

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. Desecación 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-desecación" 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—desecación 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 substancias protectivas, 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 excluída 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 linfas 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 diluída 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 jenneriana 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, 10^6 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) Wesslên, T.: *Arch. ges. Virusforsch.* B VI, H, 5:430, 1956.