

## DETERMINACIÓN DE PIRÓGENOS EN VACUNAS ANTIAFTOSA OLEOSAS

P. M. COTÍAS<sup>1</sup>, V.M. VARELA-DÍAZ<sup>2</sup>, H.S. PAIM<sup>2</sup>, J.A. MESQUITA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Instituto de Hematologia e Reagentes Sta. Catarina*  
Rua Pardal Mallet 26, 20270-280 Rio de Janeiro, RJ, Brasil

<sup>2</sup>*Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (OPS/OMS)*  
Caixa Postal 589, 20001-970 Rio de Janeiro, RJ, Brasil

**RESUMEN.** Se efectuaron pruebas de pirogenicidad *in vivo* e *in vitro* en una serie de lotes de vacuna oleosa antiaftosa. Los hallazgos demostraron que normalmente estos inmunógenos no son reactivos en estas técnicas. Se sugiere emplear pruebas de pirógenos en aquellos casos en que se sospecha de problemas de contaminación bacteriana en vacunas antiaftosa, y para la caracterización de las reacciones posvacunales.

La ocurrencia de una amplia variedad de manifestaciones clínicas después de la administración de distintos tipos de vacuna contra la fiebre aftosa, a veces asociadas con estados de hipersensibilidad, ha sido registrada esporádicamente a través de los años (2,4,9). A partir de esas observaciones, se planteó la posibilidad de que, en algunos casos, la reacción posvacunal pudiera resultar de la presencia de pirógenos en los inmunógenos correspondientes. Por tanto, se estimó que la determinación de pirogenicidad en las vacunas antiaftosa sería de interés por su potencial para su inclusión entre los factores a analizar para explicar la aparición de signos posvacunación. Sin embargo, la viabilidad de esta propuesta depende de la demostración de que estos inmunógenos normalmente no revelen reactividad en pruebas de pirógenos.

Actualmente, la pirogenicidad se evalúa *in vivo* e *in vitro* mediante las pruebas de pirógenos en conejo (10) y la técnica del lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL), respectivamente (1,3). LAL es el procedimiento más sensible para detectar endotoxinas de bacterias gramnegativas y puede presentar reacciones con cantidades mínimas, de alrededor de 0,0005 µg de endotoxina por ml (5,6). Además, la prueba de LAL es más rápida, de menor costo, y más sencilla que la prueba de pirogenicidad en conejos.

En general, se considera que una prueba de LAL positiva es específica para la presencia de endotoxina bacteriana (1,3). Sin embargo, una variedad de compuestos que no son lipopolisacáridos, tales como la ribonucleasa, las actividades del sistema de coagulación sanguínea de mamíferos, poli(I), poli(C) y poli(A), poli(U), también producen reacciones positivas. Por este motivo, el hallazgo de un resultado positivo en el examen de una solución desconocida debe interpretarse con cautela (1). Por otra parte, se ha establecido que ciertos compuestos que son piro-

---

Solicitar separatas al:  
Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (OPS/OMS).

génicos en el conejo no necesariamente lo serán también en la prueba de LAL (1).

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se examinó una serie de vacunas antiaftosa oleosas para determinar si estos inmunógenos no reaccionan en pruebas de LAL y de conejos para pirógenos. Inicialmente, se examinaron tres lotes seleccionados al azar de vacunas elaboradas en el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (OPS/OMS), según lo descrito (8). Posteriormente, se examinaron otros siete lotes de vacuna que habían sido sometidos por empresas comerciales para control de calidad por las autoridades de sanidad animal de Argentina y Colombia, las que gentilmente las suministraron para estos estudios.

Para la detección de pirógenos por LAL en estas vacunas, los reactivos utilizados para la prueba se adquirieron comercialmente (Whittaker Bioproducts Inc., Walkerville MD, USA\*) y el procedimiento se efectuó según lo descrito en el prospecto. Esencialmente, el lisado se reconstituyó y se mezcló con partes iguales de la muestra de vacuna. Los tubos se incubaron sin moverse a 37°C durante una hora y se les examinó, invirtiéndolos para detectar la formación del gel. Diluciones dobles del estándar de endotoxina, diluciones de las vacunas en estudio y agua del reactivo LAL sin alterar, sirvieron de controles.

Posteriormente, los mismos lotes de vacunas se examinaron mediante la prueba de pirógenos en conejos, la que se llevó a cabo esencialmente según lo descrito en la Farmacopea de los Estados Unidos (10). Antes de usarse, toda la cristalería se calentó a 250°C durante 30 minutos para que estuviese libre de pirógenos, y se dejó enfriar hasta alcanzar 37°C. Se emplearon grupos de tres conejos adultos New Zealand White, todos del mismo sexo y de aproximadamente 1,5 kg de peso.

\* La mención de firmas comerciales o de sus productos se hace con fines de identificación y no implica su endoso por los autores o sus respectivas instituciones.

Los conejos se mantuvieron individualmente en salas especiales libres de ruidos y otras distracciones, acondicionadas a una temperatura uniforme de 22-26°C. El alimento se removió 12 horas antes de efectuar la prueba, pero los animales tuvieron acceso a agua en todo momento.

Los termómetros se insertaron por vía rectal a una profundidad de 7,5 cm por lo menos, 40 minutos antes de inocular las vacunas. En ningún conejo la temperatura fue superior a 39,8°C o inferior a 37,5°C, ni se registraron variaciones mayores de 1°C entre lecturas repetidas, condiciones que hubieran requerido descartarlos según los requisitos de la prueba.

Cada animal se inoculó por vía endovenosa (vena marginal de la oreja) con 0,5ml de vacuna por kg de peso, liberándola lentamente a fin de suministrarla durante un intervalo de 10 minutos. Se inocularon tres conejos con cada vacuna. Otros animales que no fueron inoculados se examinaron en paralelo.

Se registraron lecturas seriadas de temperatura en ocho ocasiones consecutivas, a intervalos de una hora. Los animales se acondicionaron previamente efectuando pruebas en blanco del procedimiento completo, exceptuando la inoculación de las vacunas, así como inoculándolos con solución salina apirogénica.

El criterio para establecer la ausencia de pirógenos en las vacunas consistió en constatar que ninguno de los animales inoculados mostró un incremento en la temperatura de 0,6°C o mayor, en comparación con su respectivo control térmico, o si la suma de los tres incrementos individuales en la temperatura no excedió 1,4°C. El registro de valores superiores se consideró como indicativo de la presencia de pirógenos. En todos los casos, los animales se examinaron clínicamente para detectar signos de sensibilidad al inóculo.

Cabe señalar que el procedimiento indica que, de no cumplirse estas condiciones, la prueba debe repetirse usando cinco conejos. Si menos de tres de ellos presentan aumentos en la temperatura de 0,6°C o más, o si la suma de los tres incrementos máximos no excede 1,4°C, la prueba se considera libre de pirógenos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados demostraron que ninguna de las vacunas examinadas indujo una respuesta de pirógenos en conejos, o de gelificación en la prueba de LAL. Estas observaciones indican que es factible efectuar estos procedimientos en lotes de vacuna asociados con reactividad posvacunal, a fin de asistir en la caracterización de estos cuadros. Esto parece adquirir una utilidad particular en aquellas situaciones en que las inmunizaciones se han llevado a cabo a partir de frascos de vacunas parcialmente usadas que se han mantenido almacenadas en los establecimientos problema, así como cuando se sospechen problemas de contaminación bacteriana durante el proceso de manufactura del inmunógeno.

La búsqueda bibliográfica revela que, en algunos países, se realizan pruebas de pirógenos con fines de control de calidad del producto final, en vacunas antirrábicas para uso humano (7), así como en vacunas humanas de polisacárido meningocócico (6). Sin embargo, la aplicación de investigaciones de pirógenos en vacunas contra el virus de la fiebre aftosa u otros agentes infecciosos no se ha registrado para uso veterinario (5). De ahí que la justificación para su incorporación como rutina queda por demostrarse.

## REFERENCIAS

1. ELIN, R.J., WOLFF, S.M. Nonspecificity of the Limulus Amebocyte Lysate test: positive reactions with polynucleotides and proteins. *J. Infect. Dis.*, 128 (3): 349-352, 1973.
2. FEDIDA, M., DANNACHER, G., BELLI, P., COUDERT, M. Accidents survenus après vaccination anti-aphteuse au cours de la campagne 1984-1985: les cause possibles. *Rec. Méd. Vét.*, 162 (8-9): 947-972, 1986.
3. LEVIN, J., TOMASULO, P.A., OSER, R.S. Detection of endotoxin in human blood and demonstration of an inhibitor. *J. Lab. Clin. Med.*, 75 (6): 903-911, 1970.
4. MUSSGAY, M.W. Accidentes y reacciones de las vacunas contra la fiebre aftosa. En: *III Reunión Interamericana sobre el Control de la Fiebre Aftosa y otras Zoonosis*. Buenos Aires, Argentina, 14-17 de abril de 1970. Washington, D.C., OPS/OMS, 1971. p. 82-87 (Pub. Cien., 218).
5. OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. *Manual of standards for diagnostic tests and vaccines*. 2.ed. Paris, OIE, 1992.
6. ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. *27° Informe del Comité de Expertos de la OMS en Patrones Biológicos*. Ginebra, OMS, 1976. 91p. (OMS. Ser. Inf. Técn., 594).
7. ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. *31° Informe del Comité de Expertos de la OMS en Patrones Biológicos*. Ginebra, OMS, 1981. 332p. (OMS. Ser. Inf. Técn., 658).
8. ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD. *Producción, control de calidad y uso de vacunas con adyuvante oleoso contra la fiebre aftosa*. Washington, D.C., OPS/OMS/BID, 1987. 260p.
9. QUIROZ, R., SUTMOLLER, P., BARROETA, M. Factors associated with anaphylactic reactions to chicken embryo foot-and-mouth disease vaccines and Flury rabies vaccines in cattle of Venezuela. *Am. J. Vet. Res.*, 25: 1627-1634, 1964.
10. *The United States Pharmacopeia*. 19. rev. Rockville, MD, United States Pharmacopeial Convention, Inc., 1975.