

LA INOCUIDAD DE LAS VACUNAS¹

F. T. Perkins, Ph.D.²

La inocuidad de las vacunas fabricadas durante los últimos 20 años se ha debido al estricto control ejercido en la elaboración del producto, a la integridad y experiencia del personal, y a la inspección minuciosa que se hace en los locales para evitar cualquier contaminación.

En los últimos 20 años se han experimentado considerables adelantos en la producción de vacunas, gracias a un mayor conocimiento de la inmunología, el aislamiento de una serie de virus patógenos y el establecimiento de técnicas nuevas para manipular los virus. Estos progresos han desempeñado un papel trascendental no solo en la forma de elaborar y producir vacunas sino también en el establecimiento de los métodos de ensayo empleados hoy para garantizar su inocuidad y eficacia.

Se ha recorrido un gran trecho desde el empleo del arriesgado procedimiento de variolización—en el que se utilizaba material de una pústula variólica supurante como vacuna con la esperanza de proteger a las personas susceptibles—hasta la utilización de las técnicas modernas para garantizar que una vacuna vírica sea inocua y esté exenta de todo agente extraño. Si bien es cierto que en tiempos anteriores había una gran preocupación por la inocuidad de productos tales como el toxoide diftérico y tetánico y la vacuna antipertussis y antivariólica, no se estableció un procedimiento más estricto para ensayar la inocuidad de todas las vacunas hasta que no se empezaron a preparar las vacunas víricas en cultivo tisular, que requerían un mayor conocimiento de técnicas nuevas.

Desde el punto de vista de los conocimientos actuales, asombra que fueran eficaces

los métodos de ensayo hasta cierto punto superficiales que se emplearon durante la primera mitad de este siglo y, sin embargo, fueron muy pocos los accidentes que ocurrieron al emplearse esas medidas profilácticas. De un estudio reciente de Wilson sobre los accidentes y las complicaciones de la inmunización se percibe claramente (1)³ que se han adquirido considerables conocimientos y que pocos contratiempos ocurrirían hoy día. La mayoría de los accidentes actuales están relacionados con la idiosincrasia del paciente, y no con la producción defectuosa de vacunas o procedimientos de ensayo inapropiados. Un mejor conocimiento de las reacciones de autoinmunidad contribuiría a eliminar muchos de estos accidentes.

Será más instructivo que, en lugar de examinar la evolución de las pruebas de inocuidad de las vacunas, se analice la situación actual, lo que permitirá establecer automáticamente una comparación con los métodos antiguos. También se examinarán los progresos futuros en materia de pruebas de inocuidad, pues si bien se dispone de técnicas modernas refinadas, es mucho lo que queda todavía por hacer, en especial con respecto al empleo de substratos exentos de agentes extraños.

Consideraciones generales

a. Homogeneidad de la producción

Para comenzar, es indispensable reconocer que ninguna vacuna puede controlarse debidamente con el simple examen de una

¹ Este es el 12° artículo en español de la serie que se publicó en inglés en el *Brit Med Bull* 25(2) 1969. Se reproduce aquí con la autorización de dicha revista. El primer artículo apareció en el *Boletín* de noviembre de 1972.

² División de Control de Productos Inmunológicos, Instituto Nacional de Investigaciones Médicas, Laboratorios Hampstead, Londres.

³ Véase la reseña "The hazards of immunization". *Brit Med Bull* 25(2):216, 1969.

muestra pequeña del producto preparado. La organización de la producción, la experiencia y la destreza del personal son factores integrantes que revisten tanta importancia como las pruebas de laboratorio en lo que concierne a la inocuidad del producto. Cualquier prueba ejecutada por separado apenas ofrece probabilidad de que el producto sea satisfactorio. El lote de vacuna que forma parte de una serie en la que todos pasan las pruebas de inocuidad, tiene muchas más posibilidades de ser una vacuna inocua que la que pasa todas las pruebas de manera fortuita, pero que está intercalada en lotes deficientes en cualquier respecto. De ahí que para determinar la inocuidad de las vacunas, es esencial la homogeneidad de la producción.

b. Edificios y personal

En la Gran Bretaña, cuando un fabricante obtiene la licencia para vender vacuna con arreglo a la Ley de Sustancias Terapéuticas de 1956, está obligado a permitir la inspección de los locales por la autoridad que expide las licencias. El cuidado y la atención que se dedica a las instalaciones de producción casi siempre se refleja en el producto acabado, y es indispensable saber dónde y quién ha preparado la vacuna. Cada producto inmunológico se debe elaborar en un sector distinto, y si se preparan dos vacunas diferentes en un mismo local, la elaboración de cada una de ellas debe hacerse en lugares materialmente separados. Es también importante que los sistemas de filtración del aire no permitan la mezcla de aire procedente de distintos sectores de producción.

Sin embargo, aun con estas precauciones, hay ciertos productos que nunca deben elaborarse en el mismo edificio ya que la contaminación accidental podría tener consecuencias graves. Por ejemplo, la vacuna antitetánica debe prepararse siempre en una zona independiente, y una vacuna viva infecciosa de administración oral (v.g., la antipoliomielítica) no debe producirse en el

mismo local en que se prepara la de administración parenteral. Los edificios resultan costosos, y el problema de tener que utilizar uno solo para la fabricación de varios productos a menudo se resuelve mediante la producción sucesiva, con la debida esterilización y disposición de los locales cuando se procede a la fabricación de diferentes productos.

c. Pruebas de inocuidad

Las pruebas de inocuidad aplicadas a cualquier sustancia biológica permiten conocer los posibles peligros que pueden surgir durante la producción o el empleo del producto. Estas pueden considerarse desde tres puntos de vista: i) la cepa de siembra; ii) el substrato, y iii) las pruebas para determinar la presencia de agentes extraños y la toxicidad.

Aunque hay varios principios comunes a la producción de vacunas bacterianas y víricas, conviene examinarlas por separado.

Vacunas bacterianas y toxoides

a. Cepa bacteriana de siembra

En la preparación de toxoide se presta considerable atención a la obtención de cepas bacterianas que produzcan gran cantidad de toxina. Una vez obtenida la cepa apropiada, se mantiene en condiciones estables a fin de que sus propiedades biológicas no se alteren, de la misma manera que el fabricante de cerveza cuida celosamente sus cepas de levadura. Siempre que en el cultivo no proliferen contaminantes que puedan introducir subproductos indeseables, no son muy graves los problemas del control de la inocuidad de la cepa. Aun en el caso de las vacunas de suspensión bacteriana, preparadas con bacterias muertas, se insiste más en la inmunogenicidad de las cepas que en su toxicidad inherente.

No obstante, cuando se trata de vacunas bacterianas vivas, como el BCG, la situación es mucho más parecida a la de las vacunas víricas y por consiguiente se procede a las pruebas de inocuidad para garantizar que la

cepa de la vacuna no difiere del material original de inocuidad demostrada por ensayos clínicos humanos (2). Cualquier desviación observada debe interpretarse como señal de peligro. La tasa de proliferación, el tamaño y la reacción a la inyección intradérmica en cobayos constituyen pruebas significativas. Hasta hace poco solo se disponía de vacuna BCG líquida y, debido a su inestabilidad, se utilizaba todo el material antes de que pudieran completarse las pruebas adecuadas de inocuidad. Pero desde que se introdujo la vacuna BCG liofilizada, que puede almacenarse en espera de los resultados satisfactorios antes de su empleo, se han eliminado los riesgos que acompañaban a ese producto.

b. El substrato para el cultivo bacteriano

La producción de toxoides bacterianos presenta pocas dificultades desde el punto de vista de la inocuidad del substrato. En la actualidad se emplean medios de cultivo bien definidos, los toxoides quedan muy purificados y en el producto acabado aparece muy poco substrato. En el caso de las vacunas bacterianas, los organismos invariablemente se liberan del medio de cultivo antes de la inactivación térmica o química, y la gran cantidad de proteína presente en la forma de suspensión bacteriana es muy superior a cualquier residuo de substrato en el producto acabado. La preocupación principal con respecto a una vacuna de suspensión de bacterias muertas estriba en la presencia de una endotoxina, cuya concentración puede afectar al substrato. Por esta razón se practican pruebas en animales.

c. Pruebas de toxicidad

Las pruebas de control de la toxicidad de los toxoides no constituyen un problema. Bastan las pruebas en animales para garantizar tanto la destoxificación del toxoide como la actividad suficiente. La esterilidad bacteriana y la ausencia de toxicidad anormal completan los requisitos necesarios de una prueba satisfactoria.

Las vacunas bacterianas con gérmenes

muertos se someten a pruebas similares a las de los toxoides, con la precaución adicional de evitar un contenido proteínico excesivo en una dosis humana. Así se establece un límite inferior en la actividad, pero un límite superior en la concentración bacteriana. En el caso de la vacuna BCG se ejerce un estricto control de la cepa aprobada y se toman todas las precauciones para evitar que se contamine, prohibiendo el manejo de otras cepas en el sector de producción. El control del recuento bacteriano es indispensable, así como las observaciones del curso de la infección después de la inoculación de animales para verificar que no ha ocurrido ninguna anomalía.

Vacunas víricas

Las pruebas de las vacunas víricas, tanto las inactivadas como las vivas atenuadas, requieren mucho más tiempo y resultan más costosas. Su producción supone el empleo de sistemas biológicos complejos y, por lo tanto, exige la atención constante de expertos. Un científico con la preparación necesaria debe asumir la responsabilidad general, y todas las personas que firmen cualquier sección de los protocolos, que son mucho más completos que los relativos a otras sustancias profilácticas, deben registrarse en el organismo que expide las licencias.

a. Cepa vírica de siembra

Cuando se prepara una vacuna de virus muerto lo único que se exige de la segunda cepa es su capacidad de producir una vacuna muerta con propiedades inmunógenas satisfactorias. La razón de que la vacuna anti-poliomielítica muerta estuviera en proceso de elaboración durante varios años fue que todas las tentativas anteriores para matar el virus destruían también la antigenicidad. Una vez hallada la concentración decisiva exacta de formol, que mataba al virus sin destruir la antigenicidad, ya no fueron necesarios otros requisitos que obligaran el empleo de una cepa determinada. Se efectuaron detenidas pruebas con una serie de cepas para cada tipo de virus y se

seleccionaron las inmunógenas. En una infección como la influenza, el problema es muy distinto porque constantemente aparecen variantes antigénicas nuevas. Puesto que es importante preparar vacunas con las cepas del virus que han causado las epidemias más recientes, la composición de las vacunas antigripales debe ser objeto de examen continuo.

En cuanto a las vacunas preparadas con virus vivos atenuados, los datos que se requieren para la aprobación de una cepa de siembra son mucho más complejos. De manera invariable el virus natural aislado originalmente se atenúa en cultivos celulares (v.g., se utilizó tejido renal de mono incubado a 35°C para los virus poliomiélticos; en cambio, se emplearon cultivos en células fibroblásticas de embrión de ave para atenuar los virus de fiebre amarilla, sarampión, parotiditis y rubéola). Como indicación de que el virus podría ser apropiado para un pequeño ensayo clínico piloto para comprobar la reactividad en el hombre, se utiliza un cambio en la patogenicidad del virus mostrado por algunas pruebas en animales de laboratorio (v.g., los virus poliomiélticos atenuados ya no paralizan a los monos y el virus de sarampión atenuado ha dejado de producir erupción o viremia en los mismos animales). Por último, antes de autorizar el uso general de la vacuna se requieren ensayos en mayor escala para comprobar la inocuidad y la inmunogenicidad, así como la aceptabilidad general para su utilización común. Una vez efectuados estos valerosos ensayos bajo un minucioso control, y obtenida la aprobación de la determinada cepa para la producción de vacunas, es de importancia que las pruebas de control garanticen que la mezcla de virus de siembra, preparada con la cepa aprobada, no experimente una reversión a la forma natural ni se atenúe más.

Después de seleccionar la cepa de siembra y ensayar la mezcla de siembra para determinar la presencia de agentes extraños o de propiedades indeseables, se aplica

estrictamente el "sistema de virus de siembra". En ese sistema la mezcla de siembra se mantiene congelada o desecada en porciones apropiadas, y cada lote de producción de vacuna debe proceder de la cepa aprobada. En el caso de las vacunas vivas atenuadas, el lote de producción no debe ser sometido más que a un número limitado de pases a partir de la siembra, y el número absoluto dependerá de la estabilidad genética de la cepa vírica. Por ejemplo, el virus del sarampión es relativamente estable, y la vacuna puede constituir incluso 10 pases a partir de la siembra; en cambio, no sería prudente en el caso de la vacuna poliomiéltica tipo 3 que excediera de dos pases.

b. Substrato para el cultivo vírico

Todavía se utilizan animales vivos para producir ciertas vacunas como la anti-variólica, antirrábica y anti-amarílica, pero las vacunas elaboradas en los últimos 20 años se preparan en cultivos celulares. La inocuidad del substrato empleado para la producción de vacunas reviste tanta importancia como el virus de siembra, y gran parte de las pruebas de inocuidad practicadas por el fabricante se refieren a la localización de agentes extraños en los cultivos celulares.

Los cultivos tisulares primarios para la fabricación de vacunas víricas se preparan con embriones íntegros de pollo o riñón de mono, perro, bovino y cobayo. Los cultivos tisulares para uso en gran escala se preparan con riñón de mono y, aun cuando se han aislado virus que forman tumores de origen símico, la ausencia en el hombre de reacciones adversas a las vacunas preparadas en estos tejidos ha dado una sensación de seguridad. En 1958, Hull, Minner y Mascoli (3) informaron del aislamiento de 26 virus símicos en tejido renal de mono, y en una reciente monografía sobre virus de simios, Hull (4) da cuenta de que el número excede de 40. La mayoría de estos virus fueron identificados por los efectos citopáticos en cultivos tisulares pero solo se conoce uno—el

virus B—que sea patógeno para el hombre. En 1960, Sweet y Hilleman (5) notificaron el aislamiento de virus vacuolizante (SV40) mediante el subcultivo de líquidos de cultivos renales de otra especie en monos. Posteriormente se demostró que el virus SV40 producía tumores en los cricetos y que también transformaba los cultivos de células cutáneas y renales humanas. A pesar de los riesgos que encierra el empleo de vacunas preparadas en tejido de mono, estas vacunas, administradas por vía parenteral u oral no han ido acompañadas, hasta la fecha, de ningún efecto adverso para el hombre. No obstante, es preciso continuar las observaciones durante un tiempo considerable hasta que se pueda determinar la ausencia de cualquier efecto nocivo.

El grado de infección por virus símicos varía según la especie de monos. El transporte de varias especies de mono en un mismo envío puede originar contaminación cruzada, problema que en gran parte se ha resuelto no solo con el transporte de monos de una sola especie por separado sino también reteniéndolos en números reducidos o en jaulas separadas. Otra precaución que se ha tomado para reducir la incidencia de virus símico es la cuarentena de los monos durante seis semanas por lo menos antes de utilizar los riñones para cultivo celular. A pesar de todas estas precauciones, que de hecho han reducido la incidencia de agentes símicos en los cultivos celulares, algunos riñones muestran una contaminación inherente que continuará mientras se capturen estos animales en la naturaleza. Sería mucho más satisfactorio criar monos, destinados a la producción de vacuna en condiciones bajo control como se hace con los perros, pollos y cobayos destinados a este fin. Pero por desgracia esta propuesta no es práctica ni económica cuando se requiere un gran número de monos.

Para abordar el problema en forma más realista se ha recurrido al empleo de tejidos o embriones de pollo. La vacuna anti-amarílica, aunque se considera como

una de las más inocuas, se produce en embriones de pollo no necesariamente exentos de virus de leucosis aviar. Se han administrado millones de dosis de esta vacuna al hombre sin observarse ningún efecto adverso inmediato, y las encuestas realizadas en miembros de las Fuerzas Armadas de los EUA inoculados con esa vacuna, hace muchos años, no han revelado ningún posible peligro a largo plazo. Ahora que los virus de leucosis aviar pueden detectarse, la medida lógica ha sido la exclusiva utilización de tejidos de pollos exentos de virus contaminantes. Por lo tanto, para producir vacuna antisarampiosa se crían grandes cantidades de aves exentas de leucosis en locales aislados, y los huevos fecundados se utilizan como fuente de cultivo. De manera similar, se crían en cuarentena estricta a los perros y cobayos cuyo tejido renal se utiliza para la producción de vacuna, y los cultivos tisulares preparados con este material han experimentado mucho menos contaminación vírica. Es posible que la confianza actual en la ausencia de agentes extraños se deba en parte a su uso limitado y a la falta de conocimientos sobre agentes contaminantes de esos tejidos.

Así, en una tentativa para evitar la posible contaminación de recolecciones víricas, la primera medida consistió en utilizar especies de monos que muestran una menor contaminación inherente. La segunda medida fue la de criar una especie animal en estricto aislamiento, evitando toda fuente externa de contaminación o bien de razas de aves protegidas también de la contaminación.

Los organismos que expiden las licencias han insistido en que, para la producción de vacunas víricas el tejido que se utilice para la multiplicación de virus sea un tejido primario que no haya sido propagado en serie. La razón se deriva de los tiempos en que el cultivo tisular era casi obra de magia y en que la mística predominaba sobre la ciencia. Hace menos de 10 años un estudio de las publicaciones realizado por el profesor Leonard Hayflick indicó que era difícil, si no

imposible, el subcultivo en cultivos tisulares primarios, y que en cambio había muchas estirpes celulares capaces de propagarse indefinidamente, todas las cuales procedían de un carcinoma o habían sido transformadas *in vitro*. Se trataba en su mayoría de células de tipo epitelial, y la única forma de distinguir entre el cultivo tisular primario y una estirpe celular era la incapacidad del primero para propagarse de manera continua. Por consiguiente, se comprendió que células capaces de propagarse estuvieran relacionadas con propiedades cancerosas. Hayflick y Moorhead (6) han rechazado estas teorías; estos autores, comenzando con un tejido pulmonar de embrión humano, han propagado una población de células fibroblásticas que retienen durante toda su vida la forma cariológica humana normal. Estas células pueden subcultivarse hasta 45 ó 50 pases durante un período de seis a nueve meses, pero acaban muriéndose. Como este es un concepto relativamente nuevo, provoca ciertas sospechas en cuanto a esas cepas celulares, pero Hayflick (7) ha comparado sus propiedades con las de cultivos tisulares primarios que se han aceptado sin objeción desde hace muchos años. Tanto los cultivos primarios como las cepas celulares de embriones humanos son diploides, lo que significa que tienen un complemento de pares de cromosomas, y así el punto de discusión no es la cuestión de ploidía sino el efecto de la propagación seriada sobre la biología de las células que se separan *in vitro*.

No se debe suponer que los tejidos tisulares primarios no hayan pasado por cualquier duplicación celular, puesto que para que se forme una capa celular confluyente con una gran población de células deben ocurrir varias duplicaciones celulares. Así, tanto los cultivos primarios como las cepas celulares han pasado por varios de esos procesos, y este criterio no puede servir para excluir a uno y aceptar al otro. Si no existen verdaderas diferencias o inconvenientes en el empleo de una cepa celular frente a un cultivo primario, ¿hay alguna ventaja?

Indudablemente la hay, pues en primer lugar una cepa celular en cualquier fase de proceso de propagación seriada puede congelarse a la temperatura de -70°C o inferior, deteniendo la proliferación por un período indefinido mientras se procede a un examen completo de la población celular para determinar la presencia de agentes extraños. En segundo lugar se puede utilizar una cepa celular para preparar un substrato estandarizado o reproducible para la producción de vacunas. Por consiguiente se ofrece la posibilidad de utilizar un "sistema de siembra celular" que es de primordial importancia para uniformar la producción de vacunas víricas. De esta manera se pueden evitar riesgos tales como la contaminación de virus latente o la posible hibridación de virus vacunal con un genoma vírico latente para producir un virus oncogénico.

Se pueden producir cepas de células diploides de casi todos los animales, y cabe preguntar por qué son objeto de investigación intensiva las células diploides de embrión humano. Hayflick y Moorhead (6) seleccionaron el tejido embrionario porque tiene menos probabilidades de albergar virus latentes y también porque la duplicación celular es mayor que en el tejido adulto, antes de entrar en la fase de decadencia. De esta manera se dispone de más tejidos para la producción de vacuna. Además, el tejido fibroblástico de embrión humano no ha sufrido ninguna alteración o transformación espontánea, en cambio se observa con frecuencia una modificación espontánea de las células renales de mono. Se ha demostrado con pruebas exhaustivas que la cepa WI-38 de célula pulmonar de embrión humano está exenta de todo virus, bacteria, hongo y micoplasma detectables. Si se alega que este tejido de feto humano estandarizado y propagado en serie puede albergar un virus no detectable patógeno para el hombre, este virus deberá ser capaz de i) atravesar la placenta; ii) permanecer latente en el cultivo sin producir cambios cariológicos, de cultivo

o morfológicos aparentes durante numerosos pases en serie; iii) no producir cambio alguno en una gran variedad de otros tipos de células humanas y animales; iv) no causar efectos observables en ninguna especie de animales de experimento, y v) propagarse en el cultivo por lo menos hasta el punto de no perderse con la dilución a través de 20 a 30 generaciones de células. Considerada en su conjunto, esta serie de circunstancias muy improbables deben considerarse en comparación con las dificultades conocidas inherentes a los cultivos tisulares primarios, como los preparados en riñón de mono. Si los cultivos en riñón de mono se sometieran a las mismas pruebas rigurosas que han sido practicadas con respecto a la cepa WI-38 de células diploides humanas, es muy probable que cualquier lote de cultivo recibiera la aprobación para su empleo en la preparación de vacunas.

Estos argumentos contribuyen de manera considerable a eliminar el recelo en cuanto al empleo de células diploides humanas como sustrato para producir vacuna vírica. Las células diploides humanas tienen el mayor margen de susceptibilidad para la proliferación de virus que afectan al hombre y, por consiguiente, son más apropiadas para la producción de vacuna vírica para uso humano. Ya se han preparado numerosos ensayos de vacuna utilizando la cepa celular humana WI-38; entre esas vacunas figuran las de adenovirus tipo 4, rinovirus, poliomieltis, sarampión, rubéola, vaccinia, varicela, arbovirus y rabia que han sido administradas a más de 2,500,000 sujetos sin que se registraran efectos adversos, y continúa la vigilancia de las vacunas (8-23).

c. Pruebas en sustrato celular

Es mucho mejor evitar que aparezcan virus extraños en una vacuna que tratar de detectar unos cuantos virus contaminantes en presencia de una fuerte concentración de virus vacunal, o intentar la eliminación de virus contaminantes. Para ello hay que asegurarse de que la vacuna se prepara

únicamente en tejido exento de virus extraños. En consecuencia se separa, como testigos no inoculados, cerca del 25 % del tejido empleado para la producción de vacuna y se examinan los tejidos y los líquidos para determinar la presencia de virus extraños. El tejido testigo se incuba en las mismas condiciones que el que se emplea en la producción de vacunas, y los líquidos que se van a examinar se obtienen en el momento en que se inocula el tejido de producción con virus y también en el momento de la recolección vírica. Además, el tejido testigo se incuba durante 10 a 14 días después de recogerse el virus del tejido de producción y se hace otra verificación para comprobar la presencia de virus extraños. Cuando se utiliza un sustrato de células diploides humanas hay una oportunidad de estandarizar mientras el sustrato se mantiene congelado.

d. Pruebas en virus recolectado

El virus recolectado de tejidos celulares en que se ha comprobado la ausencia de virus contaminantes se somete también a rigurosas pruebas en busca de agentes extraños. Estas pruebas difieren de las practicadas en los cultivos celulares testigo porque en esta fase se observa una fuerte concentración de virus vacunal que debe neutralizarse con suero monoespecífico antes de averiguar si hay virus extraños. En un esfuerzo por detectar todos los posibles virus contaminantes se practican pruebas en varios cultivos celulares distintos y en animales pequeños.

Los agentes extraños se detectan por los efectos citopáticos, o los de interferencia en cultivos celulares, o bien por los signos clínicos que manifiestan los animales. Sin embargo, no todos los virus causan degeneración citopática de los cultivos celulares, y algunos (v.g., los virus de leucosis aviar y el de la rubéola) solo pueden detectarse por su capacidad de infectar cultivos celulares y hacerlos resistentes a la confrontación con un segundo virus que

normalmente causaría degeneración citopática en cultivos no infectados (de ahí la denominación de interferencia). Algunos virus pueden detectarse también mediante la tinción de capas celulares con colorantes fluorescentes de ácido nucleico, y todavía otros solo pueden observarse mediante el examen de cultivos celulares en el microscopio electrónico.

Es muy probable que se puedan aislar los virus contaminantes en el momento en que se recoja el virus y en el caso de vacunas muertas, antes de la adición del agente inactivador, como el formaldehído o β -propiolactona. En el caso de las vacunas muertas es también indispensable seguir el curso de la inactivación vírica, y cualquier desviación de la normalidad debe considerarse como una señal de peligro. Después de un período específico de inactivación se procede a las pruebas para verificar que la inactivación ha sido completa, así como otras investigaciones en busca de agentes extraños.

Las pruebas practicadas en muestras obtenidas durante la producción de vacunas (ensayos durante el proceso), suelen estar a cargo únicamente del fabricante, pero las del producto acabado a granel corresponde tanto al fabricante como al laboratorio de control. Como ya se ha mencionado, no hay prueba que pueda considerarse como una garantía absoluta de la ausencia de agentes extraños, y la confianza en las pruebas depende de la eficacia de la siembra directa en capa del sistema celular que se utilice. Es muy probable que las pruebas no sean mejores que las que se emplean para examinar la esterilidad bacteriana, y esta es otra razón para fomentar el uso de un substrato celular estandarizado exento de agentes extraños.

e. Futuros adelantos en las pruebas de inocuidad

Los nuevos resultados de estudios virológicos sugieren una constante reevaluación de los métodos empleados para controlar

las vacunas, y los adelantos logrados en los últimos cinco años han sido tan rápidos que cabe preguntar qué ocurrirá en el futuro. El hecho de que gran parte de la vacuna antipoliomielítica inactivada producida con anterioridad a 1960 estuviera contaminada con virus SV40 vivo fue una experiencia muy saludable. La detección de virus de leucosis aviar ha obligado a producir vacunas en tejidos exentos de todos esos virus. No cabe duda de que la próxima medida consistirá en garantizar la eliminación de todos los virus oncogénicos, y la reciente demostración de la hibridación vírica de un genoma vírico latente con la de virus vacunal está siendo objeto de considerable atención. Mediante la tinción fluorescente es posible detectar genoma SV40 o antígeno tumoral, y estas técnicas se emplearán en forma sistemática para el ensayo de la vacuna en un futuro cercano. Como ya se advirtió, el empleo de un substrato estandarizado con la ausencia comprobada de todos esos agentes daría lugar, sin duda, a una mayor inocuidad y confianza en la vacuna.

Es importante asegurarse de que el propuesto substrato estandarizado no produce tumores ni alberga virus oncogénicos. Los animales de laboratorio son especialmente resistentes a las células tumorígenas; en realidad, el abazón del criceto es uno de los pocos lugares en que las células forman un tumor. No obstante, los recientes trabajos de Stanbridge y Perkins (24), han demostrado que las células HeLa se establecerán y producirán rápidamente un tumor en ratones tratados con suero antilinfocítico. Tal vez esta sea una de las pruebas más útiles para seleccionar nuevos substratos celulares.

Los recientes trabajos de Watkins, Ford y Schoeffl (25) sobre la fusión de células se están aplicando también para la selección de substratos celulares, pues se sabe que esa fusión rescatará a los virus incompletos. Así, si un substrato celular estuviera contaminado con un virus incompleto, este

podría ser rescatado y detectado por la fusión con un substrato celular exento de virus. Estos trabajos, que están todavía en sus comienzos, pueden muy bien conducir al establecimiento de pruebas valiosas.

Resumen

En los últimos 20 años se han presenciado progresos considerables en materia de fabricación, control y ensayos clínicos de vacuna. Gracias a las nuevas técnicas se han elaborado las vacunas modernas, y el empleo en gran escala de vacunas vivas, preparadas con cepas víricas atenuadas, ha exigido métodos de ensayo de la inocuidad más rigurosos.

El control de la vacuna comienza con la inspección de los locales en que se fabrican, pues el cuidado y la atención dedicados al diseño de las instalaciones de producción casi siempre se refleja en el producto acabado. Igualmente la integridad y la experiencia del personal, así como la homogeneidad de la producción, desempeñan un papel esencial.

Las pruebas aplicadas a cada lote de vacuna se refieren tanto a la inocuidad como a la eficacia. Se trata con todo empeño de garantizar que no surja ninguna sustancia extraña nociva, viva o simplemente química, del substrato empleado para el cultivo del organismo específico con el que se prepara la vacuna y que, en el caso de vacunas vivas, las propiedades de la cepa vacunal no experimenten alteración alguna. La actividad se comprueba midiendo la reacción de anticuerpos de un animal de laboratorio a la vacuna o por la determinación del número de organismos vivos contenidos en la dosis humana.

Las vacunas que se están elaborando son varias. Algunas se encuentran pendientes de nuevos métodos de evaluación. Sin embargo, el procedimiento moderno de control de las vacunas ha sentado la pauta para el futuro y, junto con la vigilancia continua y prolongada de las reacciones vacunales del hombre, ha permitido la obtención de vacunas más inocuas. □

REFERENCIAS

- (1) Wilson, G. S. *The hazards of immunization*. Athlone Press: Londres, 1967.
- (2) Consejo de Investigaciones Médicas: Comité sobre la Estandarización de Vacuna BCG Liofilizada. *Brit Med J* 1:79, 1958.
- (3) Hull, R. N.; Minner, J. R., y Mascoli, C. C. *Am J Hyg* 68:31, 1958.
- (4) Hull, R. N. *Virol Monogr* No. 2, pág. 1, 1968.
- (5) Sweet, B. H. y Hilleman, M. R. En *Second International Conference on Live Poliovirus Vaccines* (Washington, D.C., 6-10 de junio de 1960). Publicación Científica de la OPS 50, 1960.
- (6) Hayflick, L. y Moorhead, P. S. *Expl Cell Res* 25: 585, 1961.
- (7) Hayflick, L. En *First International Conference on Vaccines against Viral and Rickettsial Diseases of Man* (Washington, D.C., 7-11 de noviembre de 1966). Publicación Científica de la OPS 147, 1967.
- (8) Hayflick, L.; Plotkin, S. A.; Norton, T. W., y Koprowski, H. *Am J Hyg* 75:240, 1962.
- (9) Pagano, J. S., Böttiger, M., y Gard, S. En *Proceedings, VIII Symposium of the European Association against Poliomyelitis and Allied Diseases* (Praga, 23-26 de septiembre de 1962), pág. 498. Bruselas, Asociación Europea contra la Poliomiélitis, 1962.
- (10) Buser, F.; Fleury, C.; Du Pan, R. M. y Rohner, E. En *Proceedings of the Symposium on the Characterization and Uses of Human Diploid Cell Strains, Opatija 1963*, pág. 381. Ginebra, Sección Permanente de Estandarización Microbiológica, Asociación Internacional de Sociedades de Microbiología, 1963.
- (11) Hannoun, C. *Ibid.*, pág. 241.
- (12) Holper, J. C.; Fenters, J., y Marquis, G., jr. *Ibid.*, pág. 291.
- (13) Ikić, D., Jancikic, B., Branica, M. y Manhalter, T. *Ibid.*, pág. 405.
- (14) Pagano, J. S. y Böttiger, M. *Arch Ges Virusforsch* 15:20, 1964.
- (15) Pagano, J. S.; Böttiger, M.; Bonnevier, J. O., y Gard, S. *Am J Hyg* 79:74, 1964.
- (16) Wiktor, T. J.; Fernandes, M. V., y Koprowski, H. *J Immunol* 93:353, 1964.
- (17) Ikić, D. *Prog Immunobiol Stand* 2:305, 1965.
- (18) Pierce, W. E.; Peckinpough, R. O.; Frazier, W. E.; Griffin, J. P.; Greenberg, B. H., y Jackson, G. G. *Antimicrob Agents Chemother* pág. 55, 1965.
- (19) Chanock, R. M.; Ludwig, W.; Heubner, R. J.; Cate, T. R., y Chu, L. W. *JAMA* 195:445, 1966.

- (20) Edmondson, W. P.; Purcell, R. H.; Gundelfinger, B. F.; Love, J. W. P.; Ludwig, W., y Chanock, R. M. *JAMA* 195:453, 1966.
- (21) Mascoli, C. C.; Leagus, M. B.; Weibel, R. E.; Stokes, J., jr.; Reinhart, H., y Hilleman, M. R. *Proc Soc Exp Biol Med* 121:1264, 1966.
- (22) Pagano, J. S. *J Pediat* 68:189, 1966.
- (23) Ikie, D. En *First International Conference on Vaccines against Viral and Rickettsial Diseases of Man* (Washington, D. C., 7-11 de noviembre de 1966) Publicación Científica de la OPS 147, 1967.
- (24) Stanbridge, E. J. y Perkins, F. T. *Nature (Londres)* 221:80, 1969.
- (25) Harris, H.; Waktins, J. F.; Ford, C. E., y Schoeff, G. I. *J Cell Sci* 1:1, 1966.

Safety of Vaccines (Summary)

The last two decades have seen considerable advances in the manufacture, control and clinical trials of vaccines. Several new techniques have been responsible for the development of the modern vaccines, and the large-scale use of living vaccines, made from attenuated virus strains, has demanded the greatest stringency in the safety test methods.

The control of vaccines starts by the inspection of the manufacturing area, for the care and attention invested in the design of the production facilities is almost always reflected in the final product. The integrity and experience of the staff as well as the consistency of production also play a major role.

The tests applied to each batch of vaccine are concerned with both safety and efficacy. Every attempt is made to ensure that no deleterious

extraneous substance, living or of purely chemical nature, arises from the substrate used for the growth of the specific organism from which the vaccine is made and that, in the case of living vaccines, there has been no change in the properties of the vaccine strain. Potency is checked either by measuring the antibody response of a laboratory animal to the vaccine or by the determination of the number of living organisms contained in the human dose.

There are several vaccines under development, some of which await new methods of evaluation. The modern approach to the control of vaccines, however, has now set the pattern for the future and this, together with the continued and long term surveillance of reactions to vaccines in humans, has undoubtedly led to safer vaccines being made available.

Segurança das vacinas (Resumo)

Nas duas últimas décadas verificaram-se consideráveis progressos na fabricação, controle e testes clínicos das vacinas. Várias técnicas novas concorreram para o desenvolvimento da vacina e o uso massivo de vacinas de vírus vivo, preparadas com germes atenuados, tem exigido o maior rigor no que respeita aos métodos de comprovação de segurança.

O controle de vacinas tem como primeira etapa o controle das fábricas, pois o cuidado e atenção dispensados ao projeto dos estabelecimentos de produção quase sempre se refletem no produto final. A idoneidade e experiência do pessoal, tanto quanto a consistência da produção desempenham papel da maior importância.

Os testes a que se submetem cada lote de produção, tanto visam à segurança como à eficácia das vacinas. Envidam-se todos os esforços

no sentido de assegurar que nenhum corpo estranho nocivo, vivo ou de natureza puramente química, apareça no substrato usado para proliferação do organismo específico de que é preparada a vacina e, no caso de vacinas de vírus vivos, que não haja qualquer alteração das propriedades do germe. A potência é medida seja pela resposta do animal de laboratório a vacina com a formação de anticorpos, seja pela determinação do número de organismos vivos contidos na dose humana.

Há várias vacinas em desenvolvimento, algumas a espera de novos métodos de avaliação. O novo método de controle, porém, fixou o padrão futuro, o que juntamente com a contínua e prolongada observação das reações do homem as vacinas, sem dúvida permite que se disponha hoje de vacinas mais seguras.

Sécurité des vaccins (Résumé)

Les deux dernières décennies ont vu des progrès sensibles dans le domaine de la fabrication, du contrôle et des essais cliniques des

vaccins. Plusieurs nouvelles méthodes ont permis de produire les vaccins actuels, et l'emploi à grande échelle de vaccins vivants préparés à

partir de souches virales atténuées a exigé la plus grande rigueur dans les épreuves d'innocuité.

Le contrôle des vaccins commence par l'inspection de l'espace réservé à leur fabrication, car les soins et l'attention qui rentrent dans la conception des moyens de production se retrouvent presque toujours dans le produit final. L'intégrité et l'expérience du personnel ainsi que l'uniformité de la production jouent également un rôle important.

Les épreuves auxquelles chaque lot de vaccins est soumis portent à la fois sur l'innocuité et l'efficacité. On veille par tous les moyens à ce qu'aucune substance étrangère nuisible, vivante ou de nature purement chimique, provienne de la couche inférieure utilisée pour la culture des organismes spécifiques à partir desquels on

obtient le vaccin et, dans le cas de vaccins vivants, qu'aucun changement ne soit survenu dans les propriétés de la souche vaccinale. L'activité est vérifiée soit en mesurant la réponse en anticorps au vaccin d'un animal de laboratoire ou en déterminant le nombre d'organismes vivants contenus dans la dose humaine.

Plusieurs vaccins font actuellement l'objet d'une mise au point dont certains attendent de nouvelles méthodes d'évaluation. Toutefois, la façon moderne d'aborder le contrôle des vaccins a maintenant constitué un précédent pour l'avenir, et ce fait, ainsi que la surveillance continue et à long terme des réactions aux vaccins chez les humains, a eu pour effet, sans aucun doute, que l'on dispose maintenant de vaccins plus sûrs.