

PRUEBAS DE INOCUIDAD, PUREZA Y ACTIVIDAD DE LAS VACUNAS ANTIVARIOLICAS*

DR. ELSE KRAG ANDERSEN

Statens Seruminstitut, Copenhagen, Dinamarca

La vacunación es el único medio efectivo de prevenir la viruela, temible enfermedad que aún se presenta endémica o epidémicamente en algunas partes del mundo.

La vacunación es esencial en todos los países, tanto si existe la enfermedad como si no se ha presentado caso alguno durante muchos años; especialmente hoy en día en que los medios de comunicación aumentan constantemente.

En algunos países, la población está protegida por la vacunación obligatoria; en otros, la vacunación es opcional, y es en ellos, en especial, donde es preciso contar con una provisión suficiente de vacuna eficaz, probada con regularidad, para la vacunación de todos los habitantes.

Las vacunas antivariólicas contienen virus vivo de vaccinia, que es una variante atenuada de la viruela o una variante de vacuna. Casi todos los establecimientos que preparan linfa vacunal mantienen su propia cepa, cuyo origen resulta casi imposible localizar.

Los métodos de preparación varían también de un lugar a otro. Por lo general, el virus se propaga en la piel de animales, tales como los terneros, búfalos u ovejas, con pases periódicos por la piel de conejos, con el objeto de evitar su deterioro.

El contenido de las pústulas se cosecha de 4 a 6 días después de la escarificación. Las vacunas preparadas de esta manera suelen estar fuertemente contaminadas de bacterias. A fin de aminorar el contenido bacteriano se pueden emplear varios antibióticos, tales como el fenol, la penicilina, estreptomycin, glicerol, etc.

Hay varias maneras de preparar vacunas

* Trabajo presentado en el Seminario de Vacunación Antivariólica celebrado en Lima, Perú, del 20 al 25 de agosto de 1956.

libres de bacterias, ya sea cultivando el virus en la membrana corioalantoica de huevos fecundados, en cultivo de tejidos o bien en conejos lactantes. En Suecia se prepara la vacuna en cultivo de tejido de la piel de embriones de ternera a fin de que las condiciones de desarrollo se asemejen en todo lo posible a las que se ha visto que producen una vacuna cualitativamente satisfactoria.

En Dinamarca realizamos, hace algunos años, experimentos sobre la posible preparación de vacuna utilizando el hígado de conejos lactantes, infectados por vía intracutánea. Sin embargo, estas vacunas son cualitativamente distintas de las que se obtienen en la piel, puesto que no pueden producir vesículas en los niños cuando se aplican en la piel, mientras que administradas por vía intracutánea causan reacciones y la formación de anticuerpos.

Puesto que las vacunas antivariólicas contienen bacterias y un virus que produce la enfermedad en los seres humanos, es evidente la importancia de que se adopten medidas satisfactorias de seguridad y pruebas de pureza.

Las vacunas antivariólicas no deben contener bacterias patógenas para el ser humano, tales como *Bacillus anthracis*, *Clostridium tetani*, estreptococos hemolíticos y estafilococos piógenos. El número permisible de microorganismos viables en 1 ml. de vacuna, varía entre 1.000 y 5.000, de acuerdo con los procedimientos establecidos en los diferentes países.

Explicaré a continuación la forma en que se hacen las pruebas de pureza e inocuidad de las vacunas antivariólicas en el Statens Seruminstitut de Dinamarca; pero he de señalar que existen otros métodos y procedimientos igualmente buenos.

Pruebas de inocuidad y pureza

Se vierten 0,5 ml. de vacuna diluída al 1:100 en cada una de tres pequeñas cajas de Petri; se vierten en cada caja y se mezclan por medio de rotación suave, 15 ml. de agar, con un 5% de suero de caballo mantenido a 45° C. Después de 48 horas de incubación a 37° C. y de dos días más a la temperatura ambiente, se cuenta el número de colonias formadas en cada caja de Petri. El promedio de colonias no debe exceder de 25, es decir, de 5.000 microorganismos por ml. Toda colonia que tenga color naranja o amarillo se analiza en cuanto a su capacidad de fermentar manitol y coagular plasma. Se esparce una gota de vacuna sin diluir y una gota de vacuna diluída al 1:100 en cada una de dos láminas de agar sangre. Se examinan al cabo de 24 y 48 horas de incubación a 37° C., para determinar la presencia de colonias hemolíticas; toda colonia sospechosa se transfiere a un caldo de suero, se investiga microscópicamente después de la incubación y se somete a prueba respecto a la producción de hemolisina. Se tipifican los estreptococos hemolíticos que se encuentren presentes.

En cada uno de tres tubos de caldo de tioglicolato líquido que contengan una pequeña cantidad de agar (U.S. Pharmacopoeia 13:689, 1947), se inocula 0,1 ml. de vacuna sin diluir. Después de cinco días de incubación, se mezcla el contenido de todos los tubos; se inoculan 0,2 ml. por vía subcutánea a tres ratones que pesen entre 18 y 20 g., y también 1 ml. por vía subcutánea, a un cobayo. Se someten los animales a observación diaria durante ocho días. Si muere alguno, se hacen frotis en agar sangre, del hígado, bazo, ganglio axilar local y del lugar de la inoculación. Se identifican los microorganismos potencialmente patógenos y se calcula la dosis letal mínima por medio de inoculaciones subcutáneas al ratón. Si se descubre algún microorganismo patógeno para el ratón y no se trata de una de las bacterias antes citadas se debe decidir sobre la aceptabilidad de la vacuna.

A fin de evitar el efecto bacteriostático de

los antibióticos agregados a la vacuna para reducir su contenido bacteriano, deben ser neutralizados hasta que su concentración en las láminas o tubos inoculados no inhiba el desarrollo.

La actividad bacteriostática *in vitro* de la penicilina y de la estreptomycinina contra los diferentes microorganismos cuyas pruebas hemos de realizar especialmente, es, según Long *et al* (*The Lancet*, 1950, I, pág. 1139) la siguiente:

	<i>Estafilococos piógenos</i>	<i>Estreptococos hemolíticos</i>	<i>Cl. tetani</i>
Penicilina, µg/ml.	0,03-0,06	0,006-	0,031 0,1
Estreptomycinina, µg/ml.	2-10	50-100	1.000

La concentración de los antibióticos que, por lo general, se utilizan en las vacunas es de 250 unidades/ml. de penicilina, o sea, el equivalente de 150 µg/ml., y 0,5 µg de estreptomycinina. Es decir, que si se emplean 0,5 ml. de una dilución al 1:100 para 15 ml. de medio, la concentración final en las láminas será de 0,05 µg de penicilina y 0,15 µg de estreptomycinina; y en las pruebas en que se emplea vacuna no diluída, 1,5 µg de penicilina y 5 µg de estreptomycinina por ml. del medio.

Esto representa 250 veces la concentración de penicilina necesaria para inhibir los estafilococos piógenos.

El clorhidrato de hidroxilamina, en proporción de 0,1 ml. en dilución al 1:300, agregado a 1 ml. de vacuna sin diluir, puede neutralizar el efecto, tanto de la penicilina como de la estreptomycinina, en las concentraciones corrientes, después de dejarlo aproximadamente durante una hora a la temperatura ambiente, sin que ejerza por sí efecto bacteriostático alguno a esta concentración.

Para la prueba de neutralización, se puede colocar una gota de vacuna sin diluir en una lámina de agar, fuertemente inoculada con estafilococos sensibles, tanto a la penicilina como a la estreptomycinina.

Si se usa únicamente estreptomycinina a la

concentración de 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml.}$, o se emplea 0,5 % de fenol, la dilución de la vacuna inoculada es suficiente para evitar el efecto bacteriostático.

En cuanto a la adición de antibióticos a las vacunas antivariólicas existe, desde luego, el posible peligro de un efecto de sensibilización, especialmente cuando se utiliza estreptomina. Cada vez se emplea mayor número de vacunaciones diferentes para el control de distintas enfermedades; algunas de esas vacunas, como la utilizada contra la poliomiélitis y algunas antivariólicas, contienen penicilina y estreptomina. La vacuna contra la poliomiélitis se administra tres veces, y por vía intracutánea, y la vacuna antivariólica, una o varias veces, por escarificación. Es posible que algunos individuos hayan recibido ya tratamiento de estreptomina y, en tales casos, incluso una cantidad muy pequeña puede producirles sensibilización. Es preciso evitar esas complicaciones, especialmente en relación con la vacunación antivariólica. Además, no es necesario emplear estreptomina en las vacunas antivariólicas.

Cuando se realizan pruebas de esterilidad en vacunas cultivadas en huevo, hay que prestar atención a la posibilidad de contaminación con *Pleuropneumonia* y, por lo tanto, debe utilizarse un medio adecuado. Un 15-20 % de caldo de suero permite el desarrollo de este microorganismo.

Además del riesgo de contaminación bacteriana, existe también la posibilidad de que las vacunas se puedan contaminar con virus extraños. No se cuenta sin embargo con métodos para descubrir esos virus contaminantes¹.

Al efectuar pruebas con una vacuna procedente de la India oriental, preparada en búfalo, descubrimos la presencia de un virus extraño imposible de identificar. Ratones lactantes infectados con la vacuna morían, por lo general, dos días después de la in-

fección; esto resultaba sorprendente, puesto que suelen morir de 5 a 7 días después de la infección con vaccinia. Por medio de varios pases en ratones y conejos lactantes pudimos aislar el virus contaminante y el virus de la vaccinia. Los experimentos de neutralización no revelaron protección cruzada alguna entre los dos virus.

Pruebas de actividad

Resultaría sumamente conveniente establecer con carácter internacional requisitos mínimos a fin de estandarizar la actividad de la vacuna antivariólica y asegurar que una vacunación, sea cual fuere la vacuna utilizada, proporcione cierto grado de protección contra la viruela. Esto podría lograrse más fácilmente si no hubiera diferencias cualitativas entre las vacunas.

Se emplean varios métodos para calcular la actividad de las vacunas antivariólicas:

1. titulación intracutánea en conejos;
2. titulación por escarificación en conejos;
3. recuento de pústulas en la membrana corioalantoica de embrión de pollo;
4. cálculo del efecto citopatógeno en el cultivo de tejido.

Me limitaré a dar una breve descripción de los métodos, puesto que han sido explicados en detalle en otros trabajos.

Método de titulación intracutánea

Se inocula 0,1 ml. de la dilución en serie de la vacuna en la piel de conejos blancos depilados. Se pueden aplicar de 30 a 40 inyecciones a cada conejo, lo que significa que se pueden titular por lo menos 5 vacunas, junto con una vacuna testigo por cada conejo. Como la susceptibilidad del conejo al virus de la vaccinia varía, hay que utilizar dos conejos para cada titulación. Las reacciones alcanzan su punto máximo entre los 4 y 6 días después de la inyección. Se anota diariamente el diámetro de la reacción.

Nosotros utilizamos este método en el Statens Seruminstitut de Dinamarca para probar nuestras propias vacunas, y los resultados son satisfactorios. Hemos obser-

¹ Sin embargo es posible que los métodos recientes de titulación de virus en cultivos de tejidos en capas monocelulares cubiertas de agar permitan delatar la presencia de virus contaminantes.

vado, sin embargo, que la aplicación de este método produce, en la mayoría de las otras vacunas, titulaciones que no son seguras; algunas dan reacciones muy débiles, aunque de un alto título, sin relación con la dosis administrada; otras no dan reacción alguna a la dilución de 1:100. El Dr. Collier, del Instituto Lister, de Inglaterra, ha mostrado que la interferencia entre los virus muertos y los virus vivos puede ser la causa de esas reacciones tan débiles; pero seguramente intervienen también en esto diferencias cualitativas entre las vacunas.

El método de titulación por escarificación

Se frota minuciosamente cierta cantidad, por ejemplo, 0,1 ó 0,2 ml. de diluciones en serie de vacuna en un área escarificada—2,5 x 5 cm.—de la piel de conejos. Con este método se han de emplear también dos conejos para cada titulación, y se debe titular una vacuna testigo simultáneamente con la vacuna que se ensaya.

Al parecer, este método facilita información más exacta sobre la actividad de una vacuna que el método de titulación intracutánea, pero las diferencias cualitativas entre las vacunas parece que influyen también en los resultados. Sin embargo, como el método de escarificación se emplea en la vacunación de seres humanos, parece indicado calcular la actividad de las vacunas por medio de una técnica semejante.

Una vacuna satisfactoria debe producir lesiones confluentes cuando se diluye a 1:1.000, y por lo menos 10 vesículas, cuando se diluye a 1:9.000.

Titulación en huevo

Según el método de recuento de vesículas, se inocula 0,1 ó 0,2 ml. de diluciones decuplicadas en serie en la membrana corioalantoica de embriones de pollo de 11 a 12 días de edad. Para cada dilución se emplean de 5 a 6 huevos, y se cuentan las vesículas al cabo de tres días de incubación a 36°C. El título se expresa, por lo general, en función del número de unidades infectivas por ml. de vacuna, número obtenido del promedio de

vesículas de las membranas infectadas con la misma dilución de vacuna.

El título que se obtiene mediante el recuento de vesículas es mucho más alto que el calculado en conejos. Con alguna experiencia, se pueden obtener recuentos en forma fácilmente reproducible, suponiendo que las partículas del virus estén dispersadas con uniformidad. Sin embargo, no siempre sucede así cuando se trata de vacunas antivariólicas, y a veces puede aparecer en la membrana una masa de vesículas que no es posible contar.

Otra dificultad observada es que algunas tienden a producir vesículas tanto grandes como pequeñas y que estas últimas se desarrollan a un ritmo más lento y, por lo tanto, son más difíciles de contar. Y al aumentar el período de incubación de 3 a 4 días, a fin de dar tiempo a que se desarrollaran todas las pequeñas vesículas, se produjo una proporción mayor de muertes de los embriones.

Por otra parte el subcultivo de las pequeñas vesículas dió origen a vesículas tanto grandes como pequeñas, de modo que lo dicho no parece que sea debido a contaminación.

Titulación en cultivo de tejido

La titulación de las vacunas antivariólicas en cultivo de tejido se encuentra por el momento en la fase experimental. Se ha demostrado que el virus de vaccinia causa alteraciones citopatogénicas en cultivos de tejido similares a las que producen otros virus.

En la titulación se emplean casi exclusivamente tubos giratorios, mientras que los tipos de células pueden variar. Se pueden utilizar células sueltas procedentes de tejido tripsinizado o bien fragmentos de tejido finamente dividido e incrustados en el plasma.

Hemos ensayado la titulación de algunas vacunas en tubos giratorios utilizando fragmentos de tejido de la piel de embriones de ternera, es decir, la misma técnica que se usa en Suecia.

Si las condiciones son óptimas, el desarrollo del tejido comienza inmediatamente y en el término de seis días se produce un

desarrollo confluyente que consiste casi exclusivamente en células fibroblásticas, que permanecen casi sin alteración durante una quincena aproximadamente. Cuando el tejido tiene ya seis días, se infecta con virus en diluciones decuplicadas en serie, preparadas en un medio fresco; de este modo el medio de cultivo se cambia simultáneamente.

Unos días después de haber infectado el tejido se manifiestan las alteraciones de las células, alcanzando su punto máximo de 8 a 14 días después de la infección.

Los resultados obtenidos son promisorios, y parece que se obtienen con esta técnica titulaciones más fácilmente reproducibles que mediante la inoculación en la membrana corioalantoica. La técnica del recuento de placas formadas sobre capas monocelulares fue descrita por Dulbecco en 1952, si bien usando virus de poliomielitis. Esta técnica está aún en su etapa experimental. Youngner ha publicado recientemente algunos resultados de pruebas de velocidad de absorción y de formación de placas, usando distintos virus, entre ellos el virus de la vaccinia.

Como se ha mencionado anteriormente, esta técnica puede ser muy útil, no sólo para la titulación del virus, sino también para el control de virus contaminantes.

La Fig. 1 muestra el título de 8 vacunas calculado por medio de diferentes técnicas.

Tres de las vacunas, números 1 a 3, se prepararon por escarificación de la piel de terneras; la No. 4 procede de un búfalo joven, la No. 5 de una oveja, la No. 6 de la membrana corioalantoica de embriones de pollo, la No. 7 del hígado de conejos lac-

tantes, y la No. 8 de cultivo de tejido de la piel de embriones de ternera.

La única que no se ha empleado en el campo es la vacuna preparada de hígado de conejos lactantes.

Se utilizaron las siguientes técnicas de titulación: intracutánea, escarificación, recuento de vesículas en membranas corioalantoicas, y mortalidad de ratones de dos días, infectados por vía pulmonar.

Las diferencias cualitativas entre las vacunas se expresan por el cociente o razón del título del recuento de vesículas al título obtenido con las otras pruebas. Se observará que algunas vacunas, las números 1, 4, 7 y 8, reaccionan mejor por inoculación intracutánea que por escarificación, mientras que las números 2, 3 y 5 tienen títulos más elevados por escarificación que por el método intracutáneo.

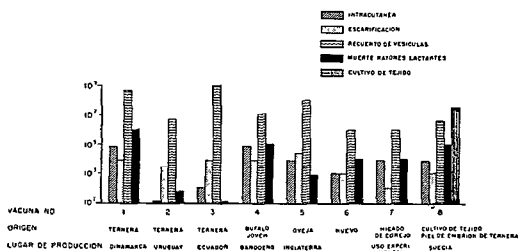
La diferencia de capacidad de las distintas vacunas para matar a los ratones lactantes es aún más notable: la vacuna No. 3 tiene un título obtenido por recuento de vesículas muy elevado, pero aun diluída a 1:10 no tiene capacidad para matar a los ratones lactantes, a pesar de que produce vesículas a una dilución de 10^{-5} ; mientras que otras vacunas, como las números 1, 4, 6, 7 y 8, pueden matar a los ratones a altas diluciones.

Las diferencias cualitativas entre las vacunas están también claramente indicadas por las reacciones que producen en conejos lactantes; algunas vacunas son capaces de matar a conejos de dos días tras haber sido inoculados por vía intracutánea, pero no así otras vacunas. Las alteraciones patológicas, especialmente las del hígado y los riñones, son muy características de la infección de vaccinia con la cepa danesa de vacuna. El hígado aparece punteado de pequeñas manchas blancas y los riñones muestran manchas rojas circulares, bien definidas, sobre un fondo más bien pálido.

Otras vacunas tienden a producir diferentes alteraciones patológicas, como la ausencia de manchas en el hígado, y necrosis circulares blancas en los riñones.

Se asegura que todas las vacunas ensaya-

FIG. 1.—Título de vacunas antivariolicas empleando distintos métodos.



das—salvo la No. 7, que no ha sido empleada en el campo—producen un 100 % de “tomas” en la primera vacunación, a pesar de sus diferentes títulos y cualidades. Se dice incluso que la vacuna No. 8, preparada en cultivo de tejido, produce 100 % de “tomas” en revacunaciones, aunque esta vacuna sólo tiene un título, obtenido por recuento de vesículas, de 4×10^6 unidades infectivas por ml. ¿Cómo, pues, es posible establecer requisitos mínimos de validez internacional para estandarizar la actividad de las vacunas antivariólicas, cuando las cepas difieren tanto cualitativamente?

La cuestión decisiva es la siguiente: ¿qué protección proporciona la vacuna contra la viruela? Algunas vacunas han mostrado su capacidad epidemiológicamente impidiendo la propagación de la enfermedad. Rao ha demostrado experimentalmente que algunas cepas indias de vaccinia pueden proteger a los monos contra la viruela. El Dr. Orskov, Director del Statens Seruminstitut, sugirió la posibilidad de transferir pasivamente anticuerpos de una coneja vacunada a sus crías y así protegerlas contra la viruela. Rao lo intentó, pero vió que, con la técnica que empleaba, el virus de la viruela no presentaba patogenicidad para los conejos lactantes.

He tratado de llamar la atención sobre las dificultades que se encuentran al tratar de determinar los requisitos mínimos para la estandarización de la actividad de vacunas de diferente origen.

Cabe suponer que una vacuna que posea la propiedad de causar todos los tipos de lesiones previamente mencionados, debe pro-

porcionar mejor protección que las vacunas que carecen de una o más de estas propiedades. Sin embargo, esto es sólo una suposición y, para los fines prácticos, será necesario escoger una sola prueba.

Si es preciso escoger uno de esos métodos de titulación para vacunas de diferente calidad, creo que el procedimiento de recuento de vesículas debe ser el preferido, si bien puede resultar que el método de titulación en tejido dé resultados más fácilmente reproducibles y sea también más económico. En mi opinión, el requisito de un título de 10^8 unidades infectivas por ml., determinadas por el recuento de vesículas, es tal vez demasiado rígido.

Cuando las vacunas han pasado satisfactoriamente las pruebas de pureza, inocuidad y actividad, se debe vacunar, con cada lote, de 12 a 20 niños no vacunados anteriormente. Al observarlos 14 días después de la vacunación, debe encontrarse un promedio de 98–100 % de primorreacciones, sin reacciones graves.

En Dinamarca agrupamos las vacunas procedentes de varias terneras, después de que cada lote ha pasado separadamente las diferentes pruebas, con el fin de disponer de una cantidad suficiente para un año. Todas las semanas, estas vacunas se emplean en la vacunación pública en el Statens Seruminstitut, de Copenhague. Las vacunaciones las realiza un vacunador de gran experiencia y las reacciones se observan 15 días más tarde.

De esta forma podemos observar siempre la tasa de primorreacciones de la vacuna en los niños vacunados por primera vez.

REFERENCIAS

- Force, J. N., y Leake, J. P.: *Hyg. Lab. Bull.* 149: 1, 1927.
- Goodpasture y Col: *Am. Jour. Path.* 8:271, 1932.
- Groth, A., y Munsterer, H. O.: *Ztschr. f. Immunitätsf.* 85:139, 1935.
- Rao, R. S.: *Ind. Jour. Med. Res.* 40:341, 1952.