

PREPARACION DE VACUNA ANTIVARIOLICA CULTIVADA EN LA MEMBRANA CORIOALANTOICA DE EMBRION DE POLLO*

DR. J. V. IRONS y E. B. M. COOK

Director de Laboratorios y Jefe de Inmunología, respectivamente, del Departamento de Salud de Texas, E. U. A.

INTRODUCCION

Desde que Goodpasture, Woodruff, y Bud-
dingh (1) descubrieron que el virus de la
vaccinia se puede cultivar en la membrana
corioalantoica (que en este artículo se designa
con la sigla M.C.A.) de embrión de pollo,
varios investigadores (2-15) han empleado
este método en la preparación de vacuna
experimental para la aplicación a seres hu-
manos. La mayoría de estos autores obtu-
vieron resultados satisfactorios y observaron
que la vacuna producía reacciones carac-
terísticas en la vacunación primaria y expre-
saron la esperanza de que una experiencia
más amplia con la vacuna producida en
embrión de pollo, daría por resultado su uso
general en la inmunización humana. Sin
embargo, han transcurrido más de 20 años
desde que se hizo el primer cultivo del virus
de la vaccinia en embrión de pollo y aún
hay cierta resistencia a abandonar el empleo
de la vacuna de linfa de ternera, que ha
demostrado su eficacia a través del tiempo.

El método del embrión de pollo presenta,
al parecer, ciertas ventajas sobre la produc-
ción de vacunas en terneras. El control de
las contaminaciones bacterianas, que es casi
imposible conseguir cuando se utiliza el
método de producción en ternera, se logra
fácilmente en el embrión de pollo. El empleo
de terneras plantea problemas relativos a su
cuidado e higiene, lo que no ocurre cuando
se utilizan huevos. Además, en casos de
urgencia, se pueden producir grandes canti-
dades de vacuna en un período de tiempo
mucho más breve, y, en general, el método
presenta otras ventajas de índole económica
que refuerzan la conveniencia del uso del

embrión de pollo para la elaboración de
vacuna antivariólica en laboratorios rela-
tivamente pequeños.

Hace algunos años, mis colaboradores y
yo emprendimos el estudio del virus de vac-
cinia en embrión de pollo, cultivado en la
membrana corioalantoica tras inoculación
por el método de la producción de una cá-
mara de aire artificial, con vistas a la posibili-
dad de su empleo en la producción de vacuna
antivariólica en gran escala.

En esta comunicación se trata principal-
mente del desenvolvimiento de los métodos
de producción y de los resultados obtenidos
por el de la membrana corioalantoica y, más
recientemente, por inoculación del virus
M.C.A. en la cavidad alantoica. En el cuadro
No. 1 se describen, en líneas generales, los
procedimientos utilizados en la producción de
vacuna M.C.A. obtenida en embriones de
pollo inoculados por los métodos de la mem-
brana corioalantoica y de la cavidad alantoica.

METODOS Y PROCEDIMIENTOS

Requisitos fundamentales

Se necesita una habitación bien iluminada
para la instalación del equipo principal.

Por lo general, cualquiera de las incuba-
doras eléctricas, de tipo comercial, es sufi-
ciente. Su capacidad depende del número de
huevos que se pretenda manipular, y ade-
más, se tiene en cuenta la necesaria para
casos de urgencia. La incubadora será de
las de "tipo de aire forzado", y debe contener
un termómetro, un higrómetro y una luz
interior. También hay que contar con otra
estufa de cultivos para incubar los huevos
inoculados. Los estantes deben ser ajustables
para facilitar la manipulación de los huevos.

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

CUADRO No. 1.—*Procedimiento de producción de vacuna antivariólica M.C.A. por el método de la inoculación en la membrana corioalantoica o por el de inoculación en la cavidad alantoica del embrión de pollo.*

Método de la membrana corioalantoica

Método de la cavidad alantoica

REQUISITOS PRELIMINARES

Huevos de gallina fecundados. Una fuente segura de huevos de gallina fértiles, 100% libres de *S. pullorum*.

1. De 11 a 13 días de edad
1. De 11 días de edad

PREPARACION PARA LA INOCULACION

Se limpian las cáscaras del huevo; se examinan los embriones en el ovoscopio y se eliminan los que estén muertos.

1. Se marca la cámara de aire y una zona sobre la M.C.A.
1. Se marca la cámara de aire
2. Se hacen pequeños agujeros en las marcas
2. Se produce una cámara de aire artificial entre la cáscara y la M.C.A.
3. Se produce una cámara de aire artificial entre la cáscara y la M.C.A.

INOCULACION

Se utiliza virus de siembra con penicilina-estreptomicina en solución tamponada.

1. Se escoge una suspensión recién descongelada de pulpa de ternera o M.C.A., de 2 a 5 pases
1. Se escoge siembra de virus del título más alto
2. Se utilizan 0,2 ml. de una dilución al 1:1.000 de tejido en suspensión
2. Se utilizan 0,2 ml. de una dilución al 1:100 de tejido en suspensión
3. Se echa gota a gota con jeringa y aguja, virus de siembra en la M.C.A. a través de una abertura de la cáscara
3. Se inocula virus de siembra en la cavidad alantoica, a través de la cámara de aire, con aguja unida a la máquina automática
4. Se sella con parafina
4. Período de incubación: 72 a 96 horas
5. Se incuba durante un período de 48 a 72 horas

Los huevos se examinan diariamente al ovoscopio y se eliminan los embriones muertos

COSECHA

Se sumergen los huevos en solución roccal al 5% y se dejan secar.

1. Se corta la cáscara y se retira la porción infectada de M.C.A., colocándola en pequeñas placas de Petri; se inspecciona visualmente en busca de signos de infección, y se conserva solamente la parte infectada de las membranas
1. Se corta la cáscara y se recoge toda la M.C.A., colocándola en pequeñas placas de Petri; se inspecciona visualmente en busca de signos de infección; y se conserva la totalidad de las membranas fuertemente infectadas.

Se inspeccionan todas las membranas en busca de signos de contaminación o infección no provocada.

PREPARACION DE LA VACUNA

Se realizan pruebas de esterilidad individuales de las membranas; se pesan, se congelan rápidamente y se conservan a baja temperatura en tubos esterilizados.

Se usa como diluyente-preservativo suero de bovino inactivado y filtrado.

Se agrupan las membranas; se procede a su homogenización en un homogenizador Waring, con un diluyente.

Se efectúa la prueba de esterilidad de cada grupo.

CONSTITUCION DE UN LOTE

El lote de vacuna comprende varios grupos de membranas.

Se realizan pruebas de esterilidad de cada lote.

CUADRO No. 1—(Cont.)

*Método de la membrana corioalantoica**Método de la cavidad alantoica*

PRUEBAS DE ACTIVIDAD

1. Se diluye el tejido al 1:5

1. Se titula el número de unidades infecciosas por ml., basándose en el recuento de pústulas—20 millones de unidades infecciosas por ml., (dilución de pulpa 1-5 a 1-20), cumplen los requisitos de Force y Leake.

2. Se realiza la prueba de Force y Leake; confluencia de 80% o más, a una dilución de 1:500, con una reducción que no exceda de 20% a una dilución de 1:1.500.

PREPARACION DEL PRODUCTO FINAL

1. Prueba de esterilidad
2. Prueba de identificación
3. Empaque
4. Distribución: Fecha de caducidad, a los dos meses.

Se debe contar con una buena provisión de huevos fecundados, a los que hay que prestar el debido cuidado desde el momento que llegan al laboratorio. En caso necesario, se deben limpiar con un cepillo antes de meterlos en la incubadora, colocándolos después en las bandejas en posición inclinada, con el extremo más estrecho hacia abajo; en ellos se estampa la fecha en que comienza la incubación. Se da vuelta a los huevos tres veces al día con un instrumento apropiado o con las manos, teniendo gran cuidado de que queden de nuevo en posición inclinada. Se sacan de la incubadora una vez al día y se dejan refrescar por corto tiempo. La temperatura de la incubadora debe ser de 36 a 37°C., con una humedad de 50 a 60%.

Se necesita un ovoscopio para comprobar la fertilidad y el desarrollo de los embriones. El ovoscopio se puede construir fácilmente con madera fina, y ha de tener unas 7 pulgadas de ancho y 10 de alto. No necesita tener fondo, pero en la parte interior de la tapa se coloca un porta-lámparas donde se ha de ajustar una bombilla de 100 vatios. En el centro de un costado de la caja se abre un orificio de 3,5 cm. de diámetro. El interior se puede pintar de blanco a fin de aumentar la refracción de la luz.

Los huevos, una vez inoculados, se sellan con parafina estéril, que debe ser blanda y

dúctil, nunca dura y quebradiza. Un punto de fusión bajo, de 48-50°C., es el mejor, y se debe aumentar la ductilidad mediante la adición de vaselina hasta una concentración de 10%. La mezcla de parafina se puede conservar adecuadamente, para la esterilización, en latas de tamaño No. 1 ó 1,5. Es conveniente disponer de un calentador eléctrico para mantener la parafina fundida y a la temperatura conveniente. Se pueden emplear recipientes esmaltados, del tipo usado en los hospitales, como recipientes de los huevos durante todo el proceso, desde su examen en el ovoscopio hasta su cosecha. Para esterilizar la cáscara del huevo se usa "phemerol", que es un germicida preparado por la casa Parke-Davis. Está teñido de rojo, con un tinte acuoso adecuado que permite indicar el área en que se ha aplicado.

El uso de una máquina automática de pipetear facilita la inoculación. Sin embargo, un operador experto puede realizar rápidamente esta labor con las jeringas y agujas ordinarias, caso de que no se disponga de una máquina de dicho tipo. No se necesita un taladro dental modificado para la inoculación en la cavidad alantoica. Se precisa disponer de gasa para limpiar la cáscara de los huevos antes de la inoculación, así como de alcohol al 70% y solución roccal para lavarse las manos durante la labor de inocula-

ción. Un pequeño homogenizador Waring, de metal, resulta excelente para preparar el material de inoculación y, después, para homogenizar las membranas infectadas. El frasco del homogenizador debe ser de un tipo conveniente para la esterilización. También hay que contar con jeringas de vidrio, con aguja de calibre 25, de $\frac{3}{4}$ o de 1 pulgada de longitud, para su empleo en la inoculación de los virus de siembra. En las pruebas de esterilidad se emplea el medio de cultivo de tioglicolato, y duran un período de siete días. La incubación se efectúa a 34°C. y los resultados se leen a los 2, a los 4 y 7 días.

Como diluyente-preservativo se usa suero estéril e inactivado de bovino. Las investigaciones realizadas para descubrir un diluyente mejor dieron por resultado que se escogiera el suero de bovino en lugar del tradicional diluyente-preservativo de glicerina al 50%, que se venía utilizando desde hacía mucho tiempo para la vacuna antivariólica (11). El suero de bovino se esteriliza por filtración Seitz y se inactiva por medio del calor. Se inocula intraperitonealmente a cinco ratones blancos, que pesen de 12 a 16 g., con 0,5 cc. cada uno de suero estéril de bovino, sin diluir. Estos ratones no deben presentar signos de enfermedad, y deben mostrar un aumento constante de peso durante los 14 días de la prueba. El suero de bovino no debe producir signo alguno de sensibilidad en la piel afeitada de un conejo o en un brazo humano. El suero de bovino como diluyente se usa puro o ligeramente diluído en solución salina tamponada.

Virus de siembra

En la fase inicial de nuestros trabajos, descubrimos que cualquier cepa dérmica de vaccinia de linfa de ternera podía servir de fuente de material de inoculación para los cultivos en membrana. Nuestros estudios anteriores (11) sobre la cepa Buddingh, realizados hasta el 309° pase, habían revelado una reducción de la actividad del virus y nos condujeron a usar virus fresco de linfa de ternera para la producción de virus de semilla. Observamos que la actividad del virus

medida por titulación, alcanzaba su punto máximo del segundo al quinto pase (13). Buddingh y Randall (12) en 1951, subrayaron de nuevo que, mediante el uso de antibióticos y con una cuidadosa inspección de la membrana infectada, el virus de linfa de ternera se puede liberar de sus contaminantes bacterianos en un pase por la membrana corioalantoica. Observamos que los cultivos libres de bacterias así obtenidos tenían un título de 10^{-8} o más, por titulación intradérmica en el conejo. El secreto de mantener este título sumamente elevado consistió sencillamente en el empleo, para la inoculación, de una dosis bastante fuerte de virus (dilución de 1:500 ó 1:1000 de la suspensión de tejido) y una cuidadosa selección de las membranas infectadas y cosechadas para su uso en las vacunas. Cuando se emplea la inoculación en la cavidad alantoica se requiere material de inoculación más concentrado para obtener una infección adecuada de la M.C.A.; debe usarse una dosis de inoculación no inferior a un millón de unidades infecciosas por huevo, lo que representa una dilución aproximada de 10^{-2} de virus de siembra de alta actividad (16).

Preparación para la inoculación en la cavidad alantoica

Para proceder a la inoculación, se examinan los huevos al ovoscopio, se retiran los embriones muertos y se marcan las cámaras de aire. Se cuida de que la cáscara esté perfectamente limpia en el punto de entrada de la aguja. Esta parte se limpia con "phemero" y con otro desinfectante adecuado. Se preparan el virus y todos los materiales necesarios. Es conveniente que la persona que va a realizar la inoculación cuente con uno o más ayudantes.

Inoculación

Es preferible la inoculación directa en la cavidad alantoica en lugar de la aplicación del virus sobre la membrana corioalantoica. Cuando se inocula una fuerte dosis de virus activo en la cavidad alantoica, la infección se extiende a toda la membrana corioalan-

toica. Por la técnica antigua, la infección se limita, más o menos, al área de membrana comprendida en la cámara de aire artificialmente formada. Es preferible inocular en la cavidad alantoica embriones de 11 días, a los de 12 días. Los huevos fecundados de 11 días quizás den títulos algo más altos que los embriones de 10 días. En los embriones de 12, de 13 y de 14 días se observa una tasa de mortalidad algo más alta antes de la cosecha, así como, con frecuencia, la formación de una sustancia lechosa en forma de película, que no se considera conveniente para uso en la vacuna. Los huevos inoculados se observan diariamente al ovoscopio, y se eliminan los embriones que mueren antes de los tres días.

Cosecha

Los embriones vivos se sacrifican de las 72 a las 96 horas. Para la cosecha, se sumergen los huevos en solución roccal durante cinco minutos a fin de desinfectar la cáscara. Se abren después insertando unas tijeras puntiagudas en la abertura de la cámara natural de aire; a continuación se corta a través de la cáscara, se elimina el contenido con el embrión y se conserva sólo la membrana corioalantoica. Las membranas se colocan en placas de Petri individuales y se examinan cuidadosamente para ver si se observan las lesiones características. Se conservan solamente las membranas fuertemente infectadas y se elimina cualquier porción de la membrana que no se haya infectado. También se elimina toda membrana que muestre contaminación. Todas las membranas se someten a la prueba de esterilidad y se conservan a -20°C . hasta que se utilicen para la preparación de la vacuna. El problema principal que plantea el método de la cavidad alantoica es evitar la excesiva mortalidad de los embriones. Si bien esto se puede conseguir sacrificándolos a las 48 horas, este lapso es demasiado corto para obtener una producción máxima de virus. El método de la cavidad alantoica permite obtener 200 vacunaciones por huevo, en lugar de las 60 ó 75 que se obtienen por el método de la membrana corioalantoica.

Preparación de la vacuna

Una vez completadas las pruebas de esterilidad a los 7 días, las membranas fuertemente infectadas se reúnen y guardan o se utilizan en la preparación de un lote de vacuna antivariólica. Es conveniente agrupar las membranas cosechadas cada semana y combinar después varios grupos para obtener un lote importante de vacuna. Las membranas se transfieren directamente, por medio de pinzas esterilizadas, de las placas de Petri al homogenizador.

Se calcula el peso exacto de las membranas de cada grupo. Parte del diluyente se vierte en el homogenizador en la cantidad necesaria para cubrir el material depositado en el mismo y se hace funcionar el aparato a toda velocidad durante cinco minutos. El material homogenizado se vierte después en un frasco esterilizado que contenga cuentas de vidrio, y luego se agrega el resto del diluyente. La concentración corriente del tejido de membrana en la vacuna final es de una parte por peso de tejido y cuatro partes por volumen del diluyente. Después de mezclar minuciosamente el contenido del frasco, se saca una muestra de 1 ml. para la prueba de esterilidad. Se coloca en cantidades de 0,1 ml. en diez tubos que contienen el medio de cultivo. Se incuba y se leen los resultados a los 2, a los 4 y 7 días. La vacuna contenida en el frasco se coloca después en la agitadora automática de Kahn y se agita continuamente durante seis horas en frío. A continuación se coloca en la cámara congeladora.

Preparación de un lote de vacuna

Un lote de vacuna se prepara mezclando varios grupos de tejidos en suspensión al 20%. En general, los grupos se preparan en el orden en que se van cosechando. El volumen total del lote varía entre 500 y 1.000 ml., cantidad que hace un lote de tamaño conveniente para distribuir y sellar en tubos capilares. Los frascos se sacan de la cámara congeladora para descongelarlos y se vacían en un recipiente esterilizado de un homogenizador a poca velocidad, hasta formar una suspensión homogénea. Después se vuelve a

colocar la vacuna en un frasco estéril y se toma una muestra de 2 ml. para las pruebas de esterilidad y de potencia en animales. El frasco se rotula adecuadamente y se vuelve a almacenar en la cámara congeladora.

Pruebas de actividad

Para las pruebas de Force y Leake (17), se usan pipetas preparadas con tubo de cristal de 3 mm. de diámetro y de 10 a 12 cm. de largo. El tubo se marca con una lima y se corta del tamaño deseado, dejando un borde afilado para escarificar la piel. Estos tubos se marcan de manera que puedan contener 0,2 ml. de vacuna. Las pipetas se envuelven y se empacan para ser esterilizadas en la autoclave. Para afeitar a los conejos se pueden utilizar maquinillas eléctricas especiales para animales, o bien jabón, crema y máquina ordinarios. Se usa un lápiz dermográfico para marcar las zonas de la piel en que se van a realizar las pruebas. Es importante que el animal esté gordo y la piel libre de defectos y arañazos, seca y sin residuos de las sustancias empleadas al limpiarla. Se preparan diluciones adecuadas de vacuna para la inoculación.

La escarificación debe producir un enrojecimiento uniforme, sin cortaduras ni hemorragias. Inmediatamente después de hechas las escarificaciones, se efectúan las inoculaciones, comenzando con la dilución más débil. Se debe seguir un procedimiento estandarizado para cada conejo, pues suele haber considerables variaciones de un conejo a otro. La reacción a la infección con vaccinia se manifiesta por pústulas individuales o lesiones confluentes; se anota el número de pústulas en una zona determinada. Los animales se observan a diario, y se anotan las lecturas hasta que la reacción alcance su mayor grado, generalmente al cuarto día. Un nuevo lote de vacuna debe producir lesiones de 80 a 100% de confluencia a la dilución de 1:500, con una reducción no mayor del 20% de la reacción a la dilución de 1:1.500. Se deben observar algunas pústulas a la dilución de 1:5.000, y por lo menos una vesícula a la dilución de 1:15.000.

La necesidad de contar con un método de titulación más breve, más económico y más fidedigno que indicara con exactitud el número de partículas infecciosas de virus en un lote determinado de vacuna, nos indujo a realizar numerosos experimentos. Se estableció la correlación entre los resultados de la titulación en huevo y las pruebas de actividad de Force y Leake. Las suspensiones de vacuna que contenían 10 millones de partículas infecciosas por ml. alcanzaron a veces el estándar de actividad de Force y Leake, mientras que, en casi todos los casos, resultaron aceptables las de 20 millones de partículas infecciosas. Así, pues, se pudo diluir material que variaba en contenido de partículas infecciosas de un lote a otro, para obtener una vacuna de una actividad estándar de 20 millones de unidades infecciosas por ml. El uso de un estándar de actividad medida en función de partículas infecciosas permite efectuar una economía considerable. En muchos casos se pudieron usar diluciones de membranas infectadas hasta de 1:20, en vez de la dilución corriente de 1:5. Las diluciones de esta magnitud permitieron aumentar de 2 a 4 veces el volumen de vacuna.

El procedimiento requiere el uso de diluciones decimales en función de peso de vacuna homogenizada. Se inocula en la membrana corioalantoica 0,1 ml. de cada una de las diluciones decimales. Los embriones de 11 a 12 días se inoculan por vía corioalantoica usando 6 huevos por dilución. Las titulaciones en que se emplean diluciones de 10^{-5} a 10^{-8} , tienden a dar resultados que se pueden contar. Después de un período de incubación de 3 días, cuando las pústulas son grandes y se pueden contar fácilmente, se examinan las porciones infectadas de las membranas bajo un microscopio de disección. Se supone que cada pústula es resultado del desarrollo de una partícula infecciosa de virus. El título se calcula basándose en el promedio del recuento de pústulas por cada dilución. Se titularon varias diluciones de virus en suero estéril e inactivado de bovino, diluido de 1:2 a 1:20 y conservado a temperatura de refrigeración, a intervalos de

hasta 90 días por los métodos de titulación de Force y Leake, y en huevo. Al parecer, el virus retiene su título igualmente bien en forma concentrada o diluída, por lo menos durante un período de varias semanas. Se observó con frecuencia un ligero aumento de título, durante los primeros días de conservación en frío, que después disminuyó lentamente.

Llenado, empaque, rotulación, etc.

La vacuna terminada se envasa en pipetas capilares esterilizadas, cerradas por un extremo. Para esta operación se descongela un frasco de vacuna stock terminada, bajo el grifo de agua fría corriente, y se mezcla suavemente durante 4 a 5 minutos. Con una pipeta se colocan de 4 a 5 ml. de vacuna de cada uno de los recipientes esterilizados que contienen, a su vez, 200 tubos capilares esterilizados. Los recipientes, con las tapas ligeramente ajustadas, se colocan en una campana de vacío, o desecador, en posición vertical. Con una buena bomba de vacío se requieren unos dos minutos para reducir la presión de mercurio a 25-30 cm. La vacuna se lleva a la parte media de los capilares por medio de una reducción lenta del vacío. Los capilares se sellan a mano con un mechero de oxígeno, cuidando de hacerlo con una llama puntiforme; la operación puede efectuarse rápidamente. La persona que la realiza debe protegerse los dedos y la cara contra la infección vacunal al sellar los capi-

lares. Los tubos capilares se enfrían y se sumergen en una solución colorante en un frasco al vacío; después se lavan sucesivamente con agua de jabón y alcohol, y se secan. Finalmente, se examinan los extremos para descubrir posibles escapes, pequeñas ampollas que pueden romperse fácilmente, o vacuna coagulada por el calor.

Los paquetes de tubos capilares cerrados se almacenan en la cámara congeladora, en espera del resultado de las pruebas de esterilidad e identidad. La prueba de identidad, como la de esterilidad, se realiza en tubos capilares escogidos al azar. La prueba de identidad se lleva a cabo en la piel afeitada del conejo, en la forma ordinaria, y sirve también de comprobación final de la actividad del producto.

La vacuna se empaca en la forma corriente, con bulbos de caucho y agujas esterilizadas, incluyéndose también una nota con instrucciones y detalles sobre su manufactura y uso. La etiqueta lleva el nombre y origen del producto, número del lote, etc. La vacuna se distribuye a solicitud de los funcionarios locales de sanidad y se le fija un plazo de validez de dos meses. Se envía en recipientes que contengan hielo, con la recomendación de que se almacene en el refrigerador, y de que se utilicen también recipientes con hielo para el transporte al punto donde se va a usar.

RESULTADOS DEL EMPLEO DE LA VACUNA M.C.A.

CUADRO No. 2.—*Distribución anual de vacuna M.C.A. 1939-1955.*

Año	No. de tubos capilares distribuidos	Año	No. de tubos capilares distribuidos
1939	3.157	1948	251.040
1940	19.175	1949	366.105
1941	26.294	1950	244.520
1942	123.398	1951	209.585
1943	109.225	1952	190.860
1944	142.287	1953	217.110
1945	152.100	1954	198.360
1946	175.100	1955	208.567
1947	155.805		
		Total	2.711.688

En el cuadro No. 2 figura la distribución anual de vacuna a los funcionarios de sanidad de Texas.

La distribución de la vacuna preparada en membrana de embrión de pollo se inició en 1939 entre un reducido número de médicos que habían accedido a llevar registros sobre su uso. La nueva vacuna fue bien recibida, y entre los primeros grupos de niños inmunizados figuraron los de una guardería—escuela para hijos de trabajadoras—en la que un caso de viruela, comprobado por pruebas de laboratorio, había expuesto, al parecer, a todos los escolares, así como a los

CUADRO No. 3.—*Informes recibidos sobre los resultados de la aplicación, en Texas, de la vacuna anti-variolica de membrana de embrión de pollo.*

Tipo de reacción	Personas vacunadas anteriormente		Personas no vacunadas anteriormente		Total de ambos grupos	
	Número	Porcentaje	Número	Porcentaje	Número	Porcentaje
Primaria.....	9.413	32,50	98.767	80,33	108.380	71,23
Acelerada.....	7.346	25,36	4.474	3,63	11.820	7,77
Inmediata.....	8.447	29,60	5.549	4,5	13.996	9,20
Total de reacciones.....	25.206	87,04	108.990	88,47	134.196	88,19
Sin reacción.....	3.753	12,96	14.203	11,53	17.956	11,80
Total notificado.....	28.959		123.193		152.152	

Datos correspondientes a 2.028.668 tubos capilares distribuidos.

Total de vacunaciones notificadas: 152.152, o sea, el 7,5%.

Total de reacciones positivas: 134.196, o sea, el 88,19%.

padres y maestros. No se notificaron casos secundarios en este grupo.

Al cabo de dos años de ensayo de la vacuna en escala limitada, se comprobó que era satisfactoria, salvo que resultaba difícil conservar su actividad. Especialmente hubo frecuentes pérdidas de actividad debidas, al parecer, a dificultades en las condiciones de envío cuando la temperatura era excesivamente alta. El envío en recipientes especiales con hielo y el uso de un diluyente-preservativo de suero de bovino, aumentó el porcentaje de vacunaciones con reacciones positivas.

Después de estos estudios preliminares se facilitó la vacuna a los servicios de salud pública de todas las ciudades y condados del Estado. Con cada envío se remitieron formularios para preparar informes sobre su aplicación, pero la proporción de informes recibidos fue muy pequeña. Las visitas a los lugares en que se había usado la vacuna revelaron que, por lo general, el hecho de que no se enviaran informes no se debía a que ésta diera malos resultados. Se recibieron informes suficientes (7,5%) para poder evaluar la vacuna en las condiciones de campo. En el cuadro No. 3 se presenta un resumen de los informes recibidos.

La información es puramente voluntaria y, por lo tanto, muy escasa, pero se han recibido informes sobre cada lote de vacuna distribuido. Consideramos que esos informes escogidos al azar, sobre su aplicación en centenares de ciudades, dan una impresión

alentadora acerca de la eficacia de la vacuna antivariolica preparada en membrana de embrión de pollo. Si bien el total de reacciones positivas en este estudio representó solamente el 88,19%, en varias ocasiones hemos obtenido un 100% de reacciones positivas en pequeños grupos controlados que no habían sido vacunados anteriormente. Aun cuando nadie discute el valor de los estudios controlados en la evaluación de una vacuna, es muy conveniente disponer de información más amplia sobre la forma en que un producto resiste las condiciones existentes en los distintos lugares en que se usa. Es lamentable que no dispongamos de estudios comparables sobre la aplicación de vacunas antivariolicas de linfa de ternera.

La eficacia de todo procedimiento de vacunación se basa, por supuesto, en la protección que proporciona al individuo inmunizado frente a posteriores exposiciones a la enfermedad. Durante los veinte últimos años, al notificarse cualquier caso de viruela en Texas, se han llevado a cabo programas de inmunización colectiva en la localidad afectada. No se han presentado virtualmente casos secundarios de la enfermedad. El último brote importante de viruela ocurrió en 1949, en que se notificaron ocho casos, con una defunción, en los condados de Starr e Hidalgo, a lo largo de la frontera mexicana. Los síntomas del primer caso diagnosticado aparecieron el 17 de febrero de 1949. Los funcionarios de sanidad instituyeron una

campaña de inmunización colectiva, que comenzó hacia el 1° de marzo, y se vacunaron aproximadamente 106.000 personas en el condado de Hidalgo, 103.000 en el de Cameron y 30.000 en el de Starr. Gran parte de la labor de vacunación se efectuó en un período de cinco días, entre el 13 y el 18 de marzo. En más del 99% de las vacunaciones se empleó vacuna antivariólica de membrana de embrión de pollo, facilitada por el Departamento de Sanidad del Estado (14).

De los ocho casos de viruela confirmados en este brote, sólo uno había sido vacunado (12 años antes) y su ataque fue relativamente leve. Uno de los niños, un caso confirmado en el laboratorio, había perdido dos

veces la oportunidad de vacunarse en la escuela donde sus dos hermanos mayores habían sido vacunados varios años antes, con vacuna de membrana de embrión de pollo. Este niño contrajo viruela y sus dos hermanos escaparon a la infección, a pesar de la fuerte exposición en el medio familiar.

CONCLUSIONES

1. El cultivo en M.C.A. es perfectamente adecuado para la producción de una vacuna antivariólica inocua y altamente activa.
2. Es un procedimiento económico que requiere sólo un mínimo de local y personal.
3. Se ha empleado con éxito en el control de la viruela en Texas.

REFERENCIAS

1. Goodpasture, E. W., Woodruff, A. M. y Buddingh, G. J.: *Am. J. Path.*, 8:271, 1932.
2. Goodpasture, E. W. y Buddingh, G. J.: *Science*, 78:484, 1933.
3. Goodpasture, E. W. y Buddingh, G. J.: *Am. J. Hyg.*, 21:319, 1935.
4. Tanigushi, T., Kogita, Y., Hosokawa, M. y Kuga, S.: *Jap. J. Exper. Med.*, 13:19, 1935.
5. Ellis, R. V. y Boynton, R. E.: *Pub. Health Rep.*, Washington, 54:1012, 1939.
6. Gastinel, P. y Fasquelle, R.: *C. R. Soc. Biol.*, Paris, 135:30, 1941 y *C. R. Soc. Biol.*, Paris, 135:124, 1941.
7. Balozet, L.: *Arch. Inst. Pasteur*, Tunis, 31:290, 1942.
8. Buddingh, G. J.: *Am. J. Hyg.*, 38:310, 1943.
9. Nagler, F. P. O.: *Australian J. Exper. Biol. and M. Sc.*, 22:29, 1944.
10. Pandit, C. G.: De un informe del King Institute of Preventive Medicine, Guindy, India, 1° octubre 1941 a 31 marzo 1946.
11. Cook, E. B. M., Crain, P. N. y Irons, J. V.: *The Public Health Laboratory*, 6:50, 1948.
12. Buddingh, G. J. y Randall, C. C.: *Am. J. Hyg.*, 53:152, 1951.
13. Cook, E. B. M., Bell, B., Forsyth, P., Irons, J. V. y Cox, G. W.: *Texas Rep. Biol. & Med.*, 11:522, 1953.
14. Irons, J. V., Sullivan, T. D., Cook, E. B. M., Cox, G. W., y Hale, R. A.: *Am. J. Pub. Health*, 43:25, 1953.
15. Cabasso, V. J., Kornis, R. F., Moore, I. F., y Cox, H. R.: *Am. J. Pub. Health*, 44:194, 1954.
16. Forsyth, P. J. y Cook, E. B. M.: Datos no publicados.
17. Force, J. N. y Leake, J. P.: *U. S. P. H. S. Hyg. Lab. Bull.*, No. 149, 1927.