

VACUNA ANTIVARIOLICA DESECADA EN EL PERU*

DR. AURELIO SOUSA IGLESIAS

División de Producción, Instituto Nacional de Salud Pública, Lima, Perú

HISTORIA

En 1951 la Oficina Sanitaria Panamericana proporcionó los servicios de un consultor especializado en la producción de vacuna antivariólica desecada, en cuya preparación teníamos gran interés por su reconocida resistencia al calor, condición esencial de una vacuna que debe ser usada en climas tropicales.

En marzo de 1953 se preparó el primer lote de esta vacuna bajo la dirección personal del consultor de la Oficina Sanitaria Panamericana. Desde entonces quedó bajo nuestra responsabilidad la preparación de los lotes siguientes.

Hemos producido hasta la fecha numerosos lotes con un número total de 3.700.000 dosis.

PREPARACION DE LA VACUNA DESECADA

Materiales, métodos y condiciones:

Las pulpas, que constituyen la materia prima y que sirven para preparar la vacuna seca, deben de llenar una serie de requisitos relacionados con los animales que las producen, cuidado de los mismos durante el tiempo de su permanencia en el establo, condiciones de rigurosa asepsia en el momento en que se inoculan y se recoleccionan, requerimientos bacteriológicos que deben reunir y potencia que deben de tener las vacunas, no solamente en el momento en que salen del laboratorio de producción, sino durante su almacenamiento.

Para llenar los requisitos citados, los animales productores deben de ser observados con minuciosa atención durante la cuarentena, se someten a la inoculación de tuberculina; luego, son esquilados y aseados, aplicándoles insecticidas en caso necesario. Esta

labor, que se verifica bajo control veterinario, debe constar en una parte especial para su protocolización.

El suelo y paredes del establo son cuidadosamente desinfectados con una solución de lisol al 10%, y diariamente el ternero o ternera se polvoriga con una solución de roccal al 1/500, y también se polvoriga el ambiente con DDT.

La temperatura del establo durante la evolución de la vacuna debe ser de 25°C. (77°F.)

La sala de operaciones es también objeto de cuidados muy minuciosos durante los procesos de inoculación de las cepas y de recolección de las pulpas. El suelo y las paredes de esta sala se desinfectan con solución de lisol al 10%. Todos los muebles se rocían con solución de roccal al 1/500 primero y luego con solución de DDT 5 a 10%. La ropa de todas las personas que entran debe estar completamente limpia, y no se permite penetrar en la citada sala con la ropa y los zapatos de calle. Más tarde y durante la recolección de las pulpas, se emplea ropa estéril, incluso guantes, gorro, máscara y zapatillas de lona, y se instala una carpa de tela estéril durante los 15 minutos que actúa el roccal en la zona del animal que va a ser recolectada; esta zona es, además, protegida de toda contaminación periférica mediante campos estériles.

En todo se cumplen los requisitos norteamericanos en cuanto al número de lavados, uso de escobillas esterilizadas a vapor en autoclave (las escobillas esterilizadas por simple ebullición pueden ser esporógenas), lavado de las manos después de cada escobillaje con solución de roccal, lavado con alcohol y acción de roccal por 15 minutos en la zona de recolección.

La recolección se hace también de acuerdo con el destino ulterior que se dé a las pulpas, destinando la parte central de la zona a

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

vacuna seca, y la periférica a vacuna glicerinada. Con respecto al color del animal productor, se dedican las pulpas provenientes de terneras blancas a la vacuna seca, y las procedentes de otros animales de color a la vacuna glicerinada. Es sabida la influencia del color de la piel de los animales sobre la vacuna y su aceptación por los encargados de aplicarla en humanos.

Entre nosotros hay muchas dificultades para conseguir los vacciníferos que reúnan condiciones de sexo, edad y color. Es difícil conseguir hembras por destinarlas a la cría los ganaderos, y se tiene que vacunar a veces machos mayores de un año y medio de edad, por la dificultad de conseguirlos menores dada la circunstancia de que casi todos los machos de todas las ganaderías próximas a la capital, son sacrificados en la primeras horas de nacidos y los que se pueden obtener son traídos desde la sierra, donde esperan a que los animales tengan edad suficiente para soportar difíciles condiciones de transporte.

Todos los animales en los que se verifica la recolección de las pulpas, son autopsiados de inmediato por el veterinario oficial, el que observa detenidamente toda posibilidad de tuberculosis y otras enfermedades del ganado que pueden ser transmitidas al hombre. En caso de la menor sospecha, las pulpas son inutilizadas por esterilización.

Las pulpas después de recolectadas, se catalogan y guardan en refrigeradoras a menos 15°C. en espera de manipulación posterior. Descongeladas a más 5°C., son examinadas en cuanto a contenido bacteriológico y a potencia, y si reúnen las condiciones necesarias, se diluyen en uno de los medios utilizados al efecto y que pasamos a describir.

Mestrum de Hornibrook y W. Gebhard:

Citrato de potasio (K ₃ C ₆ H ₅ O ₇)	1,35 g.
Citrato de sodio (Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇)	2,45 g.
Fosfato de potasio (K ₂ HPO ₄)	0,61 g.
Cloruro de calcio anhidro (CaCl ₂)	1,33 g.

Cloruro de magnesio (MgCl ₂ ·6H ₂ O)	0,60 g.
Carbonato de potasio (K ₂ CO ₃ ·1,5H ₂ O)	1,00 g.
Acido láctico (C ₃ H ₅ O ₃)	Cantidad suficiente para alcanzar pH = 7
Lactosa	57 g.

Disolver todos los ingredientes, menos el cloruro de calcio, en 500 mililitros de agua bi-destilada; disolver el cloruro de calcio en 500 mililitros de agua bi-destilada; mezclar las dos soluciones y ajustar pH = 7; filtrar en bujía Berkfeld; controlar la esterilidad en medios anaerobios y aerobios.

Agua albuminosa:

Este medio se prepara con albúmina de clara de huevo a una concentración de 25 a 50 %.

Los huevos se lavan escrupulosamente con agua y jabón, y luego se depositan en un recipiente con alcohol yodado. Después de 10 minutos, se procede a la rotura y separación de la clara. Por término medio se obtienen 30 cc. por cada huevo normal.

Durante la maniobra el operador debe usar ropa, máscara, gorro y guantes esterilizados, y trabajar bajo cubículo.

Las claras mezcladas convenientemente con agua destilada se llevan a un agitador en un frasco resistente hasta su total homogenización.

Se puede agregar la cantidad conveniente de antibiótico antes de la homogenización.

Este medio debe ser controlado, como el anterior, bacteriológicamente.

Medio de Collier:

Contiene peptona "Difco" al 5 % en suero, tamponado y esterilizado al autoclave.

Se ha venido usando, y la mayor parte de la vacuna seca que se ha preparado hasta la fecha, ha sido diluída en el medio de Hornibrook-Gebhard; pero su preparación es laboriosa por las numerosas pesadas y la filtración en bujía, lo que requiere un material numeroso y equipo delicado y de esmerada conservación. Se tiene la experiencia

necesaria para asegurar que este medio es excelente en cuanto a supervivencia de virus. Se han verificado investigaciones en las que se constató que la vacuna preparada en este medio, sometida a la temperatura ambiente y a 37°C., puede durar año y medio sin pérdida de potencia, siempre que los tubos que la contienen estén perfectamente cerrados a un vacío de 100 a 50 micras. El medio albuminoso es de fácil preparación, pero se viene observando que la potencia decrece algo si la vacuna no es rigurosamente almacenada a 5°C. De todas maneras, a la temperatura de 22 a 26°C., su potencia se conserva constante por un año.

La baja de potencia que se observa en las vacunas preparadas en este medio se debe posiblemente a ciertas encimas de la clara de huevo.

El medio de Collier nos parece magnífico por las seguridades de esterilización y la sencillez con que se prepara; vacunas obtenidas hasta hoy con este medio han dado excelentes índices de potencia. No se tiene suficiente experiencia para poderse pronunciar sobre la durabilidad de las vacunas, pero en caso de que las investigaciones en proceso den el resultado que se espera se comunicará de inmediato.

El Departamento de Inmunizaciones de la División de Enfermedades Transmisibles, ha confirmado nuestras observaciones en cuanto a la durabilidad de las vacunas en el medio de Hornibrook-Gebhard, usando con todo éxito nuestras vacunas que llevaban casi dos años almacenadas, en condiciones casi ambientales y sin tener mayores precauciones en cuanto a refrigeración.

Molido de la pulpa:

Después de diluirlas las pulpas en uno de los medios descritos anteriormente, se muele en el *Waring Blendor*, primero lentamente y luego a gran velocidad durante una hora. No se creen necesarias las interrupciones de la molienda con fines de refrigeración si se usa un aditamento especial, con alcohol y hielo seco, como el que se usa en el Instituto de Boston, el que tiene la ventaja de pro-

teger a la vacuna y a la máquina misma de todo recalentamiento. La vacuna se filtra después en un filtro de 100 mallas por centímetro cuadrado, según modelo Lansing protegido por campos estériles durante la maniobra.

Pruebas:

El filtrado es nuevamente sometido a pruebas bacteriológicas, que comprenden:

1. Inoculación de 1 ml. en cobayo por vía subcutánea, siembra en tioglicolato (caldo) e inoculación de ratones después del 7° día de cultivo. (Prueba de seguridad contra el tétanos)
2. Siembra de agar-sangre y cultivo para descubrir estreptococo hemolítico.
3. Siembra y cultivo en agar corriente para hallar el número de colonias por mililitro.
4. Inoculación epidérmica en el conejo para apreciar la potencia. Esta inoculación se verifica a diluciones de 1/1.000, 1/3.000, 1/10.000 y 1/30.000, previa rasuración, depilación y escarificación de la piel.

Se emplea también la técnica de inoculación intradérmica de Groth, la que permite una apreciación más exacta de la potencia cuando se le da un valor en un tanto por ciento a cada puntura, y permite además apreciar la potencia de las vacunas a diluciones mayores.

En la actualidad se está empleando para la apreciación de potencia la técnica de titulación del virus vacuna en membrana coriolantaoidea de embriones de pollo de 11 días de incubación. Los primeros resultados han sido muy alagüeños y nos proponemos hacer titulaciones por la técnica de Overman y Tamm, no obstante creer muy suficiente la prueba epidérmica en conejos, que, por lo demás, es la requerida por el National Institutes of Health, seguida por nosotros con la mayor exactitud posible.

La apreciación de la potencia en membrana corioalantoidea tiene el inconveniente de las continuas contaminaciones, falsas lesiones, etc., pero, cuando se tiene cierta experiencia para apreciarla, resulta muy clara y precisa, y se pueden contar las

lesiones referidas al mililitro y establecer la comparación con una vacuna patrón.

La prueba epidérmica en conejo tiene, además, la ventaja de constituir también una prueba de inocuidad, pues la inoculación en amplias zonas representa más de 400 veces la inoculación en humanos; solamente en superficie, sin tener en cuenta el peso, pues si se hace intervenir éste, resulta que un conejo de 2 kilos de peso recibe más de 1.200 dosis de las empleadas en un niño de 6 kilos. Además, por esta prueba se puede juzgar la formación de edemas, flemones erisipelatosos y la asociación de otros virus neurotrópicos si se observa atentamente la evolución de la prueba y se sigue la curva ponderal de los conejos inoculados durante un período de 10 a 15 días después de la caída de las costras.

Inoculación en humanos:

Seguros de las pruebas satisfactorias negativas por lo que a tétanos y a estreptococo hemolítico se refiere, y recuento de gérmenes no mayor de 500 a 1.000 por ml. y potencia igual o mayor que la de la vacuna estándar del National Institutes of Health, se procede a la vacunación de humanos, la que se hace al principio con un escaso número de primovacunas, cuya observación se pueda hacer diariamente en cuanto al desarrollo típico de la vacuna en sus diferentes períodos, curva febril, hipertrofia ganglionar, estado general y caída de las costras de los vacunados. Después se repite la prueba en mayor escala y esta vez, en el Centro de Vacunación del Departamento de Inmunizaciones, verificándose de 50 a 100 primovacunas y otras tantas revacunaciones. Se observan estos casos con lecturas periódicas cada tres días, que realizan médicos expertos; al mismo tiempo se hacen diagramas durante el uso de la vacuna, y en cada lote, a fin de deducir su efectividad y su inocuidad. Todos los resultados se comunican al Instituto a fin de incorporarlos al protocolo de cada uno de los lotes.

Tenemos la gran satisfacción de que, hasta la fecha, nuestra vacuna seca ha actuado en estas pruebas y en miles y miles de casos,

con una potencia y una inocuidad 100 %. No se ha presentado entre varios millones de vacunados un solo caso de complicación neurológica, ni flemón erisipelatoso ni ninguna otra complicación importante. En la meritísima campaña que ha verificado con todo éxito para erradicar la viruela en el Perú el Jefe del Departamento de Inmunizaciones de la División de Enfermedades Transmisibles, se ha comprobado, en la dura prueba de una campaña con varios millones de primovacunados y revacunados, la efectividad altísima y la inocuidad absoluta de nuestra vacuna seca.

Uso de antibióticos:

Se han hecho numerosas investigaciones con estos agentes en la purificación de las pulpas vaccinales, obteniendo resultados contradictorios y muchas veces nulos. De todas maneras, se pueden resumir en la forma siguiente:

1. Los antibióticos solamente tienen acción bacteriostática transitoria cuando se usan en las vacunas secas.
2. Cuando se usan en cantidades masivas, bajan la potencia de las vacunas.
3. Si se usan antibióticos específicos al espectro de los diversos gérmenes se obtienen a veces resultados contraproducentes, pues mientras se extinguen unos gérmenes, se exalta la reproducción de otros y en algunas ocasiones en cantidades increíbles.
4. La mayor cantidad de los gérmenes saprofitos contaminantes de las pulpas tienen un espectro de sensibilidad al cloranfenicol.
5. La penicilina, si bien tiene una acción antibiótica para ciertos gérmenes contaminantes, es de efecto nulo sobre gran número de ellos.
6. La asociación penicilina-estreptomina no tiene, en nuestro concepto, mayor ventaja, pues muchos gérmenes contaminantes crecen dentro de la zona de influencia de estos dos antibióticos.

Para ajustarnos a la técnica original de Hornibrook-Gebhard en la preparación de la vacuna seca, agregamos a toda vacuna de 10 a 20 unidades de penicilina por mililitro.

Uso de ácido carbólico:

Siguiendo atentamente los trabajos de los doctores Arispe, Ida Fischer y Catalina del Valle, del Instituto Malbrán de la Argentina, hemos usado ácido carbólico en la purificación y preservación de numerosos lotes de vacuna glicerinada y por nuestra propia iniciativa en las vacunas desecadas, llegando a la conclusión de que dicho producto, a concentraciones desde 0,20 g. % a 0,50 g. %, no influye sobre la potencia y es, hasta hoy, el único purificador y preservativo de esta clase de vacunas.

Las investigaciones realizadas en nuestros laboratorios han demostrado categóricamente, en dos años de observación, estas afirmaciones, y así el 15 de julio pasado se ha hecho la última prueba en una vacuna fenicada y desecada, con más de un año de almacenamiento.

No estamos de acuerdo en lo afirmado por algunos investigadores sobre la influencia contraria, con respecto a potencia, por los microcristales de ácido fénico que se formarían por recristalización en el momento del enfriado para la congelación, atacando el ácido fénico puro y disminuyendo la potencia en cada una de las zonas periféricas a cada microcristal, y luego la disminución de la potencia en la totalidad de la vacuna. Si bien esto podría explicarse en algunas vacunas líquidas—la antirrábica por ejemplo—creemos que, en la vacuna antivariólica seca, la rápida desecación impide la formación de estos microcristales, o que estos no actúan por carencia de agua.

Pruebas después del envasado:

Como es sabido, esta vacuna se envasa en tubos a un vacío entre 200 y 50 micras. Las

pruebas se reducen a la constatación de este vacío por medio de la detección eléctrica.

Como es posible la contaminación por el manejo desde que se llenan los tubos hasta su cierre en el manifold respectivo, tomamos al azar algunos tubos de cada lote para un nuevo y último control bacteriológico, que comprende nueva inoculación en cobayo, nueva siembra en medios aerobios y anaerobios, nueva siembra en agar-sangre y numeración de colonias por mililitro.

Aunque no creemos de suma necesidad estas últimas pruebas bacteriológicas, las hacemos ante la posibilidad de una defectuosa esterilización del material de vidrio, de jebes, etc. que se usa para el envase.

Intencionalmente no nos hemos ocupado del procedimiento de la liofilización y desecación por ser de todos conocido, pero podemos decir que todo se reduce al llenado de los tubos por una máquina pipeteadora bajo cubículo con todas las precauciones de esterilidad, al enfriamiento y congelación de la vacuna a -80°C . por una mezcla de alcohol y hielo seco y a la rápida desecación por vacío mediante sulfato de calcio anhidro en un desecador de Stokes. El vacío debe conservarse a 100 micras, pudiendo verificarse con un margen de tolerancia de 100 a 700 micras.

Sugerencias:

Creemos que se debe estandarizar la forma de envase, cantidad de vacuna que debe contener cada envase, la técnica de reconstitución de la vacuna seca y las diluciones en que puede ser usada; duración de la vacuna después de su reconstitución, número de dosis por mililitro y la duración segura de la vacuna seca en los climas cálidos, tanto cuando se conserva en refrigeración como a la temperatura ambiente.

BIBLIOGRAFIA

- Arispe, C. M.; Escher, Ida, y del Valle, C.: Contribución al estudio de la purificación de las linfas vaccinales. Nuevo método acelerado por el ácido fénico. *Rev. Inst. Malbrán*, Argentina, Tomo XV, 1950 a 1953.
- Collier, R. H.: Desenvolvimiento y estabilización de Vacuna Antivariólica. *Bol. Inst. Pasteur*, tomo 54 No. 4, abril, 1956.
- Hornibrook, J. W., y Gebhard, W.: Dried Smallpox Vaccine, *Pub. Health Rep.*, enero, 1951.
- Irons, J. V.; Sullivan, T. D.; Cook, E. M. B.;

Cox, G. M., y Hale, R. A.: Preparación de Vacuna Antivariólica en la membrana Carioalantoidea del Embrión de Pollo. *Am. Jour. Pub. Health*, 43:25, 1953.

Massachusetts Department of Public Health, Division of Biologic Laboratories, octubre, 1954.

National Institutes of Health. Minimum Re-

quirements for Smallpox Vaccine, 1946.

Overman, J., y Tamm, I.: Titulación cuantitativa del Virus Vacuna en la Membrana Carioalantoidea. *Inst. Rockefeller*, septiembre, 1955.

Vilches, A. M., y Chialvo, E.: Purificación y Desecación de Vacuna Antivariólica libre de gérmenes bacterianos. *Rev. Inst. Malbrán*, tomo XV, 1950 a 1953.