization: the clinical profile of a combined diphtheria, tetanus, pertussis, hepatitis B and Haemophilus influenzae type b vaccine. *Int J Infect Dis* 2003 Jun;7(2):143-51.
- (194) Botet Asensi FI, Veronese A, Del Carmen OM, Desamparados Tamarit PM, Hontangas Lopez JL, Viviani S. Immunogenicity and safety in infants of a DTwPHib full liquid vaccine. *Acta Paediatr* 2003 May;92(5):541-5.
- (195) Casey JR, Pichichero ME. Acellular pertussis vaccine safety and efficacy in children, adolescents and adults. *Drugs* 2005;65(10):1367-89.
- (196) Gatchalian S, Reyes M, Bernal N, Chandrasekaran V, Han HH, Bock HL, et al. A new DTPw-HBV/Hib vaccine: immune memory after primary vaccination and booster dosing in the second year of life. *Hum Vaccin* 2008 Jan;4(1):60-6.
- (197) Grimprel E, Begue P. [What uses for the acellular pertussis vaccine?]. *Arch Pediatr* 1998 May;5(5):557-60.
- (198) Miller E. Overview of recent clinical trials of acellular pertussis vaccines. *Biologicals* 1999 Jun;27(2):79-86.
- (199) Pichichero ME. Acellular pertussis vaccines. Towards an improved safety profile. *Drug Saf* 1996 Nov;15(5):311-24.
- (200) Shah RC, Shah AR. Pertussis vaccine controversies and acellular pertussis vaccine. *Indian J Pediatr* 2003 Jun;70(6):485-8.
- (201) Hla KH, Thein SA, Aye A, Han HH, Bock HL, David MP, et al. Reactogenicity and immunogenicity profiles of a novel pentavalent diphtheria-tetanus-whole cell pertussis-hepatitis B and Haemophilus influenzae type B vaccine: a randomized dose-ranging trial of the Hib tetanus-conjugate content. *Pediatr Infect Dis J* 2006 Aug;25(8):706-12.
- (202) Bernatowska E, Klaudel-Dreszler M. [Combined vaccines in European Union]. *Przegl Epidemiol* 2004;58 Suppl 1:44-50.:44-50.

- (203) Ahmed F, Temte JL, Campos-Outcalt D, Schunemann HJ. Methods for developing evidence-based recommendations by the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) of the U.S. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Vaccine* 2011 Nov 15;29(49):9171-6.
- (204) Chokephaibulkit K. Combination vaccines. *J Med Assoc Thai* 2002 Aug;85 Suppl 2:S694-9.:S694-S699.
- (205) Corbel MJ, Xing DK. Toxicity and potency evaluation of pertussis vaccines. *Expert Rev Vaccines* 2004 Feb;3(1):89-101.
- (206) Edwards KM, Decker MD. Combination vaccines consisting of acellular pertussis vaccines. *Pediatr Infect Dis J* 1997 Apr;16(4 Suppl):S97-102.
- (207) Freed GL, Cowan AE, Clark SJ, Santoli J, Bradley J. Use of a new combined vaccine in pediatric practices. *Pediatrics* 2006 Aug;118(2):e251-e257.
- (208) Godfroid F, Denoel P, de GD, Schuerman L, Poolman J. Diphtheria-tetanus-pertussis (DTP) combination vaccines and evaluation of pertussis immune responses. *Int J Med Microbiol* 2004 Oct;294(5):269-76.
- (209) Kitchin NR. Review of diphtheria, tetanus and pertussis vaccines in clinical development. *Expert Rev Vaccines* 2011 May;10(5):605-15.
- (210) Exley C, Swarbrick L, Gherardi RK, Authier FJ. A role for the body burden of aluminium in vaccine-associated macrophagic myofasciitis and chronic fatigue syndrome. *Med Hypotheses* 2009 Feb;72(2):135-9.
- (211) Barbour ML. Conjugate vaccines and the carriage of *Haemophilus influenzae* type b. *Emerg Infect Dis* 1996 Jul;2(3):176-82.
- (212) Breukels MA, Spanjaard L, Sanders LA, Rijkers GT. Immunological characterization of conjugated *Haemophilus influenzae* type b vaccine failure in infants. *Clin Infect Dis* 2001 Jun 15;32(12):1700-5.
- (213) Duke T. *Haemophilus influenzae* type b meningitis: how much better is prevention than cure? *P N G Med J* 2002 Sep;45(3-4):213-8.
- (214) Eskola J. Foresight in medicine: current challenges with *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines. *J Intern Med* 2010 Mar;267(3):241-50.
- (215) Licensure of a diphtheria and tetanus toxoids and acellular pertussis adsorbed, inactivated poliovirus, and haemophilus B conjugate vaccine and guidance for use in infants and children. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2008 Oct 3;57(39):1079-80.
- (216) Khalil MK, Al-Mazrou YY, al-Ghamdi YS. Vaccines: World Health Organization versus Federal Drug Administration recommended formula. *East Mediterr Health J* 2000 Jul;6(4):644-51.

- (217) Pickering LK, Orenstein WA. Development of pediatric vaccine recommendations and policies. *Semin Pediatr Infect Dis* 2002 Jul;13(3):148-54.
- (218) Brennan FR, Dougan G. Non-clinical safety evaluation of novel vaccines and adjuvants: new products, new strategies. *Vaccine* 2005 May 2;23(24):3210-22.
- (219) Nunes MC, Madhi SA. Review of a new fully liquid, hexavalent vaccine: Hexaxim. *Expert Opin Biol Ther* 2013 Apr;13(4):575-93.
- (220) Lyseng-Williamson KA, Dhillon S. DTPa-HBV-IPV/Hib vaccine (Infanrix hexa): a guide to its use in infants. *Paediatr Drugs* 2012 Oct 1;14(5):337-43.
- (221) Frampton JE. DTaP(5)-IPV-Hib vaccine (Pediace(R)). *Paediatr Drugs* 2011 Dec 1;13(6):401-15.
- (222) Dhillon S. Spotlight on DTPa-HBV-IPV/Hib Vaccine (Infanrix hexa). *BioDrugs* 2010 Oct 1;24(5):299-302.
- (223) Frampton JE, Keam SJ. Reduced-antigen, combined diphtheria-tetanus-acellular pertussis vaccine, adsorbed (Boostrix) US formulation): use as a single-dose booster immunization in adolescents aged 10-18 years. *Paediatr Drugs* 2006;8(3):189-95.
- (224) Paradiso PR, Hogerman DA, Madore DV, Keyserling H, King J, Reisinger KS, et al. Safety and immunogenicity of a combined diphtheria, tetanus, pertussis and Haemophilus influenzae type b vaccine in young infants. *Pediatrics* 1993 Dec;92(6):827-32.
- (225) Destexhe E, Prinsen MK, van S, I, Kuper CF, Garcon N, Veenstra S, et al. Evaluation of C-reactive protein as an inflammatory biomarker in rabbits for vaccine nonclinical safety studies. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2013 Apr 23;13(13):10.
- (226) Berner R, Boissard F, Thomas S, Mwawasi G, Reynolds D. Safety and immunogenicity of fully liquid DTaP(5)-IPV-Hib pediatric combination vaccine (Pediace(R)) compared to DTaP(3)-HBV-IPV/Hib (Infanrix(R) Hexa) when coadministered with heptavalent pneumococcal conjugate vaccine (PCV7) as a booster at 11-18 months of age: a phase III, modified double-blind, randomized, controlled, multicenter study. *Vaccine* 2012 Jul 27;30(35):5270-7.
- (227) Langley JM, Halperin SA, Rubin E, White C, McNeil S, Mutch J, et al. Safety and immunogenicity of 2 mixed primary infant immunization schedules of pentavalent diphtheria, tetanus, acellular pertussis, inactivated poliomyelitis, and Haemophilus influenzae Type B vaccines at 2, 4, and 6 months of age: a randomized controlled trial. *Pediatr Infect Dis J* 2012 Feb;31(2):189-92.
- (228) Shao PL, Lu CY, Hsieh YC, Bock HL, Huang LM. Immunogenicity and reactogenicity of diphtheria-tetanus-acellular pertussis-hepatitis B-inactivated poliovirus and Haemophilus influenzae type B. *J Formos Med Assoc* 2011 May;110(5):336-41.

- (229) Morel S, Denoel P, Godfroid F, Cortvrindt C, Vanderheyde N, Poolman J. Induction of Bordetella pertussis-specific immune memory by DTPa vaccines. *Vaccine* 2011 Apr 18;29(18):3449-55.
- (230) David S, Vermeer-de Bondt PE, van der Maas NA. Reactogenicity of infant whole cell pertussis combination vaccine compared with acellular pertussis vaccines with or without simultaneous pneumococcal vaccine in the Netherlands. *Vaccine* 2008 Oct 29;26(46):5883-7.
- (231) Marshall GS, Happe LE, Lunacsek OE, Szymanski MD, Woods CR, Zahn M, et al. Use of combination vaccines is associated with improved coverage rates. *Pediatr Infect Dis J* 2007 Jun;26(6):496-500.
- (232) Weissman IL. Developmental switches in the immune system. *Cell* 1994 Jan 28;76(2):207-18.
- (233) Fuchs TC, Hewitt P. Biomarkers for drug-induced renal damage and nephrotoxicity-an overview for applied toxicology. *AAPS J* 2011 Dec;13(4):615-31.
- (234) Bevan MJ. Understand memory, design better vaccines. *Nat Immunol* 2011 Jun;12(6):463-5.
- (235) Bevan MJ. Memory T cells as an occupying force. *Eur J Immunol* 2011 May;41(5):1192-5.
- (236) Cozine CL, Wolniak KL, Waldschmidt TJ. The primary germinal center response in mice. *Curr Opin Immunol* 2005 Jun;17(3):298-302.
- (237) Chappell CP, Jacob J. Germinal-center-derived B-cell memory. *Adv Exp Med Biol* 2007;590:139-48.:139-48.
- (238) Peled JU, Kuang FL, Iglesias-Ussel MD, Roa S, Kalis SL, Goodman MF, et al. The biochemistry of somatic hypermutation. *Annu Rev Immunol* 2008;26:481-511. doi: 10.1146/annurev.immunol.26.021607.090236.:481-511.
- (239) Shinall SM, Gonzalez-Fernandez M, Noelle RJ, Waldschmidt TJ. Identification of murine germinal center B cell subsets defined by the expression of surface isotypes and differentiation antigens. *J Immunol* 2000 Jun 1;164(11):5729-38.
- (240) Stavnezer J, Guikema JE, Schrader CE. Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annu Rev Immunol* 2008;26:261-92. doi: 10.1146/annurev.immunol.26.021607.090248.:261-92.
- (241) Pulendran B, Ahmed R. Immunological mechanisms of vaccination. *Nat Immunol* 2011 Jun;12(6):509-17.
- (242) Nolan T, Lambert S, Robertson D, Marshall H, Richmond P, Streeton C. DTPa-HBV-IPV vaccine for primary vaccination of infants. *J Paediatr Child Health* 2007 Sep;43(9):587-92.

- (243) Black S, Friedland LR, Schuind A, Howe B. Immunogenicity and safety of a combined DTaP-IPV vaccine compared with separate DTaP and IPV vaccines when administered as pre-school booster doses with a second dose of MMR vaccine to healthy children aged 4-6 years. *Vaccine* 2006 Aug 28;24(35-36):6163-71.
- (244) Duclos P. A global perspective on vaccine safety. *Vaccine* 2004 May 7;22(15-16):2059-63.
- (245) Marshall GS, Gellin BG. Challenges to vaccine safety. *Prim Care* 2001 Dec;28(4):853-68, vii.
- (246) Begue P. [Eradication of infectious diseases and vaccination]. *Bull Acad Natl Med* 2001;185(4):777-84.
- (247) Brenzel L, Wolfson LJ, Fox-Rushby J, Miller M, Halsey NA, Kodama S, et al. Vaccine-preventable Diseases
Nasal immunization with plasmid DNA encoding P6 protein and immunostimulatory complexes elicits nontypeable *Haemophilus influenzae*-specific long-term mucosal immune responses in the nasopharynx. *Vaccine* 2011 Feb 24;29(10):1881-90.
- (248) Loucq C. Vaccines today, vaccines tomorrow: a perspective. *Clin Exp Vaccine Res* 2013 Jan;2(1):4-7.
- (249) Luby SP, Brooks WA, Zaman K, Hossain S, Ahmed T. Infectious diseases and vaccine sciences: strategic directions. *J Health Popul Nutr* 2008 Sep;26(3):295-310.
- (250) Passwell JH. [Vaccines for all occasions]. *Harefuah* 2004 Aug;143(8):576-7, 622.
- (251) Leroux-Roels G. Unmet needs in modern vaccinology: adjuvants to improve the immune response. *Vaccine* 2010 Aug 31;28 Suppl 3:C25-36. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.07.021.:C25-C36.
- (252) Autret-Leca E, Jonville-Bera AP, Beau-Salinas F. [Vaccines pharmacovigilance]. *Rev Prat* 2004 Mar 15;54(5):526-31.
- (253) Ullmann AJ, Karthaus M, Cornely OA. [Vaccination of the immunocompromised host]. *Wien Med Wochenschr* 2004 May;154(9-10):218-25.
- (254) Bell F, Heath P, Maclennan J, Shackley F, Shearstone N, Diggle L, et al. Adverse effects and sero-responses to an acellular pertussis/diphtheria/tetanus vaccine when combined with *Haemophilus influenzae* type b vaccine in an accelerated schedule. *Eur J Pediatr* 1999 Apr;158(4):329-36.
- (255) Halsey NA. Combination vaccines: defining and addressing current safety concerns. *Clin Infect Dis* 2001 Dec 15;33 Suppl 4:S312-8.:S312-S318.
- (256) Beveridge MG, Polcari IC, Burns JL, Adler A, Hendrickson B, Stein SL. Local vaccine site reactions and contact allergy to aluminum. *Pediatr Dermatol* 2012 Jan;29(1):68-72.

-
- (257) Day MJ, Schoon HA, Magnol JP, Saik J, Devauchelle P, Truyen U, et al. A kinetic study of histopathological changes in the subcutis of cats injected with non-adjuvanted and adjuvanted multi-component vaccines. *Vaccine* 2007 May 16;25(20):4073-84.
- (258) Mishra A, Bhalla SR, Rawat S, Bansal V, Sehgal R, Kumar S. Standardization and validation of a new atomic absorption spectroscopy technique for determination and quantitation of aluminium adjuvant in immunobiologics. *Biologicals* 2007 Oct;35(4):277-84.
- (259) Calabro S, Tritto E, Pezzotti A, Taccone M, Muzzi A, Bertholet S, et al. The adjuvant effect of MF59 is due to the oil-in-water emulsion formulation, none of the individual components induce a comparable adjuvant effect. *Vaccine* 2013 May 16;31(13):10.
- (260) Soliakov A, Kelly IF, Lakey JH, Watkinson A. Anthrax sub-unit vaccine: the structural consequences of binding rPA83 to Alhydrogel(R). *Eur J Pharm Biopharm* 2012 Jan;80(1):25-32.
- (261) Decker MD. Combination vaccines. *Prim Care* 2001 Dec;28(4):739-61, vi.
- (262) Subramanyam M, Rinaldi N, Mertsching E, Hutto D, Gad SC. Selection of Relevant Species. *Pharmaceutical Sciences Encyclopedia*. John Wiley & Sons, Inc.; 2010.
- (263) WHO/Draft/NCE_Adjuvanted vaccines. Guidelines on the non clinical evaluation of vaccine adjuvants and adjuvanted vaccines. *Curr.Opin.Pulm.Med.* 4-8-2013.
Ref Type: Unpublished Work
- (264) Gámez R, Más R. Aspectos generales de los estudios toxicológicos preclínicos más empleados. *Revista CENIC Ciencias Biológicas* 2007;38(3):204-8.
- (265) Wiley J. Summary of Combined DTP-HBV-HIB vaccine versus separately administered DTP-HBV and HIB vaccines for primary prevention of diphtheria, tetanus, pertussis, hepatitis B and Haemophilus influenzae B (HIB). *Evid-Based Child Health* 2011;(6):66-7.
- (266) Greenberg DP, Vadheim CM, Partridge S, Chang SJ, Chiu CY, Ward JI. Immunogenicity of Haemophilus influenzae type b tetanus toxoid conjugate vaccine in young infants. The Kaiser-UCLA Vaccine Study Group. *J Infect Dis* 1994 Jul;170(1):76-81.
- (267) Greenberg DP, Vadheim CM, Marcy SM, Partridge S, Jing J, Chiu CY, et al. Safety and immunogenicity of a recombinant hepatitis B vaccine administered to infants at 2, 4 and 6 months of age. The Kaiser-UCLA Vaccine Study Group. *Vaccine* 1996 Jun;14(8):811-6.
- (268) Greenberg DP, Wong VK, Partridge S, Chang SJ, Jing J, Howe BJ, et al. Immunogenicity of a Haemophilus influenzae type b-tetanus toxoid conjugate vaccine when mixed with a diphtheria-tetanus-acellular pertussis-hepatitis B combination vaccine. *Pediatr Infect Dis J* 2000 Dec;19(12):1135-40.
- (269) Greenberg DP, Wong VK, Partridge S, Howe BJ, Ward JI. Safety and immunogenicity of a combination diphtheria-tetanus toxoids-acellular pertussis-hepatitis B vaccine administered

at two, four and six months of age compared with monovalent hepatitis B vaccine administered at birth, one month and six months of age. *Pediatr Infect Dis J* 2002 Aug;21(8):769-77.

- (270) Grimprel E, Wysocki J, Boisnard F, Thomas S, Mwawasi G, Reynolds D. Immunogenicity and safety of fully liquid DTaP(5)-IPV-Hib compared with DTaP(3)-IPV/Hib when both coadministered with a heptavalent pneumococcal conjugate vaccine (PCV7) at 2, 3, 4, and 12 to 18 months of age: a phase III, single-blind, randomised, controlled, multicentre study. *Vaccine* 2011 Oct 6;29(43):7370-8.
- (271) Zepp F, Schuind A, Meyer C, Sanger R, Kaufhold A, Willems P. Safety and reactogenicity of a novel DTPa-HBV-IPV combined vaccine given along with commercial Hib vaccines in comparison with separate concomitant administration of DTPa, Hib, and OPV vaccines in infants. *Pediatrics* 2002 Apr;109(4):e58.
- (272) Kalies H, Grote V, Verstraeten T, Hessel L, Schmitt HJ, von KR. The use of combination vaccines has improved timeliness of vaccination in children. *Pediatr Infect Dis J* 2006 Jun;25(6):507-12.

11. ANEXOS

Figura I. Copia del Informe de análisis del lote de vacuna monovalente empleado en las evaluaciones de Seguridad preclínica.

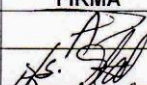
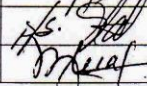
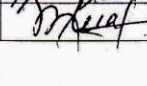
CENTRO DE INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA		SIC-092	PPO 4.09.144.99
		Edición 02	Pág. 1 de 1
INFORME DE ANÁLISIS		FOLIO: 066	
PRODUCTO: Vacuna de Hemófilo		MUESTRA: Lote Final	
No. de control: 12723- 12733	No. de Lote: EH1023E	Presentación: 0.25 mL	Fecha Fabricación:09/08/01
ENSAYOS	ESPECIFICACIONES/REFERENCIAS		RESULTADOS
Características Organolépticas	Líquido transparente, libre de partículas. Visual		Pasa la prueba
Esterilidad	Pasa la prueba USP 24		Pasa la prueba
pH	6.4-7.4 USP 24		6.7
Contenido de PRP	0.032 mg/mL – 0.048 mg/mL Determinación colorimétrica por orcinol		0.036 mg/mL
Identidad del PRP	Aglutina Inmunoidentificación por latex		Pasa el ensayo
Contenido de preservo	0.042-0.120mg/mL Complejometría		0.120 mg/mL
Inocuidad	Conforme BP 98		Conforme
Pirógenos	Pasa la prueba USP 24		Conforme
Inmunogenicidad	Seroconversión de al menos la mitad de los animales del lote y la vacuna control Ensayo de inmunogenicidad en conejos, según el fabricante		100%
Observaciones: Cumple con las especificaciones			
	NOMBRES Y APELLIDOS	FIRMA	FECHA
REALIZADO POR:	Amarilys Rodríguez Arrebato		18/2/02
REVISADO POR:	Lourdes Costa Anguiano		19/02/02
RECIBIDO POR:	Marissa Esteve Lucas		20.03.02

Figura II. Copia del Informe de análisis del lote de adyuvante empleado en las evaluaciones de Seguridad preclínica de la vacuna monovalente.

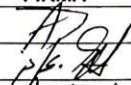
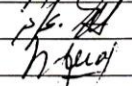
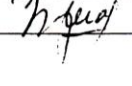
CENTRO DE INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA		SIC-092	PPO 4.09.144.99
		Edición 02	Pág. 1 de 1
INFORME DE ANÁLISIS		FOLIO: 069	
PRODUCTO: Fosfato de Aluminio (Adyuvante para la vacuna conjugada Hib sintético - T)		MUESTRA: Lote Final	
No. de control: 12688 - 12698	No. de Lote: AmpFA 1001T	Presentación: 0.25 mL	Fecha Fabricación:07/08/01
ENSAYOS	ESPECIFICACIONES/REFERENCIAS		RESULTADOS
Características Organolépticas	Suspensión blanco grisácea, libre de partículas. Visual PPO: 4.09.140.98		Pasa la prueba
Esterilidad	Pasa la prueba PPO 4.09.274.94 USP 24		Pasa la prueba
pH	6.4-7.4 PPO 4.09.068.92 USP 24		6.6
Contenido de Aluminio	6.0 mg/mL - 8.1 mg/mL Complejometría PPO 4.09.064.92		7.68 mg/mL
Contenido de Timerosal	0.042 - 0.120mg/mL Espectrofotometría PPO 4.09.062.92		0.108 mg/mL
Inocuidad	Conforme BP 98 PNO: 07001		*
Pirógenos	Pasa la prueba USP 24 PNO: 07002		*
Observaciones:			
*Los ensayos de pirógenos e inocuidad se realizó con el producto final.			
	NOMBRES Y APELLIDOS	FIRMA	FECHA
REALIZADO POR:	Amarilys Rodríguez Arrebato		19/2/02
REVISADO POR:	Lourdes Costa Anguiano		19/2/02
RECIBIDO POR:	Marissa Apestu Lucero		20.03.02



Figura III. Copia del Informe de análisis del lote de vacuna TRIVAC-HB empleado en las evaluaciones de Seguridad preclínica de la vacuna pentavalente.

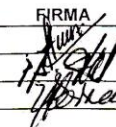
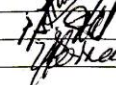
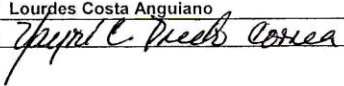
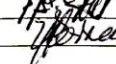
CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA DIRECCION CALIDAD		SIC-092	PPO 4.09.144.99
		Edición 02	Pág. 1 de 1
INFORME DE ANALISIS		FOLIO: 292	
PRODUCTO: Vacuna Tetravalente de Difteria, Tétanos, Pertussis y Hepatitis B recombinante (Trivac HB). Multidosis.			MUESTRA: Producto Final
Nº DE CONTROL: 001	Nº DE LOTE: 3T0101	PRESENTACION: --	FECHA DE FABRICACION: 20/03/03
ENSAYOS	ESPECIFICACIONES/REFERENCIAS	RESULTADOS	
CARACTERISTICAS ORGANOLEPTICAS	Líquido grisáceo libre de partículas, que al estar en reposo se separa en dos fases, un sedimento blanco (adyuvante) y un sobrenadante transparente que al agitarse se resuspende fácilmente. PNO 02.028 *	Líquido grisáceo libre de partículas, que al estar en reposo se separa en dos fases, un sedimento blanco (adyuvante) y un sobrenadante transparente que al agitarse se resuspende fácilmente.	
CONTENIDO DE ALUMINIO	De 0.3 a 0.85 mg/mL PNO 02.028 *	0.75 mg/mL	
VOLUMEN	No menor que el volumen declarado en la etiqueta PNO 02.028 *	No menor que el volumen declarado en la etiqueta	
ESTERILIDAD	PASA LA PRUEBA USP 24 *	Pasa la Prueba	
SEGURIDAD GENERAL	PASA LA PRUEBA PNO 07.001 *	Pasa la Prueba	
CONTENIDO DE TIOMERSAL	De 0.030 a 0.1 mg/mL PNO 02.028 *	0.036 mg/mL	
pH	De 6.4 a 7.7 PNO 02.028 *	6.8	
CONTENIDO DE FORMALDEHIDO	≤ 200 µg/mL PPO 4.09.206.94	12.02 µg/mL	
PORCIENTO DE ADSORCION DEL AgsHB	≥ 95 % PPO 4.09.106.92	99.9 %	
IDENTIDAD DEL AgsHB (ELISA)	Positivo a la Identificación PPO 4.09.038.92	Identificado	
IDENTIDAD DE LA ANATOXINA DIFTERICA	De 40 – 60 Lf/mL Technical Report Series 800, 1990	50 Lf/mL	
IDENTIDAD DE LA ANATOXINA TETANICA	De 16 – 24 Lf/mL Technical Report Series 800, 1990	20 Lf/mL	
IDENTIDAD DE LA BORDETELLA PERTUSSIS	Presencia de los 3 aglutinógenos Technical Report Series 800, 1990	Presencia de los 3 aglutinógenos	
TOXICIDAD DE LA ANATOXINA DIFTERICA	Satisfactorio Pharmacopeia Europea*	Satisfactorio	
TOXICIDAD DE LA ANATOXINA TETANICA	Satisfactorio Pharmacopeia Europea*	Satisfactorio	
TOXICIDAD DE LA BORDETELLA PERTUSSIS	Satisfactorio Pharmacopeia Europea*	Satisfactorio	
POTENCIA IN VIVO DEL AgsHB	Potencia relativa ≥ 0.5 % PPO 4.09.060.92	0.614 %	
POTENCIA DE LA ANATOXINA DIFTERICA	≥ 2 UI/mL Método indirecto 1 (FDA) *	2.136 UI/mL	
POTENCIA DE LA ANATOXINA TETANICA	≥ 2 UI/mL Método indirecto 1 (FDA) *	19.16 UI/mL	
POTENCIA DE LA BORDETELLA PERTUSSIS	≥ 4 UI/dosis L. I. ≥ 2 UI/dosis Technical Report Series 800, 1990 *	8 UI/mL 2 UI/mL	
OBSERVACIONES: CONFORME * Estos ensayos se realizaron en el CNB.			
	NOMBRES Y APELLIDOS	FIRMA	FECHA
REALIZADO POR:	María de los Angeles Denis Cruz		8/07/03
REVISADO POR:	Lourdes Costa Anguiano		8/2/03
RECIBIDO POR:			5/2/03

Figura IV. Copia del Informe de análisis del lote de vacuna monovalente empleado en las evaluaciones de Seguridad preclínica de la vacuna pentavalente.

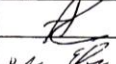
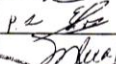

CENTRO DE INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA		SIC-092	PPO 4.09.144.99
		Edición 02	Pág. 1 de 1
INFORME DE ANÁLISIS		FOLIO: 0125	
PRODUCTO: Vacuna de Hemófilo		MUESTRA: Lote Final	
No. de control: 238 - 249	No. de Lote: EH2003E	Presentación: 0.25 mL	Fecha Fabricación:12/102
ENSAYOS	ESPECIFICACIONES/REFERENCIAS		RESULTADOS
Características Organolépticas	Líquido transparente, libre de partículas. Visual		Pasa la prueba
Esterilidad	Pasa la prueba USP 24		Pasa la prueba
pH	6.4-7.4 USP 24		6.8
Contenido de PRP	0.032 mg/mL – 0.048 mg/mL Determinación colorimétrica por orcinol		0.037 mg/mL
Identidad del PRP	Aglutina Inmunoidentificación por latex		Pasa el ensayo
Contenido de preservo	0.042-0.120mg/mL Complejometría		0.042 mg/mL
Inocuidad	Conforme BP 98		Conforme
Pirógenos	Pasa la prueba USP 24		Conforme
Inmunogenicidad	Seroconversión de al menos la mitad de los animales del lote y la vacuna control Ensayo de inmunogenicidad en conejos, según el fabricante		100%
Observaciones: Cumple con las especificaciones			
	NOMBRES Y APELLIDOS	FIRMA	FECHA
REALIZADO POR:	Amarilys Rodríguez Arrebato		20/3/02
REVISADO POR:	Lourdes Costa Anguiano		20-03-02
REVISADO POR:	Marissa Plata Torres		20 03 02



Figura V. Copia del Informe de análisis del lote de vacuna monovalente empleado en las evaluaciones de Seguridad preclínica de la vacuna pentavalente.

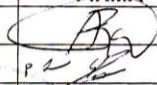
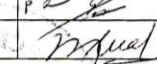
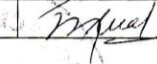
CENTRO DE INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA		SIC-092	PPO 4.09.144.99
		Edición 02	Pág. 1 de 1
INFORME DE ANÁLISIS		FOLIO: 0124	
PRODUCTO: Vacuna de Hemófilo		MUESTRA: Lote Final	
No. de control: 226 - 237	No. de Lote: EH2002E	Presentación: 0.25 mL	Fecha Fabricación:12/1/02
ENSAYOS	ESPECIFICACIONES/REFERENCIAS		RESULTADOS
Características Organolépticas	Líquido transparente, libre de partículas. Visual		Pasa la prueba
Esterilidad	Pasa la prueba USP 24		Pasa la prueba
pH	6.4-7.4 USP 24		6.8
Contenido de PRP	0.032 mg/mL – 0.048 mg/mL Determinación colorimétrica por orcinol		0.036 mg/mL
Identidad del PRP	Aglutina Inmunoidentificación por latex		Pasa el ensayo
Contenido de preservo	0.042-0.120mg/mL Complejometría		0.045 mg/mL
Inocuidad	Conforme BP 98		Conforme
Pirógenos	Pasa la prueba USP 24		Conforme
Inmunogenicidad	Seroconversión de al menos la mitad de los animales del lote y la vacuna control Ensayo de inmunogenicidad en conejos, según el fabricante		100%
Observaciones: Cumple con las especificaciones			
	NOMBRES Y APELLIDOS	FIRMA	FECHA
REALIZADO POR:	Amarily Rodríguez Arrebato		20/3/02
ELABORADO POR:	Lourdes Costa Anguiano		20-03-02
RECIBIDO POR:	Marissa Méndez Torres		20.03.02



Figura VI. Copia del Informe de análisis del lote de vacuna monovalente empleado en las evaluaciones de Seguridad preclínica de la vacuna pentavalente.




CENTRO DE INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA		SIC-092	PPO 4.09.144.99
DIRECCIÓN DE CALIDAD		Edición 02	Pág. 1 de 1
INFORME DE ANÁLISIS		FOLIO: 0266	
PRODUCTO: Vacuna de Hemófilo		MUESTRA: Producto Final	
No. de control: 832-840	No. de Lote: EH2009 E	Presentación: 0.25 mL	Fecha Fabricación: 01/03/02
ENSAYOS	ESPECIFICACIONES/REFERENCIAS		RESULTADOS
Identidad del PRP	Aglutina Inmunoidentificación por latex		Pasa el ensayo
Carbohidratos totales	PPO: 4.09.055.02 De 0.032 a 0.048 mg/mL		0.037 mg/mL
% Carbohidratos libres	PPO: 4.09.055.02 ≤ 20 %		< 12.5 %
Inmunogenicidad	Ensayo en conejos, según el fabricante ≥ 50 % Seroconversión		80 %
Esterilidad	Pasa la prueba USP 24, PPO: 4.09.274.94		Pasa la prueba
Inocuidad	Conforme BP 98, PNO 07.001		Conforme
Pirógenos	Conforme USP 24, PNO 07.002		Conforme
Características Organolépticas	Líquido transparente, libre de partículas. Visual PPO 4.09.140.98		Pasa la prueba
pH	6.4 -7.4 USP 24, PPO: 4.09.068.92		6.8
Contenido de timerosal	0.042-0.120mg/mL PPO 4.09.062.92		0.044 mg/mL
Observaciones: Cumple con las especificaciones.			
	NOMBRES Y APELLIDOS	FIRMA	FECHA
REALIZADO POR:	Yanet Alderete Avalos		22/05/02
REVISADO POR:	Lourdes Costa Anguiano		27/5/02
RECIBIDO POR:	Araceli Vázquez Campesí		16/2/04

Figura VII. Copia del Informe de análisis del lote del placebo TRIVAC-HB empleado en las evaluaciones de Seguridad preclínica de la vacuna pentavalente.



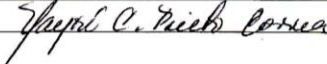




CENTRO DE INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA		SIC-092	PPO 4.09.144.99
DIRECCIÓN DE CALIDAD		Edición 02	Pág. 1 de 1
INFORME DE ANÁLISIS		FOLIO: 054	
PRODUCTO: TRIVAC-HB		MUESTRA: Placebo	
No. de Control: 2063-2068	No. de Lote: P03I	Presentación: --	Fecha de Fabricación: 16/07/03
ENSAYOS	ESPECIFICACIONES/REFERENCIAS	RESULTADOS	
INOCUIDAD	--	Pasa la prueba	
PIRÓGENOS	--	Pasa la prueba	
CARACTERÍSTICAS ORGANOLEPTICAS	--	Pasa la prueba	
ALUMINIO	--	0.88 mg/mL	
ESTERILIDAD	--	Pasa la prueba	
TIOMERSAL	--	0.064 mg/mL	
Observaciones:			
	NOMBRES Y APELLIDOS	FIRMA	FECHA
REALIZADO POR:	Yanet Alderete Avalos		27/01/04
REVISADO POR:	Lourdes Costa Anguiano		30/1/04
RECIBIDO POR:			5/2/04



Figura VIII. Copia del Informe de análisis del lote del placebo Quimi-Hib empleado en las evaluaciones de Seguridad preclínica de la vacuna pentavalente.

CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA		SIC-092	PPO 4.09.144.99
DIRECCION DE CALIDAD		Edición 02	Pág. 1 de 1
INFORME DE ANALISIS		FOLIO: 612	
PRODUCTO: Vacuna conjugada Hib sintético -T			MUESTRA: Placebo
N° DE CONTROL: 2680- 2685	N° DE LOTE: PH3001E	PRESENTACION: --	FECHA DE FABRICACION: 11/09/03
ENSAYOS	ESPECIFICACIONES/REFERENCIAS	RESULTADOS	
Características Organolepticas	--	Pasa la prueba	
pH	--	6.73	
Contenido de timerosal	--	0.053 mg/mL	
Esterilidad	-	Pasa la prueba	
Pirógenos	--	Pasa la prueba	
Inocuidad	--	Pasa la prueba	
OBSERVACIONES:			
	NOMBRES Y APELLIDOS	FIRMA	FECHA
REALIZADO POR:	Yanet Alderete Avalos		22/10/03
REVISADO POR:	José Luis Marcelo		23/10/03
RECIBIDO POR:	Olivia Vázquez Lugo		24/10/03

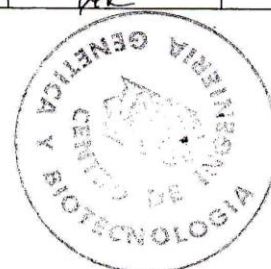


Figura IX. Copia del Certificado de salud de los animales empleados en el estudio de Toxicidad aguda de la vacuna Quimi-Hib.

División Roedores Gnotobióticos
CENPALAB
CENTRO NACIONAL PARA LA PRODUCCION DE ANIMALES DE LABORATORIO

RG.CC.02.95
No. **023**

Certificado de Salud

Especie: Rata		Sistema protegido de origen: SPH			
Línea: Cerp: SD	Número de lote: 3943101		Total de cajas: 10		
Total: 180 Machos 90 Hembras 90		Peso: 51-78g		Edad: 24-29 días	
Centro de destino: CIGB / Toxicología					
Fecha de expedición: 26 / 9 / 01			Hora de expedición: 11:05 am		

EXAMEN CLINICO:

Los animales a la inspección clínica no muestran desviaciones de los parámetros de salud establecidos para esta especie y línea, cumpliendo con las especificaciones de calidad dadas por el productor.

BACTERIOLOGIA * RESULTADOS						RESULTADOS					
Entidad	Método	Pos	Neg	No testado	Fecha	Entidad	Método	Pos	Neg	No testado	Fecha
Salmonella spp.	Cult/Serot		X		03/08/01	Streptococcus pneumoniae	Cult/Serot		X		03/08/01
Streptobacillus moniliformis	Cult/Serot		X		10/3/00	Pasteurella pneumotropica	ELISA		X		23/05/01
Streptococcus β hemolítico	Cult/Serot		X		03/08/01	Clostridium piliformis	Insp.Clin		X		12/2/01
Bordetella bronchiseptica	ELISA		X		23/05/01	Leptospira spp.	ELISA		X		23/05/01
Corynebacterium kutscheri	Cult/ELISA		X		03/08/01	Mycoplasma arthritis	ELISA		X		24/05/01
Helicobacter sp	Cultivo		X		12/2/01						

PARASITOLOGIA * RESULTADOS						PATOLOGIA * RESULTADOS					
ENTIDAD	Método	Pos	Neg	No testado	Fecha	Examen macroscópico: 02/08/01					
Endoparásitos.	DIR/FLOT		X		01/08/01	No se observan lesiones macroscópicas compatibles con alteraciones patológicas					
Toxoplasma gondii	ELISA		X		23/05/01						
Trichosomoides crassicuuda	Sediment.		X		09/05/01						
Ectoparásitos.	InspClínica		X		01/08/01						

VIRUSOLOGIA * (SEROLOGIA) RESULTADOS						RESULTADOS					
Entidad	Método	Pos	Neg	No testado	Fecha	Entidad	Método	Pos	Neg	No testado	Fecha
Virus Sialodacryadenitis/ Virus corona (SDAV/RCV)	ELISA		X		18/08/01	Virus Sendai	ELISA		X		18/08/01
Virus Pneumonia (PVM)	ELISA		X		18/08/01	Reovirus Tipo 3 (REO 3)	IFA		X		18/08/01
Virus encefalomieltitis Theiler (TMEV)	ELISA		X		18/08/01	Virus Kilham (KRV)	IFA		X		18/08/01
Virus Toolan (H-1)	IFA		X		18/08/01						
Coriomeningitis linfocitaria (LCM)	IFA		X		21/2/01	Mycoplasma pulmonis	ELISA		X		18/08/01

* Según lo certificado por la División de Aseguramiento de la calidad del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio, de acuerdo al cronograma de monitoreo de los roedores criados y mantenidos en sistemas protegidos y que consta en los archivos de nuestra Institución. Válido a partir del 20/08/01 hasta Noviembre del año 2001

Aprobado por:


Especialista de Aseguramiento de la Calidad

Vto. Bno.:


División de Roedores Gnotobióticos

Figura X. Copia del Certificado de salud de los animales empleados en el estudio de Toxicidad a dosis repetidas de la vacuna Quimi-Hib.

División Roedores Gnotobióticos
CENPALAB
CENTRO NACIONAL PARA LA PRODUCCIÓN DE ANIMALES DE LABORATORIO

RG.CC.02.95
No. **0323**

Certificado de Salud

Especie: Rata		Sistema protegido de origen: SPH	
Línea: Cenp: SD	Número de lote: 4348401	Total de cajas: 6	
Total: 180 Machos 90 Hembras 90	Peso: 51-75g	Edad: 4-5aem	
Centro de destino: CIGA			
Fecha de expedición: 24/10/01		Hora de expedición: 10:15 am	

EXAMEN CLINICO:

Los animales a la inspección clínica no muestran desviaciones de los parámetros de salud establecidos para esta especie y línea, cumpliendo con las especificaciones de calidad dadas por el productor.

BACTERIOLOGIA *						RESULTADOS						RESULTADOS					
Entidad	Método	Pos	Neg	No testado	Fecha	Entidad	Método	Pos	Neg	No testado	Fecha	Entidad	Método	Pos	Neg	No testado	Fecha
Salmonella spp.	Cult/Serot		X		03/08/01	Streptococcus pneumoniae	Cult/Serot		X		03/08/01	Streptococcus pneumoniae	Cult/Serot		X		03/08/01
Streptobacillus moniliformis	Cult/Serot		X		10/3/00	Pasteurella pneumotropica	ELISA		X		23/05/01	Pasteurella pneumotropica	ELISA		X		23/05/01
Streptococcus β hemolítico	Cult/Serot		X		03/08/01	Clostridium piliformis	Insp.Clin		X		12/2/01	Clostridium piliformis	Insp.Clin		X		12/2/01
Bordetella bronchiseptica	ELISA		X		23/05/01	Leptospira spp.	ELISA		X		23/05/01	Leptospira spp.	ELISA		X		23/05/01
Corynebacterium kutscheri	Cult/ELISA		X		03/08/01	Mycoplasma arthritis	ELISA		X		24/05/01	Mycoplasma arthritis	ELISA		X		24/05/01
Helicobacter sp	Cultivo		X		12/2/01												

PARASITOLOGIA *						RESULTADOS						PATOLOGIA *						RESULTADOS					
ENTIDAD	Método	Pos	Neg	No testado	Fecha	Examen macroscópico: 02/08/01																	
Endoparásitos.	DIR/FLOT		X		01/08/01	No se observan lesiones macroscópicas compatibles con alteraciones patológicas																	
Toxoplasma gondii	ELISA		X		23/05/01																		
Trichosomoides crassicuuda	Sediment.		X		09/05/01																		
Ectoparásitos.	InspClínica		X		01/08/01																		

VIRIOLOGIA * (SEROLOGIA)						RESULTADOS						RESULTADOS					
Entidad	Método	Pos	Neg	No testado	Fecha	Entidad	Método	Pos	Neg	No testado	Fecha	Entidad	Método	Pos	Neg	No testado	Fecha
Virus Sialodacryadenitis/ Virus corona (SDAV/RCV)	ELISA		X		18/08/01	Virus Sendai	ELISA		X		18/08/01	Virus Sendai	ELISA		X		18/08/01
Virus Pneumonia (PVM)	ELISA		X		18/08/01	Reovirus Tipo 3 (REO 3)	IFA		X		18/08/01	Reovirus Tipo 3 (REO 3)	IFA		X		18/08/01
Virus encefalomielitidis Theiler (TMEV)	ELISA		X		18/08/01	Virus Kilham (KRV)	IFA		X		18/08/01	Virus Kilham (KRV)	IFA		X		18/08/01
Virus Toolan (H-1)	IFA		X		18/08/01												
Coriomeningitis linfocitaria (LCM)	IFA		X		21/2/01	Mycoplasma pulmonis	ELISA		X		18/08/01	Mycoplasma pulmonis	ELISA		X		18/08/01

* Según lo certificado por la División de Aseguramiento de la calidad del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio, de acuerdo al cronograma de monitoreo de los roedores criados y mantenidos en sistemas protegidos y que consta en los archivos de nuestra Institución. Válido a partir del 20/08/01 hasta Noviembre del año 2001

Aprobado por:

ASSEGURAMIENTO DE LA CALIDAD
CENPALAB
Especialista de Aseguramiento de la Calidad

Vto. Bno.:

División de Roedores Gnotobióticos

Figura XI. Copia del Certificado de salud de los animales empleados en el estudio de Tolerancia local de la vacuna Quimi-Hib.

División Roedores Gnotobióticos
CENPALAB
CENTRO NACIONAL PARA LA PRODUCCIÓN DE ANIMALES DE LABORATORIO

RG.CC.02.95
No. **0071**

Certificado de Salud

Especie: Rata		Sistema protegido de origen: SPH	
Línea: Cenp: SD	Número de lote: 013007002	Total de cajas: 4	
Total: 80	Machos 40	Hembras 40	Peso: 50-60g
Centro de destino: CIOB		Edad: 4 sem	
Fecha de expedición: 27/3/02		Hora de expedición: 10:45am	

EXAMEN CLINICO

Los animales a la inspección clínica no muestran desviaciones de los parámetros de salud establecidos para esta especie y línea, cumpliendo con las especificaciones de calidad dadas por el productor.

BACTERIOLOGIA *						RESULTADOS					
Entidad	Método	Pos	Neg	No testado	Fecha	Entidad	Método	Pos	Neg	No testado	Fecha
Salmonella spp.	Cult/Serot		X		11/02/02	Streptococcus pneumoniae	Cult/Serot		X		11/02/02
Streptobacillus moniliformis	Cult/Serot		X		10/3/00	Pasteurella pneumotropica	ELISA		X		14/11/01
Streptococcus β hemolítico	Cult/Serot		X		11/02/02	Clostridium piliformis	Insp.Clin		X		11/02/02
Bordetella bronchiseptica	ELISA		X		14/11/01	Leptospira spp.	ELISA		X		23/05/01
Corynebacterium kutscheri	Cult/ELISA		X		11/02/02	Mycoplasma arthritidis	ELISA		X		14/11/01
Helicobacter sp	Cultivo		X		11/02/02						

PARASITOLOGIA *						PATOLOGIA *					
ENTIDAD	Método	Pos	Neg	No testado	Fecha	RESULTADOS					
Endoparásitos.	DIR/FLOT		X		5/02/02	Examen macroscópico: 11/02/02					
Toxoplasma gondii	ELISA		X		23/05/01	No se observan lesiones macroscópicas compatibles con alteraciones patológicas					
Trichosomoides crassicauda	Sediment.		X		5/02/02						
Ectoparásitos.	InspClínica		X		5/02/02						

VIROLOGIA * (SEROLOGIA)						RESULTADOS					
Entidad	Método	Pos	Neg	No testado	Fecha	Entidad	Método	Pos	Neg	No testado	Fecha
Virus Sialodacryadenitis/ Virus corona (SDAV/RCV)	ELISA		X		18/08/01	Virus Sendai	ELISA		X		18/08/01
Virus Pneumonia (PVM)	ELISA		X		18/08/01	Reovirus Tipo 3 (REO 3)	IFA		X		18/08/01
Virus encefalomiélitis Theiler (TMEV)	ELISA		X		18/08/01	Virus Kilham (KRV)	IFA		X		18/08/01
Virus Toolan (H-1)	IFA		X		18/08/01						
Coriomeningitis linfocitaria (LCM)	IFA		X		21/2/01	Mycoplasma pulmonis	ELISA		X		18/08/01

* Según lo certificado por la División de Aseguramiento de la calidad del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio, de acuerdo al cronograma de monitoreo de los roedores criados y mantenidos en sistemas protegidos y que consta en los archivos de nuestra Institución. Válido a partir del Febrero 2002 hasta Mayo del año 2002

probado por:


ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD
CENPALAB
 Especialista de Aseguramiento de la calidad

Vto. Bno.:


 División de Roedores Gnotobióticos

Figura XII. Copia del Certificado de salud de los animales empleados en el estudio de Toxicidad aguda de la vacuna TRIVAC-HB + Quimi-Hib.

División Roedores Gnotobióticos
CENPALAB
CENTRO NACIONAL PARA LA PRODUCCIÓN DE ANIMALES DE LABORATORIO

RG.CC.02.95
No. 0050

Certificado de Salud

Especie: Rata		Sistema protegido de origen: SPH			
Línea: Cerp: SD		Número de lote: 13 04904		Total de cajas:	
Total: 80 Machos 40		Hembras 40		Peso: 51-75g	
Centro de destino: CIQB		Edad: 4-5 semanas			
Fecha de expedición: 31 / 3 / 04				Hora de expedición: 9:30am	

EXAMEN CLINICO

Los animales a la inspección clínica no muestran desviaciones de los parámetros de salud establecidos para esta especie y línea, cumpliendo con las especificaciones de calidad dadas por el productor.

BACTERIOLOGIA * RESULTADOS						RESULTADOS					
Entidad	Método	Pos	Neg	No testado	Fecha	Entidad	Método	Pos	Neg	No testado	Fecha
Salmonella spp.	Cult/Serot		X		18/11/03	Streptococcus pneumoniae	Cult/Serot		X		18/11/03
Streptobacillus moniliformis	Cult/Serot		X		18/11/03	Pasteurella pneumotropica	Cultivo		X		18/11/03
Streptococcus β hemolítico	Cult/Serot		X		18/11/03	Clostridium piliformis	Insp.Clin		X		18/02/03
Bordetella bronchiseptica	Cultivo		X		18/11/03	Leptospira spp.	MAT		X		5/12/03
Corynebacterium kutscheri	Cultivo		X		18/11/03	Mycoplasma arthritis	ELISA		X		5/12/03
Helicobacter sp	Cultivo		X		18/02/03						

PARASITOLOGIA * RESULTADOS						PATOLOGIA * RESULTADOS					
ENTIDAD	Método	Pos	Neg	No testado	Fecha	Examen macroscópico: 22/07/03					
Endoparásitos	DIR/FLOT		X		11/11/03	No se observan lesiones macroscópicas compatibles con alteraciones patológicas					
Toxoplasma gondii	ELISA		X		23/05/01						
Trichosomoides crassicuuda	Sediment.		X		11/11/03						
Ectoparásitos	InspClínica		X		11/11/03						

VIRUSLOGIA * (SEROLOGIA) RESULTADOS						RESULTADOS					
Entidad	Método	Pos	Neg	No testado	Fecha	Entidad	Método	Pos	Neg	No testado	Fecha
Virus Sialodacryadenitis/ Virus corona (SDAV/RCV)	IFA		X		23/07/03	Virus Sendai	IFA		X		23/07/03
Virus Pneumonia (PVM)	IFA		X		23/07/03	Reovirus Tipo 3 (REO 3)	IFA		X		23/07/03
Virus encefalomiелitis Theiler (TMEV)	IFA		X		23/07/03	Virus Kilham (KRV)	IFA		X		23/07/03
Virus Toolan (H-1)	IFA		X		23/07/03						
Coriomeningitis linfocitaria (LCM)	IFA		X		23/07/03	Mycoplasma pulmonis	ELISA			X	23/07/03

* Según lo certificado por la División de Aseguramiento de la calidad del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio, de acuerdo al cronograma de monitoreo de los roedores criados y mantenidos en sistemas protegidos y que consta en los archivos de nuestra Institución. Válido a partir de Noviembre/2003 hasta el mes de Mayo/2004.

Aprobado por

CENPALAB
Grupo Aseguramiento de la Calidad
Especialista de Aseguramiento de la Calidad

Vto. Bno.:

División de Roedores Gnotobióticos

Figura XIII. Copia del Certificado de salud de los animales empleados en el estudio de Tolerancia local de la vacuna TRIVAC-HB + Quimi-Hib.

División Roedores Gnotobióticos
CENPALAB
CENTRO NACIONAL PARA LA PRODUCCIÓN DE ANIMALES DE LABORATORIO

RG.CC.02.95
No. 0079

Certificado de Salud

Especie: Rata		Sistema protegido de origen: SPH	
Línea: Cerp: SD	Número de lote: 18006204		Total de cajas: 2
Total: 55 Machos 55 Hembras -	Peso: 51-75 g		Edad: 24-28 días
Centro de destino: 1163			
Fecha de expedición: 5/14/04		Hora de expedición: 10:30 AM	

EXAMEN CLINICO

Los animales a la inspección clínica no muestran desviaciones de los parámetros de salud establecidos para esta especie y línea, cumpliendo con las especificaciones de calidad dadas por el productor.

BACTERIOLOGIA * RESULTADOS						RESULTADOS					
Entidad	Método	Pos	Neg	No testado	Fecha	Entidad	Método	Pos	Neg	No testado	Fecha
Salmonella spp.	Cult/Serot		X		09/02/04	Streptococcus pneumoniae	Cult/Serot		X		09/02/04
Streptobacillus moniliformis	Cult/Serot		X		18/11/03	Pasteurella pneumotropica	Cultivo		X		09/02/04
Streptococcus β hemolítico	Cult/Serot		X		09/02/04	Clostridium piliformis	Insp.Clin		X		09/02/04
Bordetella bronchiseptica	Cultivo		X		09/02/04	Leptospira spp.	MAT		X		5/12/03
Corynebacterium kutscheri	Cultivo		X		18/11/03	Mycoplasma arthritis	ELISA		X		5/12/03
Helicobacter sp	Cultivo		X		09/02/04						

PARASITOLOGIA * RESULTADOS						PATOLOGIA * RESULTADOS	
ENTIDAD	Método	Pos	Neg	No testado	Fecha	Examen macroscópico: 05/02/04	
Endoparásitos.	DIR/FLOT		X		04/02/04	No se observan lesiones macroscópicas compatibles con alteraciones patológicas	
Toxoplasma gondii	ELISA		X		23/05/01		
Trichosomoides crassicauda	Sediment.		X		04/02/04		
Ectoparásitos.	InspClínica		X		04/02/04		

VIRIOLOGIA * (SEROLOGIA) RESULTADOS						RESULTADOS					
Entidad	Método	Pos	Neg	No testado	Fecha	Entidad	Método	Pos	Neg	No testado	Fecha
Virus Sialodacryadenitis/ Virus corona (SDAV/RCV)	IFA		X		19/02/04	Virus Sendai	IFA		X		19/02/04
Virus Pneumonia (PVM)	IFA		X		19/02/04	Reovirus Tipo 3 (REO 3)	IFA		X		19/02/04
Virus encefalomielitidis Theiler (TMEV)	IFA		X		19/02/04	Virus Kilham (KRV)	IFA		X		19/02/04
Virus Toolan (H-1)	IFA		X		19/02/04						
Coriomeningitis linfocitaria (LCM)	IFA		X		19/02/04	Mycoplasma pulmonis	ELISA			X	19/02/04

* Según lo certificado por la División de Aseguramiento de la calidad del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio, de acuerdo al cronograma de monitoreo de los roedores criados y mantenidos en sistemas protegidos y que consta en los archivos de nuestra Institución. Válido a partir de Febrero/2004 hasta Junio 2004.

Aprobado por

CENPALAB
Grupo Aseguramiento
Especialista de Aseguramiento de la Calidad

Vto. Bno.

CENPALAB
División de Roedores Gnotobióticos

Figura XIV. Copia del Certificado de salud de los animales empleados en el estudio de Toxicidad a dosis repetidas de la vacuna TRIVAC-HB + Quimi-Hib.

CENPALAB REG-CC-0295

Certificado de Salud 0177

Especie: Rata		Sistema protegido de origen: SPH	
Línea: Cemp: SD	Número de lote: 3609604	Total de cajas: 12	
Total: 120 Machos 85 Hembras 85	Peso: 51-75g	Edad: 4-5 semanas	
Centro de destino: CIGUB		Fecha de expedición: 8/9/04	
		Hora de expedición: 10:00 am	

EXAMEN CLINICO

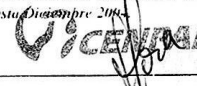
Los animales a la inspección clínica no muestran desviaciones de los parámetros de salud establecidos para esta especie y línea, cumpliendo con las especificaciones de calidad dadas por el productor.

BACTERIOLOGIA * RESULTADOS						RESULTADOS					
Entidad	Método	Pos	Neg	No testado	Fecha	Entidad	Método	Pos	Neg	No testado	Fecha
Salmonella spp	Cult/Serot		X		23/07/04	Streptococcus pneumoniae	Cult/Serot		X		28/07/04
Streptobacillus moniliformis	Cult/Serot		X		18/11/03	Pasteurella pneumotropica	ELISA		X		20/07/04
Streptococcus hemolítico	Cult/Serot		X		23/07/04	Clostridium piliformis	Insp Clin		X		09/02/04
Bordetella bronchiseptica	ELISA		X		23/07/04	Leptospira spp	MAT		X		03/06/04
Corynebacterium Kutscheri	Cultivo		X		23/07/04	Mycoplasma arthritis	ELISA		X		5/12/02
Helicobacter sp	Cultivo		X		09/02/04						

PARASITOLOGIA * RESULTADOS						PATOLOGIA * RESULTADOS					
ENTIDAD	Método	Pos	Neg	No testado	Fecha	Examen macroscópico 20/07/04					
Endoparasitos	DIR/FLOT		X		20/07/04	No se observan lesiones macroscópicas compatibles con alteraciones patológicas					
Toxoplasma gondii	ELISA		X		23/05/01						
Trichosomoides crassicauda	Sediment.		X		20/07/04						
Ectoparasitos	Insp Clínica		X		20/07/04						

VIROLOGIA * (SEROLOGIA) RESULTADOS						RESULTADOS					
Entidad	Método	Pos	Neg	No testado	Fecha	Entidad	Método	Pos	Neg	No testado	Fecha
Virus Sialodacryadenitis/ Virus corona (SDAV/RCV)	IFA		X		02/08/04	Virus Sendai	IFA		X		19/02/04
Virus Pneumonia (PVM)	IFA		X		02/08/04	Reovirus Tipo 3 (REO 3)	IFA		X		02/08/04
Virus encefalomielitico Theiler (TMEV)	IFA		X		02/08/04	Virus Kihnam (KRV)	IFA		X		02/08/04
Virus Toxian (H-1)	IFA		X		02/08/04						
Coniomeningitis linfocitaria (LCM)	IFA		X		02/08/04	Mycoplasma pulmonis	ELISA			X	19/02/04

Según lo certificado por la División de Aseguramiento de la Calidad del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio, de acuerdo al cronograma de monitoreo de los reproductores criados y mantenidos en sistemas protegidos y que consta en los archivos de nuestra institución. Válido a partir de agosto 2004 hasta Diciembre 2004.

Aprobado por: 
 Grupo Aseguramiento Especialista de Aseguramiento de la Calidad

Vto. Bno. 
 División de Reproductores Genéticos CENPALAB

Tabla I. Valores promedios de alimento consumido (media \pm DS) y valores de p entre grupos en cada tiempo de pesaje. Estudio: Evaluación de la Toxicidad Aguda de la vacuna Quimi-Hib.

Grupo	Tiempo (Días)											
	1 (p=0.577)	2 (p=0.191)	3 (p=0.564)	4 (p=0.964)	5 y 6 (p=0.701)	7 (p=0.659)	8 (p=0.433)	9 (p=0.936)	10 (p=0.983)	11 (p=0.767)	12 y 13 (p=0.683)	14 (p=0.824)
I	17.3 \pm 1.59	17.0 \pm 1.94	17.7 \pm 3.56	18.1 \pm 2.64	40.7 \pm 6.75	18.6 \pm 3.31	18.6 \pm 2.50	19.2 \pm 2.49	18.9 \pm 3.45	18.8 \pm 3.91	41.3 \pm 6.20	18.3 \pm 4.29
II	16.7 \pm 1.26	17.0 \pm 1.41	18.4 \pm 1.56	18.3 \pm 2.31	39.0 \pm 3.59	17.9 \pm 3.14	18.4 \pm 2.27	19.1 \pm 3.28	19.1 \pm 2.56	20.3 \pm 5.71	39.6 \pm 6.75	19.9 \pm 4.70
III	17.2 \pm 1.77	15.7 \pm 1.42	17.6 \pm 1.46	7.6 \pm 2.18	38.7 \pm 4.78	18.3 \pm 2.75	18.2 \pm 4.19	18.3 \pm 3.65	18.7 \pm 3.40	19.1 \pm 2.56	39.7 \pm 7.33	20.0 \pm 4.13
IV	18.8 \pm 3.54	16.9 \pm 2.33	18.8 \pm 3.96	17.9 \pm 4.70	41.1 \pm 6.31	19.6 \pm 3.27	20.9 \pm 4.03	18.8 \pm 4.10	19.4 \pm 4.74	19.7 \pm 3.20	42.2 \pm 8.24	19.6 \pm 4.93

Tabla II. Valores promedios de peso corporal en animales hembras (media \pm DS) y valores de *p* entre grupos por semana de tratamiento. Estudio: Evaluación de la Toxicidad a Dosis Repetidas de la vacuna Quimi-Hib.

Grupo	Día 1 (p=0.768)	Día 7 (p=0.122)	Día 14 (p=0.190)
I	94.4 \pm 10.7	129.4 \pm 13.9	151.4 \pm 14.8
II	99.6 \pm 6.50	135.2 \pm 9.48	159.9 \pm 14.0
III	91.1 \pm 3.93	131.0 \pm 7.53	153.9 \pm 9.46
IV	95.7 \pm 8.72	138.7 \pm 9.27	161.5 \pm 11.8
V	99.9 \pm 8.41	141.3 \pm 12.9	166.8 \pm 16.9
VI	93.3 \pm 6.38	131.8 \pm 8.83	156.1 \pm 11.0

Tabla III. Valores promedios de peso corporal en animales machos (media \pm DS) y valores de *p* entre grupos por semana de tratamiento. Estudio: Evaluación de la Toxicidad a Dosis Repetidas de la vacuna Quimi- Hib.

Grupo	Día 1 (p=0.768)	Día 7 (p=0.842)	Día 14 (p=0.953)
I	99.2 \pm 13.8	152.4 \pm 14.9	198.0 \pm 17.4
II	100.0 \pm 7.75	156.5 \pm 14.4	202.7 \pm 16.7
III	100.3 \pm 11.9	160.4 \pm 13.3	210.3 \pm 15.5
IV	96.6 \pm 11.9	154.6 \pm 18.1	202.0 \pm 21.9
V	99.6 \pm 8.58	154.3 \pm 8.51	208.6 \pm 32.9
VI	101.2 \pm 10.1	153.2 \pm 10.8	194.1 \pm 10.9

Tabla IV. Valores promedios de alimento consumido en animales hembras (media \pm DS) y valores de p entre grupos por semana de tratamiento. Estudio: Evaluación de la Toxicidad a Dosis Repetidas de la vacuna Quimi-Hib.

Grupo	Tiempo (Días)											
	1 (p=0.282)	2 (p=0.418)	3 (p=0.391)	4 (p=0.545)	5 y 6 (p=0.753)	7 (p=0.350)	8 (p=0.150)	9 (p=0.925)	10 (p=0.751)	11 (p=0.149)	12 y 13 (p=0.944)	14 (p=0.369)
I	15.4 \pm 1.52	15.8 \pm 1.30	16.0 \pm 2.12	16.4 \pm 0.55	32.0 \pm 4.24	14.0 \pm 1.41	15.6 \pm 1.82	17.2 \pm 2.05	16.8 \pm 3.49	16.0 \pm 2.55	33.2 \pm 3.03	16.8 \pm 1.92
II	16.5 \pm 1.96	17.4 \pm 2.63	16.5 \pm 3.50	17.6 \pm 4.62	32.7 \pm 3.40	15.8 \pm 1.55	16.8 \pm 3.46	16.5 \pm 1.96	18.4 \pm 2.55	16.8 \pm 1.40	34.3 \pm 3.16	16.5 \pm 2.17
III	16.2 \pm 1.93	16.2 \pm 1.32	16.9 \pm 1.60	16.3 \pm 1.77	32.6 \pm 3.34	15.0 \pm 3.92	16.2 \pm 4.69	16.6 \pm 2.07	16.9 \pm 2.18	16.2 \pm 1.62	34.2 \pm 2.86	15.9 \pm 1.20
IV	16.1 \pm 2.23	17.4 \pm 1.58	18.0 \pm 1.56	18.3 \pm 2.58	34.1 \pm 3.11	16.6 \pm 1.35	18.1 \pm 1.60	16.8 \pm 2.53	16.6 \pm 1.07	17.3 \pm 1.49	34.8 \pm 2.97	16.4 \pm 2.37
V	15.9 \pm 2.23	16.7 \pm 1.83	17.3 \pm 2.41	17.3 \pm 1.70	34.2 \pm 3.77	16.3 \pm 2.16	15.7 \pm 1.83	16.0 \pm 3.02	17.2 \pm 2.66	17.9 \pm 2.23	34.3 \pm 3.86	17.8 \pm 1.62
VI	14.7 \pm 1.49	17.1 \pm 1.60	15.7 \pm 2.98	16.9 \pm 2.18	32.6 \pm 4.12	15.6 \pm 2.80	16.7 \pm 1.77	16.5 \pm 2.01	17.0 \pm 3.62	15.8 \pm 1.62	34.5 \pm 3.31	16.5 \pm 1.96

Tabla V. Valores promedios de alimento consumido en animales machos (media \pm DS) y valores de p entre grupos por semana de tratamiento. Estudio: Evaluación de la Toxicidad a Dosis Repetidas de la vacuna Quimi-Hib.

Grupo	Tiempo (Días)											
	1 (p=0.910)	2 (p=0.730)	3 (p=0.639)	4 (p=0.239)	5 y 6 (p=0.190)	7 (p=0.218)	8 (p=0.785)	9 (p=0.024)	10 (p=0.053)	11 (p=0.260)	12 y 13 (p=0.465)	14 (p=0.048)
I	17.2 \pm 1.79	18.2 \pm 1.48	19.4 \pm 1.95	16.6 \pm 2.30	37.4 \pm 1.52	17.2 \pm 0.84	19.4 \pm 1.95	19.4 \pm 1.52	22.2 \pm 2.39	20.0 \pm 2.55	41.6 \pm 4.28	23.4 \pm 1.52
II	17.3 \pm 1.89	18.8 \pm 1.81	19.7 \pm 2.45	19.0 \pm 2.62	38.8 \pm 4.96	19.2 \pm 2.74	20.0 \pm 2.67	20.6 \pm 2.99	21.0 \pm 3.37	21.6 \pm 2.91	45.0 \pm 4.90	22.8 \pm 2.35
III	17.7 \pm 2.54	19.5 \pm 2.37	19.2 \pm 2.94	19.5 \pm 2.46	41.4 \pm 3.86	20.7 \pm 2.58	21.6 \pm 2.67	21.6 \pm 2.72	20.1 \pm 4.15	22.2 \pm 2.74	45.9 \pm 4.46	23.8 \pm 1.62
IV	17.0 \pm 2.49	18.6 \pm 3.98	20.0 \pm 2.62	19.6 \pm 2.17	40.7 \pm 5.06	19.8 \pm 3.33	20.3 \pm 2.58	21.4 \pm 3.24	19.8 \pm 2.86	20.8 \pm 2.30	44.0 \pm 4.27	23.6 \pm 1.71
V	17.2 \pm 1.55	18.1 \pm 0.99	19.2 \pm 1.03	17.9 \pm 2.81	38.1 \pm 2.42	20.1 \pm 2.02	20.0 \pm 2.26	21.3 \pm 2.00	17.3 \pm 2.31	21.7 \pm 1.89	43.1 \pm 3.63	22.7 \pm 1.89
VI	17.5 \pm 1.51	18.6 \pm 1.78	18.2 \pm 1.81	18.5 \pm 2.01	36.9 \pm 2.77	19.7 \pm 2.00	19.9 \pm 2.18	20.0 \pm 1.89	21.0 \pm 2.21	19.9 \pm 2.18	43.2 \pm 3.29	21.3 \pm 1.49

Tabla VI. Determinaciones hematológicas por grupo de tratamiento y por sexo. (Media del parámetro medido \pm DS y valores de p entre grupos). Estudio de dosis repetidas de la vacuna Quimi-Hib.

Grupo	HG (p=0.024)	ETO (p=0.007)	HTO (p=0.126)	VCM (p=0.089)	HCM (p=0.052)	CHCM (p=0.007)	Plaquetas (p=0.549)	Leucocitos (p=0.031)	Neutrófilos (p=0.058)	Linfocitos (p=0.081)
Animales Hembras										
T0	15.5 ± 0.85	6.38 ± 0.50	41.2 ± 2.53	64.6 ± 2.07	24.3 ± 0.91	37.6 ± 0.46	824.8 ± 49.4	6.50 ± 0.61	7.20 ± 2.28	92.0 ± 2.83
I	14.6 ± 0.6	6.02 ± 0.22	39.3 ± 1.24	65.2 ± 1.78	24.2 ± 0.79	37.1 ± 0.75	777.0 ± 63.5	8.14 ± 1.58	8.20 ± 2.95	91.0 ± 2.74
II	14.3 ± 0.62	5.89 ± 0.26	39.1 ± 2.01	66.4 ± 1.96	24.3 ± 0.73	36.5 ± 0.42	778.0 ± 66.5	6.43 ± 1.69	11.3 ± 4.11	87.8 ± 3.88
III	14.9 ± 0.89	6.35 ± 0.50	40.8 ± 2.64	64.6 ± 2.31	23.6 ± 1.00	36.9 ± 0.66	744.1 ± 85.1	8.89 ± 2.49	11.5 ± 3.03	87.3 ± 2.58
IV	14.7 ± 0.86	5.90 ± 0.45	39.8 ± 3.0	67.4 ± 1.87	24.9 ± 0.91	36.9 ± 0.65	761.1 ± 74.4	7.62 ± 1.34	11.7 ± 4.27	87.8 ± 4.06
V	12.6 ± 1.80	5.17 ± 0.82	34.3 ± 5.08	66.2 ± 2.33	24.4 ± 0.95	36.8 ± 0.36	790.0 ± 107.5	8.19 ± 1.47	8.89 ± 3.86	89.8 ± 3.67
Animales Machos										
Grupo	HG (p=0.013)	ETO (p=0.033)	HTO (p=0.007)	VCM (p=0.354)	HCM (p=0.755)	CHCM (p=0.082)	Plaquetas (p=0.114)	Leucocitos (p=0.245)	Neutrófilos (p=0.466)	Linfocitos (p=0.547)
T0	14.1 ± 0.54	5.74 ± 0.34	37.5 ± 1.00	65.2 ± 2.39	24.6 ± 0.89	37.7 ± 0.81	815.4 ± 36.1	8.14 ± 1.88	7.80 ± 3.90	91.4 ± 3.51
I	14.4 ± 0.74	5.84 ± 0.21	38.6 ± 1.91	66.0 ± 2.00	24.7 ± 0.76	37.4 ± 0.48	687.2 ± 178.1	9.18 ± 0.82	6.60 ± 2.70	92.0 ± 3.54
II	15.2 ± 1.02	6.35 ± 0.54	41.1 ± 2.89	64.8 ± 1.39	24.1 ± 0.64	37.2 ± 0.53	788.0 ± 72.7	9.24 ± 1.38	9.50 ± 2.37	89.5 ± 2.46
III	14.4 ± 0.97	5.83 ± 0.41	38.1 ± 2.35	65.2 ± 2.35	24.6 ± 0.82	37.7 ± 0.64	761.4 ± 69.5	8.54 ± 1.78	15.9 ± 2.37	83.1 ± 26.1
IV	13.4 ± 1.01	5.53 ± 0.37	35.8 ± 0.57	64.9 ± 1.52	24.3 ± 0.79	37.6 ± 0.77	822.4 ± 72.02	10.42 ± 0.37	11.2 ± 9.40	88.2 ± 9.51
V	14.3 ± 1.43	5.88 ± 0.72	38.9 ± 4.60	66.2 ± 1.13	24.4 ± 0.69	36.9 ± 0.74	780.0 ± 81.2	9.57 ± 1.88	9.00 ± 3.00	90.4 ± 3.13

Tabla VII. Parámetros bioquímicos (valor promedio ± desviación estándar) por sexo y grupos. Estudio Dosis repetidas de a vacuna Quimi-Hib.

Grupo/Tratamiento	Creatinina (mg/dL)		ALAT (U/L)		ASAT (U/L)		ALP (U/L)	
	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂
I	0,58 ± 0,2	0,76 ± 0,1	15,1 ± 2,3	15,6 ± 4,8	177,3 ± 5,0	178,1 ± 3,8	145,5 ± 6,4	213,7 ± 27,3
Rango calculado	0,22-0 ,94	0,41-1,1	10,4 - 19,8	6,06 – 25,1	167,2- 187,4	170,4- 185,7	132,8-158,4	159,0- 268,3
Rango para la especie	0,20-0,94	0,29- 0,85	16 - 83	21- 85	43- 277	39- 283	33- 310	67- 382
II	0,20 ± 0,04	0,27 ± 0,04	18,4 ± 3,2	24,0 ± 3,2	105,7 ± 3,4	155,0 ± 53,2	200,2 ± 3,4	214,4 ± 2,8
III	0,95 ± 0,3	0,67 ± 0,07	35.,0 ± 1,75	19,9 ± 6,8	100,9 ± 2,7	110,8 ± 3,6	178,3 ± 7,8	248,0 ± 3,4
IV	0,95 ± 0,1	0,58 ± 0,1	23,6 ± 6,1	14,7 ± 6,6	102,8 ± 2,7	153,9 ± 39,7	182,1 ± 11,0	261,2 ± 9,2
V	0,69 ± 0,04	0,51 ± 0,0	16,5 ± 1,4	16,1 ± 1,8	98,0 ± 4,0	156,9 ± 46,6	152,1 ± 2,6	174,9 ± 8,6
VI	0,62 ± 0,2	0,61 ± 0,2	24,4 ± 3,9	27,7 ± 2,9	97,7 ± 10,7	100,32 ± 6,9	246,2 ± 26,7	224,0 ± 20,9

Tabla VIII. Valores del peso relativo de los órganos evaluados (bazo, hígado y timo) por grupo de tratamiento y por sexo. (Media del parámetro medido \pm DS, y el rango de peso establecido por cada órgano a partir de la media de los valores del grupo control negativo \pm 2 unidades). Estudio Dosis repetidas de a vacuna Quimi-Hib.

Animales Hembras (p=0.000)			
Grupos	Bazo (Límites: 0.228 \pm 2)	Hígado (Límites: 3.53 \pm 2)	Timo (Límites: 0.38 \pm 2)
I	0.228 \pm 3.3 x 10 ⁻²	3.53 \pm 0.28	0.38 \pm 9.03 x 10 ⁻²
II	0.299 \pm 3.2 x 10 ⁻²	3.96 \pm 0.36	0.34 \pm 4.61x 10 ⁻²
III	0.242 \pm 3.4 x 10 ⁻²	4.14 \pm 0.34	0.34 \pm 6.26 x 10 ⁻²
IV	0.251 \pm 4.2 x 10 ⁻²	3.75 \pm 0.28	0.36 \pm 4.27 x 10 ⁻²
V	0.235 \pm 2.9 x 10 ⁻²	3.52 \pm 0.19	0.34 \pm 6.57 x 10 ⁻²
VI	0.183 \pm 2.7 x 10 ⁻²	3.76 \pm 0.28	0.22 \pm 4.25 x 10 ⁻²
Animales Machos (p=0.000)			
Grupos	Bazo (Límites: 0.274 \pm 2)	Hígado (Límites: 3.49 \pm 2)	Timo (Límites: 0.38 \pm 2)
I	0.274 \pm 4.3 x 10 ⁻²	3.49 \pm 7.4 x 10 ⁻²	0.38 \pm 3.5 x 10 ⁻²
II	0.269 \pm 2.9 x 10 ⁻²	3.67 \pm 0.27	0.34 \pm 5.1x 10 ⁻²
III	0.278 \pm 3.3 x 10 ⁻²	3.56 \pm 0.26	0.34 \pm 5.9 x 10 ⁻²
IV	0.30 \pm 7.19 x 10 ⁻²	3.83 \pm 0.16	0.37 \pm 5.8 x 10 ⁻²
V	0.268 \pm 4.71 x 10 ⁻²	3.41 \pm 0.45	0.38 \pm 7.2 x 10 ⁻²
VI	0.192 \pm 3.94 x 10 ⁻²	3.72 \pm 0.25	0.18 \pm 2.2 x 10 ⁻²

Tabla IX. Valor promedio semanal de consumo de alimento por grupo de tratamiento ($g \pm DS$). Estudio Toxicidad aguda de la vacuna pentavalente TRIVAC-HB + Quimi-Hib concentrada.

Grupo	Semana 1		Semana 2	
	♀ (p=0.105)	♂ (p=0.514)	♀ (p=0.456)	♂ (p=0.136)
I	17,0±0,4	19,0 ±1,9	18.6±0,6	23,3±1,0
II	16,7±0.4	18,6±1,3	18,5±0,6	22,9±1,2
III	17,3±0,6	16,7±0,5	19,6±0,8	24,4±0,5
IV	17,3±0,6	19,9±2,0	17,3±1,1	24,6±0,5
V	16,8±0,8	19,7±1,3	17,9±0,6	24,0±0,4
VI	15,4±1,1	20,1±1,1	18,1±0,6	23,8±0,4
VII	17,4±0,6	19,5±1,4	19,5±1,4	23,7±1,0

Tabla X. Valores promedios de peso corporal en animales hembras ($media \pm DS$) y valores de p entre grupos por semana de tratamiento. Estudio: Evaluación de la Toxicidad a Dosis Repetidas de la vacuna pentavalente TRIVAC-HB + Quimi-Hib concentrada.

Grupo	Sexo	Día 0 (p=0.054)	Día 7 (p=0.682)	Día 14 (p= 0.522)	Día 21	Día 28
I	♀	85,6 ± 4,0	141 ± 10,6	168,0 ±15,2	---	---
II		84,9 ± 4,7	138,0 ± 5,5	163,0 ± 5,8		
III		83,8 ± 4,0	132,6 ± 3,6	163,0 ± 4,4		
IV		85,8 ± 3,4	136,8 ± 4,5	166,8 ± 4,2		
V		85,3 ± 3,5	143,6 ± 14,4	174,0 ±20,0		
VI		81,3 ± 3,8	137,8 ± 6,6	170,4 ± 10,8		
VII		87,0 ± 5,3	135,8 ± 5,5	158,0 ± 8,8		
VIII		81,0 ± 4,4	134,8 ±7,4	162,4 ± 8,1		

Tabla XI. Valores promedios de peso corporal en animales machos (media \pm DS) y valores de p entre grupos por semana de tratamiento. Estudio: Evaluación de la Toxicidad a Dosis Repetidas de la vacuna pentavalente TRIVAC-HB + Quimi-Hib concentrada.

Grupo	Sexo	Día 0 (p= 0.622)	Día 7 (p=0.580)	Día 14 (p= 0.928)	Día 21	Día 28
I	♂	87,0 \pm 7,5	157,6 \pm 12,7	213,6 \pm 19,2	---	---
II		83,6 \pm 2,4	151,4 \pm 14,4	206 \pm 24,2		
III		88,0 \pm 4,9	163,6 \pm 11,4	215,2 \pm 17,1		
IV		87,2 \pm 5,3	153,2 \pm 13,9	200,4 \pm 18,3		
V		88,6 \pm 4,5	161,6 \pm 7,7	206,6 \pm 21,0		
VI		86,9 \pm 8,3	153,8 \pm 13,1	197,8 \pm 24,0		
VII		85,5 \pm 2,9	155,0 \pm 5,6	208,0 \pm 6,0		
VIII		87,6 \pm 6,2	162,2 \pm 7,6	215,2 \pm 9,0		

Tabla XII. Valores promedios de alimento consumido por los animales (media \pm DS) y valores de p entre grupos por semana de tratamiento. Estudio: Evaluación de la Toxicidad a Dosis Repetidas de la vacuna pentavalente TRIVAC-HB + Quimi-Hib concentrada.

Grupo	Semana 1		Semana 2		Semana 3		Semana 4	
	♀ (p=0.713)	♂ (p=0.713)	♀ (p=0.842)	♂ (p=0.842)	♀	♂	♀	♂
I	17,7	19,4	16,5	20,3	---	---	---	---
II	17,8	19,6	16,5	20,1				
III	17,0	20,4	16,0	21,3				
IV	17,6	19,7	16,0	18,7				
V	17,6	20,1	16,5	19,5				
VI	17,9	19,2	19,5	18,5				
VII	17,2	19,5	15,9	20,7				
VIII	17,1	19,6	15,2	20,5				

Tabla XIII. Parámetros hematológicos (valor promedio \pm desviación estándar) de los animales hembras del Estudio: Evaluación de la Dosis repetidas de la vacuna pentavalente TRIVAC-HB + Quimi-Hib concentrada

Grupo	Hb (g/dL)	Hto (vol/L)	Leuco ($\times 10^3$)	Polimorfonucleares (%)	Linfoc (%)	Monocitos (%)	Eosinófilos (%)
Basal	13,5 \pm 0,50	0,45 \pm 0,02	12,5 \pm 3,55	18 \pm 8,09	76,8 \pm 5,7	3 \pm 3,0	1 \pm 0,00
Rango Normal para la especie	13,05-14,04	0,43-0,47	9,0-16,1	10-26,0	71-83	0,0-6,0	0-1
I	14,02 \pm 0,74	0,44 \pm 0,04	11,17 \pm 1,78	21 \pm 2,6	76,6 \pm 3,1	4 \pm 2,8	0 \pm 0,00
II	13,99 \pm 0,30	0,46 \pm 0,02	10,61 \pm 6,26	24 \pm 4,0	75 \pm 5,0	2 \pm 0,0	0 \pm 0,00
III	13,17 \pm 0,35	0,43 \pm 0,01	11,12 \pm 0,94	22 \pm 1,7	76 \pm 1,0	3 \pm 2,8	0 \pm 0,00
IV	12,49 \pm 0,82	0,41 \pm 0,04	9,57 \pm 2,40	19 \pm 3,1	78,6 \pm 3,1	1,5 \pm 0,7	1 \pm 0,00
V	11,36 \pm 0,83	0,38 \pm 0,03	11,92 \pm 5,34	35 \pm 3,8	61,3 \pm 7,1	4,5 \pm 3,5	1 \pm 0,00
VI	11,76 \pm 0,60	0,39 \pm 0,02	14,56 \pm 2,16	37 \pm 3,1	61,0 \pm 4,6	2,0 \pm 0,0	1,5 \pm 0,7
VII	14,43 \pm 0,35	0,45 \pm 0,01	7,54 \pm 2,03	51 \pm 3,6	0,48 \pm 4,0	1,5 \pm 0,7	1 \pm 0,00

Leyenda:

HB: Hemoglobina, Hto: hematocrito; Leuco: leucocitos; Linfoc: linfocitos.

Tabla XIV. Parámetros hematológicos (valor promedio \pm desviación estándar) de los animales machos del Estudio: Evaluación de la Dosis repetidas de la vacuna pentavalente TRIVAC-HB + Quimi-Hib concentrada

Grupo	Hb (g/dL)	Hto (vol/L)	Leuco ($\times 10^3$)	Polimorfonucleares (%)	Linfoc (%)	Monocitos (%)	Eosinófilos (%)
Basal	13,55\pm0,50	0,45\pm0,02	12,58\pm3,55	19 \pm 7,5	76,2\pm4,7	5,7\pm2,5	1\pm0,00
Rango Normal para la especie	13,05-14,04	0,43-0,47	9,0-16,1	11,5-26	71-81	3,3-8	0-1
I	13,37 \pm 0,18	0,44 \pm 0,02	10,83 \pm 4,54	18,6 \pm 4,5	78,6 \pm 4,2	1,0 \pm 0,0	2,5 \pm 0,7
II	13,46 \pm 0,72	0,44 \pm 0,01	11,1 \pm 1,49	26 \pm 5,3	72,0 \pm 4,6	1,3 \pm 0,6	1 \pm 0,0
III	13,17 \pm 0,35	0,43 \pm 0,01	11,12 \pm 0,94	19,3 \pm 5,5	79,0 \pm 3,6	1,5 \pm 0,7	0 \pm 0.00
IV	12,49 \pm 0,82	0,41 \pm 0,04	9,57 \pm 2,40	21,6 \pm 2,5	77,0 \pm 2,3	1,5 \pm 0,7	2 \pm 0,0
V	12,63 \pm 0,48	0,41 \pm 0,01	16,20 \pm 3,05	38,6 \pm 2,5	59,0 \pm 3,6	3,5 \pm 2,1	0 \pm 0.00
VI	11,91 \pm 0,28	0,40 \pm 0,02	12,54 \pm 2,23	37,2 \pm 9,7	62,0 \pm 10,1	1,5 \pm 0,7	0 \pm 0.00
VII	13,95 \pm 0,50	0,44 \pm 0,02	7,57 \pm 1,79	37,3 \pm 4,6	62,0 \pm 3,8	1,5 \pm 0,7	0 \pm 0.00

Leyenda:

HB: Hemoglobina, Hto: hematocrito; Leuco: leucocitos; Linfoc: linfocitos.

Tabla XV. Determinaciones bioquímicas por grupo de tratamiento, animales hembras. (Media del parámetro medido \pm DS y valores de p entre grupos), animales hembras. Estudio: Evaluación de la Dosis Repetidas de la vacuna pentavalente TRIVAC-HB + Quimi-Hib concentrada.

Grupo	Sexo	Cratinina (mg/dL)	ALAT (U/L)	ASAT (U/L)	ALP (U/L)
T0	♀	0,43 \pm 0,09	75,28 \pm 6,6	115.0 \pm 7,3	139,6 \pm 3,1
rango normal		0,34-0,54	68,6-81,8	107,6 - 122,4	136,5-142,8
rango para la especie		0,20-0,94	16 - 83	43- 277	33- 310
I		0,46 \pm 0,06	81,4 \pm 1,1	134,6 \pm 1,0	143,4 \pm 1,0
II		0,50 \pm 0,0	82,5 \pm 2,2	136,1 \pm 1,3	147,0 \pm 2,2
III		0,37 \pm 0,1	83,3 \pm 1,8	138,6 \pm 1,5	148,27 \pm 1,6
IV		0,38 \pm 0,12	83,3 \pm 1,1	140,9 \pm 1,2	150,6 \pm 1,6
V		0,44 \pm 0,06	84,2 \pm 1,7	146,4 \pm 1,8	149,5 \pm 1,8
VI		0,43 \pm 0,16	84,0 \pm 1,6	147,5 \pm 1,9	148,0 \pm 2,9
VII		0,38 \pm 0,0	84,4 \pm 1,3	148,6 \pm 1,8	148, 8 \pm 1.2

Tabla XVI. Determinaciones bioquímicas por grupo de tratamiento, animales machos. (Media del parámetro medido \pm DS y valores de p entre grupos), animales machos. Estudio: Evaluación de la Dosis Repetidas de la vacuna pentavalente TRIVAC-HB +Quimi-Hib concentrada.

Grupo	Sexo	Cratinina (mg/dL)	ALAT (U/L)	ASAT (U/L)	ALP (U/L)
T0	♂	0,47 \pm 0,06	82,4 \pm 2,5	204,8 \pm 4,2	232,2 \pm 5,2
rango normal		0,41-0,54	79,9 - 84,9	200,6-209,0	226,9-237,5
rango para la especie		0,29- 0,85	21- 85	39- 283	67- 382
I		0,46 \pm 0,0	87,2 \pm 1,7	223,0 \pm 2,0	243,5 \pm 4,2
II		0,50 \pm 0,0	88,8 \pm 1,1	226,01 \pm 1,1	247,7 \pm 1,6
III		0,35 \pm 0,13	89,1 \pm 0,7	227,9 \pm 1,4	248,5 \pm 1,3
IV		0,31 \pm 0,06	88,3 \pm 1,6	236,1 \pm 5,7	249,7 \pm 0,4
V		0,44 \pm 0,0	90 ,0 \pm 1,3	238,4 \pm 2,0	248,0 \pm 1,9
VI		0,42 \pm 0,06	87,5 \pm 1,5	238,8 \pm 1,6	247,8 \pm 1,2
VII		0,45 \pm 0,13	87,3 \pm 1,6	237,6 \pm 2,0	248,0 \pm 1,4

Tabla XVII. Valores del peso relativo de los órganos evaluados por grupo de tratamiento. (Media del parámetro medido \pm DS, y el rango de peso establecido por cada órgano a partir de la media de los valores del grupo control negativo \pm 2 unidades), animales hembras sacrificados tras 4 administraciones de los distintos tratamientos. Estudio Dosis repetidas de a vacuna pentavalente TRIVAC-HB + Quimi-Hib concentrada.

Grupo	Sexo	Bazo (p= 0.023)	Adrenales (p= 0.308)	Riñón Izquierdo (p=0.006)	Riñón derecho (p= 0.274)	Hígado (p= 0.035)	Timo (p= 0.633)	Pulmón (p= 0.488)
I	♀	0,32 \pm 0,05	0,03 \pm 0,0	0,47 \pm 0,02	0,48 \pm 0,02	5,26 \pm 0,32	0,33 \pm 0,04	0,89 \pm 0,26
Rango Normal		0,27 - 0,36	0,028 - 0,037	0,44 -0,49	0,458 - 0,495	4,935 – 5,578	0,29 - 0,37	0,63 -1,15
II		0,29 \pm 0,04	0,03 \pm 0,01	0,47 \pm 0,04	0,49 \pm 0,04	5,06 \pm 0,07	0,34 \pm 0,04	0,85 \pm 0,08
III		0,29 \pm 0,04	0,03 \pm 0,00	0,47 \pm 0,01	0,48 \pm 0,01	5,11 \pm 0,26	0,37 \pm 0,08	0,84 \pm 0,10
IV		0,35 \pm 0,04	0,03 \pm 0,01	0,49 \pm 0,04	0,51 \pm 0,06	5,12 \pm 0,61	0,36 \pm 0,05	0,93 \pm 0,15
V		0,31 \pm 0,04	0,03 \pm 0,01	0,44 \pm 0,02	0,49 \pm 0,02	5,05 \pm 0,20	0,34 \pm 0,04	0,74 \pm 0,18
VI		0,33 \pm 0,02	0,03 \pm 0,00	0,52 \pm 0,03	0,52 \pm 0,05	4,85 \pm 0,12	0,32 \pm 0,04	0,88 \pm 0,14
VII		0,36 \pm 0,04	0,03 \pm 0,01	0,51 \pm 0,03	0,51 \pm 0,02	4,57 \pm 0,32	0,36 \pm 0,03	0,78 \pm 0,09

Tabla XVIII. Valores del peso relativo de los órganos evaluados por grupo de tratamiento. (Media del parámetro medido \pm DS, y el rango de peso establecido por cada órgano a partir de la media de los valores del grupo control negativo \pm 2 unidades), animales machos sacrificados tras 4 administraciones de los distintos tratamientos. Estudio Dosis repetidas de a vacuna pentavalente TRIVAC-HB + Quimi-Hib concentrada.

Grupo	Sexo	Bazo (p= 0.335)	Adrenales (p= 0.403)	Riñón Izquierdo (p= 0.096)	Riñón derecho (p= 0.221)	Hígado (p= 0.033)	Timo (p= 0.184)	Pulmón (p= 0.517)
I	♂	0,33 \pm 0,04	0,06 \pm 0,08	0,47 \pm 0,02	0,48 \pm 0,03	5,27 \pm 0,39	0,37 \pm 0,05	0,80 \pm 0,07
Rango Normal		0,29 -0,37	0,00 - 0,14	0,45 - 0,49	0,45 -0,51	4,88 - 5,66	0,32-0,42	0,73 - 0,87
II		0,32 \pm 0,03	0,02 \pm 0,004	0,46 \pm 0,03	0,48 \pm 0,03	4,76 \pm 0,5	0,32 \pm 0,05	0,94 \pm 0,28
III		0,34 \pm 0,05	0,03 \pm 0,005	0,50 \pm 0,05	0,50 \pm 0,04	5,06 \pm 0,4	0,34 \pm 0,02	0,79 \pm 0,20
IV		0,40 \pm 0,12	0,02 \pm 0,003	0,51 \pm 0,03	0,53 \pm 0, 04	4,87 \pm 0,34	0,32 \pm 0,04	0,77 \pm 0,19
V		0,32 \pm 0,04	0,03 \pm 0,006	0,49 \pm 0,03	0,50 \pm 0,03	4,52 \pm 0,28	0,31 \pm 0,07	0,95 \pm 0,26
VI		0,30 \pm 0,02	0,03 \pm 0,003	0,50 \pm 0,03	0,52 \pm 0,03	4,79 \pm 0,52	0,28 \pm 0,03	0,82 \pm 0,15
VII		0,30 \pm 0,04	0,02 \pm 0,005	0,49 \pm 0,02	0,51 \pm 0,02	4,38 \pm 0,20	0,31 \pm 0,07	0,97 \pm 0,27

Tabla XIX. Valores del peso relativo de los órganos evaluados por grupo de tratamiento y por sexo. (Media del parámetro medido \pm DS, y el rango de peso establecido por cada órgano a partir de la media de los valores del grupo control negativo \pm 2 unidades), animales hembras sacrificados tras 14 administraciones de los distintos tratamientos. Estudio Dosis repetidas de a vacuna pentavalente TRIVAC-HB + Quimi-Hib concentrada.

Grupo	Sexo	Bazo (p= 0.003)	Adrenales (p=0.132)	Riñón Izquierdo (p= 0.634)	Riñón derecho (p= 0.167)	Hígado (p= 0.094)	Timo (p= 0.213)	Pulmón (p= 0.503)
I	♀	0,27 \pm 0,03	0,03 \pm 0,01	0,50 \pm 0,16	0,55 \pm 0,27	5,21 \pm 0,62	0,34 \pm 0,08	0,72 \pm 0,05
Rango Normal		0,24 - 0,30	0,02 - 0,04	0,34 -0,66	0,28 - 0,82	4,59 – 5,83	0,26 - 0,42	0,67 - 0,77
II		0,26 \pm 0,04	0,03 \pm 0,004	0,47 \pm 0,03	0,48 \pm 0,04	4,97 \pm 0,44	0,30 \pm 0,05	0,84 \pm 0,12
III		0,32 \pm 0,04	0,03 \pm 0,002	0,47 \pm 0,02	0,48 \pm 0,01	5,34 \pm 0,61	0,32 \pm 0,04	0,87 \pm 0,19
IV		0,36 \pm 0,05	0,03 \pm 0,005	0,45 \pm 0,03	0,45 \pm 0,02	5,07 \pm 0,34	0,39 \pm 0,03	0,82 \pm 0,07
V		0,41 \pm 0,17	0,03 \pm 0,002	0,48 \pm 0,02	0,49 \pm 0,03	5,40 \pm 0,15	0,33 \pm 0,04	0,85 \pm 0,06
VI		0,48 \pm 0,07	0,04 \pm 0,005	0,47 \pm 0,02	0,49 \pm 0,02	5,21 \pm 0,42	0,32 \pm 0,05	0,88 \pm 0,17
VII		0,27 \pm 0,04	0,04 \pm 0,004	0,47 \pm 0,03	0,48 \pm 0,05	4,511 \pm 0,41	0,33 \pm 0,04	0,82 \pm 0,13

Tabla XX. Valores del peso relativo de los órganos evaluados por grupo de tratamiento y por sexo. (Media del parámetro medido \pm DS, y el rango de peso establecido por cada órgano a partir de la media de los valores del grupo control negativo \pm 2 unidades), animales machos sacrificados tras 14 administraciones de los distintos tratamientos. Estudio Dosis repetidas de a vacuna pentavalente TRIVAC-HB + Quimi-Hib concentrada.

Grupo	Sexo	Bazo (p= 0.000)	Adrenales (p= 0.009)	Riñón Izquierdo (p= 0.878)	Riñón derecho (p= 0.221)	Hígado (p= 0.033)	Timo (p= 0.184)	Pulmón (p= 0.517)
I	♂	0,30 \pm 0,03	0,02 \pm 0,003	0,45 \pm 0,03	0,46 \pm 0,03	5,22 \pm 0,28	0,30 \pm 0,04	0,74 \pm 0,13
Rango Normal		0,27 - 0,30	0,01 - 0,03	0,42 - 0,48	0,43 - 0,49	4,94 - 5,50	0,26 - 0,35	0,61 - 0,87
II		0,29 \pm 0,06	0,02 \pm 0,006	0,45 \pm 0,08	0,47 \pm 0,08	5,12 \pm 1,26	0,29 \pm 0,05	0,64 \pm 0,11
III		0,39 \pm 0,03	0,02 \pm 0,003	0,44 \pm 0,03	0,45 \pm 0,03	5,03 \pm 0,40	0,35 \pm 0,06	0,75 \pm 0,16
IV		0,44 \pm 0,04	0,02 \pm 0,006	0,45 \pm 0,02	0,46 \pm 0,02	4,61 \pm 0,19	0,32 \pm 0,02	0,77 \pm 0,10
V		0,50 \pm 0,05	0,03 \pm 0,003	0,48 \pm 0,03	0,47 \pm 0,03	4,93 \pm 0,55	0,26 \pm 0,06	0,78 \pm 0,09
VI		0,58 \pm 0,009	0,03 \pm 0,009	0,47 \pm 0,06	0,49 \pm 0,04	4,32 \pm 0,57	0,30 \pm 0,03	0,74 \pm 0,16
VII		0,20 \pm 0,02	0,02 \pm 0,002	0,46 \pm 0,02	0,47 \pm 0,04	4,92 \pm 0,17	0,29 \pm 0,03	0,62 \pm 0,12

Tabla XXI. Valores de área de diferentes regiones del bazo evaluados por grupo de tratamiento y por sexo. (Media del parámetro medido \pm DS), animales hembras. Estudio Dosis repetidas de a vacuna pentavalente TRIVAC-HB + Quimi-Hib concentrada

Grupo	Sexo	Área total	Área folículo	Área zona B	Área zona T
II	♀	799.3 \pm 181.2	16.6 \pm 6.94	11.6 \pm 4.59	4.99 \pm 2.39
III		680.1 \pm 110.7	15.0 \pm 0.37	11.6 \pm 2.34	3.47 \pm 1.55
IV		572.5 \pm 196.2	26.4 \pm 10.6	16.4 \pm 5.98	9.99 \pm 6.91
V		659.7 \pm 112.4	35.3 \pm 16.6	27.8 \pm 15.8	7.49 \pm 3.39
VIII		810.5 \pm 131.9	37.4 \pm 18.4	28.6 \pm 17.6	8.87 \pm 4.95

Tabla XXII. Valores de área de diferentes regiones del bazo evaluados por grupo de tratamiento y por sexo. (Media del parámetro medido \pm DS), animales machos. Estudio Dosis repetidas de a vacuna pentavalente TRIVAC-HB + Quimi-Hib concentrada.

Grupo	Sexo	Área total	Área folículo	Área zona B	Área zona T
II	♂	1028.9 \pm 58.4	30.1 \pm 12.1	19.0 \pm 8.84	11.0 \pm 4.73
III		943.5 \pm 135.8	14.2 \pm 5.24	11.2 \pm 4.52	2.96 \pm 1.02
IV		721.7 \pm 77.2	36.8 \pm 19.6	29.2 \pm 19.6	7.68 \pm 4.88
V		774.6 \pm 183.6	23.2 \pm 8.44	15.3 \pm 5.98	7.92 \pm 3.67
VIII		789.0 \pm 164.2	26.9 \pm 10.3	18.4 \pm 5.95	8.57 \pm 7.73

Tabla XXIII. Incidencia de la aparición de centros germinativos en bazo evaluados por grupo de tratamiento y por sexo. (Media del parámetro medido \pm DS). Estudio Dosis repetidas de a vacuna pentavalente TRIVAC-HB + Quimi-Hib concentrada.

Grupo	Centros germinativos	
	♀	♂
II	1 \pm 1.73	1.25 \pm 1.26
III	1.2 \pm 0.45	2 \pm 0.00
IV	1 \pm 0.71	2 \pm 1.41
V	1.4 \pm 0.55	1.8 \pm 1.30
VIII	1 \pm 1.23	1.2 \pm 1.30

Tabla I. Valores promedios de alimento consumido (media \pm DS) y valores de p entre grupos en cada tiempo de pesaje. Estudio: Evaluación de la Toxicidad Aguda de la vacuna Quimi-Hib.

Grupo	Tiempo (Días)											
	1 (p=0.577)	2 (p=0.191)	3 (p=0.564)	4 (p=0.964)	5 y 6 (p=0.701)	7 (p=0.659)	8 (p=0.433)	9 (p=0.936)	10 (p=0.983)	11 (p=0.767)	12 y 13 (p=0.683)	14 (p=0.824)
I	17.3 \pm 1.59	17.0 \pm 1.94	17.7 \pm 3.56	18.1 \pm 2.64	40.7 \pm 6.75	18.6 \pm 3.31	18.6 \pm 2.50	19.2 \pm 2.49	18.9 \pm 3.45	18.8 \pm 3.91	41.3 \pm 6.20	18.3 \pm 4.29
II	16.7 \pm 1.26	17.0 \pm 1.41	18.4 \pm 1.56	18.3 \pm 2.31	39.0 \pm 3.59	17.9 \pm 3.14	18.4 \pm 2.27	19.1 \pm 3.28	19.1 \pm 2.56	20.3 \pm 5.71	39.6 \pm 6.75	19.9 \pm 4.70
III	17.2 \pm 1.77	15.7 \pm 1.42	17.6 \pm 1.46	7.6 \pm 2.18	38.7 \pm 4.78	18.3 \pm 2.75	18.2 \pm 4.19	18.3 \pm 3.65	18.7 \pm 3.40	19.1 \pm 2.56	39.7 \pm 7.33	20.0 \pm 4.13
IV	18.8 \pm 3.54	16.9 \pm 2.33	18.8 \pm 3.96	17.9 \pm 4.70	41.1 \pm 6.31	19.6 \pm 3.27	20.9 \pm 4.03	18.8 \pm 4.10	19.4 \pm 4.74	19.7 \pm 3.20	42.2 \pm 8.24	19.6 \pm 4.93

Tabla II. Valores promedios de peso corporal en animales hembras (media \pm DS) y valores de *p* entre grupos por semana de tratamiento. Estudio: Evaluación de la Toxicidad a Dosis Repetidas de la vacuna Quimi-Hib.

Grupo	Día 1 (p=0.768)	Día 7 (p=0.122)	Día 14 (p=0.190)
I	94.4 \pm 10.7	129.4 \pm 13.9	151.4 \pm 14.8
II	99.6 \pm 6.50	135.2 \pm 9.48	159.9 \pm 14.0
III	91.1 \pm 3.93	131.0 \pm 7.53	153.9 \pm 9.46
IV	95.7 \pm 8.72	138.7 \pm 9.27	161.5 \pm 11.8
V	99.9 \pm 8.41	141.3 \pm 12.9	166.8 \pm 16.9
VI	93.3 \pm 6.38	131.8 \pm 8.83	156.1 \pm 11.0

Tabla III. Valores promedios de peso corporal en animales machos (media \pm DS) y valores de *p* entre grupos por semana de tratamiento. Estudio: Evaluación de la Toxicidad a Dosis Repetidas de la vacuna Quimi- Hib.

Grupo	Día 1 (p=0.768)	Día 7 (p=0.842)	Día 14 (p=0.953)
I	99.2 \pm 13.8	152.4 \pm 14.9	198.0 \pm 17.4
II	100.0 \pm 7.75	156.5 \pm 14.4	202.7 \pm 16.7
III	100.3 \pm 11.9	160.4 \pm 13.3	210.3 \pm 15.5
IV	96.6 \pm 11.9	154.6 \pm 18.1	202.0 \pm 21.9
V	99.6 \pm 8.58	154.3 \pm 8.51	208.6 \pm 32.9
VI	101.2 \pm 10.1	153.2 \pm 10.8	194.1 \pm 10.9

Tabla IV. Valores promedios de alimento consumido en animales hembras (media \pm DS) y valores de p entre grupos por semana de tratamiento. Estudio: Evaluación de la Toxicidad a Dosis Repetidas de la vacuna Quimi-Hib.

Grupo	Tiempo (Días)											
	1 (p=0.282)	2 (p=0.418)	3 (p=0.391)	4 (p=0.545)	5 y 6 (p=0.753)	7 (p=0.350)	8 (p=0.150)	9 (p=0.925)	10 (p=0.751)	11 (p=0.149)	12 y 13 (p=0.944)	14 (p=0.369)
I	15.4 \pm 1.52	15.8 \pm 1.30	16.0 \pm 2.12	16.4 \pm 0.55	32.0 \pm 4.24	14.0 \pm 1.41	15.6 \pm 1.82	17.2 \pm 2.05	16.8 \pm 3.49	16.0 \pm 2.55	33.2 \pm 3.03	16.8 \pm 1.92
II	16.5 \pm 1.96	17.4 \pm 2.63	16.5 \pm 3.50	17.6 \pm 4.62	32.7 \pm 3.40	15.8 \pm 1.55	16.8 \pm 3.46	16.5 \pm 1.96	18.4 \pm 2.55	16.8 \pm 1.40	34.3 \pm 3.16	16.5 \pm 2.17
III	16.2 \pm 1.93	16.2 \pm 1.32	16.9 \pm 1.60	16.3 \pm 1.77	32.6 \pm 3.34	15.0 \pm 3.92	16.2 \pm 4.69	16.6 \pm 2.07	16.9 \pm 2.18	16.2 \pm 1.62	34.2 \pm 2.86	15.9 \pm 1.20
IV	16.1 \pm 2.23	17.4 \pm 1.58	18.0 \pm 1.56	18.3 \pm 2.58	34.1 \pm 3.11	16.6 \pm 1.35	18.1 \pm 1.60	16.8 \pm 2.53	16.6 \pm 1.07	17.3 \pm 1.49	34.8 \pm 2.97	16.4 \pm 2.37
V	15.9 \pm 2.23	16.7 \pm 1.83	17.3 \pm 2.41	17.3 \pm 1.70	34.2 \pm 3.77	16.3 \pm 2.16	15.7 \pm 1.83	16.0 \pm 3.02	17.2 \pm 2.66	17.9 \pm 2.23	34.3 \pm 3.86	17.8 \pm 1.62
VI	14.7 \pm 1.49	17.1 \pm 1.60	15.7 \pm 2.98	16.9 \pm 2.18	32.6 \pm 4.12	15.6 \pm 2.80	16.7 \pm 1.77	16.5 \pm 2.01	17.0 \pm 3.62	15.8 \pm 1.62	34.5 \pm 3.31	16.5 \pm 1.96

Tabla V. Valores promedios de alimento consumido en animales machos (media \pm DS) y valores de p entre grupos por semana de tratamiento. Estudio: Evaluación de la Toxicidad a Dosis Repetidas de la vacuna Quimi-Hib.

Grupo	Tiempo (Días)											
	1 (p=0.910)	2 (p=0.730)	3 (p=0.639)	4 (p=0.239)	5 y 6 (p=0.190)	7 (p=0.218)	8 (p=0.785)	9 (p=0.024)	10 (p=0.053)	11 (p=0.260)	12 y 13 (p=0.465)	14 (p=0.048)
I	17.2 \pm 1.79	18.2 \pm 1.48	19.4 \pm 1.95	16.6 \pm 2.30	37.4 \pm 1.52	17.2 \pm 0.84	19.4 \pm 1.95	19.4 \pm 1.52	22.2 \pm 2.39	20.0 \pm 2.55	41.6 \pm 4.28	23.4 \pm 1.52
II	17.3 \pm 1.89	18.8 \pm 1.81	19.7 \pm 2.45	19.0 \pm 2.62	38.8 \pm 4.96	19.2 \pm 2.74	20.0 \pm 2.67	20.6 \pm 2.99	21.0 \pm 3.37	21.6 \pm 2.91	45.0 \pm 4.90	22.8 \pm 2.35
III	17.7 \pm 2.54	19.5 \pm 2.37	19.2 \pm 2.94	19.5 \pm 2.46	41.4 \pm 3.86	20.7 \pm 2.58	21.6 \pm 2.67	21.6 \pm 2.72	20.1 \pm 4.15	22.2 \pm 2.74	45.9 \pm 4.46	23.8 \pm 1.62
IV	17.0 \pm 2.49	18.6 \pm 3.98	20.0 \pm 2.62	19.6 \pm 2.17	40.7 \pm 5.06	19.8 \pm 3.33	20.3 \pm 2.58	21.4 \pm 3.24	19.8 \pm 2.86	20.8 \pm 2.30	44.0 \pm 4.27	23.6 \pm 1.71
V	17.2 \pm 1.55	18.1 \pm 0.99	19.2 \pm 1.03	17.9 \pm 2.81	38.1 \pm 2.42	20.1 \pm 2.02	20.0 \pm 2.26	21.3 \pm 2.00	17.3 \pm 2.31	21.7 \pm 1.89	43.1 \pm 3.63	22.7 \pm 1.89
VI	17.5 \pm 1.51	18.6 \pm 1.78	18.2 \pm 1.81	18.5 \pm 2.01	36.9 \pm 2.77	19.7 \pm 2.00	19.9 \pm 2.18	20.0 \pm 1.89	21.0 \pm 2.21	19.9 \pm 2.18	43.2 \pm 3.29	21.3 \pm 1.49

Tabla VI. Determinaciones hematológicas por grupo de tratamiento y por sexo. (Media del parámetro medido \pm DS y valores de p entre grupos). Estudio de dosis repetidas de la vacuna Quimi-Hib.

Grupo	HG (p=0.024)	ETO (p=0.007)	HTO (p=0.126)	VCM (p=0.089)	HCM (p=0.052)	CHCM (p=0.007)	Plaquetas (p=0.549)	Leucocitos (p=0.031)	Neutrófilos (p=0.058)	Linfocitos (p=0.081)
Animales Hembras										
T0	15.5 \pm 0.85	6.38 \pm 0.50	41.2 \pm 2.53	64.6 \pm 2.07	24.3 \pm 0.91	37.6 \pm 0.46	824.8 \pm 49.4	6.50 \pm 0.61	7.20 \pm 2.28	92.0 \pm 2.83
I	14.6 \pm 0.6	6.02 \pm 0.22	39.3 \pm 1.24	65.2 \pm 1.78	24.2 \pm 0.79	37.1 \pm 0.75	777.0 \pm 63.5	8.14 \pm 1.58	8.20 \pm 2.95	91.0 \pm 2.74
II	14.3 \pm 0.62	5.89 \pm 0.26	39.1 \pm 2.01	66.4 \pm 1.96	24.3 \pm 0.73	36.5 \pm 0.42	778.0 \pm 66.5	6.43 \pm 1.69	11.3 \pm 4.11	87.8 \pm 3.88
III	14.9 \pm 0.89	6.35 \pm 0.50	40.8 \pm 2.64	64.6 \pm 2.31	23.6 \pm 1.00	36.9 \pm 0.66	744.1 \pm 85.1	8.89 \pm 2.49	11.5 \pm 3.03	87.3 \pm 2.58
IV	14.7 \pm 0.86	5.90 \pm 0.45	39.8 \pm 3.0	67.4 \pm 1.87	24.9 \pm 0.91	36.9 \pm 0.65	761.1 \pm 74.4	7.62 \pm 1.34	11.7 \pm 4.27	87.8 \pm 4.06
V	12.6 \pm 1.80	5.17 \pm 0.82	34.3 \pm 5.08	66.2 \pm 2.33	24.4 \pm 0.95	36.8 \pm 0.36	790.0 \pm 107.5	8.19 \pm 1.47	8.89 \pm 3.86	89.8 \pm 3.67
Animales Machos										
Grupo	HG (p=0.013)	ETO (p=0.033)	HTO (p=0.007)	VCM (p=0.354)	HCM (p=0.755)	CHCM (p=0.082)	Plaquetas (p=0.114)	Leucocitos (p=0.245)	Neutrófilos (p=0.466)	Linfocitos (p=0.547)
T0	14.1 \pm 0.54	5.74 \pm 0.34	37.5 \pm 1.00	65.2 \pm 2.39	24.6 \pm 0.89	37.7 \pm 0.81	815.4 \pm 36.1	8.14 \pm 1.88	7.80 \pm 3.90	91.4 \pm 3.51
I	14.4 \pm 0.74	5.84 \pm 0.21	38.6 \pm 1.91	66.0 \pm 2.00	24.7 \pm 0.76	37.4 \pm 0.48	687.2 \pm 178.1	9.18 \pm 0.82	6.60 \pm 2.70	92.0 \pm 3.54
II	15.2 \pm 1.02	6.35 \pm 0.54	41.1 \pm 2.89	64.8 \pm 1.39	24.1 \pm 0.64	37.2 \pm 0.53	788.0 \pm 72.7	9.24 \pm 1.38	9.50 \pm 2.37	89.5 \pm 2.46
III	14.4 \pm 0.97	5.83 \pm 0.41	38.1 \pm 2.35	65.2 \pm 2.35	24.6 \pm 0.82	37.7 \pm 0.64	761.4 \pm 69.5	8.54 \pm 1.78	15.9 \pm 2.37	83.1 \pm 26.1
IV	13.4 \pm 1.01	5.53 \pm 0.37	35.8 \pm 0.57	64.9 \pm 1.52	24.3 \pm 0.79	37.6 \pm 0.77	822.4 \pm 72.02	10.42 \pm 0.37	11.2 \pm 9.40	88.2 \pm 9.51
V	14.3 \pm 1.43	5.88 \pm 0.72	38.9 \pm 4.60	66.2 \pm 1.13	24.4 \pm 0.69	36.9 \pm 0.74	780.0 \pm 81.2	9.57 \pm 1.88	9.00 \pm 3.00	90.4 \pm 3.13

Tabla VII. Parámetros bioquímicos (valor promedio \pm desviación estándar) por sexo y grupos. Estudio Dosis repetidas de a vacuna Quimi-Hib.

Grupo/Tratamiento	Creatinina (mg/dL)		ALAT (U/L)		ASAT (U/L)		ALP (U/L)	
	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂
I	0,58 \pm 0,2	0,76 \pm 0,1	15,1 \pm 2,3	15,6 \pm 4,8	177,3 \pm 5,0	178,1 \pm 3,8	145,5 \pm 6,4	213,7 \pm 27,3
Rango calculado	0,22-0 ,94	0,41-1,1	10,4 - 19,8	6,06 – 25,1	167,2- 187,4	170,4- 185,7	132,8-158,4	159,0- 268,3
Rango para la especie	0,20-0,94	0,29- 0,85	16 - 83	21- 85	43- 277	39- 283	33- 310	67- 382
II	0,20 \pm 0,04	0,27 \pm 0,04	18,4 \pm 3,2	24,0 \pm 3,2	105,7 \pm 3,4	155,0 \pm 53,2	200,2 \pm 3,4	214,4 \pm 2,8
III	0,95 \pm 0,3	0,67 \pm 0,07	35,0 \pm 1,75	19,9 \pm 6,8	100,9 \pm 2,7	110,8 \pm 3,6	178,3 \pm 7,8	248,0 \pm 3,4
IV	0,95 \pm 0,1	0,58 \pm 0,1	23,6 \pm 6,1	14,7 \pm 6,6	102,8 \pm 2,7	153,9 \pm 39,7	182,1 \pm 11,0	261,2 \pm 9,2
V	0,69 \pm 0,04	0,51 \pm 0,0	16,5 \pm 1,4	16,1 \pm 1,8	98,0 \pm 4,0	156,9 \pm 46,6	152,1 \pm 2,6	174,9 \pm 8,6
VI	0,62 \pm 0,2	0,61 \pm 0,2	24,4 \pm 3,9	27,7 \pm 2,9	97,7 \pm 10,7	100,32 \pm 6,9	246,2 \pm 26,7	224,0 \pm 20,9

Tabla VIII. Valores del peso relativo de los órganos evaluados (bazo, hígado y timo) por grupo de tratamiento y por sexo. (Media del parámetro medido \pm DS, y el rango de peso establecido por cada órgano a partir de la media de los valores del grupo control negativo \pm 2 unidades). Estudio Dosis repetidas de a vacuna Quimi-Hib.

Animales Hembras (p=0.000)			
Grupos	Bazo (Límites: 0.228 \pm 2)	Hígado (Límites: 3.53 \pm 2)	Timo (Límites: 0.38 \pm 2)
I	0.228 \pm 3.3 x 10 ⁻²	3.53 \pm 0.28	0.38 \pm 9.03 x 10 ⁻²
II	0.299 \pm 3.2 x 10 ⁻²	3.96 \pm 0.36	0.34 \pm 4.61x 10 ⁻²
III	0.242 \pm 3.4 x 10 ⁻²	4.14 \pm 0.34	0.34 \pm 6.26 x 10 ⁻²
IV	0.251 \pm 4.2 x 10 ⁻²	3.75 \pm 0.28	0.36 \pm 4.27 x 10 ⁻²
V	0.235 \pm 2.9 x 10 ⁻²	3.52 \pm 0.19	0.34 \pm 6.57 x 10 ⁻²
VI	0.183 \pm 2.7 x 10 ⁻²	3.76 \pm 0.28	0.22 \pm 4.25 x 10 ⁻²
Animales Machos (p=0.000)			
Grupos	Bazo (Límites: 0.274 \pm 2)	Hígado (Límites: 3.49 \pm 2)	Timo (Límites: 0.38 \pm 2)
I	0.274 \pm 4.3 x 10 ⁻²	3.49 \pm 7.4 x 10 ⁻²	0.38 \pm 3.5 x 10 ⁻²
II	0.269 \pm 2.9 x 10 ⁻²	3.67 \pm 0.27	0.34 \pm 5.1x 10 ⁻²
III	0.278 \pm 3.3 x 10 ⁻²	3.56 \pm 0.26	0.34 \pm 5.9 x 10 ⁻²
IV	0.30 \pm 7.19 x 10 ⁻²	3.83 \pm 0.16	0.37 \pm 5.8 x 10 ⁻²
V	0.268 \pm 4.71 x 10 ⁻²	3.41 \pm 0.45	0.38 \pm 7.2 x 10 ⁻²
VI	0.192 \pm 3.94 x 10 ⁻²	3.72 \pm 0.25	0.18 \pm 2.2 x 10 ⁻²

Tabla IX. Valor promedio semanal de consumo de alimento por grupo de tratamiento ($g \pm DS$). Estudio Toxicidad aguda de la vacuna pentavalente TRIVAC-HB + Quimi-Hib concentrada.

Grupo	Semana 1		Semana 2	
	♀ (p=0.105)	♂ (p=0.514)	♀ (p=0.456)	♂ (p=0.136)
I	17,0±0,4	19,0 ±1,9	18.6±0,6	23,3±1,0
II	16,7±0.4	18,6±1,3	18,5±0,6	22,9±1,2
III	17,3±0,6	16,7±0,5	19,6±0,8	24,4±0,5
IV	17,3±0,6	19,9±2,0	17,3±1,1	24,6±0,5
V	16,8±0,8	19,7±1,3	17,9±0,6	24,0±0,4
VI	15,4±1,1	20,1±1,1	18,1±0,6	23,8±0,4
VII	17,4±0,6	19,5±1,4	19,5±1,4	23,7±1,0

Tabla X. Valores promedios de peso corporal en animales hembras ($media \pm DS$) y valores de p entre grupos por semana de tratamiento. Estudio: Evaluación de la Toxicidad a Dosis Repetidas de la vacuna pentavalente TRIVAC-HB + Quimi-Hib concentrada.

Grupo	Sexo	Día 0 (p=0.054)	Día 7 (p=0.682)	Día 14 (p= 0.522)	Día 21	Día 28
I	♀	85,6 ± 4,0	141 ± 10,6	168,0 ±15,2	---	---
II		84,9 ± 4,7	138,0 ± 5,5	163,0 ± 5,8		
III		83,8 ± 4,0	132,6 ± 3,6	163,0 ± 4,4		
IV		85,8 ± 3,4	136,8 ± 4,5	166,8 ± 4,2		
V		85,3 ± 3,5	143,6 ± 14,4	174,0 ±20,0		
VI		81,3 ± 3,8	137,8 ± 6,6	170,4 ± 10,8		
VII		87,0 ± 5,3	135,8 ± 5,5	158,0 ± 8,8		
VIII		81,0 ± 4,4	134,8 ±7,4	162,4 ± 8,1		

Tabla XI. Valores promedios de peso corporal en animales machos (media \pm DS) y valores de p entre grupos por semana de tratamiento. Estudio: Evaluación de la Toxicidad a Dosis Repetidas de la vacuna pentavalente TRIVAC-HB + Quimi-Hib concentrada.

Grupo	Sexo	Día 0 (p= 0.622)	Día 7 (p=0.580)	Día 14 (p= 0.928)	Día 21	Día 28
I	♂	87,0 \pm 7,5	157,6 \pm 12,7	213,6 \pm 19,2	---	---
II		83,6 \pm 2,4	151,4 \pm 14,4	206 \pm 24,2		
III		88,0 \pm 4,9	163,6 \pm 11,4	215,2 \pm 17,1		
IV		87,2 \pm 5,3	153,2 \pm 13,9	200,4 \pm 18,3		
V		88,6 \pm 4,5	161,6 \pm 7,7	206,6 \pm 21,0		
VI		86,9 \pm 8,3	153,8 \pm 13,1	197,8 \pm 24,0		
VII		85,5 \pm 2,9	155,0 \pm 5,6	208,0 \pm 6,0		
VIII		87,6 \pm 6,2	162,2 \pm 7,6	215,2 \pm 9,0		

Tabla XII. Valores promedios de alimento consumido por los animales (media \pm DS) y valores de p entre grupos por semana de tratamiento. Estudio: Evaluación de la Toxicidad a Dosis Repetidas de la vacuna pentavalente TRIVAC-HB + Quimi-Hib concentrada.

Grupo	Semana 1		Semana 2		Semana 3		Semana 4	
	♀ (p=0.713)	♂ (p=0.713)	♀ (p=0.842)	♂ (p=0.842)	♀	♂	♀	♂
I	17,7	19,4	16,5	20,3	---	---	---	---
II	17,8	19,6	16,5	20,1				
III	17,0	20,4	16,0	21,3				
IV	17,6	19,7	16,0	18,7				
V	17,6	20,1	16,5	19,5				
VI	17,9	19,2	19,5	18,5				
VII	17,2	19,5	15,9	20,7				
VIII	17,1	19,6	15,2	20,5				

Tabla XIII. Parámetros hematológicos (valor promedio \pm desviación estándar) de los animales hembras del Estudio: Evaluación de la Dosis repetidas de la vacuna pentavalente TRIVAC-HB + Quimi-Hib concentrada

Grupo	Hb (g/dL)	Hto (vol/L)	Leuco ($\times 10^3$)	Polimorfonucleares (%)	Linfoc (%)	Monocitos (%)	Eosinófilos (%)
Basal	13,5 \pm 0,50	0,45 \pm 0,02	12,5 \pm 3,55	18 \pm 8,09	76,8 \pm 5,7	3 \pm 3,0	1 \pm 0,00
Rango Normal para la especie	13,05-14,04	0,43-0,47	9,0-16,1	10-26,0	71-83	0,0-6,0	0-1
I	14,02 \pm 0,74	0,44 \pm 0,04	11,17 \pm 1,78	21 \pm 2,6	76,6 \pm 3,1	4 \pm 2,8	0 \pm 0,00
II	13,99 \pm 0,30	0,46 \pm 0,02	10,61 \pm 6,26	24 \pm 4,0	75 \pm 5,0	2 \pm 0,0	0 \pm 0,00
III	13,17 \pm 0,35	0,43 \pm 0,01	11,12 \pm 0,94	22 \pm 1,7	76 \pm 1,0	3 \pm 2,8	0 \pm 0,00
IV	12,49 \pm 0,82	0,41 \pm 0,04	9,57 \pm 2,40	19 \pm 3,1	78,6 \pm 3,1	1,5 \pm 0,7	1 \pm 0,00
V	11,36 \pm 0,83	0,38 \pm 0,03	11,92 \pm 5,34	35 \pm 3,8	61,3 \pm 7,1	4,5 \pm 3,5	1 \pm 0,00
VI	11,76 \pm 0,60	0,39 \pm 0,02	14,56 \pm 2,16	37 \pm 3,1	61,0 \pm 4,6	2,0 \pm 0,0	1,5 \pm 0,7
VII	14,43 \pm 0,35	0,45 \pm 0,01	7,54 \pm 2,03	51 \pm 3,6	0,48 \pm 4,0	1,5 \pm 0,7	1 \pm 0,00

Leyenda:

HB: Hemoglobina, Hto: hematocrito; Leuco: leucocitos; Linfoc: linfocitos.

Tabla XIV. Parámetros hematológicos (valor promedio \pm desviación estándar) de los animales machos del Estudio: Evaluación de la Dosis repetidas de la vacuna pentavalente TRIVAC-HB + Quimi-Hib concentrada

Grupo	Hb (g/dL)	Hto (vol/L)	Leuco (x 10 ³)	Polimorfonucleares (%)	Linfoc (%)	Monocitos (%)	Eosinófilos (%)
Basal	13,55\pm0,50	0,45\pm0,02	12,58\pm3,55	19 \pm 7,5	76,2\pm4,7	5,7\pm2,5	1\pm0,00
Rango Normal para la especie	13,05-14,04	0,43-0,47	9,0-16,1	11,5-26	71-81	3,3-8	0-1
I	13,37 \pm 0,18	0,44 \pm 0,02	10,83 \pm 4,54	18,6 \pm 4,5	78,6 \pm 4,2	1,0 \pm 0,0	2,5 \pm 0,7
II	13,46 \pm 0,72	0,44 \pm 0,01	11,1 \pm 1,49	26 \pm 5,3	72,0 \pm 4,6	1,3 \pm 0,6	1 \pm 0,0
III	13,17 \pm 0,35	0,43 \pm 0,01	11,12 \pm 0,94	19,3 \pm 5,5	79,0 \pm 3,6	1,5 \pm 0,7	0 \pm 0.00
IV	12,49 \pm 0,82	0,41 \pm 0,04	9,57 \pm 2,40	21,6 \pm 2,5	77,0 \pm 2,3	1,5 \pm 0,7	2 \pm 0,0
V	12,63 \pm 0,48	0,41 \pm 0,01	16,20 \pm 3,05	38,6 \pm 2,5	59,0 \pm 3,6	3,5 \pm 2,1	0 \pm 0.00
VI	11,91 \pm 0,28	0,40 \pm 0,02	12,54 \pm 2,23	37,2 \pm 9,7	62,0 \pm 10,1	1,5 \pm 0,7	0 \pm 0.00
VII	13,95 \pm 0,50	0,44 \pm 0,02	7,57 \pm 1,79	37,3 \pm 4,6	62,0 \pm 3,8	1,5 \pm 0,7	0 \pm 0.00

Leyenda:

HB: Hemoglobina, Hto: hematocrito; Leuco: leucocitos; Linfoc: linfocitos.

Tabla XV. Determinaciones bioquímicas por grupo de tratamiento, animales hembras. (Media del parámetro medido \pm DS y valores de p entre grupos), animales hembras. Estudio: Evaluación de la Dosis Repetidas de la vacuna pentavalente TRIVAC-HB + Quimi-Hib concentrada.

Grupo	Sexo	Cratinina (mg/dL)	ALAT (U/L)	ASAT (U/L)	ALP (U/L)
T0	♀	0,43 \pm 0,09	75,28 \pm 6,6	115.0 \pm 7,3	139,6 \pm 3,1
rango normal		0,34-0,54	68,6-81,8	107,6 - 122,4	136,5-142,8
rango para la especie		0,20-0,94	16 - 83	43- 277	33- 310
I		0,46 \pm 0,06	81,4 \pm 1,1	134,6 \pm 1,0	143,4 \pm 1,0
II		0,50 \pm 0,0	82,5 \pm 2,2	136,1 \pm 1,3	147,0 \pm 2,2
III		0,37 \pm 0,1	83,3 \pm 1,8	138,6 \pm 1,5	148,27 \pm 1,6
IV		0,38 \pm 0,12	83,3 \pm 1,1	140,9 \pm 1,2	150,6 \pm 1,6
V		0,44 \pm 0,06	84,2 \pm 1,7	146,4 \pm 1,8	149,5 \pm 1,8
VI		0,43 \pm 0,16	84,0 \pm 1,6	147,5 \pm 1,9	148,0 \pm 2,9
VII		0,38 \pm 0,0	84,4 \pm 1,3	148,6 \pm 1,8	148,8 \pm 1,2

Tabla XVI. Determinaciones bioquímicas por grupo de tratamiento, animales machos. (Media del parámetro medido \pm DS y valores de p entre grupos), animales machos. Estudio: Evaluación de la Dosis Repetidas de la vacuna pentavalente TRIVAC-HB +Quimi-Hib concentrada.

Grupo	Sexo	Cratinina (mg/dL)	ALAT (U/L)	ASAT (U/L)	ALP (U/L)
T0	♂	0,47 \pm 0,06	82,4 \pm 2,5	204,8 \pm 4,2	232,2 \pm 5,2
rango normal		0,41-0,54	79,9 - 84,9	200,6-209,0	226,9-237,5
rango para la especie		0,29- 0,85	21- 85	39- 283	67- 382
I		0,46 \pm 0,0	87,2 \pm 1,7	223,0 \pm 2,0	243,5 \pm 4,2
II		0,50 \pm 0,0	88,8 \pm 1,1	226,01 \pm 1,1	247,7 \pm 1,6
III		0,35 \pm 0,13	89,1 \pm 0,7	227,9 \pm 1,4	248,5 \pm 1,3
IV		0,31 \pm 0,06	88,3 \pm 1,6	236,1 \pm 5,7	249,7 \pm 0,4
V		0,44 \pm 0,0	90 ,0 \pm 1,3	238,4 \pm 2,0	248,0 \pm 1,9
VI		0,42 \pm 0,06	87,5 \pm 1,5	238,8 \pm 1,6	247,8 \pm 1,2
VII		0,45 \pm 0,13	87,3 \pm 1,6	237,6 \pm 2,0	248,0 \pm 1,4

Tabla XVII. Valores del peso relativo de los órganos evaluados por grupo de tratamiento. (Media del parámetro medido \pm DS, y el rango de peso establecido por cada órgano a partir de la media de los valores del grupo control negativo \pm 2 unidades), animales hembras sacrificados tras 4 administraciones de los distintos tratamientos. Estudio Dosis repetidas de a vacuna pentavalente TRIVAC-HB + Quimi-Hib concentrada.

Grupo	Sexo	Bazo (p= 0.023)	Adrenales (p= 0.308)	Riñón Izquierdo (p=0.006)	Riñón derecho (p= 0.274)	Hígado (p= 0.035)	Timo (p= 0.633)	Pulmón (p= 0.488)
I	♀	0,32 \pm 0,05	0,03 \pm 0,0	0,47 \pm 0,02	0,48 \pm 0,02	5,26 \pm 0,32	0,33 \pm 0,04	0,89 \pm 0,26
Rango Normal		0,27 - 0,36	0,028 - 0,037	0,44 -0,49	0,458 - 0,495	4,935 – 5,578	0,29 - 0,37	0,63 -1,15
II		0,29 \pm 0,04	0,03 \pm 0,01	0,47 \pm 0,04	0,49 \pm 0,04	5,06 \pm 0,07	0,34 \pm 0,04	0,85 \pm 0,08
III		0,29 \pm 0,04	0,03 \pm 0,00	0,47 \pm 0,01	0,48 \pm 0,01	5,11 \pm 0,26	0,37 \pm 0,08	0,84 \pm 0,10
IV		0,35 \pm 0,04	0,03 \pm 0,01	0,49 \pm 0,04	0,51 \pm 0,06	5,12 \pm 0,61	0,36 \pm 0,05	0,93 \pm 0,15
V		0,31 \pm 0,04	0,03 \pm 0,01	0,44 \pm 0,02	0,49 \pm 0,02	5,05 \pm 0,20	0,34 \pm 0,04	0,74 \pm 0,18
VI		0,33 \pm 0,02	0,03 \pm 0,00	0,52 \pm 0,03	0,52 \pm 0,05	4,85 \pm 0,12	0,32 \pm 0,04	0,88 \pm 0,14
VII		0,36 \pm 0,04	0,03 \pm 0,01	0,51 \pm 0,03	0,51 \pm 0,02	4,57 \pm 0,32	0,36 \pm 0,03	0,78 \pm 0,09

Tabla XVIII. Valores del peso relativo de los órganos evaluados por grupo de tratamiento. (Media del parámetro medido \pm DS, y el rango de peso establecido por cada órgano a partir de la media de los valores del grupo control negativo \pm 2 unidades), animales machos sacrificados tras 4 administraciones de los distintos tratamientos. Estudio Dosis repetidas de a vacuna pentavalente TRIVAC-HB + Quimi-Hib concentrada.

Grupo	Sexo	Bazo (p= 0.335)	Adrenales (p= 0.403)	Riñón Izquierdo (p= 0.096)	Riñón derecho (p= 0.221)	Hígado (p= 0.033)	Timo (p= 0.184)	Pulmón (p= 0.517)
I	♂	0,33 \pm 0,04	0,06 \pm 0,08	0,47 \pm 0,02	0,48 \pm 0,03	5,27 \pm 0,39	0,37 \pm 0,05	0,80 \pm 0,07
Rango Normal		0,29 -0,37	0,00 - 0,14	0,45 - 0,49	0,45 -0,51	4,88 - 5,66	0,32-0,42	0,73 - 0,87
II		0,32 \pm 0,03	0,02 \pm 0,004	0,46 \pm 0,03	0,48 \pm 0,03	4,76 \pm 0,5	0,32 \pm 0,05	0,94 \pm 0,28
III		0,34 \pm 0,05	0,03 \pm 0,005	0,50 \pm 0,05	0,50 \pm 0,04	5,06 \pm 0,4	0,34 \pm 0,02	0,79 \pm 0,20
IV		0,40 \pm 0,12	0,02 \pm 0,003	0,51 \pm 0,03	0,53 \pm 0, 04	4,87 \pm 0,34	0,32 \pm 0,04	0,77 \pm 0,19
V		0,32 \pm 0,04	0,03 \pm 0,006	0,49 \pm 0,03	0,50 \pm 0,03	4,52 \pm 0,28	0,31 \pm 0,07	0,95 \pm 0,26
VI		0,30 \pm 0,02	0,03 \pm 0,003	0,50 \pm 0,03	0,52 \pm 0,03	4,79 \pm 0,52	0,28 \pm 0,03	0,82 \pm 0,15
VII		0,30 \pm 0,04	0,02 \pm 0,005	0,49 \pm 0,02	0,51 \pm 0,02	4,38 \pm 0,20	0,31 \pm 0,07	0,97 \pm 0,27

Tabla XIX. Valores del peso relativo de los órganos evaluados por grupo de tratamiento y por sexo. (Media del parámetro medido \pm DS, y el rango de peso establecido por cada órgano a partir de la media de los valores del grupo control negativo \pm 2 unidades), animales hembras sacrificados tras 14 administraciones de los distintos tratamientos. Estudio Dosis repetidas de a vacuna pentavalente TRIVAC-HB + Quimi-Hib concentrada.

Grupo	Sexo	Bazo (p= 0.003)	Adrenales (p=0.132)	Riñón Izquierdo (p= 0.634)	Riñón derecho (p= 0.167)	Hígado (p= 0.094)	Timo (p= 0.213)	Pulmón (p= 0.503)
I	♀	0,27 \pm 0,03	0,03 \pm 0,01	0,50 \pm 0,16	0,55 \pm 0,27	5,21 \pm 0,62	0,34 \pm 0,08	0,72 \pm 0,05
Rango Normal		0,24 - 0,30	0,02 - 0,04	0,34 -0,66	0,28 - 0,82	4,59 – 5,83	0,26 - 0,42	0,67 - 0,77
II		0,26 \pm 0,04	0,03 \pm 0,004	0,47 \pm 0,03	0,48 \pm 0,04	4,97 \pm 0,44	0,30 \pm 0,05	0,84 \pm 0,12
III		0,32 \pm 0,04	0,03 \pm 0,002	0,47 \pm 0,02	0,48 \pm 0,01	5,34 \pm 0,61	0,32 \pm 0,04	0,87 \pm 0,19
IV		0,36 \pm 0,05	0,03 \pm 0,005	0,45 \pm 0,03	0,45 \pm 0,02	5,07 \pm 0,34	0,39 \pm 0,03	0,82 \pm 0,07
V		0,41 \pm 0,17	0,03 \pm 0,002	0,48 \pm 0,02	0,49 \pm 0,03	5,40 \pm 0,15	0,33 \pm 0,04	0,85 \pm 0,06
VI		0,48 \pm 0,07	0,04 \pm 0,005	0,47 \pm 0,02	0,49 \pm 0,02	5,21 \pm 0,42	0,32 \pm 0,05	0,88 \pm 0,17
VII		0,27 \pm 0,04	0,04 \pm 0,004	0,47 \pm 0,03	0,48 \pm 0,05	4,511 \pm 0,41	0,33 \pm 0,04	0,82 \pm 0,13

Tabla XX. Valores del peso relativo de los órganos evaluados por grupo de tratamiento y por sexo. (Media del parámetro medido \pm DS, y el rango de peso establecido por cada órgano a partir de la media de los valores del grupo control negativo \pm 2 unidades), animales machos sacrificados tras 14 administraciones de los distintos tratamientos. Estudio Dosis repetidas de a vacuna pentavalente TRIVAC-HB + Quimi-Hib concentrada.

Grupo	Sexo	Bazo (p= 0.000)	Adrenales (p= 0.009)	Riñón Izquierdo (p= 0.878)	Riñón derecho (p= 0.221)	Hígado (p= 0.033)	Timo (p= 0.184)	Pulmón (p= 0.517)
I	♂	0,30 \pm 0,03	0,02 \pm 0,003	0,45 \pm 0,03	0,46 \pm 0,03	5,22 \pm 0,28	0,30 \pm 0,04	0,74 \pm 0,13
Rango Normal		0,27 - 0,30	0,01 - 0,03	0,42 - 0,48	0,43 - 0,49	4,94 - 5,50	0,26 - 0,35	0,61 - 0,87
II		0,29 \pm 0,06	0,02 \pm 0,006	0,45 \pm 0,08	0,47 \pm 0,08	5,12 \pm 1,26	0,29 \pm 0,05	0,64 \pm 0,11
III		0,39 \pm 0,03	0,02 \pm 0,003	0,44 \pm 0,03	0,45 \pm 0,03	5,03 \pm 0,40	0,35 \pm 0,06	0,75 \pm 0,16
IV		0,44 \pm 0,04	0,02 \pm 0,006	0,45 \pm 0,02	0,46 \pm 0,02	4,61 \pm 0,19	0,32 \pm 0,02	0,77 \pm 0,10
V		0,50 \pm 0,05	0,03 \pm 0,003	0,48 \pm 0,03	0,47 \pm 0,03	4,93 \pm 0,55	0,26 \pm 0,06	0,78 \pm 0,09
VI		0,58 \pm 0,009	0,03 \pm 0,009	0,47 \pm 0,06	0,49 \pm 0,04	4,32 \pm 0,57	0,30 \pm 0,03	0,74 \pm 0,16
VII		0,20 \pm 0,02	0,02 \pm 0,002	0,46 \pm 0,02	0,47 \pm 0,04	4,92 \pm 0,17	0,29 \pm 0,03	0,62 \pm 0,12

Tabla XXI. Valores de área de diferentes regiones del bazo evaluados por grupo de tratamiento y por sexo. (Media del parámetro medido \pm DS), animales hembras. Estudio Dosis repetidas de a vacuna pentavalente TRIVAC-HB + Quimi-Hib concentrada

Grupo	Sexo	Área total	Área folículo	Área zona B	Área zona T
II	♀	799.3 \pm 181.2	16.6 \pm 6.94	11.6 \pm 4.59	4.99 \pm 2.39
III		680.1 \pm 110.7	15.0 \pm 0.37	11.6 \pm 2.34	3.47 \pm 1.55
IV		572.5 \pm 196.2	26.4 \pm 10.6	16.4 \pm 5.98	9.99 \pm 6.91
V		659.7 \pm 112.4	35.3 \pm 16.6	27.8 \pm 15.8	7.49 \pm 3.39
VIII		810.5 \pm 131.9	37.4 \pm 18.4	28.6 \pm 17.6	8.87 \pm 4.95

Tabla XXII. Valores de área de diferentes regiones del bazo evaluados por grupo de tratamiento y por sexo. (Media del parámetro medido \pm DS), animales machos. Estudio Dosis repetidas de a vacuna pentavalente TRIVAC-HB + Quimi-Hib concentrada.

Grupo	Sexo	Área total	Área folículo	Área zona B	Área zona T
II	♂	1028.9 \pm 58.4	30.1 \pm 12.1	19.0 \pm 8.84	11.0 \pm 4.73
III		943.5 \pm 135.8	14.2 \pm 5.24	11.2 \pm 4.52	2.96 \pm 1.02
IV		721.7 \pm 77.2	36.8 \pm 19.6	29.2 \pm 19.6	7.68 \pm 4.88
V		774.6 \pm 183.6	23.2 \pm 8.44	15.3 \pm 5.98	7.92 \pm 3.67
VIII		789.0 \pm 164.2	26.9 \pm 10.3	18.4 \pm 5.95	8.57 \pm 7.73

Tabla XXIII. Incidencia de la aparición de centros germinativos en bazo evaluados por grupo de tratamiento y por sexo. (Media del parámetro medido \pm DS). Estudio Dosis repetidas de a vacuna pentavalente TRIVAC-HB + Quimi-Hib concentrada.

Grupo	Centros germinativos	
	♀	♂
II	1 \pm 1.73	1.25 \pm 1.26
III	1.2 \pm 0.45	2 \pm 0.00
IV	1 \pm 0.71	2 \pm 1.41
V	1.4 \pm 0.55	1.8 \pm 1.30
VIII	1 \pm 1.23	1.2 \pm 1.30