

INDEXED

**SEMINARIO DE
VACUNACION ANTIVARIOLICA**



**Publicaciones Científicas
No. 29**

Marzo, 1957

**OFICINA SANITARIA PANAMERICANA
Oficina Regional de la
Organización Mundial de la Salud
Washington, D.C.**

SEMINARIO DE VACUNACION ANTIVARIOLICA

(Lima, Perú, 20-25 de agosto, 1956)

TABLA DE MATERIAS

	Página
Introducción.....	107
Documentos de trabajo:	
Procedimiento para la manufactura de vacuna antivariólica glicerinada, utilizado por la División de Laboratorios del Departamento de Sanidad de Michigan— <i>W. H. Gebhard y H. D. Anderson</i>	109
Vacuna antivariólica desecada en el Perú— <i>Aurelio Sousa Iglesias</i>	126
Preparación, estandarización y empleo de una vacuna antivariólica desecada, estable y purificada— <i>Douglas McClean</i>	132
Preparación de vacuna antivariólica cultivada en la membrana corioalantoica de embrión de pollo— <i>J. V. Irons y E. B. M. Cook</i>	138
Pruebas de inocuidad, pureza y actividad de las vacunas antivariólicas— <i>Else Krag Andersen</i>	147
Diagnóstico de laboratorio de la viruela— <i>Alfred S. Lazarus</i>	153
Informe sobre la campaña de vacunación antivariólica efectuada durante el período octubre 1950-diciembre 1955— <i>Antonio de la Fuente E.</i>	160
Discusiones, recomendaciones y votos.....	167
Anexo I—Programa	
Anexo II—Lista de asistentes	

OFICINA SANITARIA PANAMERICANA

Oficina Regional de la
Organización Mundial de la Salud
1501 New Hampshire Avenue, N. W.
Washington 6, D.C., E.U.A.

Reimpreso del BOLETÍN DE LA OFICINA SANITARIA PANAMERICANA
Año 36, Vol. XLII, No. 2, febrero 1957

Introducción

La viruela constituye todavía un problema importante de salud pública en numerosas zonas del mundo y particularmente en algunos países de este continente, a pesar de que, desde hace más de siglo y medio, se dispone de un elemento preventivo de tan alta eficacia como la vacunación antivariólica. Los esfuerzos realizados han tropezado en algunos países con dificultades de orden económico y administrativo que han impedido obtener la erradicación de la enfermedad.

Tomando en cuenta la importancia del problema, la XIII Conferencia Sanitaria Panamericana, Ciudad Trujillo, 1950, recomendó a los países miembros la ejecución de programas de vacunación y revacunación antivariólica tendientes a la erradicación de la enfermedad de todo el continente, y que dichos programas se desarrollaran en su aspecto internacional de acuerdo con la orientación que impartiese la Organización Sanitaria Panamericana.

Posteriormente el Consejo Directivo, en su VI Reunión, La Habana, 1952, y la XIV Conferencia Sanitaria Panamericana, Santiago, 1954, asignaron fondos especiales para la iniciación y puesta en marcha de un programa continental de erradicación de la viruela.

Como una primera etapa de este programa la Oficina Sanitaria Panamericana ha estimulado la producción en los diversos países de vacunas antivariólicas de alta calidad y capaces de resistir los efectos del clima y de las condiciones de transporte existentes en grandes zonas del continente. Con este fin se ha suministrado a varios laboratorios nacionales el equipo necesario para la producción de vacuna antivariólica desecada. Al mismo tiempo se han provisto los servicios de un consultor especializado en la producción de esta clase de vacuna, se

ha distribuido información técnica sobre el tema, se han otorgado becas a los técnicos encargados de la producción de vacuna, para su adiestramiento en los métodos más modernos de producción y se han facilitado los servicios de un laboratorio de reconocida competencia internacional para llevar a cabo pruebas de control de potencia, de pureza e inocuidad.

Varios laboratorios pertenecientes a distintos países del continente están produciendo en estos momentos vacunas glicerinadas y desecadas, que se utilizan en campañas nacionales y en algunos casos se exportan a otros países del continente.

Las técnicas de producción y control seguidas por los diversos laboratorios difieren en numerosos aspectos. Asimismo los resultados obtenidos en las pruebas de control efectuadas por el laboratorio internacional a cargo de ellas han mostrado variaciones a veces considerables entre la vacuna producida por los distintos laboratorios y, en ocasiones, incluso entre distintos lotes de vacuna producida bajo las mismas condiciones por el mismo laboratorio. En estas circunstancias se consideró conveniente reunir a los profesionales encargados de la producción y control de la vacuna en los distintos países en un seminario con el fin de intercambiar ideas y experiencias y llegar a un acuerdo sobre las ventajas e inconvenientes de diversos detalles técnicos de producción y a una cierta uniformidad de procedimientos de control a fin de obtener resultados comparables. Se creyó conveniente discutir también durante esta reunión los métodos de laboratorio para el diagnóstico de la viruela y analizar los resultados obtenidos con el uso de distintos tipos de vacuna en campañas de vacunación.

Este seminario se reunió del 20 al 25 de

agosto, 1956, en Lima, y las reuniones tuvieron lugar en el Instituto Nacional de Salud Pública. Concurrieron a él 19 personas, entre participantes y observadores, de 10 países del continente* y asistieron como consultores destacadas figuras científicas reconocidas como autoridades mundiales en el tema.

Durante el seminario se celebraron dos tipos de reuniones, las académicas de mesa redonda, destinadas a discutir libremente un tema especial en cada sesión, y las demostraciones prácticas de diversos detalles técnicos de producción. Los trabajos publicados en este folleto fueron presentados al

* Argentina, Brasil, Colombia, Cuba, El Salvador, Estados Unidos de América, México, Perú, Uruguay y Venezuela.

tratarse los temas respectivos y sirvieron de base a las discusiones cuyo resumen se incluye también.

Como consecuencia de estas discusiones y del intercambio de ideas en la última sesión del seminario se aprobaron las conclusiones y recomendaciones que aparecen más adelante.

Como puede verse, la labor del seminario fue intensa, y cabe esperar de ella, no sólo una mejora de la calidad de la vacuna producida y un estímulo de las investigaciones destinadas a obtener un producto cada vez más eficaz, sino también una intensificación de las campañas de vacunación, que será decisiva para alcanzar la meta propuesta: la erradicación continental de la viruela.

Documentos de Trabajo

PROCEDIMIENTO PARA LA MANUFACTURA DE VACUNA ANTIVARIOLICA GLICERINADA, UTILIZADO POR LA DIVISION DE LABORATORIOS DEL DEPARTAMENTO DE SANIDAD DE MICHIGAN*

W. H. GEBHARD y H. D. ANDERSON

División de Laboratorios, Departamento de Sanidad de Michigan, E. U. A.

En todo estudio de métodos para la producción de vacuna antivariólica que se emprenda en la actualidad, hay que tener en cuenta los siguientes aspectos:

1) Selección de un procedimiento de elaboración y cosecha de una vacuna de bajo recuento bacteriano, elevada actividad antigénica y alto índice de vacunaciones satisfactorias.

2) Selección de un procedimiento de inoculación que reduzca a un mínimo el riesgo de otras infecciones, ya sean de origen bacteriano o viral.

3) Selección de una cepa de virus de vacuna que haya dado muestra de poseer actividad antigénica y que, además, esté libre de características neurotrópicas.

4) Selección de un procedimiento que resulte económico.

5) Preparación de un producto final lo suficientemente estable para que su aplicación dé un índice elevado de vacunaciones satisfactorias.

6) Selección de un tipo de envase conveniente y eficaz.

Naturalmente, cada laboratorio ha de tener en cuenta otros aspectos importantes, tales como la especie del animal que se ha de utilizar, tipo de local que puede proporcionarse, y la preparación y experiencia del personal técnico de que se dispone.

Este informe tiene por objeto describir un procedimiento que satisface los requisitos

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

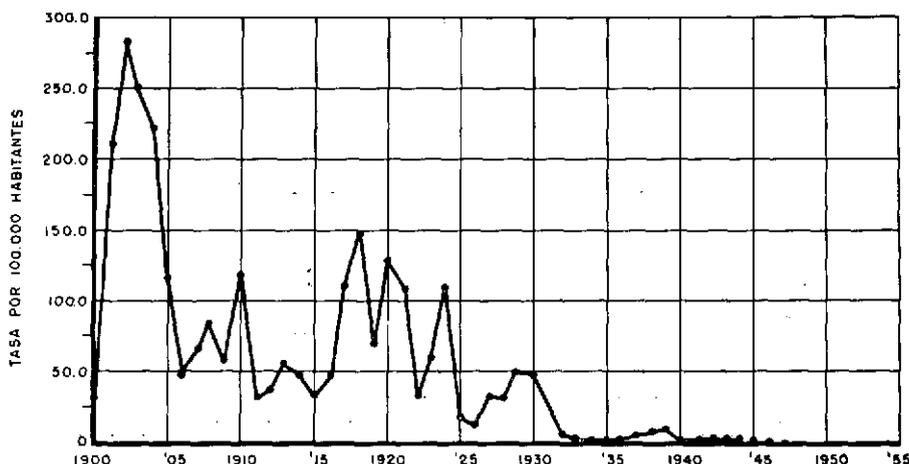
antes citados para el Estado de Michigan, E. U. A.

En Michigan tenemos un clima templado, y está muy extendido el uso de la refrigeración mecánica, por lo cual la vacuna glicerinada ha resultado satisfactoria para el fin perseguido y es el único tipo de vacuna que se ha preparado para su distribución en el estado.

La producción de vacuna antivariólica se inició en estos laboratorios en 1930. En aquel entonces las autoridades sanitarias se encontraban en medio de un brote de viruela durante el cual se notificaron 2.410 casos en 1929 y 2.375 en 1930. La Fig. 1 muestra la variación de la tasa de casos de viruela durante los últimos 56 años, y se observará que ascendió a 283,6 por 100.000 habitantes en 1902, y fue de 118 en 1910, de 150 en 1918, de 131 en 1920, de 109 en 1924, de 51 en 1929, y de 49 en 1930. De 1936 a 1939 ocurrió un pequeño brote que alcanzó un máximo de 5,3 en 1938. Se observará también que desde 1947 no se han notificado casos de esta clase en Michigan.

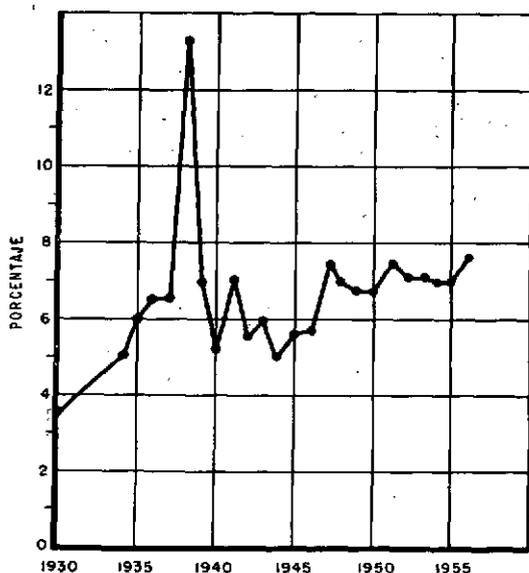
El procedimiento adoptado originalmente para la producción de vacuna fue el seguido por la División de Laboratorios Biológicos del Departamento de Sanidad de Massachusetts. Este organismo había producido vacuna antivariólica desde 1904. El virus de siembra había sido obtenido por dicho estado en 1920 de la Oficina de Laboratorios, De-

FIG. 1.—Tasa de casos de viruela



partamento de Sanidad, Nueva York, N. Y. En los laboratorios de Michigan, el procedimiento de manufactura se ha modificado en la forma descrita por Ducor,† pero desde 1945 ha permanecido esencialmente inalterado. Se acompaña una descripción sumaria de este método, preparada para mantener la continuidad del mismo y para

FIG. 2.—Porcentaje de dosis de vacuna distribuidas en años sucesivos en comparación con el número de habitantes.



† *Pub. Health Rep.*, Vol. 62, No. 16, pág. 565, ab. 18, 1947.

que sirva de guía en la preparación del personal.

En Michigan el uso de esta vacuna ha aumentado constantemente durante los 26 años de su aplicación (Fig. 2). En 1930 se distribuyó cantidad suficiente para inocular 3,7 % de la población estatal, y desde 1947 la distribución anual ha sido siempre suficiente para vacunar al 7 % aproximadamente. El porcentaje máximo (13,4) coincide con el punto intenso del brote ocurrido de 1936 hasta fines de 1939. Durante los 26 años en que se ha venido utilizando esta vacuna no se han notificado reacciones neurológicas. La experiencia indica que, de haber ocurrido algún caso de éstos, se hubiera notificado inmediatamente. Los casos de vacuna generalizada han sido sumamente raros, y al investigarlos se descubrió que se debían a una susceptibilidad anormal del individuo. Se notificó un caso de vacuna generalizada en un niño con aglobulinemia gamma. También se notificaron otros casos de niños con eczema u otras dermatosis crónicas, cuya vacunación estaba contraindicada.

Los detalles del procedimiento figuran en el trabajo de Ducor y en la descripción sucinta que acompaña a este informe. Sin embargo, se estima conveniente examinar ahora ciertos aspectos del método que pueden ser importantes.

El uso de la ternera (bovino) se basa

principalmente en la tradición y en la abundancia de estos animales. Se prefieren las hembras porque es más fácil mantener un campo de operaciones limpio y porque son más dóciles para manejar.

La cepa de virus de vacuna se ha venido utilizando continuamente desde que se obtuvo de Massachusetts en 1937. Nuestro tratamiento de la cepa merece un examen más amplio, puesto que se han podido conservar sus excelentes características de actividad y pureza y de no provocar reacciones neurológicas.

A fin de mantener la actividad de la vacuna y, al mismo tiempo, conservar sus características dermatópicas, se adoptó un procedimiento de pases alternos de virus de siembra entre el conejo y la ternera. Esto puede proporcionar también cierta protección contra la posibilidad de que el virus de siembra transporte otros virus y algunas bacterias. Igualmente se tiene gran cuidado de hacer una ligera escarificación al inocular los animales con el objeto de evitar que, debido a una inoculación más profunda, el virus pueda adaptarse a otros tejidos.

La adquisición de las terneras está a cargo de un veterinario. Se examina minuciosamente a cada animal antes de comprarlo, y cualquier signo de enfermedad se considera causa suficiente para su rechazo. Se presta especial atención a la piel de la ternera y se sigue también la norma de rechazar todo animal que presente lesiones en la boca. Se procura adquirir todas las terneras, o la mayor parte de ellas, antes de comenzar la temporada de producción. Las terneras se alojan en un establo reservado para este fin. Se lleva un registro diario de la temperatura rectal del animal, que es inspeccionado diariamente por un veterinario. Este procedimiento permite escoger el mejor animal del hato cada vez que se ha de entregar uno al laboratorio de vacuna antivariólica, y elimina casi la posibilidad de que, debido a la admisión de un animal enfermo, se contamine la sección de cuarentena del laboratorio de vacuna antivariólica. Si en cualquier momento resulta necesario retirar un animal

del establo de cuarentena o del local de cuarentena del laboratorio de vacuna antivariólica, se lava y desinfecta minuciosamente la totalidad del local donde estuvo.

Cuando se admite una ternera en el laboratorio de vacuna, se le afeita el pelo de todo el cuerpo con una trasquiladora eléctrica. Después de lavada perfectamente con jabón y agua caliente, es examinada por un veterinario, el cual la rechaza si presenta lesiones de la boca, tiña, verruga, o infecciones del aparato respiratorio superior.

Durante el período de cuarentena en el laboratorio de vacuna, que dura siete días, se registra la temperatura rectal dos veces al día y a cada ternera se le hace una prueba de tuberculina. Al cabo de los siete días, se llevan a la sala de operaciones, para su inoculación, las terneras que han dado resultado negativo en la prueba de tuberculina y cuya temperatura ha sido normal.

La limpieza del lugar de inoculación se facilita considerablemente afeitando la parte en que se va a operar. Este procedimiento deja la superficie de la piel suave y fácil de limpiar mediante los lavados. Hay que tener gran cuidado de evitar cortaduras con la máquina o navaja de afeitar que puedan dar lugar a que se introduzca el virus de siembra en tejidos más profundos.

Se tiene el máximo cuidado de realizar todo el trabajo de la sala de operaciones en condiciones asépticas; sin embargo, resulta difícil mantener la asepsia cuando se trata de un animal incontinente, de 300 a 400 libras de peso. La conservación de un campo de operaciones aséptico es un aspecto muy importante de este procedimiento.

La sala de operaciones se mantiene escrupulosamente limpia en todo momento. Mientras se trabaja en ella, el piso se mantiene mojado con agua corriente. Las heces, orina o vómitos se limpian inmediatamente de la mesa de operaciones y se vierten por el sumidero.

No se permite a nadie permanecer en la sala de operaciones durante la inoculación o la cosecha, a menos que vista ropas protectoras esterilizadas y tenga que intervenir en

a operación. A los visitantes se les permite observar la operación a través de las ventanas de cristal que separan la sala de operaciones del corredor.

El instrumento para escarificar la piel de las terneras consiste en un sencillo soporte para cuatro agujas espaciadas 0,5 cm. y con una proyección de 2 cm. aproximadamente. Esta longitud de la aguja permite que la flexibilidad natural del acero compense las pequeñas irregularidades de la superficie de la piel. Las agujas se sostienen perpendicularmente a la piel. Rara vez se produce una escarificación suficientemente profunda como para que salga sangre, y sin embargo, se obtiene una vesiculación que, por lo general, es confluyente. No cabe duda de que una escarificación tan superficial no permite obtener grandes cantidades de pulpa vacunal, pero esto puede ser importante para mantener las características dermatrópicas del virus. Se consigue un promedio de 135 g. de pulpa por ternera, aunque se han cosechado algunos lotes de más de 300 g. Si un operador obtiene varios rendimientos sucesivos de pulpa de unos 200 g. por ternera, se revisan cuidadosamente sus métodos de inoculación y cosecha.

Después de inoculada, cada ternera es trasladada a un cuarto de incubación, donde permanece durante seis días. Se registran las temperaturas rectales dos veces al día y se cambia diariamente la ternera a un pesebre limpio. Este cuarto está equipado con un sistema de desagüe automático para eliminar las deyecciones. Las tablas del piso se lavan y esterilizan por autoclave después de cada día de uso. Los pesebres se desinfectan con una solución de hipoclorito. La zona de vacunación de cada ternera se lava diariamente con agua y jabón y se rocía con roccal al 1:1.000.

La fase más importante de este procedimiento, a la vez que la más difícil de enseñar a los que están adiestrándose, es la técnica empleada en la cosecha de la vacuna. Tiene suma importancia el que se preste cuidadosa atención a la técnica de lavado, a la eliminación del jabón residual con etanol (95%),

a la aplicación de la concentración apropiada de roccal, y a la eliminación de éste con agua destilada.

En la Fig. 3 se presentan los datos de los recuentos bacterianos en 40 lotes sucesivos cultivados por el método utilizado antes de la adopción del procedimiento actual, y en 87 lotes sucesivos obtenidos por este último método. También figuran los datos correspondientes a 19 lotes sucesivos de elevado recuento bacteriano, en los que se cometió un error en la dilución de roccal. Los altos recuentos obtenidos, a pesar de que las sucesivas fases del procedimiento fueron ejecutadas por un operador muy capacitado y experto, demuestran la importancia de la concentración del roccal empleado en la esterilización de la superficie cutánea inmediatamente antes del lavado final y de la cosecha. Al utilizar una concentración mayor de roccal (los últimos 10 lotes que aparecen en la figura) el recuento bacteriano volvió a ser bajo.

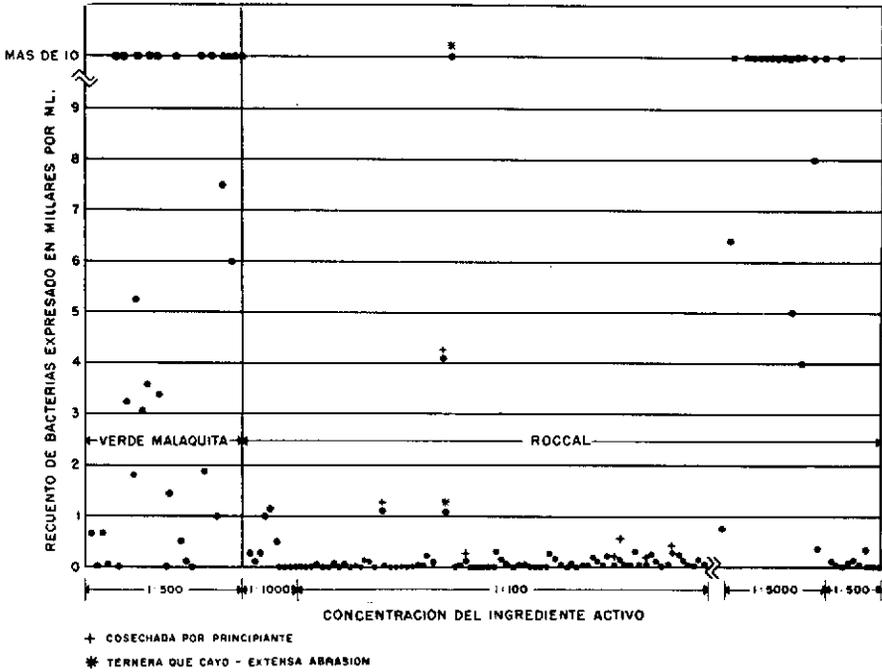
El examen de los datos correspondientes al procedimiento utilizado anteriormente, en que se empleó verde malaquita para esterilizar la superficie de la piel, indica que los resultados fueron sumamente variables, aunque fue posible producir algunos lotes de bajo recuento bacteriano. Gran parte de este éxito se debe probablemente a la técnica de lavado, que fue idéntica en los dos procedimientos.

Se observó repetidamente, al adiestrar a un nuevo operador, que el tratamiento con roccal solo, no es garantía de un recuento bacteriano bajo. Se dió el caso de un operador que no pudo producir vacuna de bajo recuento bacteriano durante un período de dos años.

Ha habido varios casos en que la ternera sufrió una caída al ser conducida del cuarto de incubación a la sala de operaciones, por lo que se presentaron extensas abrasiones en la zona vesiculada, y en la mayoría de los casos no se pudo cultivar pulpa vacunal de bajo recuento bacteriano en esos animales.

Si bien no se cuenta con suficientes datos registrados que confirmen la razón por la

FIG. 3.—Recuentos bacterianos



que se adoptó cada una de las fases del procedimiento, lo cierto es que se ha podido preparar una vacuna de elevada actividad y bajo recuento bacteriano, cosa que no existía antes de la adopción de este método. Una vez adoptado se pudo distribuir vacuna más fresca, puesto que el recuento bacteriano de la mayoría de los lotes estaba muy por debajo del límite permisible inmediatamente después de preparada. Como resultado del cambio de procedimiento, la tasa de vacunaciones satisfactorias ascendió a más del 99 % y fue preciso reducir de 30 hasta una cifra de 4 a 7 las impresiones utilizadas en el método de presiones múltiples.

RESUMEN

En este trabajo se examina el método de producción de vacuna antivariólica de elevada actividad y bajo recuento bacteriano empleado con éxito en los laboratorios de Michigan desde 1945. Esta vacuna ha dado un índice de vacunaciones satisfactorias superior al 99 %, y su uso no ha producido reacciones neurológicas. Los casos de viruela generalizada han sido muy raros y se dieron

en individuos cuya vacunación estaba contraindicada.

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen las valiosas aportaciones de C. B. Line, D.V.M., D. H. Ducor, D.V.M., H. C. Batson, Ph.D., y J. T. Tripp, Ph.D., al desenvolvimiento de este procedimiento.

DESCRIPCION GENERAL DEL PROCEDIMIENTO EMPLEADO PARA LA PREPARACION DE VACUNA DESECADA

El procedimiento de preparación de la vacuna desecada es esencialmente el mismo que se emplea en el caso de la vacuna glicerinada; varía únicamente en el método de preparación de la pulpa vacunal. Teniendo en cuenta que el contenido bacteriano de la pulpa vacunal que ha de utilizarse en la preparación de la vacuna desecada no se puede reducir por el procedimiento ordinario de conservación a baja temperatura durante un largo intervalo, es necesario producir la pulpa con el número mínimo de bacterias en el momento de la cosecha. El único procedimiento conocido para lograr este resultado

es el de prestar atención cuidadosa a todos los detalles de limpieza y técnica aséptica durante el proceso de preparación de la vacuna. Se lava la ternera de 25 a 30 veces, en lugar de 13, antes de recoger la pulpa. Es conveniente recoger la pulpa de las zonas escogidas en recipientes esterilizados separados. Después se puede cultivar la pulpa de cada recipiente para determinar el contenido bacteriano viable. Se elimina cada porción de la pulpa que contenga un número excesivo de bacterias para su uso como vacuna desecada. Es probable que varíe el número máximo de bacterias viables por gramo de pulpa utilizada para producir vacuna desecada, dependiendo de la clase de microorganismos contaminantes. Por lo general, se considera satisfactoria una pulpa que contenga 10.000 bacterias por gramo. Es posible que pueda tolerarse un número mucho mayor (entre 20.000 a 30.000 bacterias por gramo) y aún así reunir los requisitos mínimos establecidos por los Institutos Nacionales de Higiene de los E. U. A.

En vez de usar una solución de glicerina neutra al 50 % para la molienda y suspensión de la pulpa, se emplea una solución salina especial recomendada por el Dr. John W. Hornibrook, de los Institutos Nacionales de Higiene de los E. U. A. Esta mezcla tiene la siguiente composición:

Citrato de potasio ($K_3C_6H_5O_7 \cdot H_2O$)	1,35 g.
Citrato de sodio ($Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$)	2,45 g.
Fosfato de potasio (K_2HPO_4)	0,61 g.
Cloruro de calcio ($CaCl_2$ anhidro)	1,33 g.
Cloruro de magnesio ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	0,6 g.
Carbonato de potasio ($K_2CO_3 \cdot 1\frac{1}{2}H_2O$)	1,0 g.
Lactosa	57,5 g.
Acido láctico en cantidad suficiente a pH 7,00, aproximadamente	0,65 ml.
H_2O	1.000 ml.

Se disuelven todos los ingredientes, salvo el $CaCl_2$, en 500 ml. de agua. Se disuelve

el $CaCl_2$ en 500 ml. de agua. Se mezclan las dos soluciones y se ajustan a pH 7. Se filtran con filtro Berkfeld.

Puesto que el fenol no se puede emplear como preservativo, se utiliza en su lugar penicilina cristalina a una concentración de 10 unidades por ml. de vacuna final.

Preparación de la vacuna: (Esta parte corresponde al encabezamiento "H" de la descripción de la producción de la vacuna ordinaria).

1. Se transfiere la pulpa a una vasija mezcladora Waring esterilizada y se agrega un volumen suficiente de la solución salina especial para lograr una suspensión de 1:2 P/V.

2. Se homogeniza a poca velocidad durante cuatro períodos de 10 minutos cada uno, y el recipiente con la vacuna se coloca, entre cada uno de estos períodos, en la cámara congeladora a $-18^\circ C.$, a fin de enfriar de nuevo la pulpa.

3. Después del cuarto período de homogenización, se saca una muestra de 10 ml. y se transfiere a un frasco esterilizado que contenga 10 ml. de glicerina. Se rotula con el número del lote y la fecha, y se conserva a la temperatura ambiente. Esta muestra no preservada se utiliza para las pruebas de inocuidad, de conformidad con los requisitos establecidos por los Institutos Nacionales de Higiene de los E. U. A.

4. Se agrega suficiente solución salina para obtener una suspensión de pulpa de 1:4, y se añade penicilina cristalina para obtener una concentración final de 10 unidades por ml. Se homogeniza de nuevo durante 10 minutos a toda velocidad.

5. El material se pasa por el tamizador, que contiene un tamiz de alambre de 100 mallas por pulgada, y se recoge en un frasco de centrifuga esterilizado.* El tamizador se envuelve, durante esa operación, en una gasa saturada con una solución de fenol al 5 %.

6. Los frascos se cierran herméticamente con tapones de caucho esterilizados, se

* Corning No. 1250-DEXJU Corning Glass Works, Corning, Nueva York.

rotulan con el número del lote, el volumen y la fecha de preparación. Se almacenan en el refrigerador.

Las pruebas de inocuidad y actividad se hacen de idéntica manera que con la vacuna glicerizada.

Desecación de la vacuna: Se ha observado que la vacuna se puede preparar fácilmente en cantidades de 0,5 ml. en tubos estándar de Pyrex para liofilización, de 8 mm. de diámetro de abertura \times 110 mm. de longitud.* Los tubos se llenan con una pipeta de 10 ml. a la que se le ha formado un extremo capilar, y se congelan en un baño de alcohol en hielo seco, inmediatamente después de llenados, a fin de evitar la separación de la pulpa por sedimentación. Al parecer, esto no afecta la actividad, pero produce una vacuna mucho mejor desecada, de mejor apariencia y más fácil de reconstituir. Los tubos de liofilización se colocan después en un frasco de centrifuga** previamente enfriado, que se conecta al aparato de desecación. El período de desecación dura ordinariamente dos días, de acuerdo con nuestro procedimiento estándar. A la terminación de este período, los frascos de centrifuga se retiran del aparato y los tubos se colocan en un colector y se sellan al vacío con una lámpara de mano.† Después se colocan en un recipiente, se rotulan con los datos necesarios y se almacenan a una temperatura de 4°C. o inferior, hasta que se complete la prueba final y se disponga la distribución del lote.

ESTUDIO GENERAL DE LA VACUNA ANTIVARIOLICA

I. DEFINICION Y CARACTERISTICAS

Definición: La vacuna antivariólica consiste en una suspensión glicerizada de las vesículas de vacuna de animales sanos y vacunados de la especie bovina. El material

* Corning No. 1250-DEXJU Corning Glass Works, Corning, Nueva York.

** Corning No. 450260, Corning Glass Works, Corning, Nueva York.

† No. 61-NA HOKE Inc., South Dean Street, Englewood, Nueva Jersey.

se retira y prepara en condiciones asépticas. La pulpa, que consiste en la vesícula íntegra y su contenido, se muele y suspende en una solución acuosa de glicerina al 50% que contenga 0,5% de fenol como preservativo. Se agrega una parte de la pulpa vacunal a 3 partes de glicerina fenolizada (P/V).

Características: La vacuna antivariólica es una suspensión turbia grisácea, que puede tener un ligero olor debido al preservativo.

Uso: Para la vacunación contra la viruela.

II. NORMAS GENERALES

(Institutos Nacionales de Higiene y Departamento de Salud de Michigan)

A. No se preparará ninguna vacuna de animales que sufran una enfermedad transmisible distinta de la vacuna. Es indispensable que los animales utilizados para preparar la vacuna antivariólica hayan reaccionado negativamente a la prueba de la tuberculina y que, antes de la vacunación, no hayan mostrado signo alguno de enfermedades durante el período de cuarentena, por lo menos de siete días, bajo inspección veterinaria diaria.

B. Después de retirar la pulpa vacunal de cada animal, se hará la autopsia del mismo, y se llevarán registros permanentes de estas autopsias.

C. Se examinará cada lote de vacuna antivariólica para determinar su contenido bacteriano, y también se hará un examen especial de cada lote a fin de cerciorarse de que no contiene *Cl. tetani*. Se llevarán registros permanentes de estos exámenes.

D. El producto final debe colocarse en recipientes esterilizados que reúnan los requisitos establecidos por el Servicio de Salud Pública de Estados Unidos. En Estados Unidos continental, los tubos capilares sellados son los únicos recipientes legalmente autorizados.

E. La unidad de producción de vacuna antivariólica ha de trabajar en condiciones de aislamiento riguroso. No deben entrar en ella más personas que las directamente relacionadas con la preparación de la vacuna.

Las personas que se ocupen de la manufactura de la vacuna no deben frecuentar los establos, los corrales, ni la unidad de producción de toxoide tetánico.

F. Los materiales empleados en la unidad de producción de vacuna antivariólica no deben ser utilizados por otros servicios, y han de guardarse exclusivamente en dicha unidad.

G. Todas las terneras utilizadas en la preparación de vacuna antivariólica serán sacrificadas y sometidas a la autopsia dentro de las 48 horas siguientes a la cosecha de la vacuna. En ningún caso podrán estos animales ser retirados con vida del local.

H. Las dos últimas terneras de una temporada de producción en que se haya empleado el mismo número de lote de siembra se utilizan como testigos de la fiebre aftosa. Estos animales se manejan de la misma manera que las demás terneras, salvo que se inoculan en una zona menor y se mantienen vivas durante un período de observación de dos semanas subsiguientes a la cosecha de las vesículas. En caso de que se utilicen como testigos las dos primeras terneras, es conveniente aplazar la siguiente producción hasta que se hayan destruido aquéllas.

III. MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES

- A. (Tubos de 11 cc.). Gelosa tioglicolato;
- B. Caldo para la prueba de esterilidad (tubos de fermentación Smith);
- C. Solución salina al 0,85 %;
- D. Glicerina al 50 % en agua destilada;
- E. Glicerina al 50 % en agua destilada que contenga 1 % fenol;
- F. Agua destilada esterilizada (unos 3 litros en jarros de 1 galón);
- G. Solución de pentobarbital de sodio.

Pentobarbital de sodio	50 g.
Alcohol etílico (95 %)	100 g.
Agua destilada	900 g.

Se pasa por un filtro esterilizante de Seitz EK y se envasa en frascos esterilizados de 50 ml., provistos de tapón de goma perforable. El pentobarbital se disuelve primero en alcohol.

H. Solución esterilizada de jabón.

Trozos pequeños de jabón Ivory . . 1 parte (V/V)
 Agua 2 partes

Se envasa en frascos cuadrados de 16 onzas y se esteriliza en autoclave. (La relación P/V es aproximadamente de 55 g. de jabón a 425 ml. H₂O).

I. Alcohol etílico al 95 %.

J. Solución de roccal* al 1:100.

El roccal se vende en solución al 10%. Esta dilución original de 1:10 se toma en consideración siempre que se hacen diluciones subsiguientes.

K. Solución de roccal al 1:1.000

L. Solución de rotenona†

Rotenona 1 onza
 Agua caliente 1 galón

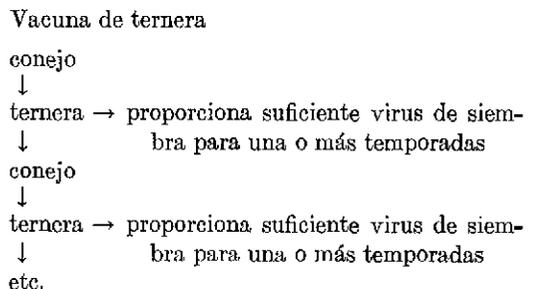
IV. VIRUS DE SIEMBRA

A. Origen del virus de siembra:

El virus de siembra utilizado por los laboratorios del Departamento de Salud de Michigan se obtuvo de los Laboratorios de Antitoxinas y Vacunas de Massachusetts. Se puede identificar como derivado directamente de la cepa Mass. No. 999, septiembre de 1937.

B. Conservación del virus de siembra:

En los laboratorios del Departamento de Salud de Michigan se sigue la práctica de dar al virus de siembra pases alternos por conejo y ternera, en la forma que se describe en el siguiente diagrama:



* Desinfectante de amonio cuaternario—Sterwin Chemicals, Nueva York, N. Y.

† Concentrado de rotenona patentado—Jansen-Salsbery, Kansas City, Mo.

C. *Selección de conejos para la producción de virus de conejo:*

1. Se escogen seis conejos albinos grandes, que pesen entre 7 y 10 lbs. Por lo general, las hembras resultan más convenientes que los machos para la producción de virus.

2. Se utilizan solamente aquellos que tengan una piel suave y lisa, sin mechones de pelo largo.

D. *Preparación de los conejos:*

1. Se coloca el conejo en posición dorsoventral en una mesa especial para esta operación. Se trata de una mesa oblonga de $3\frac{1}{2} \times 1\frac{3}{4}$ pies que permite sujetar una extremidad a cada esquina por medio de una cuerda.

2. Se les depila el lomo y los costados desde la región escapular hasta las caderas.

3. Se lava minuciosamente con jabón y agua caliente la superficie de la piel que queda expuesta. Se seca con una toalla esterilizada.

4. Se aplica a la piel alcohol al 95 %, se deja secar, y después se limpia con agua destilada esterilizada.

5. Se seca con una toalla esterilizada y se envuelve en paños esterilizados, dejando sólo al descubierto la piel desnuda expuesta.

E. *Vacunación:*

El material de inoculación consiste en una vacuna de pase por ternera, diluída con glicerina al 50 % para lograr una suspensión al 1:8.

El operador debe usar guantes.

1. Con un escarificador esterilizado de 4 puntas, (espaciadas 1 mm.), se practican cinco o seis escarificaciones paralelas en la piel que vayan de la región escapular a las caderas. Se escarifica la piel sin profundizar demasiado a fin de evitar que brote la sangre. Esto se logra manteniendo el instrumento perpendicular a la superficie de la piel.

2. Se aplica la suspensión de virus con una espátula esterilizada y se frota minuciosamente sobre la piel escarificada.

3. Se deja secar la piel y se traslada el

conejo a una jaula limpia y provista de alimento y agua.

F. *Cosecha:*

Las vesículas están listas para la cosecha al quinto día siguiente a la inoculación.

1. Se coloca al conejo en la mesa especial, en la misma forma descrita anteriormente.

2. Se sacrifica el conejo inyectándole por vía intravenosa 5 ml. de una solución de nembutal al 5 %.

3. El área de la erupción se lava minuciosamente con solución jabonosa estéril y agua destilada esterilizada. Se repite la operación tres veces, y se seca después dicha área con una toalla esterilizada.

4. Se satura el área con alcohol al 95 %. Se cubre durante 10 minutos con un paño esterilizado.

5. Se retira el paño y se lava el área de la erupción con agua destilada estéril. Se seca con una toalla esterilizada y se envuelve en paños esterilizados, dejando sólo al descubierto dicha área.

6. Se retiran las vesículas raspando con una cuchara esterilizada Volkman. La pulpa se recoge en una placa de Petri esterilizada. Seis buenos conejos darán un rendimiento de unos 20 a 30 gramos de pulpa.

G. *Preparación de la suspensión de virus de siembra:*

1. Se prepara moliendo en un homogenizador Waring una suspensión de la pulpa al 1:4 con glicerina al 50 %.

2. Con una pipeta se transfiere una muestra de 10 cc. a un frasco esterilizado que contenga 10 ml. de glicerina al 50 %. Este material se emplea en las pruebas de inocuidad, según se describe más adelante en el procedimiento para la producción de vacuna. (Véase el apartado "Pruebas de inocuidad").

3. Una vez retirada la muestra para las pruebas de inocuidad se agrega suficiente glicerina al 50 % con fenol al 1 % para lograr una suspensión final de la pulpa al 1:8 en glicerina al 50 %, que contendrá entonces 0,5 % de fenol como preservativo.

4. Se transfiere el material a un frasco

cuadrado de 4 onzas, se rotula con el número del lote, fecha de elaboración, volumen y concentración, y se almacena en la cámara congeladora a una temperatura de -18°C .

5. Se anota la fecha de producción en la tarjeta de registro del virus de conejo.

Una vez completadas satisfactoriamente y anotadas las pruebas de inocuidad y de actividad, el material está listo para ser utilizado como virus de siembra procedente de conejo para la vacunación de ternera. La vacuna preparada de esta ternera se utiliza después como virus de siembra para la producción de vacuna antivariólica en la siguiente temporada, siempre que se hayan completado satisfactoriamente y anotado todas las pruebas necesarias de inocuidad y actividad. La preparación y ensayo del virus de siembra se efectúa en la misma forma que para la vacuna ordinaria, y se tratan bajo el encabezamiento "Producción de vacuna".

H. *Estandares del virus de siembra:*

1. El virus de siembra no debe contener más de 2.000 microorganismos por ml., cifra que se determina mediante el recuento en lámina.* (Véase el apartado VI A. "Recuento bacteriano").

2. Debe estar libre de anaerobios nocivos, lo cual se determina mediante la prueba de inocuidad de tétanos. (Véase el apartado VI B. "Prueba de inocuidad de tétanos").

3. Debe tener actividad satisfactoria, determinada mediante la inoculación en el conejo. (Véase el apartado VI C. "Determinación de la actividad del virus de la vacuna").

V. PRODUCCION DE VACUNA

A. *Preparaciones de terneras para la cuarentena:*

1. Se obtienen terneras que pesen entre 350 y 400 lbs., y tengan abdomen blanco.

* Si el recuento es más alto, se incuba la suspensión de virus durante media hora a 37°C . y se ensaya de nuevo. La glicerina al 50% es bactericida a la temperatura de la incubadora. Sin embargo, esto debe hacerse con precaución porque la temperatura más alta también inactiva rápidamente el virus.

Se examinan inmediatamente después de ser entregadas para cerciorarse de que no tienen defectos físicos ni signos de enfermedad, especialmente de la piel, larvas de *Hypoderma bovis*, y enfermedades respiratorias.

2. Las terneras que se van a someter a cuarentena se esquilan completamente con una máquina ordinaria de las empleadas para trasquilar los caballos.*

3. Se baña a la ternera con jabón *Ivory* y agua caliente, se le recortan y limpian las pezuñas. Se seca cuidadosamente el animal con una toalla gruesa. Si tiene piojos, se la lava con una esponja y una solución de rotenona. Esta solución se deja en la piel y no se limpia. Si no se dispone de rotenona, se puede usar kerosene, pero éste se debe eliminar con un baño con agua y jabón. Se traslada la ternera al cuarto de cuarentena.

4. Se lleva un registro de cada ternera, utilizando para ello el formulario F433.

B. *Cuarentena y cuidado de las terneras:*

1. Duración de la cuarentena y registro de la temperatura: Las terneras se someten a cuarentena por un período no menor de una semana, durante el cual se toma y anota la temperatura rectal dos veces al día, hacia las 8 de la mañana y las 4 de la tarde. La temperatura del cuarto se mantiene entre 82°F ., y 85°F ., y se anotan en el formulario F433 las temperaturas, tanto de la ternera como del cuarto.

2. Ejecución de la prueba de la tuberculina:† La inyección se introduce en la piel del repliegue caudal derecho en la base de la cola. El repliegue se puede ver fácilmente al levantar la cola en sentido perpendicular. Se limpia el área con algodón y alcohol y se inyecta 0,1 ml. de tuberculina, usando una jeringa del No. 35, con una aguja de rosca de $\frac{1}{4}$ de pulgada, de calibre 25.

* En el Departamento de Salud de Michigan se usa una máquina Stewart con cuchilla EH.

† Tuberculina bovina para inoculación intradérmica, obtenida de la oficina de Industria Animal de la Secretaría de Agricultura de los E. U. A., Washington, D. C.

3. Lectura de la prueba: Se determina la reacción al tercer día (72 horas) o más tarde. La reacción positiva se manifiesta por una firme inflamación local en el lugar de la inyección, que a veces dura varios días. Los resultados se anotan en el formulario F117.

4. Destrucción de las terneras que muestran reacción positiva a la tuberculina: No se deben usar para la producción de vacuna las terneras que revelen reacción positiva a la tuberculina. Se debe enviar un informe sobre estos animales enfermos a las autoridades estatales de veterinaria interesadas en la erradicación de la tuberculosis.

5. Rechazo de los animales enfermos: Se rechazan las terneras que muestren signos de enfermedad durante el período de cuarentena. La enfermedad más frecuente es de carácter respiratorio y varía en gravedad desde un leve catarro a pulmonía. Estas dificultades se pueden reducir a un mínimo si la temperatura del cuarto se mantiene continuamente entre 80°F. y 85°F.

6. Alimentación de las terneras: Se alimenta a las terneras dos veces al día: una, a las 8 de la mañana y otra, a las 4 de la tarde. La ración de cada comida consiste en 1,5 cuartos de galón de avena aplastada y aproximadamente la mitad de una horqueta de alfalfa de buena calidad por ternera, así como un cubo de agua fresca y limpia.

7. Saneamiento: a) Se coloca cada ternera en un pesebre individual provisto de piso de rejilla de madera removible. Se sacan las terneras todas las mañanas para limpiar los pesebres. Se limpian éstos minuciosamente con agua caliente y se desinfectan con una abundante solución de cloro.* b) Se sacan diariamente las rejillas sucias, se frotan con un cepillo y agua caliente y se someten a la autoclave durante una hora a 120°C. c) Se lavan los cuartos dos veces al día con una manguera a fin de eliminar el polvo y se aplica diariamente a las paredes y al piso una abundante solución de cloro, con un cepillo de mango largo.

* El Departamento de Salud de Michigan usa HTH-15 Mathaison Alkali Works, Nueva York, N. Y.

C. Preparación de la ternera para la vacunación:

1. Se sujeta la ternera a la mesa de operaciones por medio de correas.

2. Con una máquina Oster empleada para animales pequeños, provista de una cuchilla del No. 40, se corta todo lo corto posible el pelo de la superficie ventral y del lado derecho del cuerpo, es decir, la superficie del abdomen, esternón, axilas, parte interior de los muslos y el lado derecho hasta una distancia de pocas pulgadas de la espina dorsal.

3. Se baña al animal con jabón, cepillo y agua corriente caliente y se limpian las pezuñas con un cepillo.

4. Con jabón ordinario de afeitar, se forma una capa espumosa en un área que abarque el lado derecho del abdomen, el esternón, axilas, la superficie interior de ambos muslos y la ubre, y después se afeita cuidadosamente con una navaja. Esta área afeitada es el lugar de la inoculación.

5. Con un cepillo de mano y una solución de jabón esterilizados, se friega minuciosamente, por lo menos seis veces, el lugar en que se va a inocular. La solución de jabón se licúa calentándola al baño de María en el momento en que vaya a usarse. Después de cada fregado, se limpia cuidadosamente el lugar de la inoculación con agua corriente tibia y, después del último, con agua corriente esterilizada.

6. Se limpia con alcohol al 95%, se deja secar y se lava con agua destilada esterilizada, usando para este fin unos tres frascos de un galón de capacidad.

7. El lugar de la inoculación se seca con una toalla esterilizada. Se envuelve el animal en paños esterilizados, dejando sólo al descubierto el lugar de la inoculación.

D. Procedimiento de vacunación:

1. Se prepara la suspensión de siembra mezclando de 5 a 10 ml. de stock de siembra con 10 a 15 ml. de glicerina al 50%, obteniendo un volumen total de 25 ml. Se envasa en frascos cuadrados de 4 onzas y

se conserva en la cámara congeladora hasta el momento de su empleo.

2. El operador debe ponerse bata y guantes de caucho, todo ello esterilizado.

3. Se usa un escarificador de cuatro agujas, espaciadas 0,5 cm. entre sí. Se trata de un instrumento en forma de T, con un soporte para las agujas y un mango. Las agujas se reemplazan fácilmente aflojando las roscas que las sujetan.

4. Se sostiene el escarificador perpendicularmente a la piel, y con una leve presión se trazan líneas paralelas en la piel con una separación de 0,5 cm. aproximadamente, siguiendo el eje longitudinal del cuerpo. La piel debe quedar bien cortada, pero sin profundizar demasiado para evitar que brote la sangre.

5. La suspensión de siembra se aplica a toda el área de inoculación, siguiendo la escarificación practicada. Con una espátula esterilizada se restriega cuidadosamente el material sobre la piel escarificada.

6. Se deja a la ternera en la mesa durante unos 30 minutos y después se le traslada al cuarto de incubación, donde permanece durante seis días.

E. Incubación:

El cuarto de incubación es semejante al de cuarentena, salvo que está provisto de ventanas de cristal rojo para evitar la luz directa del sol, que puede tener un efecto inhibitor en el desarrollo de la lesión pustulosa.

1. Saneamiento: a) Ternera: Hay que cuidar de que la ternera esté limpia en todo momento. Las materias fecales se eliminan limpiándolas con agua caliente. El área vacunada se rocía dos veces al día con una solución de roccal al 1:1.000, que es germicida. b) Cuarto de incubación: Tiene un piso de rejilla, que se saca diariamente, se lava y se esteriliza en la autoclave. El suelo del cuarto de incubación se friega diariamente con un desinfectante de cloro (HTH-15) y las paredes, bordes de las ventanas, etc., se mantienen absolutamente limpias de polvo lavando la habitación dos veces al día con agua a presión.

2. Se alimenta a las terneras en la misma forma que cuando están en cuarentena, salvo que el heno y la avena se someten antes a autoclave a 120°C. durante una hora.

3. Temperatura. Se toma la temperatura rectal dos veces al día, por la mañana y al medio día, y se anota en el formulario F433, en el que también se registran las temperaturas máxima y mínima del cuarto. Hay que ajustar el termóstato de manera que la temperatura de la habitación esté siempre entre 82°F. y 85°F.

F. Recolección de la pulpa:

El virus de la ternera se recoge al sexto día de incubación.

1. Se coloca la ternera en la mesa en la forma anteriormente descrita, y se la anestesia profundamente administrándole por vía intravenosa una solución de nembutal al 5% en la proporción de 1 ml. por cada 10 a 14 libras de peso. El operador se pone bata y guantes de goma, todo ello esterilizado.

2. Se lava el área vacunada, para lo cual se friega con una solución de jabón esterilizado, y se limpia con agua corriente tibia. Se repite esta operación trece veces o más, según sea la habilidad del operador. El número de lavados se determina por el recuento bacteriano de la pulpa recién cosechada de lotes anteriores.

3. En cada fregado se usan cepillos de mano esterilizados. La experiencia ha mostrado que la técnica de fregado del área vacunada es la fase más importante de este procedimiento para reducir el recuento bacteriano. El operador sostiene el cepillo a un ángulo de 30 grados aproximadamente y lo pasa suavemente por las vesículas, y con la otra mano enguantada estira la piel para descubrir las grietas. Se procura comenzar el fregado y lavado en el centro del campo de operaciones, en dirección hacia el exterior, en movimiento espiral. Finalmente se friega el área que rodea la extensión vacunada y se coloca el cepillo en un recipiente para limpiarlo y esterilizarlo más tarde.

4. Después del último lavado con jabón, se limpia la ternera con agua corriente

esterilizada. A continuación se frota el área con alcohol al 95 %, a fin de eliminar todo residuo de jabón. Se limpia de nuevo con agua corriente estéril y se seca con una toalla esterilizada. Se rocía el área con roccal al 1:100 y se cubre durante 15 minutos con toallas esterilizadas. Se limpia con agua destilada esterilizada y se seca.

5. Se sacrifica la ternera mediante la inserción de un trocar en la arteria carótida.

6. Una vez muerta, se limpia el área vacunada con 10 a 15 litros de agua destilada esterilizada, se seca con una toalla esterilizada y se envuelve con compresas esterilizadas, dejando sólo al descubierto el lugar de la vacunación.

7. El operador cambia de bata y guantes de caucho esterilizados. Se recoge la pulpa raspando con una cuchara esterilizada Volkman la superficie de la piel en que aparece la erupción, y se coloca en un platillo esterilizado de vidrio tarado. Se lleva la pulpa al laboratorio, se pesa y se coloca en la cámara congeladora.

G. Autopsia:

1. Se procede inmediatamente a la autopsia de la ternera, salvo en el caso de las terneras testigos, que se mantienen vivas durante un período de observación de dos semanas para eliminar la posibilidad de fiebre aftosa, según estipulan las normas establecidas por los Institutos Nacionales de Higiene de los E. U. A.

2. Se procede a un examen macroscópico de la armazón ósea y todos los órganos del animal. Con un cuchillo afilado extráiganse y háganse cortes en los siguientes ganglios linfáticos: preescapulares, prefemorales, inguinales, ilíacos, tibiales, mesentéricos, hepáticos, renales, mediastínicos, bronquiales y mandibulares.

3. Se anotan los resultados de la autopsia en el formulario F117. Se desecha la vacuna procedente de todo animal que muestre signos de septicemia o de enfermedad transmisible.

4. También se practica, en la misma forma, la autopsia de las terneras utilizadas

como testigos de fiebre aftosa, al terminar el período de observación de dos semanas.

H. Preparación de la vacuna:

1. Se transfiere la pulpa a un homogenizador Waring esterilizado y se agrega un volumen suficiente de glicerina al 50 % para formar una suspensión de 1:2 P/V.

2. Se homogeniza en frío para lo cual se enfría previamente el homogenizador en la cámara congeladora, a una temperatura de -18°C . Se muele suavemente durante cuatro períodos de 10 minutos cada uno, volviendo a colocar el homogenizador y su contenido en la cámara congeladora durante intervalos de 15 minutos entre cada período de molienda. Así se evita que la vacuna se caliente excesivamente durante esta operación.

3. Después del cuarto período de molienda, se saca una muestra de 10 ml. y se transfiere a un frasco esterilizado que contenga 10 ml. de glicerina al 50 %. Se rotula con el número del lote y la fecha, y se conserva a la temperatura ambiente. Esta muestra sin fenol se utiliza para las pruebas de inocuidad, de acuerdo con los requisitos establecidos por los Institutos Nacionales de Higiene de los E. U. A.

4. Se agrega una cantidad suficiente de glicerina al 50 % que contenga 1 % de fenol para formar una suspensión de pulpa al 1:4. (Véanse los cálculos del apartado más adelante). Se muele de nuevo durante 10 minutos a toda velocidad.

5. El material se pasa por el tamizador, que contiene un cedazo de alambre de 100 mallas por pulgada, y se recoge en un frasco esterilizado. El tamizador se envuelve, durante esa operación, en una gasa saturada de fenol al 5 %.

6. Los frascos se cierran herméticamente con tapones de caucho esterilizados, se rotulan con el número del lote, el volumen y la fecha de preparación y se almacenan en la cámara congeladora a -18°C .

7. Se anotan los datos de la preparación en el formulario F117.

8. Cálculos.

Ejemplo: Si el peso neto de la pulpa es de 100 g.,

a) Se agregan 100 ml. de glicerina al 50% para formar una suspensión de 1:2 P/V.

b) El peso de la pulpa $\times 2 - 10 = a$ la cantidad de glicerina fenolada que se debe agregar para formar una suspensión al 1:4, después de retirar la muestra de 10 ml.

Así: $(100 \times 2) - 10 = 190$ ml. de glicerina al 50% más fenol al 1%, para formar una suspensión de 1:4.

c) La cantidad de preservativo es del 1% de 190 o sea 1,9 ml. de fenol.

d) La cantidad total de diluyente (glicerina al 50%) es $(\text{Peso de la pulpa} \times 3) - \text{la cantidad de preservativo}$.

Así: $(100 \times 3) - 1,9 = 298,1$ ml. de diluyente.

VI. PRUEBAS DE INOCUIDAD Y ACTIVIDAD

Antes de entregar el virus de la vacuna para el envase, se deben realizar pruebas para determinar que el recuento bacteriano es satisfactorio, que se encuentra libre de *Cl. tetani* y que posee suficiente actividad.

A. Recuento bacteriano:

1. Se diluye 1 ml. de la vacuna en 19,0 ml. de suero fisiológico. De esta dilución, se cultiva 1 ml. en cada una en 5 placas de agar por lo menos. El recuento promedio de colonias no debe exceder de 50 por placa. (Normas establecidas por los Institutos Nacionales de Higiene).

2. Se calientan los tubos de caldo de ternera o de agar tioglicolato en una cámara al vapor hasta que se disuelva el agar. Se deja enfriar éste hasta unos 45°C., antes de verterlo. Si se han de efectuar recuentos bacterianos en varias muestras, es más conveniente preparar el medio de cultivo en frascos de 500 ml.

3. Se vierte el agar de cada tubo en una placa de Petri que contenga una dilución de vacuna, se mezcla agitando suavemente la placa, y se deja en reposo hasta que se endurezca el agar. Se invierten las placas y se colocan en una incubadora a 37°C., durante 48 horas.

4. Se cuentan las colonias y se anotan los resultados en el formulario F132.

5. En caso necesario, se vuelven a sembrar muestras en placas, a intervalos, hasta que se obtenga un recuento de 500 bacterias o menos por ml.

B. Prueba de inocuidad de tétanos:

La prueba del *Cl. tetani* se realiza en la muestra de la pulpa glicerinada molida, retirada antes de agregar el fenol a la vacuna. Se efectúan pruebas por separado de muestras de cada ternera. Las muestras se mantienen a 10°C. o más, por lo menos durante siete días o hasta que el recuento bacteriano sea inferior a 1.000 por ml.

1. Se siembran 2 ml. de la suspensión de virus en cada uno de cuatro tubos de fermentación Smith que contengan por lo menos 25 ml. de caldo, como se hace con la prueba de esterilidad. (Antes de utilizarlos, se calientan los tubos a 100°C. durante 30 minutos; se colocan en posición inclinada para eliminar el aire del brazo cerrado y se enfrían hasta 40°C. por lo menos antes de la inoculación.)

2. Se incuban todos los tubos a 37°C. durante nueve días, y se examinan diariamente en busca de signos de contaminación en el medio de cultivo.

3. Se inocula un ratón por vía subcutánea con 1 ml. del caldo no filtrado de cada uno de los tubos de Smith que muestren contaminación o gas en el brazo cerrado entre 24 y 48 horas después de su aparición.

4. Nueve días después de la siembra, se inocula un ratón subcutáneamente con 1 ml. de caldo no filtrado de cada tubo de Smith, independientemente de que se observe o no contaminación.

5. Se observan los ratones diariamente durante seis días para descubrir posibles síntomas de tétanos. Si alguno de ellos muere en el término de tres días sin mostrar dichos síntomas, se repite la prueba inmediatamente inoculando 1,0 ml. de caldo del mismo tubo. Si se repite la muerte de ratones causada por 1,0 ml. de caldo, se desecha la vacuna. También se desecha todo el lote si aparecen síntomas de tétanos en cualquiera de los animales inoculados con la muestra.

6. Se anotan los resultados de la prueba en el formulario F132.

C. Determinación de la actividad del virus de la vacuna:

Se somete a pruebas de actividad tanto la vacuna preparada en lote como la envasada en tubos capilares. Estas pruebas se llevan a cabo por inoculación en el conejo, según la técnica de Force y Leake, descrita en el *Hygienic Lab. Bull. No. 149, 1927*.

1. Dilución de la vacuna en cantidad.

a) Se agita minuciosamente el frasco de vacuna y se hacen diluciones en serie en solución salina esterilizada, en la forma siguiente:

0,5 ml. de vacuna, más 49,5 ml. de solución salina, igual a dilución al 1:100

1 ml. de 1:100, más 9 ml. de solución salina, igual a dilución al 1:1.000

1 ml. de 1:1.000, más 2 ml. de solución salina, igual a dilución al 1:3.000

1 ml. de 1:1.000, más 9 ml. de solución salina, igual a dilución al 1:10.000

1 ml. de 1:10.000, más 2 ml. de solución salina, igual a dilución al 1:30.000

b) Se hacen girar los tubos entre las palmas de las manos para dispersar la vacuna antes de mezclarla con una pipeta. Se usa una pipeta distinta para cada solución y se mezcla arriba y abajo 10 veces. La vacuna en cantidad se ensaya en las siguientes diluciones:

1:1.000, 1:3.000, 1:10.000, 1:30.000

2. Al ensayar la vacuna envasada en tubos capilares, se reúne primero la vacuna en un solo recipiente y las diluciones se efectúan con esta mezcla, utilizando por lo menos 0,1 ml. para la primera dilución.

3. Preparación del conejo.

a) Se depila el lomo y costados de un conejo albino de 7 a 10 lbs.

b) Con un sello de caucho de 2,5 × 5 cm. se marcan cuatro áreas iguales en cada costado del conejo.

4. Inoculación del conejo.

a) Se tienen a mano tubos de cristal de unas 10 pulgadas de longitud (pipetas serológicas deterioradas de 1 ml.), con un diámetro interior de unos 3 mm., taponados con algodón en ambos

extremos y esterilizados. Se cortan por el centro, para formar dos pipetas, de bordes netos.

b) Con el extremo afilado de una de las pipetas así formadas se escarifica una de las áreas marcadas, teniendo cuidado de no cortar, hasta que aparezca un enrojecimiento uniforme, sin que brote la sangre. Por supuesto, se volverá a escarificar al inocular la vacuna.

c) Por medio de una ampolla de caucho unida a la pipeta utilizada en la escarificación, se extraen 0,2 ml. de la dilución de la vacuna que se va a ensayar. Se aprieta el extremo de la pipeta contra la piel del conejo, se frota dentro del área marcada y se inoculara gradualmente la vacuna, para evitar pérdidas fuera del área de inoculación.

d) En el caso de la vacuna preparada en lote, se comienza con la dilución más alta, usando la misma pipeta para las cuatro diluciones. La vacuna sometida a ensayo se inoculara en el costado izquierdo, haciendo lo mismo en el lado derecho, en las diluciones correspondientes de la vacuna testigo, cuya actividad se conoce.

e) La vacuna procedente de tubos capilares escogidos al azar, del producto terminado, se incuba a una temperatura de 35° a 37°C., por lo menos durante 18 horas. La vacuna calentada se ensaya al mismo tiempo que la no calentada, pero sólo a una dilución de 1:1.000. La vacuna testigo se ensaya de la misma manera que el lote de vacuna de producción.

f) Una vez terminada la inoculación, se coloca al conejo en una jaula provista de alimentos, a fin de atraer su atención y evitar que lama los lugares inoculados.

5. Interpretación y anotación de las pruebas de actividad. Se anotan todos los resultados en el formulario F119.

a) Al cabo de cinco días, se examina el conejo y se anota el tamaño de la erupción en cada rectángulo. Esto se expresa por el porcentaje del área cubierta por una erupción confluyente de vesículas, y si se han formado vesículas aisladas, por el número de las mismas.

b) Una vacuna satisfactoria debe producir del 80 al 100% de confluencia con la dilución de 1:1.000; no más de un 20% de reducción con la dilución de 1:3.000; por lo menos una lesión, con la dilución de 1:30.000, y un número aproximadamente proporcional de lesiones con la dilución de 1:10.000.

c) Se puede ensayar de nuevo toda vacuna que

no reúna las exigencias antes citadas. Si la repetición de las pruebas revela que la actividad de la vacuna no alcanza tales exigencias, hay que desecharla.

VII. OTRAS INFORMACIONES

A. Concentración de iones de hidrógeno:

1. El pH de la vacuna antivariólica es aproximadamente 7,1
2. El pH de glicerina al 50% es aproximadamente 6,1
3. El pH de glicerina al 50%, más 1% de fenol es aproximadamente 6,0

B. Conservación:

La vacuna se puede conservar indefinidamente, siempre que se hagan las pruebas necesarias del producto envasado dentro de los nueve meses anteriores a la fecha de

expedición. En el Departamento de Salud de Michigan, la vacuna antivariólica preparada en lote se conserva a -18°C .

C. Fechas:

La vacuna distribuída tiene un plazo de validez de tres meses a contar de la fecha de su expedición en los meses de invierno (octubre a marzo inclusive) y de dos meses en los de verano (abril a septiembre inclusive) si se mantiene continuamente a una temperatura inferior a 5°C . (41°F).

D. Plan de producción:

Cuando el plan de producción comprende dos terneras por semana, durante la primera semana se procede solamente a la inoculación de un animal el martes y otro el viernes. Después, durante el resto de la temporada de producción, el plan es el siguiente:

Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes	Sábado
1) Cosecha	1) Inoculación de la ternera	1) Prueba de actividad 2) Se inyectan ratones de los tubos de 9 días antes	1) Cosecha	1) Inoculación de la ternera	
2) Autopsia de la ternera	2) Se eliminan los ratones de las pruebas de las semanas anteriores	3) Recuento bacteriano en placas de agar	2) Autopsia de la ternera	2) Se trae la nueva ternera, se le depila y se le baña	
3) Se muele y tamiza la vacuna	3) Se trae la nueva ternera, se la depila y se la baña		3) Se muele y tamiza la vacuna		
4) Prueba de inocuidad de tétanos. Se inocula en tubos Smith	4) Se hace la prueba de tuberculina a dos terneras				

Se examinan diariamente los tubos y los ratones inoculados

Quando se trata de tres terneras a la semana, se añade la cosecha el martes y la inoculación el miércoles.

PROCEDIMIENTO PARA FORMAR UN LOTE DE VACUNA ANTIVARIOLICA

1. Se reúnen frascos de lotes aceptables de vacuna (los de cosecha más antigua con los recuentos bacterianos más bajos).

2. Se prepara: a) un tamizador esterilizado; b) un frasco Pyrex de un galón, esterilizado; c) un tapón esterilizado para el frasco.

3. Materiales: a) frasco (por lo menos de 100 ml.) de glicerina al 50%; b) frasco (por lo menos de 100 ml.) de glicerina al 50% con fenol al 1%.

4. Si hay hielo en la vacuna, se deja derretir a la temperatura ambiente. Por lo general, el hielo se derrite en 30 minutos. No hay que dejar que se caliente la vacuna.

5. Se coloca el tamizador en uno de los frascos de un galón. Se toman medidas asépticas. Se cubre el aparato con un paño empapado en fenol al 5%.

6. Se decanta asépticamente la vacuna de los frascos en la tolva del tamizador. a) el tamizador no se llena nunca a más de las dos terceras partes de su capacidad; b) hay que evitar el recalentamiento. El tamizador se manipula a la menor velocidad posible; c) razón para tamizar: Eliminación de cualquier pelo o tejido de la ternera que pueda haber pasado anteriormente por la malla.

7. Lavado de los frascos de vacuna: Se usa para cada frasco 10 ml. de glicerina al 50% con fenol al 0,5%; en la práctica, se lava mejor decantando mayores volúmenes de frasco a frasco.

Ejemplo: Se va a agrupar el contenido de 8 frascos:

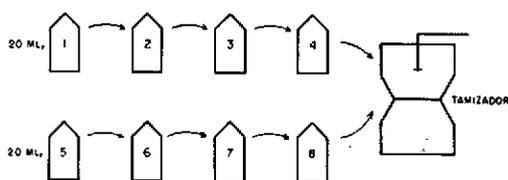
$8 \times 5 \text{ ml.} = 40 \text{ ml.}$ de glicerina al 50%

$8 \times 5 \text{ ml.} = 40 \text{ ml.}$ de glicerina al 50% más fenol al 1%

80 ml. de glicerina al 50% más fenol al 0,5%

Se agregan 20 ml. del primer lavado al frasco No. 1, y 20 ml. al No. 5

Se agita y decanta en los frascos No. 2 y No. 6 respectivamente:



El segundo se hace de la misma manera

8. Se retiran los especímenes (1 ml. cada uno) para los ensayos de inocuidad (recuento bacteriano y prueba de actividad).

9. Se rotula el frasco de vacuna: Lote No. — y fecha.

10. Se vuelve a colocar el frasco de vacuna en la cámara congeladora hasta que se completan las pruebas.

11. Se anotan los datos en el formulario F119.

El recuento bacteriano se puede anotar en la sección de "observaciones" del "Registro del lote".

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

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

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 polvoriza con una solución de roccal al 1/500, y también se polvoriza 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 copas 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

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 vacuníferos 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 ₇ 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 diluida 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 corioalantoidica 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 crisperelatosos 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 flemon 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-estreptomycinina 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 félico que se formarían por recristalización en el momento del enfriado para la congelación, atacando el ácido félico 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 actúen 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 vacunales. Nuevo método acelerado por el ácido félico. *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.
- Hornbrook, 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 Corioalantoidea 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 Requirements for Smallpox Vaccine, 1946.
- Overman, J., y Tamm, I.: Titulación cuantitativa del Virus Vacuna en la Membrana Corioalantoidea. *Inst. Rockefeller*, septiembre, 1955.
- Vilches, A. M., y Chialvo, E.: Purificación y Deseccación de Vacuna Antivariólica libre de gérmenes bacterianos. *Rev. Inst. Malbrán*, tomo XV, 1950 y 1953.

PREPARACION, ESTANDARIZACION Y EMPLEO DE UNA VACUNA ANTIVARIOLICA DESECADA, ESTABLE Y PURIFICADA*

DR. DOUGLAS McCLEAN

Instituto Lister de Medicina Preventiva, Elstree, Hertfordshire, Inglaterra

ANTECEDENTES HISTORICOS

Desde que Jenner descubrió la vacunación contra la viruela en el siglo XVIII, el problema de preservar el virus ha puesto a prueba el ingenio de los vacunadores. El rápido deterioro de la vacuna de linfa en los países cálidos y con medios de transporte deficientes, ha dificultado la vacunación de las personas expuestas a la viruela endémica, así como la colectiva de urgencia durante las epidemias. La larga historia de ensayos encaminados a preservar el virus comprende una interesante serie de adelantos en las técnicas de laboratorio, que han sido inteligentemente examinados por Collier (3), cuyo trabajo me ha permitido preparar el breve resumen que sigue y que es todo lo que aquí puedo presentar.

La labor realizada para lograr la preservación de la linfa de vacuna puede dividirse en cuatro fases:

1. Durante la primera mitad del siglo XIX, la preservación por medio de la desecación en "puntas" de marfil, en vidrio y en filamentos; en esta época se introdujo el empleo de la glicerina como preservativo de la linfa líquida.

2. Desecación de volúmenes grandes de linfa en estado líquido. A fines del siglo XIX y hasta que estalló la primera guerra mundial en 1914, se hicieron numerosos ensayos para alcanzar este objetivo, en la mayoría de los cuales se empleó ácido sulfúrico como desecante. Fue durante este período cuando se introdujeron métodos de hacer la prueba de actividad de la linfa en animales, pero en muchos casos, desgraciadamente, el supuesto éxito o fracaso en la preservación de la vacuna se basaba en los índices de los resulta-

dos satisfactorios de la aplicación de la vacuna en el campo, en condiciones de control inadecuadas y sin las correspondientes pruebas de actividad en el laboratorio. Más tarde se verá la importancia de este punto. En 1919, después de la guerra, se adoptaron nuevas técnicas. Se congeló la linfa y se mantuvo en un recipiente al vacío, usándose distintas sustancias para extraer la humedad, tales como aire líquido, CO₂ sólido en acetona, o desecantes tales como H₂SO₄ ó P₂O₅.

Los estudios de Otten (9, 10, 11, 12) merecen especial atención, pues a pesar de que utilizó los primeros métodos de desecación del estado líquido *in vacuo*, sus investigaciones fueron minuciosas y obtuvo notables resultados. También es de lamentar que Otten confiara en los índices de vacunaciones con resultados satisfactorios no confirmados por pruebas de actividad en animales, pero no hay duda que produjo vacunas desecadas de gran estabilidad; las muestras ensayadas en 1950, al cabo de 18 años de conservarlas en almacenaje a una temperatura media de 22°C. dieron hasta un 85 % de vacunaciones con resultados positivos. Otten hizo también la importante observación de que la vacuna desecada debe ser conservada al vacío, en recipientes sellados. Desgraciadamente, los ensayos realizados por distintos investigadores en otras partes del mundo, con el fin de confirmar con diferentes cepas de virus los resultados obtenidos por Otten, no han tenido éxito.

3. La adición de sustancias "protectoras" a las suspensiones líquidas de virus. Durante el período de 1920 a 1939 se estudió la capacidad de ciertas sustancias de propiedades físicas o químicas definidas, de proteger las suspensiones de virus de vacuna. Se ensayó una serie de sustancias, entre las que figuran

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

la clara de huevo, el suero normal, numerosos azúcares, agar, gelatina, peptona, mucina y agentes reductores, como el clorhidrato de cisteína. No cabe duda de que algunas soluciones coloidales, tales como el suero y la peptona, ejercen una acción protectora, y que el almacenamiento anaeróbico del material, húmedo o desecado, es un factor importante.

4. Deseccación del virus en estado de congelación. Esto nos trae a la fase presente del progreso de las técnicas, con las que, además, se han obtenido vacunas antivariólicas de notable estabilidad. Los antecedentes de este método de desecación han sido descritos por Greaves (7), quien además ha hecho importantes aportaciones a la técnica de "congelación-deseccación" aplicada a muchos productos biológicos. No es necesario examinar aquí los principios de la evaporación de la humedad, a alto vacío, del material congelado. Se evitan con este método los efectos adversos debidos a la concentración de agentes potencialmente deletéreos durante la desecación, y la naturaleza sumamente fina del material desecado obtenido permite que la reconstitución, mediante la adición de líquido, sea rápida y completa. Se puede evitar la formación de espuma al exponer a alto vacío las soluciones de proteína, ya sea por "precongelación" del material o por centrifugación durante la evacuación, procedimiento técnico que debemos a Greaves (6) y que ha permitido la construcción comercial de numerosas instalaciones de congelación—deseccación centrífuga para la preparación de una gran variedad de productos biológicos.

PREPARACION DE UNA VACUNA ESTABLE

Collier (1, 4) efectuó un amplio estudio de la acción preservativa que ejerce sobre el virus la desecación en estado de congelación en presencia de una gran variedad de sustancias protectoras, y la influencia, en la supervivencia del virus, del sellado *in vacuo*, en comparación con el empleo de aire o nitrógeno. Investigó también las ventajas que presenta la utilización de una

suspensión de virus parcialmente purificada por centrifugación diferencial, en comparación con el empleo de material crudo utilizado normalmente en las vacunas antivariólicas. Se hace un breve resumen de los resultados. Observó que se podían obtener resultados mejores y más consistentes con suspensiones purificadas de corpúsculos elementales. Los mejores resultados se obtuvieron con virus desecado en peptona al 55 %, y esta preparación resistió un prolongado almacenamiento a 45°C. El método de sellar el virus *in vacuo* es más eficaz que el hacerlo en nitrógeno, aun cuando se tomen precauciones para eliminar los residuos de oxígeno y de humedad.

Este trabajo ha servido de base a los métodos empleados en la preparación de la vacuna antivariólica desecada en ensayos combinados de laboratorio y de aplicación práctica llevados a cabo bajo los auspicios de la Organización Mundial de la Salud.

Ensayos de la Organización Mundial de la Salud

Los ensayos de vacunas desecadas procedentes de varias fuentes, iniciados por la OMS y descritos en el *Bulletin* (13) representan un importante paso en la elaboración de vacunas estables, adecuadas para su empleo en climas cálidos y en condiciones de transporte y conservación deficientes. Estas vacunas estables permiten también acumular reservas que no se deterioran para casos de epidemia, así como el suministro de preparaciones estándar estables que se pueden usar tanto para titulaciones de la actividad de distintas vacunas en todo el mundo, como para la comparación de las características de diferentes cepas de virus. Los ensayos de la OMS fueron también importantes porque, según mis referencias, son las primeras pruebas completas que se han efectuado de vacunas desecadas de diversas procedencias y bajo cuidadoso control; las pruebas de laboratorio se hicieron siempre por duplicado, en diferentes laboratorios, y la posibilidad de variación debida a diferencias de susceptibilidad a la vacunación

quedó excluida en las pruebas en seres humanos mediante la utilización de grupos de 100 hombres no vacunados para el ensayo de cada muestra. Las condiciones de almacenamiento de las vacunas sometidas a prueba fueron rigurosas: 37°C. y 45°C., durante períodos de más de un año. El examen de la estabilidad relativa de dichas vacunas no fue el único resultado obtenido en estos experimentos, pues también proporcionaron valiosa información acerca de la relación existente entre la actividad de las vacunas, determinada en el laboratorio, y su eficacia en la aplicación experimental, así como sobre la relativa exactitud de los diversos métodos de titulación en el laboratorio. Más adelante nos ocupamos de estos aspectos secundarios, aunque importantes. A pesar de la gran variación en cuanto a pureza y a estabilidad de esas vacunas, demostrada por las pruebas, no cabe duda de que todas las vacunas desecadas resultaron mucho más resistentes al calor que las correspondientes lincas glicerinadas y, con una posible excepción, hubieran sido adecuadas para su empleo en climas cálidos. La vacuna del Instituto Lister, a la que ya me he referido, dió resultados muy satisfactorios; resistió 64 semanas de almacenamiento a 45°C. sin disminución sensible de actividad, y, aún así, al ser aplicada dió un índice de 100% de vacunaciones con resultados satisfactorios.

ESTANDARIZACION DE VACUNAS

Desde comienzos de siglo se han elaborado numerosos y diferentes métodos de evaluar la actividad de la vacuna antivariólica, principalmente en conejos. Tengo entendido que se ha descartado la inoculación de la córnea, pero la inoculación en la piel, ya sea por escarificación de la epidermis o por inoculación intracutánea de diluciones crecientes de la vacuna sometida a prueba, constituye todavía el procedimiento corriente en la mayoría de los laboratorios que la producen. Debido en gran parte a la variación de la susceptibilidad de los distintos conejos al virus y a variaciones estacionales relacionadas con la época de la muda, estos métodos

producen resultados más bien cualitativos que cuantitativos. El método intracutáneo, que a simple vista parecería más exacto que el de la escarificación, tiene la desventaja de que si la vacuna contiene una gran proporción de partículas de virus inertes, éstas producen un efecto de interferencia, y hacen muy difícil la determinación de un límite de eficacia definido (2). La Reglamentación Británica sobre Substancias Terapéuticas establece que una vacuna, para ser aceptable, debe producir una reacción vacunal confluyente en la piel de conejo a una dilución de 1:1.000, y no menos de 10 vesículas a 1:10.000.

En los últimos años, se ha ido extendiendo el uso del embrión de pollo para la titulación de virus. El virus de vaccina se puede titular rápidamente mediante el recuento de las pústulas producidas en la membrana corioalantoica por diluciones crecientes de la preparación que se va a experimentar. La seguridad de este método depende de la rigurosa observación de una técnica estandarizada, tanto al hacer las diluciones como al preparar el huevo para la inoculación. Por ejemplo, las diluciones en serie se deben hacer en volúmenes totales no inferiores a 5 ml., y se ha de utilizar una nueva pipeta para cada transferencia, pasando el líquido sin "lavar" la pipeta. Se deben emplear por lo menos 5 embriones de pollo de 12 días por cada dilución ensayada; se inocula cada huevo en la membrana corioalantoica con 0,1 ml. de la dilución apropiada. Al cabo de 48 horas de incubación se retiran las zonas inoculadas de la membrana y se cuentan las lesiones. Los títulos del virus se expresan en unidades infecciosas por ml., y se computan basándose en el recuento medio de pústulas debidas a la dilución más baja que produzca pústulas contables. La Reglamentación Británica sobre Substancias Terapéuticas exige que una de las diluciones así ensayadas produzca un recuento medio no menor de 20 ni mayor de 100 lesiones moderadas en las membranas, y que este recuento indique que la vacuna no diluida contiene no menos de 10⁸ unidades infectivas de virus

por ml. El examen de los resultados de las titulaciones de laboratorio realizadas durante los experimentos de la OMS con vacunas desecadas, demuestra que el recuento de pústulas es mucho más fidedigno que la titulación en la piel de conejo. Hubo buena correlación entre los títulos obtenidos por el recuento de las pústulas y el porcentaje de vacunaciones satisfactorias. Los resultados obtenidos confirmaron que cabe esperar que una vacuna con un contenido no inferior a 10^8 unidades infectivas por ml. dé el número máximo posible de vacunaciones con resultado satisfactorio, y se pudo calcular el porcentaje de esos resultados que se obtendría en las vacunaciones primarias con el empleo de una vacuna de título conocido. El margen de error calculado de este método, basado en el recuento medio de pústulas obtenido en un laboratorio, fue del 30% aproximadamente. Si el resultado se basa en el promedio de recuentos en dos laboratorios que hayan utilizado la técnica antes descrita, el margen de error se reduce aproximadamente al 20%. Estos estimados corresponden a los recuentos de vacunas con alrededor de 10^8 unidades infectivas por ml. aproximadamente, que es el título adecuado de las vacunas; el margen de error podría ser mayor si los recuentos medios fueran, por ejemplo, 10^{15} . Es difícil, entonces, determinar la exactitud de la prueba, puesto que la distribución del número de pústulas en las distintas membranas no es "normal" o "poissoniana", y esto dificulta la computación matemática. Para fines prácticos, cabe decir que si se usa el promedio de recuentos de no menos de 5 membranas, no es probable que el margen de error exceda del 30%. Es evidente que esto representa un gran paso en comparación con la titulación de la vacuna antivariólica en la piel del conejo.

ANTIGENICIDAD DEL VIRUS INACTIVADO

Conviene hacer una breve referencia a un reciente adelanto en la producción de inmunidad por un virus muerto o inactivado. Nosotros (5) hemos podido demostrar que las suspensiones de corpúsculos elementales

de vaccinia inactivadas por irradiación ultravioleta, producen inmunidad en los conejos y en los monos, como lo revela su resistencia a pruebas subsiguientes con virus vivo y la aparición de anticuerpos circulantes neutralizantes de virus. Existe una relación logarítmica entre la exposición a la irradiación y la destrucción del virus. Del conocimiento de esta relación se puede deducir la exposición necesaria para producir inactivación completa. La exposición excesiva destruye la antigenicidad de las preparaciones. La antigenicidad del material irradiado se puede conservar por medio de la desecación en estado de congelación. Existen ciertas personas para las que resulta peligrosa la vacunación con virus vivo y si estos resultados obtenidos en animales se pueden confirmar en individuos voluntarios, cabe esperar que la obtención de una inmunidad basal con virus irradiado reduzca la incidencia de complicaciones. Se están realizando observaciones semejantes sobre la inactivación del virus de vaccinia mediante el empleo de rayos gamma y propiolactona-B.

Vacuna producida por los métodos de cultivo de tejidos

En Suecia se ha realizado recientemente un adelanto en la producción de vacuna antivariólica, que potencialmente es de gran importancia. Wesslén (14) ha empleado métodos de cultivo de tejidos para producir vacuna en grandes cantidades en la piel de embrión de bovino suspendida en líquido amniótico. La vacuna así producida se utiliza en Suecia en la vacunación jennericiana ordinaria con excelentes resultados y cabe suponer que sea también material satisfactorio para la producción de vacuna desecada. Los cultivos se realizan en frascos de Roux y el rendimiento de virus obtenido de la piel de un embrión de tres a cuatro meses es semejante al que se consigue de la inoculación de una oveja o una ternera. El método no implica, en realidad, la proliferación del tejido embrionario, puesto que los cultivos son del tipo Maitland (8) y la multiplicación del virus se realiza en presencia de células

de tejido sobrevivientes, pero no en desarrollo activo. Esta vacuna ofrece considerables ventajas en comparación con la que se produce en el animal vivo: representa una economía en trabajo y en el costo de materiales, y la vacuna está exenta de los contaminantes bacterianos que hay que destruir en las otras vacunas con el mínimo daño para el virus. Puesto que el virus se cultiva en piel de embrión de ganado bovino su afinidad de tejido debe quedar inalterada. Este método tiene también la gran ventaja, en comparación con la producción de vacuna por cultivo en la corioalantoides de pollo, de costo relativamente bajo del material necesario, así como la sencillez de la técnica. Los métodos de Wesslén se están estudiando ahora en el Instituto Lister.

EMPLEO DE LA VACUNA ANTIVARIOLICA DESECADA

Ya he señalado anteriormente que la experiencia obtenida en Inglaterra indica que la vacuna antivariólica debe contener, por lo menos, 10⁸ unidades infectivas por ml. en el momento de su distribución, para que su aplicación produzca el mayor número de vacunaciones satisfactorias. Este título dará margen a cierta reducción de la actividad antes del empleo de la vacuna. La vacuna desecada se debe envasar de tal forma que personas expertas puedan efectuar fácilmente su reconstitución, con el menor riesgo posible de contaminación accidental. El líquido reconstituyente debe ser bacteriostático, pero inocuo al virus; el que se usa en el Instituto Lister es 40% de glicerina en solución tamponada de McIlvaine M/250 con respecto al fosfato a pH 7,4. La glicerina proporciona también una consistencia adecuada a la vacunación. Por desgracia, hasta ahora no se ha podido envasar la vacuna desecada en recipientes de una sola dosis, debido en parte a la cantidad microscópica del material desecado que se requiere, pero principalmente a causa de la dificultad de proporcionar la pequeña cantidad de líquido reconstituyente en forma adecuada. La téc-

nica de vacunación es la misma que se emplea con la linfa glicerinada ordinaria, ya sea por "presiones múltiples" o por simple escarificación lineal de $\frac{1}{8}$ a $\frac{1}{4}$ pulgada (3-7 mm.) de largo. Para desinfectar la superficie epidérmica en que ha de aplicarse la vacuna, se puede usar éter o acetona; no se deben emplear antisépticos no volátiles que puedan inactivar el virus. En Inglaterra, no somos partidarios de la aplicación inmediata de una curación, salvo en aquellas personas que realizan trabajos excepcionalmente sucios. El ideal, durante la fase vesicular, es mantener la lesión fresca y seca a fin de facilitar la rápida formación de una costra firme; los vendajes tienden a suavizar la superficie de la piel y a provocar la contaminación secundaria. Si la vesícula muestra señales de romperse, se puede aplicar un vendaje esterilizado muy ligero a fin de permitir el libre acceso del aire.

RESUMEN

En este trabajo se examinan brevemente las diversas tentativas realizadas a través del tiempo de producir una vacuna antivariólica estable, y se describen los métodos empleados en la producción de este tipo de vacuna desecada, estable y purificada. Se estudian los resultados obtenidos en las pruebas de vacunas antivariólicas desecadas, iniciadas por la Organización Mundial de la Salud. Se examinan los métodos utilizados para la titulación de la actividad de las vacunas antivariólicas y su relativa exactitud, y se indican los requisitos mínimos de actividad de una vacuna. También se analiza la antigenicidad del virus de vacuna inactivado por irradiación ultravioleta y el posible empleo de este material. Se estudia, asimismo, la producción de vacuna antivariólica en piel de embrión de ganado bovino por métodos de cultivo de tejido, así como las ventajas que representa este método; y, finalmente, se mencionan ciertas consideraciones de orden práctico sobre la distribución y empleo de una vacuna antivariólica desecada.

REFERENCIAS

- (1) Collier, L. H.: Freezing and Drying, London: Institute of Biology. pág. 133, 1951.
- (2) Collier, L. H.: *Proc. VI Int. Cong. Microbiol.* Roma 2:23, 1953.
- (3) Collier, L. H.: *Bact. Rev.* 18:74, 1954.
- (4) Collier, L. H.: *J. Hyg., Cam.* 53:77, 1955.
- (5) Collier, L. H.; McClean, D., y Vallet, L.: *J. Hyg., Camb.* 53:513, 1955.
- (6) Greaves, R. I. N.: *Nature*, Londres 153:485, 1944.
- (7) Greaves, R. I. N.: Med. Res. Council, *Spec. Rep. Ser.* No. 258, 1946.
- (8) Maitland, H. B. y Laing, A. W.: *Brit. J. Exp. Path.* 11:119, 1930.
- (9) Otten, L.: *Heneesk. Tijdschr. Ned.-Ind.* 66:642, 1956.
- (10) Otten, L.: *Z. Hyg. InfektKr.* 107:677, 1927.
- (11) Otten, L.: *Meded. Dienst Volksgezondh. Ned.-Ind.* 21:196, 1932.
- (12) Otten, L.: *Z. Hyg. InfektKr.* 114:705, 1933.
- (13) Reports on Trials of Dried Vaccines, *Bulletin* de la Organización Mundial de la Salud (En prensa).
- (14) Wesslén, T.: *Arch. ges. Virusforsch.* B VI, H, 5:430, 1956.

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 Buddingh (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 humanos. La mayoría de estos autores obtuvieron resultados satisfactorios y observaron que la vacuna producía reacciones características en la vacunación primaria y expresaron 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 producción 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 cantidades 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 relativamente pequeños.

Hace algunos años, mis colaboradores y yo emprendimos el estudio del virus de vaccinia en embrión de pollo, cultivado en la membrana corioalantoica tras inoculación por el método de la producción de una cámara de aire artificial, con vistas a la posibilidad de su empleo en la producción de vacuna antivariólica en gran escala.

En esta comunicación se trata principalmente 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 membrana 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 incubadoras eléctricas, de tipo comercial, es suficiente. Su capacidad depende del número de huevos que se pretenda manipular, y además, 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 y estar dispuestos de manera conveniente para facilitar la manipulación de los huevos.

* Trabajo presentado en el Seminario de Vacunación 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 | |
| 3. Se produce una cámara de aire artificial entre la cáscara y la M.C.A. | |

INOCULACION

Se utiliza virus de siembra con penicilina-estreptomocina 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

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.

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.

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 diluido 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 descado, 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 substancias 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 empaqa 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-variólica 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 antivariólica 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 antivariólicas 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

campana 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.

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

DRA. ELSE KRAG ANDERSEN

Statens Seruminstitut, Copenhagen, Dinamarca

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

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

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

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

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

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

Hay varias maneras de preparar vacunas

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

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

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

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

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

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

Pruebas de inocuidad y pureza

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

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

A fin de evitar el efecto bacteriostático de

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

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

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

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

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

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

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

Si se usa únicamente estreptomina a la

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

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

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

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

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

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

Pruebas de actividad

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

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

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

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

Método de titulación intracutánea

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

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

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

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

El método de titulación por escarificación

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

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

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

Titulación en huevo

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

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

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

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

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

Titulación en cultivo de tejido

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

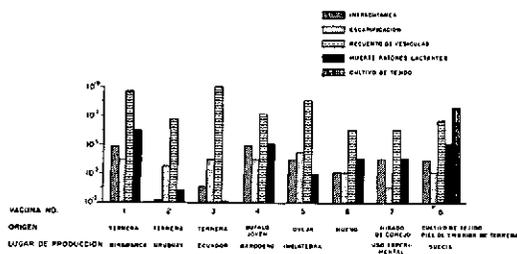
La diferencia de capacidad de las distintas vacunas para matar a los ratones lactantes es aún más notable: la vacuna No. 3 tiene un título obtenido por recuento de vesículas muy elevado, pero aun diluída a 1:10 no tiene capacidad para matar a los ratones lactantes, a pesar de que produce vesículas a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

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

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

Se asegura que todas las vacunas ensaya-

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

REFERENCIAS

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

DIAGNOSTICO DE LABORATORIO DE LA VIRUELA*

DR. ALFRED S. LAZARUS

Director del Instituto Nacional de Salud Pública, Lima, Perú, y consultor en laboratorios de salud pública, Instituto de Asuntos Interamericanos

Las pruebas específicas para el diagnóstico de la viruela han mejorado notablemente durante estos últimos años y en la actualidad prestan gran ayuda al clínico, permitiéndole el diagnóstico específico exacto. Desde que es obvia la importancia que tiene el reconocimiento temprano o precoz de la viruela, las pruebas específicas de laboratorio son de enorme utilidad, especialmente durante los primeros momentos de una epidemia, así como en los casos de áreas en las que la enfermedad no es frecuente y donde la enfermedad se encuentra muy diseminada. Por otro lado, la diferenciación precoz entre viruela y varicela sólo se puede hacer con seguridad mediante las pruebas de laboratorio. Ofrecemos a continuación un cuadro que contiene los procedimientos más importantes usados en la actualidad, el que es una modificación y una ampliación del publicado por van Rooyen y Rhodes. Aunque existen otros métodos que podrían haberse incluido en el referido cuadro, se omiten en esta oportunidad debido principalmente a que aún no han sido empleados con suficiente amplitud como medios auxiliares de diagnóstico.

Expongamos brevemente cada uno de los procedimientos de laboratorio que se mencionan en el cuadro. Por lo demás, se sabe que la mayoría de los asistentes a esta reunión tiene amplia experiencia sobre algunos o todos los métodos que se mencionan, por lo que se suplica tengan la bondad de indicar las omisiones que puedan notar a fin de discutir las oportunamente. Nuestra experiencia personal podría decirse que se refiere con más frecuencia al aspecto negativo, puesto que los servicios de laboratorio bajo nuestra supervisión frecuentemente se han orientado a descartar la posibilidad de la

viruela en casos sospechosos. Por esta razón se piden todos los comentarios que se estimen necesarios, especialmente por parte de aquellas personas que tienen amplia experiencia en casos de viruela.

Durante los primeros momentos del período prodrómico debe tratarse de obtener una muestra de suero en condiciones asépticas. Tales muestras, conservadas en condiciones ordinarias de refrigeración, puede que no se usen en el futuro. Sin embargo, en casos de cualquier prueba serológica especial que se lleve a cabo con posterioridad, tales muestras son inestimables en calidad de control o término de comparación. Todos los que tienen experiencia en los métodos de diagnóstico de laboratorio saben que se obtienen resultados positivos en las pruebas serológicas durante la etapa final de la enfermedad, o en la convalecencia, pero en tales circunstancias no es posible interpretar adecuadamente los resultados si no se dispone de una muestra tomada con anterioridad. El resultado positivo de una sola prueba serológica no es definitivo, ya que se hace necesario verificar un incremento en la presencia de los anticuerpos entre dos muestras tomadas en etapas diferentes de la enfermedad, como evidencia específica de la infección. Por consiguiente, se sugiere a todos aquellos que tienen responsabilidades en este aspecto traten siempre de obtener una muestra de suero durante las primeras fases de la enfermedad en los casos que no se ha llegado a un diagnóstico definitivo.

La observación microscópica de frotis coloreados, preparados durante las primeras fases de la viruela, es un procedimiento sencillo y de gran valor en el diagnóstico. Para esto se desinfecta con acetona o éter el área de la piel que se ha seleccionado, y luego con un escalpelo afilado se raspan aisladamente varias Petequias. Debe extenderse

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

por separado el material obtenido de cada petequia en láminas porta-objetos, debidamente limpias, usando la hoja del mismo escalpelo. Se pueden hacer en cada lámina varias de tales extensiones, y se recomienda que se separen por lo menos 6 frotis o extensiones de diferentes sitios. Enseguida se deja que las láminas se sequen, cubriéndolas luego con suero fisiológico por espacio de 3 a 5 minutos; se sacan luego al aire libre y se fijan con mezcla de partes iguales de alcohol y éter durante 3 minutos. Las láminas deberán fijarse y secarse lo antes posible después de preparadas. Una vez fijadas y secas, pueden empaquetarse a fin de enviarlas a algún laboratorio central o conservarlas para futuros usos, tales como la enseñanza.

La técnica de Paschen da excelentes resultados en la coloración de los cuerpos elementales de la viruela. De acuerdo con dicha técnica las preparaciones se tratan con una solución mordiente, filtrada, y se calienta suavemente por espacio de 5 a 10 minutos. Luego se las lava en agua, se cubren con una solución filtrada de fuscina fenicada, se calientan y se dejan en reposo durante 10 minutos antes de lavarlas y secarlas. Los pormenores de este procedimiento de coloración se pueden encontrar en cualquier libro de técnicas de laboratorio. También han sido empleadas otras técnicas de coloración, tales como la de Giemsa y la de Morosow, que ofrecen resultados inferiores a la de Paschen.

De acuerdo con nuestra experiencia es necesario tener bastante cuidado en la preparación y filtrado de las dos soluciones que se usan en el colorante de Paschen. Con frecuencia, algunos lotes de fuscina se precipitan, y las partículas del colorante se pueden confundir con los cuerpos elementales, especialmente cuando no se tiene la suficiente experiencia. Por esto se recomienda que cada lote de las soluciones empleadas en este colorante debe ser debidamente rotulado y, una vez verificada la buena calidad de las mismas, no emplearlas con otro fin. Cuando están bien preparadas no se deterioran con el tiempo, y más bien mejoran en calidad.

A la observación microscópica, usando lentes de inmersión al aceite, los cuerpos de Paschen coloreados por este método se presentan como cuerpos elementales de un color rojo intenso. Durante los primeros estudios de la viruela las preparaciones muestran gran número de cuerpos elementales, aislados o en grupos. A diferencia de esto, los cuerpos elementales de la varicela no se colorean bien por este método, son escasos en número y más pequeños que los de la viruela. Puesto que el virus vacuna es microscópicamente indiferenciable del de la viruela, a fin de ganar experiencia y controlar los resultados en la coloración de acuerdo con la técnica de Paschen, se recomienda trabajar simplemente con material procedente de terneras, pues, recordando que el método de Paschen es el procedimiento que en la actualidad se emplea preferentemente para el diagnóstico rápido durante las primeras fases de la viruela, es de suma importancia el cuidado que debe observarse en todos los aspectos o etapas del mismo: preparación de las láminas, fijación, coloración y examen.

En el caso que se tuviera la fortuna de disponer de un microscopio electrónico, las preparaciones pueden hacerse directamente sobre la montura de plástico. Aunque no tenemos experiencia personal con este procedimiento, no cabe duda que el microscopio electrónico ofrece grandes posibilidades en el diagnóstico precoz de la viruela, del mismo modo que en la diferenciación de ésta de la varicela.

Cuando se trata de aislar el virus en embrión de pollo, en cultivo de tejidos o en córnea de conejos, se hará un raspado como en los casos anteriores y el material obtenido en esta forma se suspende en 1 ml. más o menos de suero fisiológico que contenga aproximadamente 500 unidades de penicilina y cantidad igual de estreptomycin. Las inoculaciones se harán en estos casos tan pronto como sea posible después de haberse preparado el inóculo.

Para la inoculación de los huevos, es preferible emplear embriones que tengan 11 días de desarrollo. Los huevos, después de exami-

narlos para confirmar la presencia de embriones vivos, se prepararán como en los casos de inoculaciones en la membrana corioalantoica. Del material original que contiene penicilina y estreptomycinina, se preparan diluciones al 1/10 y al 1/100 en suero fisiológico. Cada embrión se inoculará con 0,1 ml. de la respectiva suspensión, y de cada dilución deberán inocularse cuando menos 6 huevos, puesto que los resultados nunca son uniformes aun en cepas del virus que tengan ya varios pasajes en el laboratorio. Los huevos inoculados deberán incubarse a 35° C.

A partir de las 72 horas de la inoculación, se abrirá diariamente un huevo de cada dilución. Con todo cuidado se removerá la membrana corioalantoica, se la extenderá en una placa Petri, examinándola contra un fondo oscuro con la ayuda de una lente de mano, en busca de lesiones, las que por lo general, son diferentes de aquellas que se observan en los embriones infectados con virus de vacuna. Al observar lesiones sospechosas en la membrana corioalantoica, deberá confirmarse microscópicamente la presencia de los cuerpos de Paschen antes de emitir un informe positivo. Es relativamente sencillo el pasaje del virus en el embrión de pollo, pero debe tenerse cuidado de inocular siempre un adecuado número de huevos dado que, como se ha dicho, la infección no es uniforme.

La misma técnica puede emplearse con las costras que se obtienen en las últimas fases de la infección. En este caso las costras se molerán convenientemente en un mortero estéril, usando de 1 a 2 ml. de suero fisiológico que contenga penicilina y estreptomycinina. Puesto que la contaminación de la superficie de las costras es frecuentemente alta, a manera de precaución se inocularán en la yema 500 unidades adicionales tanto de penicilina como de estreptomycinina, con anterioridad a la inoculación de la membrana corioalantoica.

De acuerdo con nuestras informaciones, la técnica del cultivo de tejidos aún no ha sido empleada como un procedimiento de laboratorio en el diagnóstico de la viruela. Sin

embargo, los aquí presentes están bien enterados de este tipo de estudios. Parece completamente factible el empleo de los tubos ordinarios de cultivo, conteniendo, ya sea células dispersas de riñón de mono, o "HeLa cells", para la inoculación directa de las suspensiones ya descritas. Desde luego, la verificación del desarrollo del virus no dependería en estos casos únicamente de la citólisis, sino que requeriría también la observación microscópica de los cuerpos de Paschen. Parece posible llegar a algún método de demostración de la infección con el virus de la viruela basado en el cambio de color de algún indicador, como en el método debido a Youngner y Salk en el cultivo del virus de la poliomielitis, en cuyo caso también se haría la confirmación de los cuerpos de Paschen por medio de láminas coloreadas.

La prueba de Paul en la córnea de conejo no es muy usada, a pesar de ser sencilla y tener algún valor en el aislamiento del virus. Para esta prueba se anestesia un conejo adulto con éter o por otro medio. No es conveniente anestesiarse directamente el ojo. Para la inoculación en sí, se retiene fijo el ojo en su sitio y se deja caer el inóculo sobre la córnea, inóculo que puede constituir la suspensión ya descrita o el fúido no diluido precedente de las vesículas o las pústulas. En seguida, se escarifica la córnea con la ayuda de un escalpelo o la punta de una aguja hipodérmica, haciéndose tres escarificaciones verticales y tres horizontales. Esta misma operación se repite en el otro ojo del conejo, pero esta vez usando suero fisiológico con la finalidad de controlar posibles infecciones no específicas. Después de la escarificación, se deja libre el ojo y se colocan dos o tres gotas del inóculo en el saco conjuntival. A continuación se cierra el ojo y se frota suavemente el párpado por encima de la córnea. Empleando una lente de mano se observan los ojos del conejo cada 24 horas, en busca de pequeñas lesiones crateriformes a lo largo de las líneas de la escarificación, así como de opacidad en la córnea. Aunque por lo general se requieren 72 horas para obtener resultados positivos, en algunos casos

este lapso puede ser menor. Si se llega a observar lesiones, el ojo deberá ser extraído para, después de fijado, preparar de él cortes histológicos y colorearlos. En los casos positivos podrán observarse los típicos cuerpos de Guarnieri.

La prueba de Paul tiene valor tan sólo en los casos positivos. En este sentido conviene tener en mente que un resultado negativo no desecha la posible presencia de la viruela, ya que numerosos investigadores han obtenido resultados negativos en casos probados de viruela. La razón se desconoce aún, pero probablemente cuando menos el 50% de casos de viruela ofrecen resultados negativos a la prueba de Paul. Los resultados siempre son negativos con la varicela.

Los procedimientos de laboratorio no considerados hasta aquí comprenden pruebas serológicas de diferentes clases. En dos de éstas, a saber, la de fijación del complemento y la de floculación, es necesario disponer previamente de un suero positivo de alto título para usarlo como anticuerpo. En estos casos el paciente proporciona el antígeno, y el resultado será positivo si el antígeno contiene el virus de la viruela o sustancias solubles producidas por el virus. En una tercera prueba, la inhibición de la hemaglutinación de los eritrocitos, el paciente proporciona el suero.

La preparación de un potente suero hiperinmune para la fijación del complemento se puede hacer en conejos. Con este fin se prepara un antígeno libre de bacterias por medio de pasajes en los testículos de conejo con un intervalo de 4 días. Se extraen asépticamente los testículos y se muelen en una mezcladora Waring con suero fisiológico. De esta suspensión, la que luego se centrifuga a baja velocidad con la finalidad de sedimentar las partículas gruesas, se prepara una suspensión al 10% en suero fisiológico. Esto constituye el inóculo, el que puede conservarse a una temperatura de 0 a 5°C. hasta el momento de ser usado.

Con el material anterior se inoculan, cada 2 ó 3 días, por espacio de 4 semanas, conejos que se encuentran en la convalecencia de

una infección previa por el virus vacuna. Las inoculaciones comienzan con 1,0 ml. de la suspensión de testículo durante 3 inyecciones de la primera semana, aumentando luego la dosis semanalmente, hasta que las 3 inoculaciones de la cuarta semana sean de 2,5 cc. Después de 10 días de la última inoculación se hará una sangría de prueba, recordando que un buen suero debe tener un título de fijación del complemento cuando menos de 1-32. El título del suero permanece estable de manera indefinida bajo condiciones apropiadas de conservación. Inmediatamente antes de usarlo, el suero debe ser inactivado a 56°C. por espacio de 10 minutos a fin de eliminar la actividad anticomplementaria, termolábil, que suele adquirir en el suero del conejo.

Para la titulación del suero hiperinmune del conejo debe prepararse un antígeno vacuna patrón, el que se usará también como control del material que se usa en la prueba. Este antígeno puede prepararse también de la cepa del virus de vacuna que se ha pasado a través del testículo de conejo, emulsionándolo con una pequeña cantidad de suero fisiológico. El líquido sobrenadante que se obtiene después de la centrifugación se extrae y se seca por liofilización, colocándolo en ampollitas enseguida a fin de evitar la rehidratación. Del mismo modo puede usarse un antígeno dérmico preparado en la piel del conejo. Para emplearlo como control, el polvo se suspende al 1% en suero fisiológico, el que luego se centrifuga a 1.500 revoluciones durante 15 minutos. También este antígeno, seco y colocado en ampollas, puede conservarse de manera indefinida, pero la respectiva solución deberá prepararse cada vez que va a ser usada.

El antígeno proveniente del paciente consiste en el material que se extrae de las vesículas o pústulas, en pequeña cantidad de suero fisiológico, o de las costras molidas en un mortero con un poco del mismo suero. La prueba en sí puede ser cualquiera de las variantes empleadas en la fijación del complemento. Nosotros preferimos una fijación a 5°C. durante toda la noche, aunque el

método del fijado por espacio de 4 horas tiene la ventaja de proporcionar los resultados con mayor prontitud. Cada laboratorio dedicado a estas labores tiene su método propio, por lo general basado en el horario de trabajo y en otros factores semejantes.

En el procedimiento ordinario de la fijación del complemento se usa tan solo un tubo para el antígeno, debido a la pequeña cantidad del material disponible. Por lo demás, deberán emplearse todos los controles que sean necesarios. Los métodos más recomendados pueden encontrarse en los respectivos textos sobre técnicas de laboratorio.

La fijación del complemento puede también llevarse a cabo en el suero del paciente, en cuyo caso se usa como antígeno una preparación estandarizada de vacuna o de virus de la viruela. En este caso, sin embargo, un sólo resultado positivo no tiene suficiente valor diagnóstico, ya que, como se ha mencionado en párrafos anteriores, se necesita una muestra de suero obtenida con anterioridad a fin de poder comparar los resultados. Para obtener resultados satisfactorios debe verificarse en todo caso una elevación del título de los anticuerpos, razón por la cual se recomendó anteriormente la obtención de una muestra de suero durante las primeras fases de la enfermedad.

La prueba de floculación emplea también el mismo material poco más o menos que la de fijación del complemento, y aunque es más sencilla y rápida, tiene la desventaja de no ser tan sensible ni satisfactoria en sus resultados como la de fijación del complemento. Para la prueba de floculación se prepara un suero hiperinmune como el ya mencionado. El antígeno de control también puede ser preparado como en el caso de la fijación del complemento, usando material del testículo o de la piel, infectado por el virus de la vacuna. La muestra tomada del paciente deberá centrifugarse ligeramente, si es que contiene partículas gruesas. La prueba de floculación se realiza empleando 0,2 ml. de antígeno mezclado con igual cantidad de suero hiperinmune diluído al $\frac{1}{10}$. No debe

dejar de hacerse los controles. Corrientemente, la incubación se efectúa durante toda la noche, a 50°C., después de lo cual se observa si hay o no floculación, valiéndose para ello de una lente de mano. Aunque esta prueba puede también efectuarse en el suero de convalecientes, no siempre ofrece resultados positivos en casos probados de viruela. Parece que la prueba de floculación no es muy sensible, pero tiene la ventaja de su simplicidad. En la actualidad esta prueba no es muy usada.

La inhibición de la aglutinación de los eritrocitos de pollo por el virus de la vacuna en presencia de anticuerpos específicos, ofrece la posibilidad de un método más de diagnóstico de la viruela. No tenemos experiencia personal sobre este particular, ni sabemos que se haya usado con fines diagnósticos, no obstante lo cual parece enteramente posible que este procedimiento pueda ser de utilidad. Podría ser análogo a la prueba de inhibición de la hemoaglutinación, de uso corriente en el estudio del virus de la influenza y de los anticuerpos que éste produce. Desde luego, hace algún tiempo que se conoce la capacidad que tiene el virus de la vacuna de aglutinar los eritrocitos de pollo, del mismo modo que se ha encontrado que el suero de las personas primovacunadas contiene anticuerpos capaces de inhibir tal aglutinación.

En esta prueba se mezcla el suero del paciente con el virus de la vacuna y una suspensión de glóbulos rojos de pollo. La ausencia de aglutinación significa positividad de la prueba. Desde luego, deberán hacerse los debidos controles. También en este caso cualquier resultado positivo tendrá mayor valor si se dispone de una muestra anterior de suero, con la que se podrán efectuar pruebas de comparación. Aunque este método no se presta mucho para el diagnóstico precoz, ofrece las ventajas de su bajo costo y facilidad de ejecución, lo que tiene valor en especial cuando se realizan encuestas retrospectivas o trabajos de investigación.

En este sumario acerca de los métodos de laboratorio disponibles para el diagnóstico

PROCEDIMIENTOS ESPECIFICOS DE LABORATORIO PARA EL
DIAGNOSTICO DE LA VIRUELA

(Modificación y ampliación adaptadas del "Text Book of Virology" por Van Rooyen y Rhodes)

<i>Día aproximado de la enfermedad</i>	<i>Condición clínica</i>	<i>Muestras necesarias</i>	<i>Prueba</i>	<i>Tiempo requerido</i>
1-3	Dolor de cabeza, escalofríos, fiebre, vómito, etc.	Sangre, si se sospecha una infección por virus	* Separar el suero y conservar	
1-4	Erupción prodromica, si está presente	Raspaduras del área petequial Suspensión en suero fisiológico del material extraído de las petequias	* Examen microscópico en busca de cuerpos Paschen Láminas coloreadas o microscopio electrónico * Inoculación en embriones de pollo de 11 días o en cultivos de tejido Prueba de Paul en córnea de conejo	1 hora 3 días 3 días
5	Erupción de pápulas	Raspaduras como las de arriba	Pruebas como las de arriba	Tiempos como los de arriba
6-7	Vesículas	Si el fluido no puede ser obtenido, hacer raspaduras de la base de las vesículas Fluido colectado por tubos capilares o con aguja fina y jeringa de tuberculina	* Examen microscópico de láminas coloreadas o microscópico electrónico Pruebas de fijación del complemento si es suficiente el fluido disponible * Aislamiento del virus en huevos o cultivos de tejido. Prueba de Paul	1 hora Durante la noche 3 días 3 días
8-10	Pústulas	Exudado obtenido con aguja y jeringa adecuadas	Fijación del complemento Prueba de floculación Prueba de Paul * Aislamiento del virus	Durante la noche Durante la noche 3 días 3 días
15-20	Costras	Costras	Fijación del complemento o floculación Prueba de Paul * Aislamiento del virus	12 horas a 3 días según la respectiva prueba
30	Convalecencia	Suero	Inhibición de la aglutinación en los hematíes de pollo	2 horas

* Pruebas preferidas.

de la viruela, nos hemos limitado a aquellos que son específicos. Existe, desde luego, una serie de pruebas que no son específicas en las que se emplea ya sea sangre u orina, las que proporcionan informaciones de carácter

pronóstico. Los detalles de tales pruebas, así como el significado que tienen sus resultados, pueden verse en cualquier texto de patología clínica.

Hemos tratado en el presente informe de

ofrecer alguna información sobre cada uno de los métodos seguidos en la actualidad sobre el diagnóstico de la viruela, y en el cuadro se consideran aquellos métodos que estimamos de mayor utilidad. En el diagnóstico precoz, que frecuentemente es lo más importante, la observación microscópica de preparaciones coloreadas es de gran valor y, afortunadamente, de fácil ejecución. Si se utiliza en forma adecuada, esta técnica ofrece resultados definitivos en corto tiempo. El aislamiento del virus de la viruela, a pesar de requerir algunos días, es igualmente sencillo y ofrece confirmación definitiva. En

nuestra opinión, la prueba de Paul tiene escaso valor, pues el método del aislamiento del virus a través del embrión de pollo es mucho más seguro. Las pruebas serológicas no ayudan en el diagnóstico precoz, pero tienen utilidad en el diagnóstico retrospectivo, en encuestas y en trabajos de investigación.

No cabe duda que en el futuro han de descubrirse nuevos y mejores métodos de diagnóstico en este campo. No obstante esto, en la actualidad el laboratorio está en condiciones de ofrecer ayuda en el diagnóstico, permitiendo pronta y segura información sobre la identificación de los casos de viruela.

INFORME SOBRE LA CAMPAÑA DE VACUNACION ANTIVARIOLICA
EFECTUADA DURANTE EL PERIODO
OCTUBRE 1950-DICIEMBRE 1955*

DR. ANTONIO DE LA FUENTE E.

Jefe del Departamento de Inmunizaciones, Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, Lima, Perú

El 23 de septiembre de 1950 se firmó un convenio entre el Gobierno del Perú y la Oficina Sanitaria Panamericana para llevar a efecto un programa de vacunación contra la viruela.

Se estimó que inmunizando al 80% de la población en un período de 5 años, se reducirían los casos de viruela a cifras insignificantes, y hasta sería posible erradicarla.

Para llevar adelante este programa se tuvieron en cuenta los siguientes factores.

- 1) La importancia de la enfermedad y su extensión;
- 2) La vacuna que convendría emplear;
- 3) La técnica y el equipo para su aplicación;
- 4) Las condiciones que debía reunir el personal médico y auxiliar;
- 5) El sistema de trabajo;
- 6) Los fondos necesarios para la ejecución del programa y la regularidad de sus entregas; y
- 7) La estadística y evaluación de los resultados.

1. *La importancia de la enfermedad y su extensión*

Desde la llegada de los españoles parece ser que existió la viruela en el Perú. Se cree que los ejércitos de Huayna Capac fueron destruidos por la primera epidemia de esta enfermedad, habiendo muerto de ella el mismo Emperador. Esta posible epidemia de viruela se produjo alrededor del año 1529.

Desde aquella época se hizo endémica, presentándose periódicamente brotes epidémicos que asolaban todo el país.

No vamos a hacer historia de este período ya que de él trata el Dr. Juan B. Lastres en la "Historia de la Viruela en el Perú"

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

(Volumen III de la revista *Salud y Bienestar Social*). Pero presentamos una figura (véase Fig. 1) que comprende el total de casos de viruela conocidos durante el período de 1940 a 1955, que es de 29.779, con una media anual de 1.861, influenciada fuertemente por las cifras extremas de los brotes epidémicos. La mediana correspondiente a estos 16 años es de 959 casos.

Es de tener en cuenta que todos estos datos son incompletos, pues la zona de denuncia no comprende más que el 40%, aproximadamente, de la población.

Si nos fijamos en esta figura se puede apreciar que en el año 1940 se inició un período epidémico, que abarca 4 años, con un total de 7.979 denuncias, correspondiendo esto a una media anual de 1.992 casos; el máximo fue de 3.143 en el año 1941 y el mínimo, de 466 en 1940.

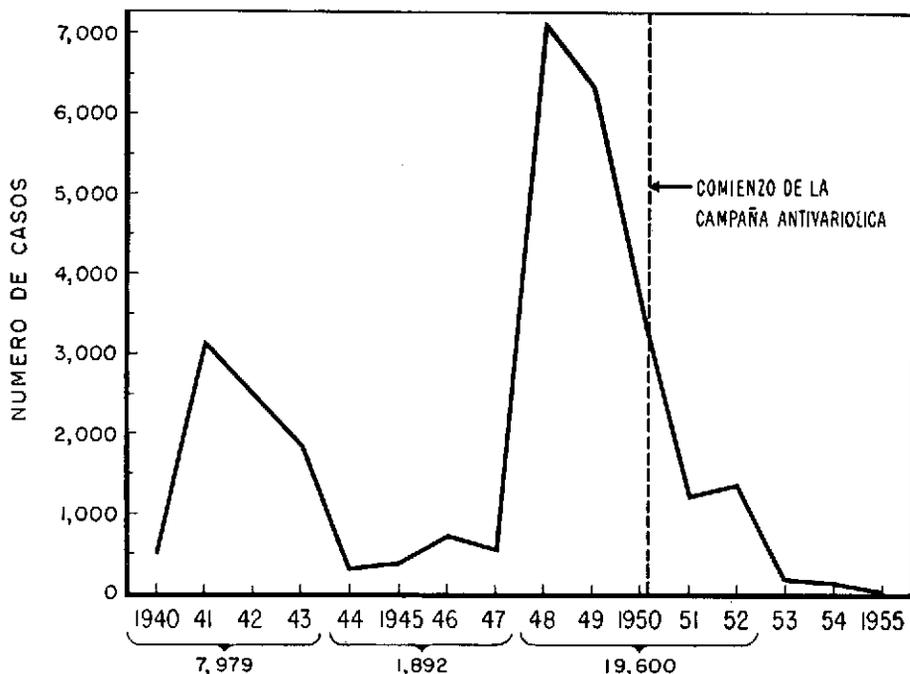
Este período va seguido de otros 4 años en que la viruela tomó un carácter endémico, produciéndose durante ese tiempo 1.889 casos y una media de 472.

En 1948 se inició el brote epidémico más alto registrado durante estos 16 años, pues durante el quinquenio 1948/52 se tuvo conocimiento de 19.600 casos, con una media de 3.920 y una mediana de 3.612. La máxima correspondió al año 1948, con 7.105, y la mínima a 1951 con 1.218 casos.

Este quinquenio es seguido por 3 años en los que solamente se presentaron 308 casos, correspondiendo 172 a 1953; 136 a 1954 y ningún caso a 1955.

Si nos referimos ahora a tasas por 100.000 habitantes, y no a números absolutos como hasta aquí, vemos que la máxima observada correspondió al año 1948 y la mínima al de 1955, que fue cero, como hemos indicado más arriba.

Fig. 1.—Total de casos de viruela conocidos durante el período 1940-1955.



CUADRO No. 1.—Número de casos de viruela en el Perú de 1940 a 1955.

Año	No. de casos	Tasa por 100.000 habitantes	Población informante
1940	466	16,3	2.850.123
1941	3.143	108,5	2.896.466
1942	2.514	85,4	2.943.562
1943	1.856	62,0	2.991.425
1944	296	9,7	3.043.159
1945	359	11,6	3.095.787
1946	700	22,2	3.152.532
1947	537	16,7	3.210.317
1948	7.105	217,0	3.275.833
1949	6.305	188,6	3.342.686
1950	3.612	107,1	3.373.290
1951	1.218	35,0	3.500.833
1952	1.360	40,0	3.412.977
1953	172	4,6	3.738.859
1954	136	3,4	3.977.066
1955	0	0	4.052.630

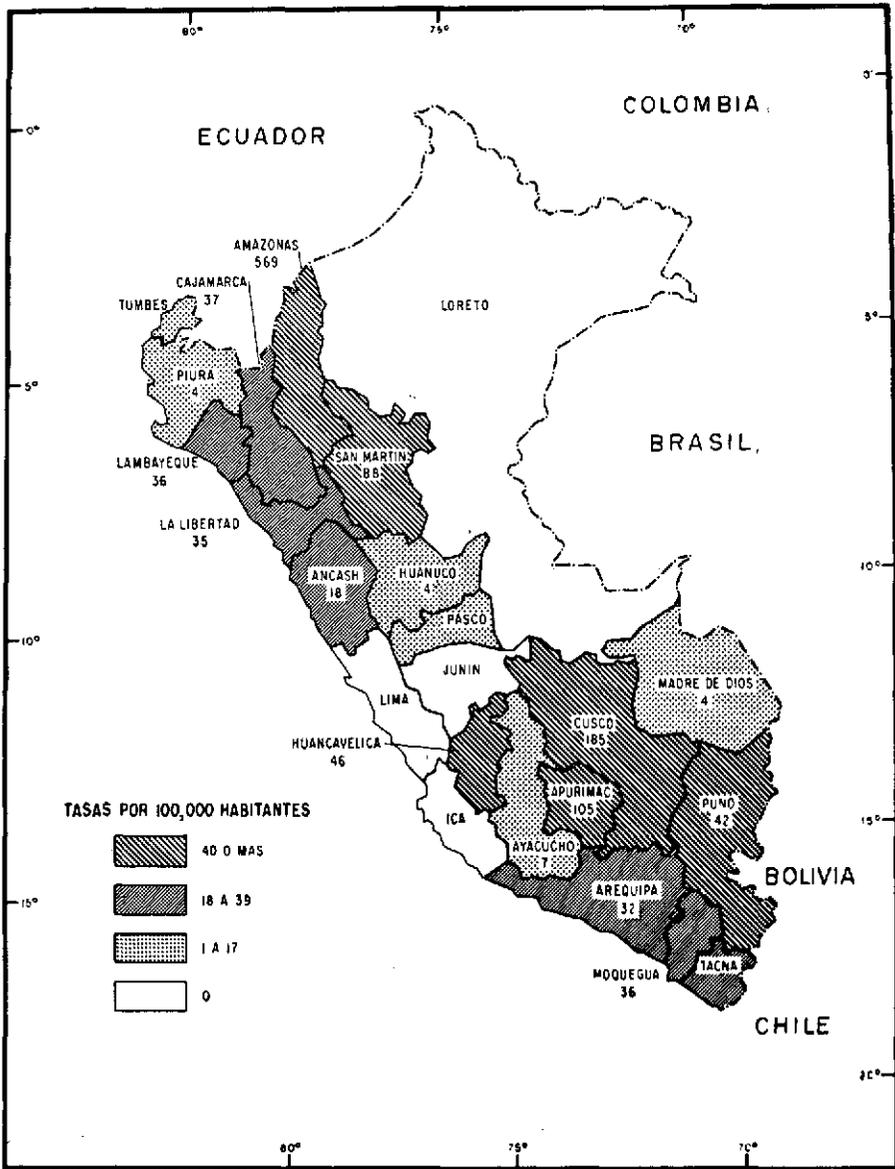
Presentamos un cuadro en relación con tasas por años y población denunciante (véase cuadro No. 1), en el que se puede apreciar que la tasa máxima correspondió al año 1948, con 217 por 100.000 habitantes. También se ve claramente que el sistema

de denuncia ha ido mejorando a través de los años, ya que en 1940 sólo abarca a 2.800.000 habitantes, y en 1955 había aumentado a 4.000.000.

Debe tenerse en cuenta que el Departamento de Inmunizaciones investiga toda denuncia de casos de viruela; por lo tanto, podemos decir que la zona de denuncia abarca casi todo el país.

Si estudiamos esta enfermedad en relación con su extensión se observa que la mayoría de los casos denunciados se distribuyen en dos grandes núcleos; uno situado en el norte, que comprende los departamentos de Piura, Cajamarca y Lambayeque, y otro en el sur, integrado por Cuzco, Ayacucho, Apurímac y Puno. Llama la atención la existencia de estos dos grandes núcleos de viruela, separados por una zona central menos castigada, así como los departamentos de la Selva, que tienen un número muy pequeño de casos. A este respecto, cabe pensar en la posibilidad de una mayor vacunación en los departamentos de la zona central debido a que las empresas mineras efectúan inoculaciones de todo su personal y familiares correspondien-

FIG. 2.—Morbosidad por viruela en el Perú, por departamentos, en 1950. Tasas por 100.000 habitantes.



tes; también se podría pensar en contactos fronterizos. En cuanto a los departamentos de la Selva, indiscutiblemente, la menor incidencia está influida por la baja densidad de su población.

Si nos referimos ahora a la situación de la viruela en el año 1950 en que se comenzó la campaña de erradicación de esta enfermedad, nos encontramos que durante ese año se tuvo conocimiento de 3.612 casos, corres-

pondiendo al Cuzco 1.247 y al departamento de Amazonas 589. En el mapa (Fig. 2) presentado, que hace referencia al total de casos por 100.000 habitantes, Amazonas ocupa el primer lugar, pero, teniendo en cuenta el terremoto producido en la ciudad de Cuzco en octubre de dicho año y el hacinamiento y traslado de la población consiguientes, se decidió comenzar el programa de vacunación por esta ciudad y demás

provincias del departamento. Se consideró además, que las vías de comunicación son mejores y la población más densa que en el departamento de Amazonas, lo que desde el punto de vista epidemiológico, lo hacía más peligroso.

2. La vacuna que convendría emplear

Uno de los puntos básicos considerados antes de comenzar el programa, fue el de la clase de vacuna que convendría emplear. El Instituto Nacional de Higiene en 1950 producía solamente vacuna glicerinada, la que, por necesitar refrigeración, hacía difícil y costosa su aplicación en el medio rural.

La Oficina Sanitaria Panamericana proporcionó vacuna seca para un experimento en una área predominantemente rural y con características de clima tropical.

Se escogió el departamento de Tumbes, que reúne estas condiciones, y el experimento consistió en comparar la vacuna glicerinada con la liofilizada sin refrigerar durante un período de 31 días.

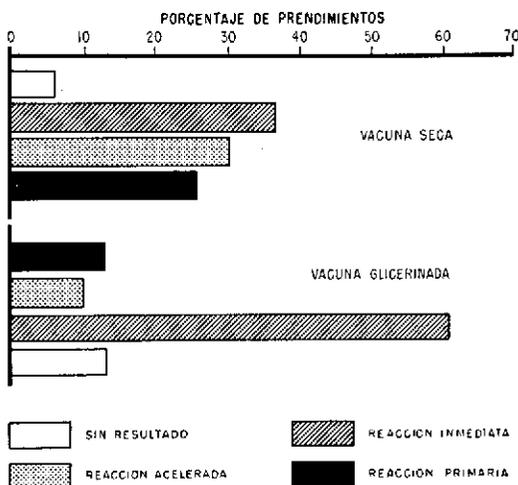
Las dos vacunas, de la misma procedencia (Laboratorio del Estado de Michigan) y con igual potencia en el momento de comenzar el ensayo, fueron inoculadas al mismo sujeto en ambos brazos, y la lectura se hizo 4 veces (en cada sujeto vacunado) de conformidad con el siguiente cuadro:

1ª lectura a los 2 días
2ª " " " 4 "
3ª " " " 7 "
4ª " " " 9 "

La Fig. 3 nos muestra que, mientras que con la vacuna liofilizada la campaña dió muy buen resultado, el de la glicerinada fue mediocre.

A partir de octubre de 1953 se empleó en el campo la vacuna liofilizada producida por el Instituto Nacional de Higiene. Se obtuvo un promedio de 90,4% de positividad en primovacunados. El lote que dió menor positividad alcanzó 77,4% y el que más 97,4%. Algunos lotes estuvieron en uso durante 21 meses, conservando, sin embargo, su potencia.

Fig. 3.—Resumen de los resultados de la vacuna seca y glicerinada sin refrigerar durante 30 días.



Podemos considerar estos resultados como muy buenos en un trabajo de campo; para el trabajo en zonas rurales se está dando preferencia al uso de la vacuna liofilizada, reservando la glicerinada para el trabajo en ciudades o en centros en donde sea fácil refrigerarla. Es probable que la diferencia que ha podido notarse en tubos de vacuna del mismo lote sea imputable a roturas capilares en el cierre de los mismos (no apreciable a simple vista), por lo que sería conveniente redondearla.

3. La técnica y el equipo para su aplicación

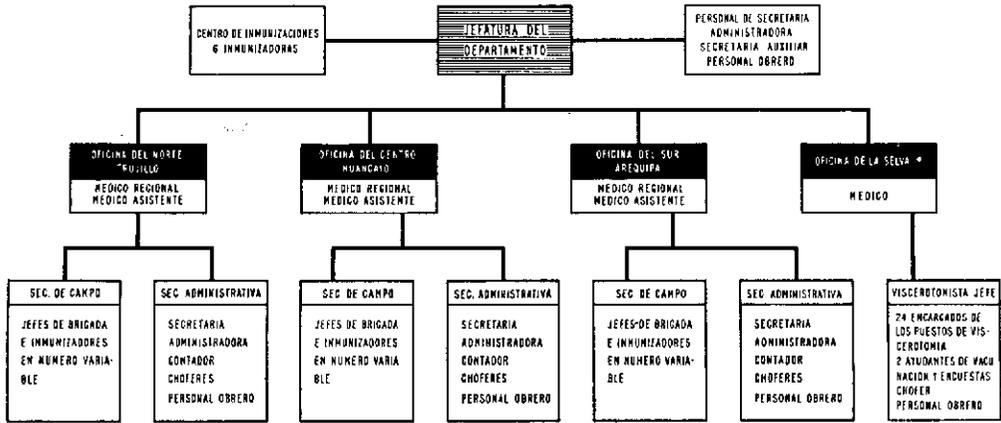
Al principio de la campaña se usó la escarificación; pero una vez entrenado el personal, se adoptó exclusivamente al método de multipresión.

El equipo que se empleó está compuesto de los siguientes elementos: 1) un campo para colocar materiales; 2) dos frascos goteros con alcohol; 3) una pinza de disección; 4) dos cajas metálicas; 5) dos jeringas de 2 cc.; 6) dos agujas intramusculares; 7) 300 agujas de multipresión; 8) dos frascos goteros para vacuna, con sus agujas; 9) sobres con algodón en cantidad suficiente.

Este equipo contenía doble cantidad de los objetos que pueden romperse, ya que no es posible sustituirlos con facilidad.

A parte de esto, cada inmunizador lleva

Fig. 4.—Organización del Departamento de Inmunizaciones.



* NOTA: LA OFICINA DE LA SELVA SE ORGANIZARA DURANTE EL PRESENTE AÑO SI EL PRESUPUESTO LO PERMITE

en el morral, para su uso personal: 1 jabonera, 1 toalla, 1 cepillo de uñas, y para identificación y confección de la estadística: 1 placa metálica con el número correspondiente, 1 carnet de identidad, 1 libreta de diario, 1 carpeta para fichas de trabajo, fichas de trabajo, Vistos M-255 y M-3-55, certificados de vacunación en cantidad suficiente, 1 banderín, 2 lápices, 1 sacapuntas, 3 lápices de cera, 1 gomero y 1 silbato.

Los inmunizadores han recibido instrucciones para mantener estos objetos en un orden determinado, con el fin de evitar, en lo posibles errores y pérdida de tiempo.

4. Las condiciones que debía reunir el personal médico y auxiliar

Se ha determinado que este tipo de campañas sean fiscalizadas por médicos dedicados exclusivamente a esta tarea y con condiciones especiales de mando y de resistencia para una vida de campo, toda vez que los médicos regionales están como mínimo el 40% de su tiempo en el campo, y los asistentes, permanentemente.

El personal médico es nombrado a propuesta de la Jefatura del Departamento.

Inicialmente los inmunizadores fueron escogidos por el Departamento de Selección y Capacitación de Personal del Ministerio, y adiestrados por entidades sanitarias ajenas a él (esto ocurrió con la primera promoción de

vacunadores). Posteriormente, el adiestramiento y la selección está a cargo de los médicos regionales, responsables del trabajo de campo, mediante un concurso de méritos, y después de someter a los postulantes a rigurosas pruebas teórico-prácticas se eliminan a todos aquellos que, a juicio del instructor, no reúnen las condiciones necesarias para el desempeño de una labor de tanta responsabilidad.

Los jefes de brigada son seleccionados de entre los inmunizadores que demuestran capacidad de mando, disciplina, fidelidad y dedicación al trabajo; y antes de su nombramiento definitivo, se les somete a una prueba de eficiencia comandando durante cierto tiempo una brigada.

En cuanto al personal de oficina, choferes, etc. los médicos regionales están autorizados para proponerlos, siendo aceptados en todos los casos. Estimamos que esta es la única forma de que la jefatura de una programa pueda hacer responsable al personal que lo dirige en el campo de los resultados del mismo.

5. El sistema de trabajo

Para efectuar el programa se organizó el Departamento de acuerdo con el cuadro que presentamos.

La Jefatura imparte las normas de trabajo. Estas normas se discuten periódicamente

con los médicos jefes regionales y en algunos casos con los médicos asistentes, siendo esta la mejor manera de que se ejecuten todas las fases del trabajo de campo con el conocimiento de los que van a dirigirlo, debiendo tenerse en cuenta que si las normas no son comprendidas y aceptadas por éstos, el trabajo fracasa por falta de interés en un plan en cuya elaboración no participaron.

También depende de la Jefatura la sección de secretaría y administración. Esta última está encargada del pedido de vacunas, de su remisión a la periferia, del almacén de materiales y del control de obreros. Existe también una sección encargada del envase de algodón en sobres individuales y de agujas para la multipresión en tubos capilares.

El Centro de Inmunización.—Está a cargo directamente de un médico a tiempo completo que se encarga de la prueba de vacunas en seres humanos, para cuyo control se utiliza la ficha modelo M-15-51. En ella figuran los distintos síntomas que pueden presentarse en una reacción vacunal a través del tiempo, y de este modo es posible calificarlas de primarias, aceleradas e inmediatas.

Además, en el Centro se capacita al personal; se hace vacunación de tipo experimental; inmunizaciones rutinarias y expedición de certificados internacionales.

Oficinas regionales.—Están situadas en puntos estratégicos para poder atender a un número de departamentos colindantes.

En la actualidad existen 3 regiones, que son la del norte, la del centro y la del sur.

Este año se piensa montar una oficina en la Selva, la cual, además de la vacunación antivariólica, ejecutará otros programas.

En cada región existen 2 médicos: uno regional, responsable de la ejecución de programas y de la marcha administrativa de su dependencia, y uno médico asistente, que se dedica estrictamente a las campañas de campo, para lo que cuenta con un número variable de jefes de brigada, inmunizadores y personal obrero.

Para la vacunación se toma como unidad de trabajo el distrito, que está formado por

un determinado número de lugares poblados, que ocupan una extensión territorial que permite, casi siempre, ubicar a una brigada de 10 hombres sin que interfieran en su trabajo, y poderlos fiscalizar en debida forma. Siempre se trabajan distritos completos; los lugares se visitan casa por casa, inscribiendo al total de personas que duermen en ella; esto permite hacer el censo de población y apreciar si el número de vacunaciones alcanza el 80% fijado, como porcentaje de seguridad en este tipo de programas.

Al iniciarse el trabajo se confecciona un itinerario; para ello, uno de los médicos y el jefe de brigada se trasladan al distrito con la debida anticipación, para hacer un estudio previo y poder asignar una zona a cada inmunizador, en forma que no pueda eludir la responsabilidad en el trabajo de la misma.

Esto también facilita la labor de fiscalización y permite ver a través del tiempo si el itinerario se confeccionó debidamente, si los programas se desenvuelven de manera adecuada y, en fin, si se tomaron bien todas las medidas.

El inmunizador, al retirarse de una casa trabajada, pega un "visto" en la cara interna de la puerta o en cualquier otro lugar visible, permitiendo esta medida apreciar la labor efectuada en la misma.

El ciclo de trabajo adoptado es rígido, dedicando las semanas impares a la aplicación de vacuna y las pares a la lectura de resultados y a la reinoculación y vacunación de los que no estaban presentes en la primera oportunidad. El mismo vacunador practica ambas visitas, lo que facilita grandemente la labor.

La lectura, con este ritmo de trabajo, se hace siempre al 8° día, lo que permite que sean comparables los resultados de las distintas oficinas regionales.

Las fiscalizaciones las hacen los médicos y los jefes de brigada empleando diversos procedimientos, ya que el sistema enunciado permite darse cuenta del trabajo, aunque haya pasado cierto tiempo.

En resumen, lo que se pretende con este

sistema es uniformar el procedimiento de manera rígida de modo que quede el menor número de factores librados al azar o a la improvisación del momento, y facilitando en lo posible la inspección del programa.

6. *Los fondos necesarios para la ejecución del programa y la regularidad de sus entregas*

Al planear este programa se formularon los presupuestos necesarios para completarlo en un lapso de 5 años, pero, debido a una serie de circunstancias imprevistas, los aportes recibidos no estuvieron en relación con el trabajo por hacer.

7. *La estadística y evaluación de los resultados*

Todos los modelos de fichas usados en el programa tienden a facilitar la confección de una estadística, lo más exacta posible, con miras a evaluar los resultados y los costos por inmunización. Desde octubre de 1950 hasta diciembre de 1955, se vacunaron

5.138.740 personas contra la viruela, a un costo aproximado de S/° 2,00 (soles) por inoculación.

Del total de personas vacunadas se han leído 570.585 primovacunados, con una positividad del 84 %.

La lectura de revacunados alcanzó a 1.134.906 personas, siendo positivas el 75 %; esto nos indica el bajo nivel de inmunidad existente en nuestro país, pues al leer a los 8 días quedan eliminadas las reacciones de inmunidad o inmediatas.

El número de departamentos trabajados es de 16, que comprenden 88 provincias y 23.642 lugares poblados; y si se calcula 5 habitantes por casa, para hacer el número de vacunaciones indicadas se ha tenido que revisar más de 1.400.000 casas.

El resultado de este programa es halagüeño, pues desde diciembre de 1954 no se tiene conocimiento de ningún caso de viruela, lo que ocurrió por primera vez desde el año 1932.

SEMINARIO DE VACUNACION ANTIVARIOLICA*

DISCUSIONES, RECOMENDACIONES Y VOTOS

TEMA I. TÉCNICAS DE PREPARACIÓN DE VACUNA GLICERINADA. SU USO.

Terminada la lectura de este trabajo, se inició el debate.

Inmediatamente se planteó la cuestión de la edad, raza y cualidades de las terneras que deben inocularse. Se estuvo de acuerdo en que es preferible usar animalés jóvenes, de 120 a 150 kilos de peso, y se destacó la importancia de la calidad de la piel, que debería ser preferiblemente poco pigmentada. Con referencia a la raza de los animales, no se han observado, según la experiencia de la mayoría, variaciones significativas.

En segundo lugar, se aceptó unánimemente la gran importancia de una cuidadosa y persistente limpieza del animal, particularmente en el momento de la cosecha. Se sugirió la conveniencia de estudiar con más detenimiento las posibles ventajas de la inoculación de antibióticos a los animales vacunados, con el objeto de obtener pulpas de bajo contenido bacteriano.

Con relación a la recomendación hecha en el trabajo del Sr. Gebhard sobre la utilización de cepas desprovistas de caracteres neurotrópicos, se aceptó que entre las cepas empleadas actualmente para la producción de vacuna en los distintos países, no se conoce ninguna que tenga reconocidas características neurotrópicas para el hombre. Los casos de encefalitis post-vaccinal no han podido ser imputados de una manera segura a la cepa empleada.

Con respecto al problema de la conservación de la vacuna glicerinada y a su fecha de vencimiento, una vez salida del laboratorio productor, se convino en que, conservada a temperatura inferior a -10°C ., mantiene su potencia por tiempo indefinido, y que, una vez salida del laboratorio, debe fijársele una fecha de vencimiento, que estará en relación

con la temperatura a que estará expuesta o será conservada. Se recomendó que la vacuna glicerinada se transporte y mantenga bajo constante refrigeración.

Se discutió el uso de antisépticos en la vacuna glicerinada, y algunos de los participantes se manifestaron a favor del uso del fenol, mientras otros declararon su preferencia por el mertiolato. Sin embargo, hubo acuerdo general en que lo fundamental es obtener una pulpa de bajo contenido de gérmenes mediante una técnica correcta, y sin confiar demasiado en los antisépticos para reducir un contenido bacteriano alto. A este respecto se mencionó la posibilidad de obtener linfa totalmente libre de gérmenes.

A continuación se discutió el momento óptimo para la recolección de la pulpa, conviniéndose en que éste es variable en los distintos países, de acuerdo con diversos factores, variando en general entre el cuarto y el sexto día. Se recomienda que la recolección se haga antes de que se presente una extensa ruptura de las pústulas o la desecación de las mismas.

Con respecto a la inoculación de los animales, se insistió en la necesidad de que la escarificación sea superficial, sin afectar los tejidos profundos. En estas condiciones, el rendimiento normal de una ternera del tamaño recomendado debe oscilar entre 125 a 150 g.

Algunos laboratorios usan sistemáticamente la oveja como animal de producción de vacuna, debido a la menor frecuencia con que enferma de tuberculosis, a su mayor resistencia a las enfermedades en general, así como a su mayor manuableidad y su mayor limpieza, dada la característica de que sus materias fecales son sólidas. El Instituto Lister, de Inglaterra, que emplea estos animales continuamente, recomienda como disciplina técnica la inoculación sobre uno de los flancos mediante escarificación cruzada, y la cosecha al cuarto día de la inoculación.

* Celebrado en Lima, Perú, del 20 al 25 de agosto de 1956.

El rendimiento habitual es de 100 g. de pulpa por animal. Los animales inoculados se mantienen durante el período de incubación a una temperatura de 16 a 17°C. El virus se conserva por pases sucesivos de conejo a oveja.

Fue la opinión unánime del grupo que, existiendo hoy la posibilidad de producir una vacuna desecada, que mantiene su potencia por largo tiempo, sería conveniente que la Organización Mundial de la Salud estableciera un patrón internacional para el control de la vacuna antivariólica.

TEMA II. TÉCNICAS DE PREPARACIÓN DE VACUNA DESECADA. SU USO.

El Dr. Aurelio Sousa Iglesias dió lectura a su trabajo titulado "La vacuna antivariólica desecada en el Perú". A continuación el Dr. Douglas McClean hizo una exposición sobre el "Método de producción de vacuna desecada utilizado por el Instituto Lister, de Inglaterra", así como sobre sus experiencias relativas a la conservación de este producto.

Destacó como los puntos más importantes de este método de producción, la purificación de la pulpa por medio de la centrifugación diferencial, que permite eliminar gran cantidad de restos tisulares, y el uso de la peptona al 5% como agente protector.

Recalcó la notable estabilidad del producto, e hizo referencia a estudios según los cuales la vacuna fue conservada a 45°C. hasta por 78 semanas, sin pérdidas apreciables de la potencia, medida tanto en embriones de pollo como en seres humanos. Dicha vacuna resistió incluso la temperatura de 100°C. por dos horas, con disminución de su título en un sólo logaritmo.

Posteriormente aludió a los métodos de titulación y se expresó en favor del que se practica en la membrana corioalantoica del embrión de pollo.

Presentó el resultado de sus experiencias, que revelan una correlación lineal entre los títulos obtenidos en la membrana corioalantoica y el porcentaje de prendimientos primarios que obtuvo en los seres humanos, lo que no ocurrió con las pruebas de escarificación e intradérmicas en conejos.

En primer término se planteó la cuestión de relacionar el grado de humedad residual con la resistencia al calor.

La opinión general fue que, en materia de vacuna antivariólica desecada, no es absolutamente necesario alcanzar el alto grado de desecación que requieren otras vacunas de virus, como la de la fiebre amarilla, por ejemplo.

Planteado el problema de la relación existente entre el título de una vacuna, determinado en el laboratorio, y la duración de la inmunidad por ella conferida, se estuvo de acuerdo en que no puede darse, por el momento, una respuesta definitiva sobre este punto, la cual se espera obtener a la terminación de los estudios que, con este objeto, se están llevando a cabo bajo los auspicios de la Organización Mundial de la Salud.

Se hizo notar que en el Instituto Lister se descartan, para la preparación de la vacuna desecada, alrededor del 10 ó 20% de los lotes de las pulpas originales por no alcanzar los títulos requeridos. Asimismo, de las vacunas secas, ya elaboradas, se eliminan del 3 al 5% por no pasar la prueba de resistencia al calor, que consiste en conservarlas a 37°C. durante un mes, al cabo del cual se practica la titulación. Igualmente se mencionó que los factores a que puede atribuirse la resistencia al calor de esta vacuna desecada, son el método de purificación y el agente protector usado.

Al discutir el valor comparativo de las pruebas del laboratorio y los resultados obtenidos en el campo, se estuvo de acuerdo en que, si bien las segundas constituyen la prueba definitiva de su eficacia, las primeras son esenciales para la emisión por el laboratorio y su posterior uso en el campo.

Sobre la conservación de la vacuna desecada en atmósfera de nitrógeno, o al vacío, se manifestó que el Instituto Lister ha encontrado que el nitrógeno provoca un descenso del título, razón por la cual no se recomienda este proceder. En cuanto a los inconvenientes que se dice existen en el momento de la apertura de los envases, al vacío, durante la vacunación en el campo,

las personas que la han aplicado en estas condiciones, en larga escala, afirmaron no haber encontrado tales inconvenientes. Se hace notar que el personal de vacunadores se mantiene a un alto nivel de inmunidad mediante vacunaciones frecuentes.

Respecto al tiempo de duración de la vacuna desecada, una vez reconstituída, fue la opinión unánime del grupo que debe estimarse en unas pocas horas a la temperatura ambiente, y en no más de siete días cuando se conserva entre 0° y 4°C. También se convino que toda vacuna desecada debe llevar una fecha de expiración al ser expedida por el laboratorio.

El Dr. McClean hizo una relación de sus experiencias de laboratorio con la vacuna irradiada con rayos ultravioleta. Afirmó que la inmunidad obtenida en los conejos por la inoculación subcutánea de dos dosis sucesivas, con dos semanas de intervalo, persiste hasta veintidós semanas, momento en que se puede aumentar mediante una inoculación de refuerzo.

Suscitada la cuestión de cómo determinar una posible actividad residual del virus, el ponente informó que había realizado experimentos concentrando la vacuna irradiada cuarenta veces e inoculando con ella doce huevos embrionados por vía corioalantoica, sin haber podido determinar la presencia de virus activo por este medio ni aún después de haber efectuado dos pases sucesivos.

También hizo referencia a que tanto las reacciones cutáneas obtenidas con la vacuna irradiada, como los títulos de anticuerpos circulantes a que da lugar, son inferiores a los que se observaron con la vacuna de virus vivo de donde puede inferirse que la vacuna irradiada actúa por su antigenicidad como una vacuna de virus muerto. Por último, mencionó que no tenía experiencia del uso de las ondas ultrasónicas como inactivantes del virus, pero que en los pocos experimentos realizados con rayos gamma no había obtenido resultados comparables.

TEMA III. TÉCNICAS DE PREPARACIÓN DE VACUNA EN EMBRIÓN DE POLLO. EXPERIENCIA ADQUIRIDA CON

SU USO: PRODUCCIÓN DE VACUNA EN CULTIVO DE TEJIDOS.

Se dió principio a la sesión con la lectura de la primera parte e informe de la relación correspondiente a la sesión anterior. A continuación el Dr. Henrique Azevedo Penna, Jefe de la División de Bacteriología e Inmunología del Instituto Oswaldo Cruz, de Río de Janeiro, después de agradecer la designación, declaró abierto el debate cediendo la palabra al Dr. Irons.

El Dr. Irons dió lectura a su trabajo titulado "Preparación de vacuna antivariólica en la membrana corioalantoica de embrión de pollo", la cual fue precedida de proyecciones sobre el tema.

Terminada la exposición, el grupo estuvo de acuerdo en la conveniencia de recomendar a los laboratorios de producción de vacuna antivariólica de los distintos países el ensayo de esta técnica y la preparación del personal correspondiente, con el objeto de poder hacer frente a posibles dificultades creadas por la escasez de los animales utilizados como fuente de producción.

La raza de los huevos empleados parece no ser factor de importancia. La resistencia al calor de la vacuna se considera inferior a la de la vacuna glicerizada de ternera. No se comprobó aún que la vacuna procedente de embrión de pollo provoque fenómenos alérgicos en el hombre cuando se aplica por escarificación. Discutida la posibilidad de producir vacuna mediante el uso de la membrana corioalantoica, cultivada según la nueva técnica de cultivo de tejido, se admitió que ofrecía buenas perspectivas por lo que merecía explorarse. Algunos de los miembros del grupo manifestaron que han elaborado y usado en el campo la vacuna en embrión de pollo desecada, con resultados en todo comparables a los obtenidos con la linfa glicerizada de ternera. Experiencias de inmunización cruzada con estas dos vacunas no han revelado diferencias entre una y otra. Asimismo, haciendo una comparación de los costos de producción y del rendimiento respectivos se llegó a la conclusión de que la vacuna obtenida de embrión de pollo es más ventajosa.

TEMA IV. PRUEBAS DE POTENCIA, DE PUREZA E INOCUIDAD.

La sesión se inició con la lectura de los resúmenes de las discusiones de la segunda parte de la segunda sesión y el de la tercera, que se aprobaron sin observaciones.

A continuación se hizo cargo de la dirección del debate el Dr. Alfred Lazarus, Director del Instituto Nacional de Salud Pública de Lima, Perú, quien declaró abierta la sesión y concedió la palabra a la Dra. Else Krag Andersen, la cual leyó su trabajo titulado "Pruebas de inocuidad, pureza y actividad de la vacuna antivariólica".

Planteada la discusión sobre la potencia que debe exigirse de las vacunas tituladas, mediante la inoculación en la membrana corioalantoica del embrión de pollo, se manifestó que el título de 10^8 requerido por el Instituto Lister, si bien podría ser excesivo, se estableció con el propósito de cubrir posibles disminuciones de potencia una vez expedida la vacuna por el laboratorio.

Observadas las grandes variaciones obtenidas en la medición de la potencia de una vacuna, mediante su titulación por distintas técnicas, se planteó el problema de la dificultad de elegir una de ellas como patrón internacional.

Si bien se reconoció que los resultados obtenidos con el uso de una vacuna en el campo constituían la prueba definitiva de la misma, se consideró también que era indispensable contar con una prueba de laboratorio que permita anticipar la potencia de la misma. En este sentido se aceptó que el método que hay que adoptar para la medición de la potencia de la vacuna podría variar en los distintos países, pero que, aunque se usasen en ellos distintos métodos, debería tratarse de relacionarlos con un patrón internacional.

De acuerdo con los resultados presentados en el trabajo previamente leído y con la experiencia de gran número de los participantes, se acordó que el método de titulación mediante la inoculación en la membrana corioalantoica del embrión de pollo es el que ha dado resultados más consistentes y comparables. Por lo tanto, se consideró este

método como el más indicado quizá para llegar a fijar un patrón internacional. Se mencionó, a este respecto, la posibilidad de usar el método de titulación por el efecto citopatogénico del virus en cultivo de tejido. Se reconoció que no se cuenta aún con suficiente experiencia al respecto, aunque parece promisorio. Un grupo de participantes hizo notar las grandes variaciones obtenidas en las titulaciones efectuadas mediante la inoculación intradérmica del conejo, lo que se explicó como debido a variaciones en las afinidades tisulares del virus.

Fue la opinión del grupo que, existiendo actualmente métodos que permiten producir vacuna de alta actividad y bajo contenido bacteriano, sería conveniente que no se aceptara la distribución de un producto que contenga más de 1.000 gérmenes no patógenos por centímetro cúbico, y que sería deseable producir vacunas totalmente libres de ellos.

A continuación la Dra. Else Krag Andersen leyó su trabajo titulado "Producción de vacuna antivariólica en cultivo de tejidos".

Se expresó que sería de interés intensificar los estudios sobre este tema, dadas las posibilidades que parece ofrecer.

Posteriormente se exhibieron dos películas, una sobre la técnica usada en el Instituto de Higiene de Caracas, Venezuela, para la producción de vacuna antivariólica en terneras, y la otra sobre la técnica de producción de vacuna antivariólica, seguida por el Instituto Butantan, de São Paulo, Brasil. El especial interés de esta última fue demostrar la técnica de inoculación en embrión de pollo, semejante a la que se puede utilizar para la producción en masa de vacuna antivariólica.

TEMA V. MÉTODOS DE LABORATORIO PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA VIRUELA

El Dr. Alfred Lazarus leyó el trabajo titulado "Diagnóstico de laboratorio de la viruela".

Se planteó el tema de la importancia de efectuar el diagnóstico de laboratorio en

todos los casos sospechosos de viruela, y se discutieron las relativas ventajas de los métodos examinados en el trabajo presentado.

La mayoría de los participantes recomendó, para el diagnóstico precoz, el uso de la técnica de aislamiento del virus en la membrana corioalantoica del embrión de pollo y la fijación del complemento, utilizando como fuente de antígeno el material procedente del enfermo sospechoso. Como método de diagnóstico en la fase de convalecencia se señaló la ventaja de utilizar la reacción de fijación del complemento con sueros pareados del enfermo y la vacunación efectuada con estos fines. Se consideró que el examen microscópico directo del material procedente de las lesiones, si bien en manos experimentadas ha dado buenos resultados, su valor es inferior al de los métodos previamente mencionados.

Por razones epidemiológicas, el diagnóstico de laboratorio, aún retrospectivo, se considera de capital importancia en los casos esporádicos.

Se subrayó la idea de que, con el objeto de que los laboratorios dispongan en el momento oportuno de material adecuado, se instruya a los trabajadores de campo sobre la recolección y envío de las muestras correspondientes. En este sentido se hace notar la importancia de enviar el material en las mejores condiciones posibles, evitando su desecación y pudiendo usar, con este objeto, una solución de glicerina neutra al 50 %.

Persuadidos de la importancia de establecer un diagnóstico lo más pronto posible, se insistió en la conveniencia de estimular los ensayos en cultivos de tejidos con el fin de alcanzar este propósito.

Otro material que fue señalado como una buena fuente para la obtención del virus, es el exudado faríngeo, donde se ha probado que persiste por largos períodos.

Con fines preventivos y epidemiológicos fue la opinión del grupo que debieran considerarse el alastrín y la viruela con un solo criterio.

Por último, el grupo subrayó la impor-

tancia de que todos los países cuenten con servicios de diagnóstico de laboratorio en materia de viruela.

TEMA VI. EXPERIENCIA DE LOS DIVERSOS PAÍSES SOBRE ORGANIZACIÓN Y DESARROLLO DE PROGRAMAS DE VACUNACIÓN

Se leyó el resumen de la cuarta sesión, que se aprobó sin discusión, y el Dr. Bacigalupi cedió la dirección del debate al Dr. Enrique Villalobos, Jefe de la División de Enfermedades Transmisibles del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social del Perú, quien pidió al Dr. Mario Galdos, del Departamento de Inmunizaciones del mismo Ministerio, que leyera el trabajo preparado por el Dr. Antonio de la Fuente, Jefe del citado Departamento, quien no pudo concurrir a la sesión por impedimento físico. El trabajo leído se titula "Informe de la campaña antivariólica en el Perú, 1951-1955".

Se discutieron las ventajas e inconvenientes del uso del alcohol en la limpieza de la piel antes de la vacunación, manifestando varios participantes no haber tenido dificultades con el uso del mismo, siempre y cuando se tuviera especial cuidado en comprobar su completa evaporación antes de aplicar la vacuna. Otros participantes refirieron su experiencia con el uso de la solución jabonosa, con la que han obtenido excelentes resultados.

Se manifestó también que durante la campaña de vacunación antivariólica en el Perú, se ha alcanzado por encima del 95 % de prendimientos primarios de vacuna desecada.

Con respecto a la técnica de inoculación, el grupo se manifestó en favor de la multipresión.

Varios participantes hicieron una breve reseña de la organización y desarrollo de las campañas en sus respectivos países, estableciendo las semejanzas y diferencias con respecto a los métodos utilizados en el Perú.

Se llamó la atención sobre la extraordinaria importancia de extender la vacunación a las áreas rurales, utilizando en éstas

de preferencia, el método "casa por casa" con el fin de vacunar al mayor número de personas.

Se insistió asimismo en la necesidad de hacer amplia educación sanitaria en el curso de las campañas de vacunación antivariólica.

Se dió lectura al resumen de las discusiones de la quinta y sexta reuniones, que fue aprobado por unanimidad. Luego, el Dr. Enrique Villalobos concedió la palabra al Dr. Ignacio Pirosky, quien declaró abierto el debate sobre las conclusiones y recomendaciones del Seminario. Después de haberse discutido este tema, se formularon las siguientes conclusiones, recomendaciones y votos:

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Es la opinión unánime del Seminario:

1) Que se debe tratar de obtener pulpas y, como consecuencia, vacunas con un bajo contenido bacteriano, debiendo tratarse de llegar a un producto libre de gérmenes.

2) Que debe usarse vacuna desecada para la vacunación de las zonas donde no existen facilidades de refrigeración.

3) Que antes de ser expedido cada lote de vacuna desecada se realicen pruebas, sometiendo las muestras a la temperatura de 37°C. durante un mes, después de lo cual deben pasar los requisitos mínimos de pureza y potencia exigidos a las vacunas glicerinadas en cada país.

4) Que toda la vacuna debe llevar una fecha de expiración a partir del momento de su distribución, la que se determinará de acuerdo con las condiciones locales.

5) Que es deseable que todo lote de vacuna, después de las pruebas completas de inocuidad y potencia efectuadas en el laboratorio, sea probado en humanos antes de usarla en gran escala.

6) Que es conveniente que todos los laboratorios productores de vacuna envíen muestras de su producto, por lo menos dos veces al año, por intermedio de la Oficina Sanitaria Panamericana,

a un laboratorio central especializado, a fin de mantener su propio control y para cooperar con los estudios encaminados a obtener un estándar internacional.

7) Que es de desear que los laboratorios de producción de vacuna realicen también trabajos de investigación con la finalidad de mejorarla y de utilizar otras fuentes de producción del virus.

8) Que en vista de que se está realizando un programa continental de erradicación de la viruela, es indispensable que los laboratorios de Salud Pública de cada país estén capacitados para realizar las pruebas de diagnóstico de la viruela.

9) Que se recomiende a los países que no hayan erradicado aún la enfermedad la realización de campañas de erradicación de la viruela, de acuerdo con los mandatos de las XIII y XIV Conferencias Sanitarias Panamericanas.

10) Que desde el punto de vista epidemiológico internacional no deben establecerse diferencias entre la viruela y el alastrím.

11) Que la Oficina Sanitaria Panamericana organice, cuando lo crea conveniente, otro seminario sobre el mismo tema para estudiar los resultados alcanzados.

VOTOS

1) Agradecer al Gobierno del Perú, en la persona del Señor Ministro de Salud Pública y Asistencia Social y de las otras autoridades sanitarias, el auspicio proporcionado a la realización de este Seminario.

2) Agradecer al Servicio Cooperativo Interamericano de Salud Pública, y en especial a las autoridades y personal del Instituto Nacional de Salud Pública, la hospitalidad y cooperación prestadas.

3) Agradecer y felicitar a la Oficina Sanitaria Panamericana por la organización y realización de este Seminario.

4) Otorgar un voto de aplauso a los consultores y al secretariado por la brillante labor realizada.

El Dr. Pirosky declaró cerrada la sesión.

Anexo I

PROGRAMA DE REUNIONES

LUNES (agosto 20)

Mañana 9:30 Sesión Inaugural. Discursos de apertura por el Ministro de Salud Pública, el Representante de la Oficina Sanitaria Panamericana y un participante.

10:30 Visita al Instituto Nacional de Salud Pública.

Tarde 2:30 Discusión sobre técnicas de preparación de vacuna glicerinada y su uso.

MARTES (agosto 21)

Mañana 9:00 Demostración de técnicas de preparación de vacuna glicerinada.

Tarde 2:30 Discusión sobre técnicas de preparación de vacuna desecada y su uso.

MIÉRCOLES (agosto 22)

Mañana 9:00 Demostración de técnicas de preparación de vacuna desecada.

Tarde 2:30 Discusión sobre técnicas de preparación de vacuna en

embrión de pollo. Experiencia adquirida con su uso. Producción de vacuna en cultivo de tejidos.

JUEVES (agosto 23)

Mañana 9:00 Demostración de técnicas de preparación de vacuna en embrión de pollo.

Tarde 2:30 Demostración y discusión de pruebas de potencia, pureza e inocuidad.

VIERNES (agosto 24)

Mañana 9:00 Discusión de los métodos de laboratorio para el diagnóstico de viruela.

Tarde 2:30 Experiencia de los diversos países sobre organización y desarrollo de programas de vacunación. Concepto de erradicación de la viruela en las Américas.

SÁBADO (agosto 25)

Mañana 9:00 Discusión general, conclusiones y clausura del Seminario.

Anexo II

LISTA DE ASISTENTES

PARTICIPANTES

ARGENTINA:

Sra. Ida Fisher de Davies
Bióloga Ayudante, Sección Vacuna Antivariolosa

Instituto Malbrán
Buenos Aires

Dr. Juan José Martino
Veterinario Bacteriólogo
Jefe de Conservatorio de Vacuna
Instituto Biológico de La Plata
Buenos Aires

Dr. Ignacio Pirofsky
Director, Instituto Malbrán
Buenos Aires

BRASIL:

Dr. Aristides Vallejo Freire
Jefe del Laboratorio de Virus

Instituto Butantán
São Paulo

Dr. Henrique de Azevedo Penna
Jefe, División de Bacteriología e Inmunología
Instituto Oswaldo Cruz
Rio de Janeiro

COLOMBIA:

Dr. Eduardo Acosta Lleras
Jefe del Parque de Vacunación
Parque de Vacunación
Bogotá

CUBA:

Dr. Pablo Cejas
Jefe de la Sección de Virus
Instituto Nacional de Higiene
La Habana

EL SALVADOR:

Dr. Roberto Arévalo

Director de la División de Laboratorios
Dirección General de Sanidad
San Salvador

MÉXICO:

Dr. Carlos Campillo
Director del Laboratorio de Virus
Secretaría de Salubridad y Asistencia
México, D.F.

PERÚ:

Dr. Juan Alemán Zegarra
Asistente del Departamento de Inmunizaciones
Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social
Lima

Dr. Antonio de la Fuente
Jefe del Departamento de Inmunizaciones
Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social
Lima

Dr. Alfred S. Lazarus
Director
Instituto Nacional de Salud Pública
Lima

Dr. Aurelio Sousa Iglesias
Jefe de la División de Producción
Instituto Nacional de Salud Pública
Lima

Dr. Enrique Villalobos
Jefe de la División de Enfermedades Transmisibles
Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social
Lima

URUGUAY:

Dr. Juan Carlos Bacigalupi
Jefe del Servicio de Bacteriología y Vacuna
Montevideo

VENEZUELA:

Srta. Carmen Massiani
Técnico de Laboratorio
Bacteriólogo Adjunto
Instituto Nacional de Higiene
Caracas

Dr. Antonio Briceño Rossi
Director
Instituto Nacional de Higiene
Caracas

OBSERVADORES

Dr. Julio C. Esteves
Jefe de la Campaña Nacional Antivariólica
Dirección General de Sanidad
Guayaquil, Ecuador

Dr. Humberto Martínez Alnuelle
Médico del Servicio de Pediatría y Centro
Servicio de Vacunación
Hospital de Policía
Lima, Perú

Dr. Cássio Miranda
Jefe de la División de Virus

Laboratorio de Preparación de Vacuna Anti-
variólica

Instituto Oswaldo Cruz
Rio de Janeiro, Brasil

Dr. Jorge A. Pérez Pardo
Epidemiólogo
Ministerio de Salud Pública
Bogotá, Colombia

CONSULTORES

Dra. Else Krag Andersen
Laboratorista del Departamento de Viruela
Statens Seruminstitut
Amager Boulevard 80
Copenhague, Dinamarca

Dr. George D. Cummings
Director de la División de Laboratorios
Departamento de Salud del Estado de Michigan
Lansing 4, Michigan
Estados Unidos

Sr. William H. Gebhard
Bioquímico de los Laboratorios
Departamento de Salud del Estado de Michigan
Lansing 4, Michigan
Estados Unidos

Dr. Jesse V. Irons
Director de los Laboratorios
Departamento de Salud del Estado de Texas
Estados Unidos

Dr. Douglas McClean
Jefe del Departamento de Vacuna Antivariólica
Instituto Lister
Elstree, Herts
Inglaterra

SECRETARIADO

Dr. Arturo Sáenz
Servicio de Enfermedades Transmisibles
Oficina Sanitaria Panamericana
Washington, D.C., Estados Unidos

Dr. Oswaldo José da Silva
Representante, Zona IV
Oficina Sanitaria Panamericana
Lima, Perú

Dr. Abraham Drobny
Oficial Médico, Zona IV
Oficina Sanitaria Panamericana
Lima, Perú

Dr. Eriberto Echezurúa
Epidemiólogo, Zona IV
Oficina Sanitaria Panamericana
Bogotá, Colombia

Dr. Carlos Quirós S.
Epidemiólogo, Zona VI
Oficina Sanitaria Panamericana
Buenos Aires, Argentina