

74, 106



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**AVANCES EN LA PRODUCCION
DE VACUNAS VIRALES**



**EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA**

TRABAJO MONOGRAFICO DE ACTUALIZACIÓN

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO**

P R E S E N T A :

ROSARIO DE LOURDES RODRIGUEZ MAURICE

MEXICO, D. F.

1987



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

1. INTRODUCCION	4
2. METODOS CONVENCIONALES DE PRODUCCION DE VACUNAS VIRALES	7
2.1 VACUNA ANTIPOLIOMIELITICA	8
2.2 VACUNA ANTISARAMPIONOSA	14
2.3 VACUNA ANTIRRABICA	19
2.4 VACUNA ANTI-HEPATITIS B	29
3. AVANCES CIENTIFICOS Y TECNOLOGICOS	34
3.1 VACUNA ANTIPOLIOMIELITICA	35
3.2 VACUNA ANTISARAMPIONOSA	43
3.3 VACUNA ANTIRRABICA	48
3.4 VACUNA ANTI-HEPATITIS B	53
4. DISCUSION	61
5. RESUMEN	66
6. CONCLUSIONES	70
7. BIBLIOGRAFIA	73
8. ANEXO	84
8.1 NORMAS PARA LA VACUNA ANTIPOLIOMIELITICA INACTIVADA	85
8.2 NORMAS PARA LA VACUNA ANTIPOLIOMIELITICA ORAL	88
8.3 NORMAS PARA LA VACUNA ANTISARAMPIONOSA VIVA	93
8.4 NORMAS PARA LA VACUNA ANTIRRABICA DE USO HUMANO	97
8.5 NORMAS PARA LA VACUNA ANTI-HEPATITIS B	101
8.6 CELULAS DIPLOIDES HUMANAS	106
8.7 NORMAS PARA CELULAS DIPLOIDES HUMANAS UTILIZADAS EN LA PRODUCCION DE VACUNAS VIRALES	108

1. INTRODUCCION

Desde que Edward Jenner introdujo hace casi dos siglos el empleo de una vacuna por primera vez (65), la tecnología de producción de las vacunas virales ha evolucionado considerablemente para lograr el desarrollo de productos cada vez más eficaces, seguros y económicos.

Debido a que existe un gran número de enfermedades virales prevenibles por vacunación, sería muy extenso tratar de describir los avances científicos y tecnológicos para cada una de ellas; por tanto, en el presente trabajo se han seleccionado las vacunas antipoliomielítica y antisarampionosa, las cuales son vacunas para las que la Organización Mundial de la Salud recomienda aplicación prioritaria en el Programa Ampliado de Inmunizaciones (112); así como las vacunas antirrábica (para uso humano) y anti-hepatitis B, las cuales han presentado avances de gran importancia respecto a los procesos de producción.

Para efectuar el estudio de los avances científicos y tecnológicos que han sufrido los procesos de producción de vacunas virales, es necesario realizar una revisión de los métodos que existen actualmente, tanto de los procesos convencionales como de los novedosos, así como de los problemas que se han encontrado en ellos para comprender el enfoque que se ha dado a la tecnología del futuro.

Un aspecto importante en la producción de vacunas, así como en todos los productos biológicos empleados en el hombre, es que deben ser sometidas a rigurosas pruebas para comprobar su inocuidad. Existen normas de la Organización Mundial de la Salud para sustancias biológicas en relación con cada vacuna de uso generalizado. Las normas comprenden tres secciones:

- a) Materiales iniciales
- b) Proceso de producción
- c) Producto final.

A medida que se han desarrollado cambios tecnológicos en los procesos de producción de vacunas, se han introducido también normas complementarias o diferentes a las propuestas inicialmente. En el anexo se presenta un resumen de las normas más recientemente publicadas por el Comité de Expertos de la Organización Mundial de la Salud, para las vacunas antipoliomielítica, antitarampionosa, antirrábica y antihepatitis-B (102,104, 105, 106, 107, 108, 109). En el futuro, la posible elaboración de vacunas mediante la aplicación de la Ingeniería Genética, hará necesario revisar estas Normas y actualizarlas periódicamente de acuerdo con los avances técnicos en materia de fabricación e inspección (99,111).

**2. METODOS CONVENCIONALES DE
PRODUCCION DE VACUNAS VIRALES.**

2.1 VACUNA ANTIPOLIOMIELITICA.

Hace más de treinta años, la National Foundation for Infantile Paralysis de los Estados Unidos de Norteamérica, en un intento por llegar a desarrollar una vacuna contra la poliomielitis, comisionó a J. Salk para trabajar en la elaboración de una vacuna de virus inactivados, y a A. Sabin para desarrollar una vacuna de virus vivos atenuados (34). Ambos investigadores desarrollaron los dos tipos de vacunas contra la poliomielitis utilizadas actualmente. Los procesos convencionales de producción de ambas vacunas, los cuales se describen a continuación, emplean cultivos de células renales de mono para la propagación de las cepas de poliovirus. Recientemente, la adaptación de las cepas virales al crecimiento en líneas celulares continuas en cultivos con microcarreadores como soportes para el crecimiento celular, ha permitido la producción en gran escala de la vacuna antipoliomielítica inactivada, así como el empleo de cultivos de células diploides humanas ha sido un avance importante en la producción de vacuna antipoliomielítica de virus vivos atenuados (50, 57, 83, 87).

2.1.1 Vacuna antipoliomielítica de virus inactivados.

La producción de la vacuna se basa en el sistema de siembra por lotes, y tradicionalmente se han utilizado cultivos de células renales de mono para la propagación de los virus. Las cepas de polio virus que se utilizan son las siguientes: Mahoney, del tipo 1; MEF, del tipo 2 y Saukett, del tipo 3; las cuales se propagan por separado (45).

En la figura 1 se presenta el diagrama de flujo del proceso de producción de la vacuna. Para preparar los cultivos celulares se extraen los riñones de monos que hayan pasado satisfactoriamente un periodo de cuarentena. Los riñones se descapsulan, se cortan y se tripsinizan en un aparato de tripsinización de flujo continuo durante 3 a 4 horas, empleando solución de tripsina al 0.25%. Las células tripsinizadas se levantan con solución de Hanks y se ajusta su concentración a 600 000 células/ml de solución de Hanks.

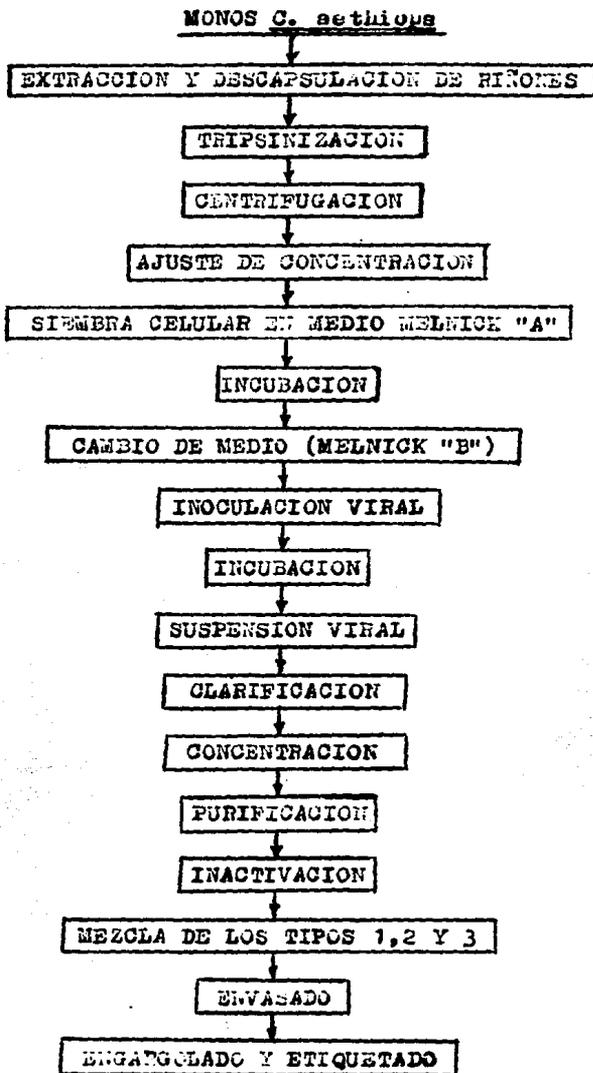


FIGURA 1. PROCESO DE PRODUCCION DE VACUNA ANTIPOLIOMIELITICA DE VIRUS INACTIVADOS EN CULTIVOS CELULARES DE RIÑON DE MONO.

Se procede a la siembra celular en medio Melnick "A", y los cultivos celulares se incuban a 36°C durante 5 días, al final de los cuales se elimina el medio de cultivo, cambiándolo por medio Melnick "B".

Los cultivos celulares se inoculan por separado con cada uno de los tres tipos de poliovirus mencionados anteriormente y se incuban a 36°C. Cuando el efecto citopático es completo, cada suspensión viral se concentra por ultrafiltración y se purifica haciendo pasar la suspensión a través de una columna de intercambio iónico (DEAE) o a través de una columna de ADNasa inmovilizada o de una columna de inmunoadsorción (104).

A más tardar 72 horas después de la filtración, se efectúa el proceso de inactivación, el cual consiste en incubar las mezclas monovalentes en solución de formalina 1:1000, a una temperatura de 37°C durante 12 a 14 días. Una vez que los virus se han inactivado, se procede a la mezcla de las suspensiones para preparar la vacuna trivalente, la cual se envasa en frascos ampula de vidrio incoloro y transparente. En la tabla 1 se presentan las características generales de la vacuna antipoliomielítica tipo Salk (95).

FORMULA:	Cada dosis contiene (U. de antígeno D):
	Poliovirus tipo 1 40 unidades
	Poliovirus tipo 2 8 unidades
	Poliovirus tipo 3 32 unidades
DOSIS:	1.0 ml
VIA DE ADMON.:	Subcutánea
PRESENTACION:	Frasco-ampula de 1 ó 5 dosis
CONSERVACION:	En refrigeración, entre 2 y 8°C. Evitar la congelación.

TABLA 1. CARACTERISTICAS GENERALES DE LA VACUNA ANTIPOLIOMIELITICA DE VIRUS INACTIVADOS.

La vacunación con vacuna de poliovirus inactivados ha sido practicada continuamente desde el decenio de 1950 solamente en Finlandia, Islandia, Holanda y Suecia (13) pues aunque la vacuna es altamente estable y no causa reacciones adversas, se administra por vía parenteral, lo cual es una desventaja en comparación con la vacuna de virus vivos atenuados, la cual se administra por vía oral, permitiendo por tanto mayor facilidad para su aplicación en los programas de inmunización masiva.

2.1.2 Vacuna antipoliomielítica de virus vivos atenuados.

La vacuna tipo Sabin se prepara mediante el sistema de siembra por lotes. Las cepas de poliovirus utilizadas son las siguientes: LSc, 2ab del tipo 1; P712, ch, 2ab del tipo 2 y Leon, 12a, b del tipo 3 (45); las cuales se propagan por separado en cultivos primarios de mono del género Cercopithecus. En la figura 2 se muestra el diagrama de flujo del proceso.

Para preparar los cultivos celulares, se efectúa el proceso descrito en el capítulo 2.1.1., empleando también medio de cultivo de Earle adicionado de hidrolizado de lactosalbúmina y de 0.4% de glucosa. Los cultivos celulares se inoculan por separado con cada uno de los tres tipos de poliovirus y se incuban a una temperatura comprendida entre 33 y 35°C.

Cuando el efecto citopático es completo, lo cual ocurre entre 48 y 72 horas después de la inoculación, se efectúa la cosecha de los virus, para lo cual los cultivos se someten a un ciclo de congelación-descongelación y se reúnen los fluidos.

Estos fluidos se mezclan, se clarifican por filtración simple y la vacuna trivalente se envasa en frascos ampula. En la tabla 2 se encuentran resumidas las características generales de la vacuna antipoliomielítica tipo Sabin (40, 105).

FORMULA:

Cada dosis contiene (DICT₅₀):

Poliovirus tipo 1	10 ^{6.0}
Poliovirus tipo 2	10 ^{5.0} -10 ^{5.3}
Poliovirus tipo 3	10 ^{5.3} -10 ^{5.7}

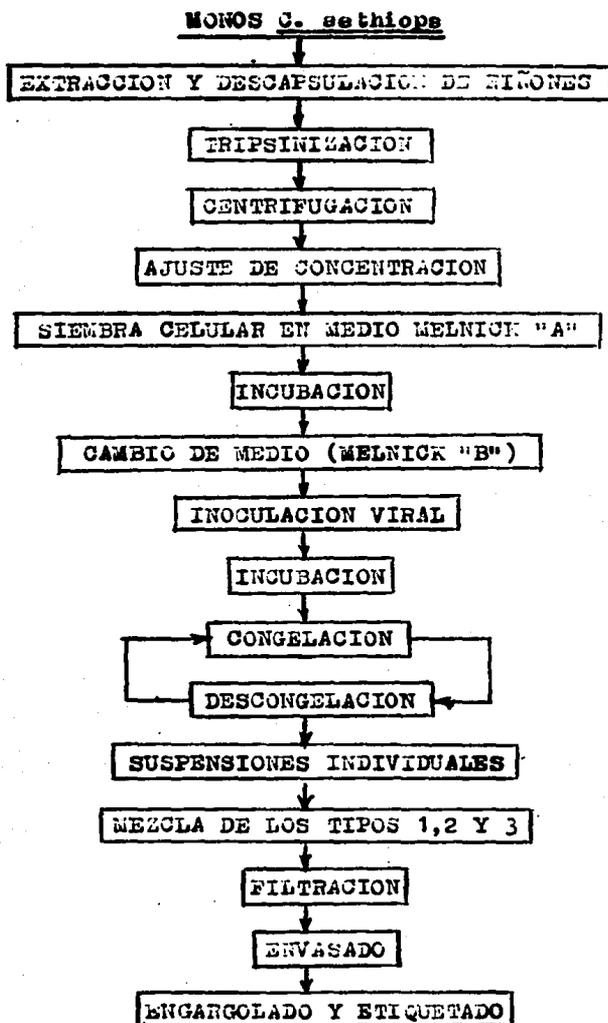


FIGURA 2. PROCESO DE PRODUCCION DE VACUNA ANTIPOLIOMIELITICA DE VI -
RUS VIVOS ATENUADOS EN CULTIVOS CELULARES DE RIÑON DE MONO.

DOSIS:	Tres dosis de 0.2 ml cada una, con intervalos de dos a tres meses.
VIA DE ADMON.:	Oral.
PRESENTACION:	Frasco con gotero calibrado, con 25 dosis.
CONSERVACION:	En refrigeración, entre 2 y 10°C.

TABLA 2. CARACTERISTICAS GENERALES DE LA VACUNA ANTIPOLIOMIELITICA DE VIRUS VIVOS ATENUADOS.

Esta vacuna ha probado ser inocua, eficaz y de fácil aplicación durante los programas de inmunización masiva, por lo cual se utiliza en la mayoría de los países del mundo (40,112). Sin embargo es menos estable que la vacuna tipo Salk, e incluso en algunos países tropicales o semi-tropicales se ha detectado una respuesta baja de anticuerpos a vacunas tipo Sabin aparentemente activas (111,145). En niños que por alguna razón presenten inmunodeficiencia, no se recomienda la administración de vacuna antipoliomielítica de virus vivos atenuados(80).

2.2 VACUNA ANTISARAMPIONOSA.

Las primeras vacunas contra el sarampión introducidas al mercado fueron del tipo inactivado, sin embargo, en la década de los cincuenta fracasó su uso debido a que durante el proceso de inactivación con éter Tween y formol se destruía la proteína de fusión del virus, y por tanto la vacuna no estimulaba una respuesta inmune a dicho componente. Está comprobado que los anticuerpos dirigidos contra la proteína de fusión del virus impiden que la enfermedad se propague, por lo que con las vacunas inactivadas sólo se induce una inmunidad transitoria, provocándose reacciones de hipersensibilidad retardada en el caso de exposición al sarampión natural (111).

Por lo tanto, la vacuna antisarampionosa de uso generalizado es la de virus vivos atenuados. La primera vacuna de este tipo, la Edmonston B desarrollada por Enders (115), produjo respuesta de formación de anticuerpos y protección de los individuos vacunados excelentes, sin embargo, las reacciones clínicas debidas a la vacunación (fiebre elevada y exantema), limitaron la aceptación de la vacuna por parte de los pacientes y los médicos(154). Posteriormente, se hicieron investigaciones tendientes a encontrar virus sarampionosos más a tenuados. La mayor parte de las cepas empleadas en la fabricación de vacunas se han derivado de la cepa Edmonston, y han sido adaptadas a diversos medios de cultivo con objeto de obtener cepas que permitan producir vacunas de virus vivos atenuados con gran poder inmunogénico, que no causen reacciones adversas. En la figura 3 se presentan las cepas derivadas de la cepa Edmonston.

Tradicionalmente, la vacuna antisarampionosa se ha producido propagando el virus en cultivos de fibroblastos de embrión de pollo, y en muchos países, entre los que se encuentran Estados Unidos de América, Italia y Reino Unido, aún se utilizan estas vacunas(95). Sin embargo el virus ha sido adaptado a una gran diversidad de cultivos, como son: cultivos celulares de embrión de perdiz, cultivos de células renales de ternero o de mono y cultivos de células diploides humanas. El cultivo en estas últimas, corresponde a la tendencia actual(135) para la producción de la vacuna, y se describirá posteriormente. en el capítulo 3.2. En la tabla 3 se presentan las principa

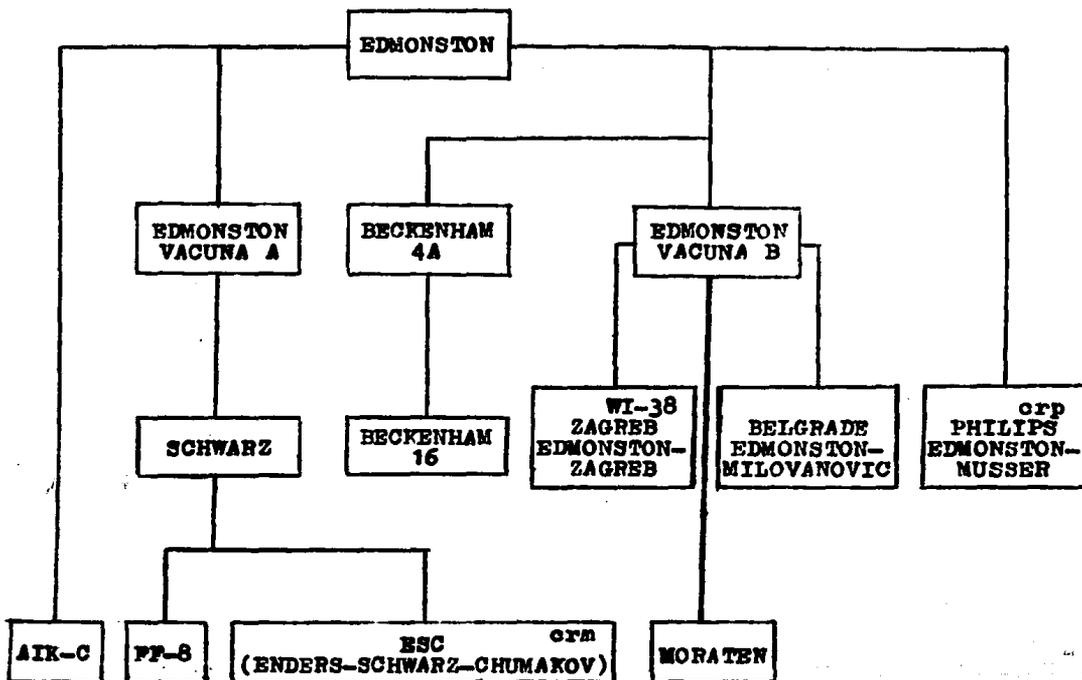


FIGURA 3. CEPAS DE VIRUS DE SARAMPION DERIVADAS DE LA CEPA EDMONSTON.

NOTA: Todas las cepas se cultivan en fibroblastos de embrión de pollo, excepto las indicadas con las siguientes abreviaturas:
 WI-38= células diploides humanas
 crp= células renales de rato
 crm= células renales de mono.

las cepas y los cultivos celulares a los cuales se han adaptado para la producción de la vacuna contra el sarampión.

CEPA	CULTIVO CELULAR AL QUE SE HA ADAPTADO	PAIS
Schwarz		E.U.A., Japón
Moraten	Células de embrión de pollo	E.U.A.
Shanghai-191		China
Toyoshima		Japón
Leninrad-16	Células de embrión de perdiz	U.P.S.S.
Sugiyama	Células de riñón de ternero	Japón, Irán
Zagreb		Yugoslavia
AIK	Células diploides humanas MRC-5	Irán
E-2		México

TABLA 3. PRINCIPALES CEPAS EMPLEADAS PARA LA PRODUCCION DE VACUNAS ANTISARAMPIONOSAS (53, 59, 85, 115, 116, 135, 154).

Para la producción de la vacuna se utiliza el sistema de siembra por lotes. En la figura 4 se presenta el diagrama de flujo del proceso de fabricación utilizando cultivos celulares de embrión de pollo. Para preparar los cultivos, se utilizan embriones de 10 días, los cuales se cortan y se lavan en solución salina isotónica (se eliminan las cabezas, patas, alas y vísceras). Los fragmentos de tejido se colocan en un matraz de tripsinización, se agrega solución de tripsina al 0.25% y se incuban a temperatura ambiente durante 45 minutos con agitación magnética continua. Las células tripsinizadas se lavan con medio de Earle adicionado del 0.5% de lactoalbúmina y se ajusta su concentración a 600 000 células viables por mililitro de medio de cultivo 199 adicionado de 0.5% de suero de terneros (85). Los frascos para la obtención de los cultivos celulares se siembran con esta suspensión y se incuban a 35°C durante 24 a 48 horas, tiempo después del cual se elimina el medio de crecimiento y se adiciona medio 199 a cada frasco.

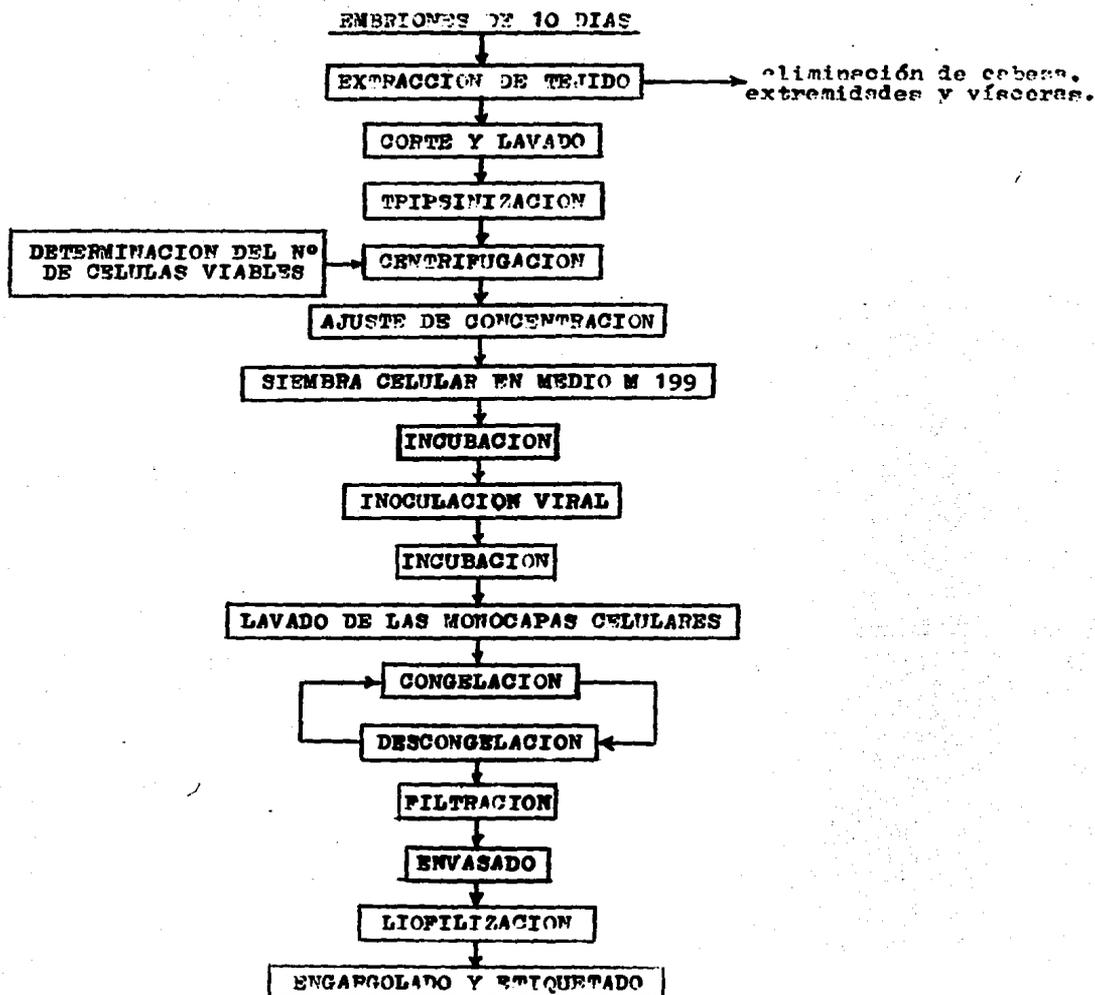


FIGURA 4. PROCESO DE PRODUCCION DE VACUNA ANTISARBANPTOSA EN CULTIVOS CELULARES DE EMBRION DE POLLO.

Cada frasco se inocula con 0.5 ml de la suspensión viral de siembra, y se incuba a la temperatura óptima de la cepa que se emplee. Un día después de la inoculación del virus es importante lavar las monocapas celulares (con medio 199) para eliminar el interferón. En el momento en el cual el efecto citopático es completo, se procede a la cosecha del virus, para lo cual los cultivos se someten a un proceso de congelación-descongelación. Los fluidos se extraen mediante vacío, se reúnen en un solo frasco y se agrega un volumen igual al recolectado de estabilizador de lactosa y ácido gálico. La suspensión, adicionada de celita 0.1%, se clarifica por filtración, se envasa en frascos ampula sábar y se liofiliza(45). En la tabla 4 se presentan las características generales de la vacuna contra el sarampión fabricada por el método convencional(107, 131).

FORMULA:	Cada frasco contiene: Vacuna antisarampiónosa producida en cultivos celulares de embrión de pollo, con 1000 DICT ₅₀ .
DOSIS:	Unica de 0.5 ml.
VIA DE ADMON.:	Subcutánea.
PRESENTACION:	Frasco ampula con suspensión inyectable liofilizada para una o diez dosis. El empaque contiene el líquido para la rehidratación.
CONSERVACION:	En refrigeración, entre 2 y 8°C, protegida de la luz.

TABLA 4. CARACTERISTICAS DE LA VACUNA ANTISARAMPIONOSA PREPARADA EN CULTIVOS CELULARES DE EMBRION DE POLLO.

Esta vacuna es altamente eficaz e inocua, sin embargo, en algunos individuos puede producir fiebre moderada y erupción después de 8 a 12 días de la vacunación (112).

2.3 VACUNA ANTIRRABICA.

Para la producción de vacuna antirrábica se han desarrollado diversos métodos, los cuales, aunque básicamente consisten de las mismas etapas, han presentado avances de gran importancia respecto al desarrollo de nuevas cepas, en los métodos de inactivación del virus y, especialmente en cuanto a los medios utilizados para la propagación del virus. Por otra parte, el desarrollo de vacunas subunitarias contra la rabia se encuentra aún en etapa de experimentación. Los avances logrados en el campo de la Ingeniería Genética para la producción de estas nuevas vacunas, serán descritos en el capítulo 3.3.

1. Cepas.

La mayor parte de las cepas empleadas para la producción de la vacuna antirrábica, se han derivado del virus original de Pasteur (VP), aunque también se han utilizado otras aisladas del hombre o de animales. Las cepas deben limitarse a lo que se denomina una cepa "fija" de virus (106), la cual se caracteriza por tener un periodo de incubación corto, estable y reproducible cuando se inyecta por vía intracerebral en animales idóneos.

En la tabla 5 se presentan las principales cepas que satisfacen los requisitos especificados de actividad, inocuidad e identidad.

CEPA	MEDIO DE PROPAGACION
Pasteur (VP)	Cerebro de conejo adulto.
Fuenzalida: CVS 241/4 51-123/A 91-122	Cerebro de ratón lactante.
Pitman-Moore (PM)	Cerebro de ratón, huevos embrionados de pato y células diploides humanas WI-38.
Vnukovo-32	Cultivos celulares de riñón de hámster
CTN 1T Zinan-1	Células diploides humanas.

TABLA 5. CEPAS DEL VIRUS DE LA RABIA UTILIZADAS EN LA PRODUCCION DE DIFERENTES VACUNAS ANTIRRABICAS PARA USO HUMANO.

2. Métodos de inactivación.

Puesto que la Organización Mundial de la Salud (98) ha establecido que en el hombre no se emplearán vacunas antirrábicas que contengan virus vivos, es necesario utilizar un método adecuado de inactivación, para lo cual se han utilizado agentes químicos y físicos(106).

a) Agentes químicos.

La suspensión vírica se deja en contacto con un agente químico adecuado durante varios días a temperatura ambiente hasta obtener la inactivación completa del virus. Se han utilizado satisfactoriamente los siguientes agentes químicos:

-Fenol, en concentración de 0.5 a 1.0%.

-Beta-propiolactona, en concentración de 1:3500 a 1:5000.

El tiempo de incubación requerido es relativamente largo (uno o varios días), lo cual puede deteriorar los componentes antigénicos del virus.

b) Agentes físicos.

La suspensión del virus se expone a radiación ultravioleta utilizando un esterilizador de flujo continuo(48) durante algunos minutos hasta obtener la inactivación completa del virus. Este método permite conservar prácticamente intactas las fracciones antigénicas del virus, además de que el tiempo necesario para lograr la inactivación es breve comparado con el que se requiere cuando se emplean métodos químicos. Sin embargo, el equipo requerido es costoso, lo cual limita la utilización del método.

3. Medios de propagación del virus.

El desarrollo de la tecnología de producción de vacuna antirrábica ha residido fundamentalmente en el empleo de diferentes medios de propagación viral(129). Originalmente se utilizó el tejido nervioso de animales vivos, obteniéndose vacunas eficaces. Sin embargo, la incidencia de reacciones secundarias llevó a buscar nuevas alternativas, surgiendo así las vacunas producidas en huevos embrionados de pato, y más recientemente, en cultivos celulares(6,47). La vacuna producida en cultivos celulares, la cual será analizada en el capítulo 3.3, presenta grandes ventajas sobre las producidas empleando los métodos convencionales descritos en el presente capítulo.

a) Tejido nervioso de animales adultos (Vacuna tipo Semple).

Las vacunas preparadas en tejido nervioso de animales adultos, se obtienen inoculando el virus rábico en el cerebro de ovejas, cabras o conejos adultos. En la figure 5 se presenta el diagrama de flujo del proceso de producción.

El virus de siembra consiste en una suspensión al 10% de encéfalos infectados con el virus Pasteur, en agua destilada estéril. Para la fabricación de la vacuna se inoculan 0.25 ml de una dilución 10^{-3} del virus de siembra, a cada animal, por vía intracerebral. Los animales se mantienen en observación durante un periodo de 4 a 7 días, tiempo después del cual se sacrifican en el momento en el cual presenten parálisis total, mediante una inyección de aire (aproximadamente 20 ml) en la vena marginal de la oreja(137).

Inmediatamente después, se procede a la cosecha del virus, para lo cual se extraen los encéfalos y se prepara una suspensión al 40% en solución salina isotónica estéril adicionada de 0.5% de fe nol. El tejido se homogeneiza y se incuba a una temperatura comprendida entre 20 y 30°C durante 76 horas con agitación, hasta lograr la completa inactivación del virus. Posteriormente se prepara una dilución al 20% de tejido y se adiciona tiomersal en concentración de 1:10000. La suspensión se clarifica por filtración y se envasa en frascos ampula. La vacuna puede liofilizarse (138).

La producción de vacunas antirrábicas a partir de tejido nervioso de animales adultos se ha abandonado en estos últimos años en países como Alemania, Bulgaria y Checoslovaquia entre otros (98), debido a que estas vacunas tienen el inconveniente de que para su administración se requiere de un gran número de dosis y tienden a provocar encefalitis o reacciones locales adversas ya que contienen factores neuroparalíticos como la mielina. Además, para la manutención y el manejo de los animales se requiere de espaciosas construcciones, gastos de alimentación y numeroso personal.

En la table 6 se presentan las características generales de la vacuna antirrábica preparada en cerebro de animales adultos.

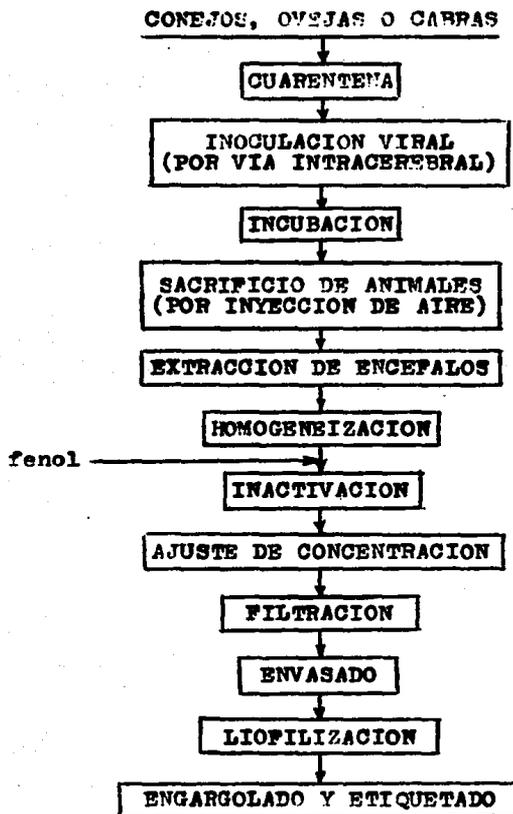


FIGURA 5. PROCESO DE PRODUCCION DE VACUNA ANTIRRABICA EN TEJIDO NERVIOSO DE ANIMALES ADULTOS.

FORMULA:	Suspensión al 5% de tejido cerebral de conejos, ovejas o cabras, infectados con virus rábico fijo. Contiene fenol al 0.25% y tiomersal 1:10000
DOSIS:	Se administran de 14 a 21 inyecciones de 2 ml cada una(una diaria).
VIA DE ADMON.:	Subcutánea.
PRESENTACION:	Frasco ampula con 14 dosis.
CONSERVACION:	En refrigeración, entre 2 y 8°C.

TABLA 6. CARACTERISTICAS GENERALES DE LA VACUNA ANTIRRABICA TIPO SEMPLI.

b) Tejido nervioso de animales recién nacidos (Vacuna tipo Fuenzalida).

Para reducir el riesgo que presentan las sustancias neuroparalíticas presentes en el cerebro de los animales adultos, se introdujo el empleo de tejido nervioso de animales recién nacidos, en los cuales la concentración de dichas sustancias es mínima. Principalmente se han utilizado ratones lactantes (39), pero también pueden emplearse ratas, conejos, corderos o cricetos recién nacidos (42,47,62). En la figura 6 se presenta el diagrama de flujo del proceso de producción.

La fabricación se basa en el sistema de siembra por lotes. Los lotes de siembra consisten en una suspensión al 20% de encéfalos de ratones adultos previamente inoculados con el virus rábico, en agua bidestilada estéril. A partir de un lote de siembra, se prepara el inóculo, el cual contiene 100 DE₅₀, suero equino al 2%, 200 UI de penicilina y 200 microgramos de estreptomina por cada mililitro de agua bidestilada. Cada uno de los ratones (de cuatro días de edad) se inyecta con 0.01 ml del inóculo por vía intracerebral. Los animales se mantienen en observación durante un periodo de 92 a 96 horas, tiempo después del cual se sacrifican colocándolos en un recipiente hermético con un algodón impregnado con éter o cloroformo(45).

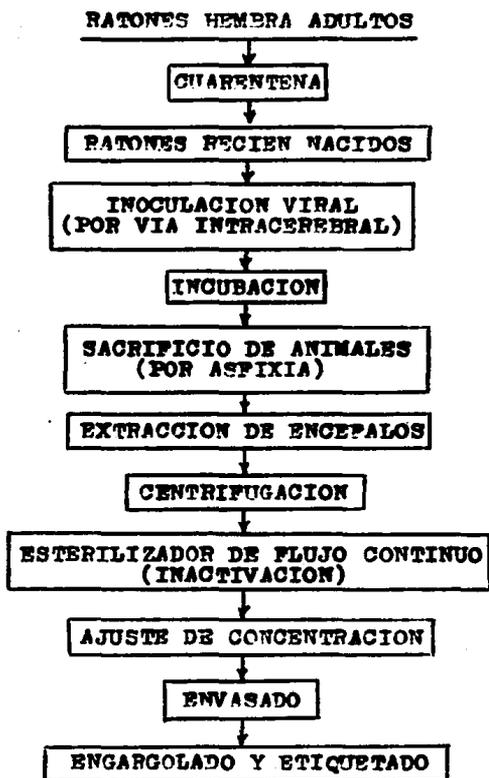


FIGURA 6. PROCESO DE PRODUCCION DE VACUNA ANTIRRABICA EN
TEJIDO NERVIOSO DE ANIMALES RECIENTE NACIDOS.

Inmediatamente después se procede a la cosecha del virus, para lo cual se extraen los encefalos y se prepara una suspensión al 10 % en agua bidestilada estéril fría, la cual se centrifuga durante 10 minutos a 2500 rpm. El sobrenadante se afora con agua bidestilada para restituir el volumen original. La suspensión se diluye al 5% y se procede a la inactivación del virus mediante radiación ultravioleta utilizando un esterilizador de flujo continuo (38,48). Posteriormente la suspensión se diluye al 1% y se adicionan fenol 1:1000 y tiomersal 1:10000. La vacuna se envasa en frascos ampula, con agitación continua.

Esta vacuna se emplea en muchos países, entre los cuales se encuentra el nuestro (6,95) sin que se tengan reportes de reacciones adversas debidas a su administración (98). En la tabla 7 se presentan las principales características de la vacuna antirrábica preparada en cerebro de ratón lactante.

FORMULA:	Suspensión al 1% de tejido cerebral de ratones lactantes infectados con virus rábico fijo. Contiene 0.1% de fenol y 0.01% de tiomersal.
DOSIS:	Catorce (una dosis) de 1 ml cada una.
VIA DE ADMON.:	Subcutánea.
PRESENTACION:	Frasco ampula con 14 dosis.
CONSERVACION:	En refrigeración, entre 2 y 8 °C.

TABLA 7. CARACTERISTICAS DE LA VACUNA ANTIRRABICA TIPO FUENZALIDA.

c) Huevos embrionados de pato.

Como otra alternativa para evitar las reacciones adversas producidas por las vacunas preparadas en tejido nervioso de animales, surgió el empleo de huevos embrionados de ave como medio de propagación viral. Para la fabricación de la vacuna se utilizan huevos embrionados de pato incubados brevemente (7 días) a una temperatura de 38°C. En la figura 7 se muestra el diagrama de flujo del proceso.

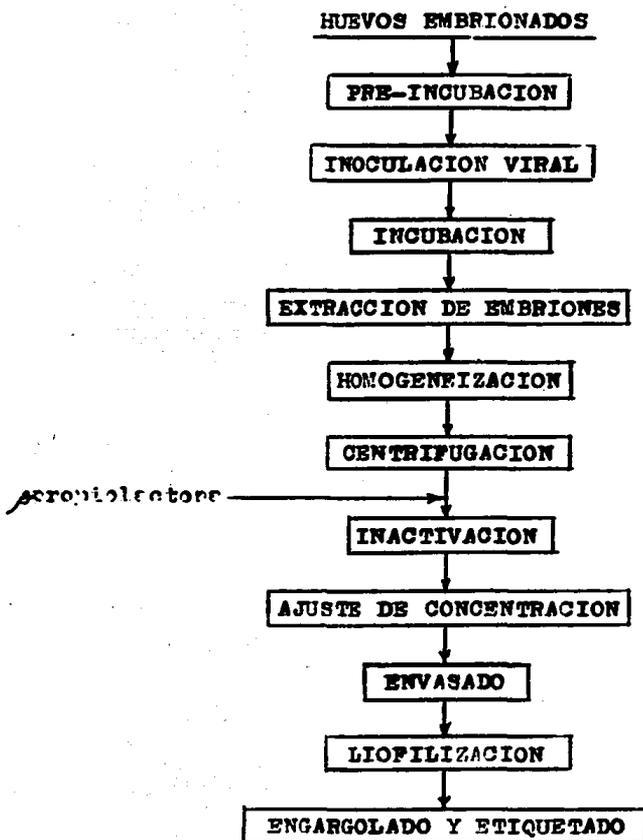


FIGURA 7. PROCESO DE PRODUCCION DE VACUNA ANTIRRABICA EN HUEVOS EMBRIONADOS DE PATO.

El virus de siembra consiste en una suspensión clarificada al 33% de tejido de embrión de pato infectado con la cepa Pitman Moore de virus rábico, en solución de Hanks adicionada de estreptomycin y cloranfenicol (Ver anexo).

Los huevos embrionados se inoculan con 0.5 ml cada uno de una dilución 10^{-1} del virus de siembra, y se incuban a 36.5°C durante 10 días, manteniendo la humedad de la incubadora entre 60 y 70% de humedad relativa. Posteriormente se realiza la cosecha del virus, para lo cual se extraen los embriones intactos, se homogeneizan en un medio estabilizador con cisteína, lactosa y gelatina (ver anexo) y se prepara una suspensión al 33% en este mismo medio. La suspensión se clarifica mediante centrifugación en frío (4°C), a una velocidad de 2600 rpm durante 30 minutos, y después se adiciona una solución de betapropiolactona 1:2500 y se incuba a 36°C durante 2 horas, hasta la completa inactivación del virus (56). La vacuna, adicionada con tiomersal 1:10000, se envase en frascos ampula y se liofiliza. Las características generales de la vacuna antirrábica preparada en huevos embrionados de pato, se muestran en la tabla 8.

FORMULA:	Suspensión al 3% de tejido embrionario de pato infectado con virus rábico fijo inactivado con betapropiolactona 1:2500. Contiene tiomersal 1:10000.
DOSIS:	De 14 a 21 inyecciones de 1 ml cada una (una diaria), y 2 refuerzos a los 10 y 20 días después de la última aplicación.
VIA DE ADMON.:	Subcutánea.
PRESENTACION:	Frasco ampula con 7 dosis de vacuna liofilizada.
CONSERVACION:	En refrigeración, entre 2 y 8°C .

TABLA 8. CARACTERISTICAS DE LA VACUNA ANTIRRABICA PREPARADA EN HUEVOS EMBRIONADOS DE PATO.

Las vacunas preparadas en embrión de pato casi no se utilizan porque además del riesgo alérgico debido a las proteínas del huevo, la vacuna es poco inmunogénica y no produce de manera constante una concentración adecuada de anticuerpos neutralizantes en el hombre. Por lo tanto, en algunos países como Estados Unidos de Norteamérica, la producción de vacuna antirrábica en embrión de pato se reemplazó desde el año de 1981 (124,125) por la fabricación en cultivos de células diploides humanas (175), proceso que será descrito en el capítulo 3.3.

2.4 VACUNA ANTI-HEPATITIS B.

En el año de 1971, Krugman y asociados (109,157), haciendo uso del conocimiento de que el "antígeno Australia" descubierto en el suero de un aborigen australiano y la demostración ulterior de que ese antígeno es en realidad el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B, preparó por primera vez una vacuna para prevenir la enfermedad. El procedimiento, consistente en someter a calentamiento suero infeccioso de portadores de la hepatitis B, es un proceso totalmente nuevo en el campo de la producción de vacunas (125).

Aunque la vacuna utilizada por Krugman no estaba normalizada ni completamente inactivada, sí produjo anticuerpos contra el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B en humanos, confiriéndoles inmunidad contra la enfermedad a las personas inoculadas que fueron sometidas a prueba (109).

Estudios posteriores llevaron a la preparación de vacunas de diversos grados de pureza y perfeccionamiento técnico. El componente esencial de las vacunas desarrolladas es el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B, ya que se ha comprobado que este antígeno es el único que puede suscitar una inmunidad protectora contra la enfermedad (110). Dicho antígeno, es una proteína que puede presentarse en forma glicosilada (con masa molecular de 28000 daltons) o no glicosilada (24000 daltons), y se encuentra predominantemente en forma de partículas esféricas de 20 a 22 nm de diámetro y tubulares (150). El antígeno de superficie posee un determinante antigénico común "a" y, por lo general, al menos dos subdeterminantes mutuamente excluyentes "d" o "y" y "w" o "r" (81).

En la figura 8 se presenta el diagrama de flujo del proceso de producción de la vacuna. Las materias primas para la fabricación se obtienen de sangre o plasma donados por personas que hayan padecido la enfermedad, y que en el momento de la donación se encuentren en buen estado de salud y presenten resultados de las pruebas de función hepática dentro de los normales (109).

Los plasmas que hayan pasado satisfactoriamente las pruebas de esterilidad y de determinación del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B, se someten a numerosas pruebas para determinar la presencia de microorganismos patógenos y de meta-

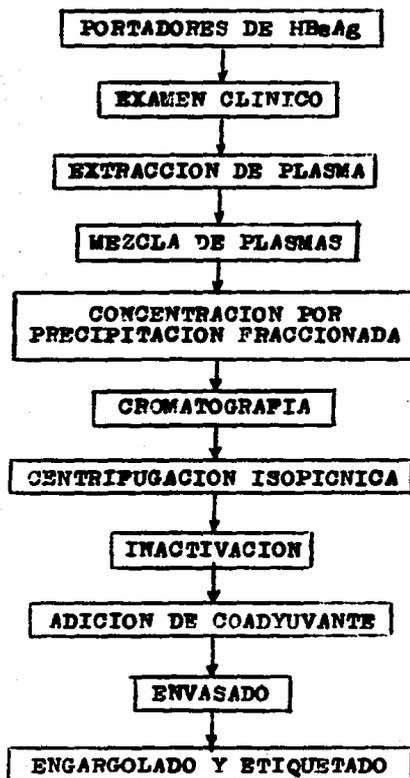


FIGURA 8. PROCESO DE PRODUCCION DE VACUNA ANTI-HEPATITIS B A PARTIR DE SANGRE HUMANA.

rial genético residual del virus de la hepatitis B (ver anexo). Posteriormente, la mezcla de plasma se concentra mediante precipitación fraccionada con sulfato de amonio y polietilenglicol, y se purifica por cromatografía y centrifugación isopícnica sucesiva y zonal. (109).

El antígeno de superficie del virus de la hepatitis B, una vez concentrado y purificado, se inactiva utilizando alguno de los siguientes métodos:

- a) Tratamiento químico, para lo cual se han empleado los siguientes agentes, o combinaciones de ellos: urea (8 mol/l), pepsina (3 U.I.) y formalina (1:4 000).
- b) Separación física, mediante centrifugación zonal a través de cloruro de cesio, de sacarosa o con bromuro de potasio, y un tratamiento químico ulterior.
- c) Tratamiento físico, mediante calentamiento del antígeno de superficie durante 90 segundos a 104.5°C ó 10 horas a 65°C.

Para asegurar la inactivación de todos los agentes infecciosos detectables en la sangre, en la mayoría de los casos se utilizan combinaciones de los métodos anteriores, siendo las más efectivas las siguientes (109):

1. Centrifugación por zonas a través de cloruro de cesio, seguida de tres procedimientos de tratamiento químico: incubación con pepsina 3 U.I. a 37°C durante 18 horas, con urea 8 mol/l a 37°C durante 4 horas y con formalina 1:4000 a 37°C durante 3 días.
2. Tres operaciones de centrifugación isopícnica por zonas con bromuro de potasio, y después una centrifugación de proporciones zonales a través de sacarosa. A continuación, el antígeno de superficie se calienta a 60°C durante 10 horas y finalmente se incuba con formalina 1:2000 a 37°C durante 4 días.

Una vez que se ha comprobado la inactivación del producto, se procede a la adición de alumbre como coadyuvante, en cantidad

tal, que la concentración máxima de aluminio por cada dosis de producto final sea de 1.25 mg. Finalmente, la vacuna se envasa y se almacena en refrigeración, evitando la congelación. En la tabla 9 se presentan las características generales de la vacuna contra la hepatitis B preparada a partir de plasma humano.

FORMULA:	Cada dosis contiene: 20 μ g de antígeno de superficie del virus de la hepatitis B purificado, 1.25 μ g de alumbre como coadyuvante y tiomersal 10^{-4} como conservador.
DOSIS:	Tres dosis de 1 ml cada una, con intervalos de 1 y 6 meses.
VIA DE ADMON.:	Intramuscular. (La primera aplicación puede ser subcutánea en caso de riesgo de hemorragia).
PRESENTACION:	Frasco ampolla con 3 ml.
CONSERVACION:	En refrigeración, entre 2 y 8 °C, evitando la congelación.

TABLA 9. CARACTERISTICAS DE LA VACUNA ANTI-HEPATITIS B PREPARADA A PARTIR DE PLASMA HUMANO.

Debido a que el plasma utilizado como materia prima para la fabricación de la vacuna puede contener agentes infecciosos con una gran diversidad de características fisicoquímicas y biológicas, es necesario efectuar un examen riguroso de las pruebas aplicadas para la selección de donadores, a las materias primas, a los productos intermedios y a la vacuna terminada, debiendo desecharse todo el material infectado con algún agente patógeno. Un problema que ha empezado a inquietar en lo que respecta al uso de la sangre humana y algunos productos derivados de ésta, ha sido la aparición en proporciones epidémicas del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), enfermedad causada por un virus transmisible a través de fluidos orgánicos (109).

Lo anterior, aunado a la dificultad para conseguir un suministro adecuado en cantidad y calidad de plasma, el lento proceso de fabricación (hasta 65 semanas) y el elevado costo de la vacuna, son desventajas importantes del método de producción (75,111).

Sin embargo, es necesario disponer de una vacuna contra la hepatitis B, principalmente para su aplicación en los grupos de alto riesgo: personal de salud (cirujanos, médicos, dentistas, enfermeras, laboratoristas), pacientes sometidos a tratamientos con hemodiálisis y sus ayudantes, niños cuyas madres adquirieron la enfermedad durante el embarazo, pacientes sometidos a múltiples transfusiones, farmacodependientes adictos a drogas inyectables y personas que habitan en zonas tropicales en las cuales la sanidad es precaria (157). Se calcula que el número de portadores del virus de la hepatitis B en el mundo supera los 200 millones, con la siguiente distribución geográfica (109): 0.1% en América del Norte y Australia, 5% en Europa y en el resto de América, 7.5% en los Estados del Golfo Árabe y hasta 20% en algunas regiones de África y Asia.

El virus de la hepatitis B aún no se ha podido cultivar en medios celulares, y los pequeños animales de laboratorio no son susceptibles a la infección. Sin embargo, se ha demostrado que las proteínas separadas de la cubierta vírica, las cuales contienen el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B, estimulan la producción de anticuerpos protectores en el hombre. En base a lo anterior, se iniciaron estudios fructíferos que actualmente han permitido la preparación de vacunas subunitarias mediante la Ingeniería Genética (86,88,150). Esta tecnología ha venido a revolucionar por completo los métodos convencionales de producción de vacunas virales. La preparación de la vacuna contra la hepatitis B mediante el empleo de esta nueva tecnología se describe en el capítulo 3.4.

3. AVANCES**CIENTIFICOS Y TECNOLOGICOS**

3.1 VACUNA ANTIPOLIOMIELITICA.

En la actualidad existen dos tipos de vacunas contra la poliomielitis: la vacuna tipo Salk de virus inactivados y la vacuna tipo Sabin de virus vivos atenuados. Desde que estas vacunas se introdujeron en la década de los años cincuenta ha habido varios adelantos en las técnicas de fabricación, encaminados a lograr una mayor producción de vacunas de alta calidad al menor costo, las cuales se describen a continuación.

3.1.1 Vacuna antipoliomielítica de virus inactivados.

En lo que respecta a la vacuna tipo Salk, las innovaciones más importantes residen en alguno de los siguientes aspectos (104):

- empleo de diferentes sustratos celulares,
- producción de células en gran escala para propagar el virus,
- grado en el cual la vacuna puede ser purificada actualmente.

Todos estos cambios han estado orientados a producir el máximo rendimiento de células con el fin de propagar los poliovirus para producir vacunas en gran escala. Con este propósito, se han utilizado microcarreadores como soportes para el crecimiento celular, los cuales son pequeñas esferas de material inerte (generalmente dextranas entrecruzadas), sobre las cuales las células crecen formando una monocapa (83). Aunque en la tecnología moderna de cultivo celular empleando microcarreadores, se utilizaron originalmente células renales de monos obtenidas de una colonia de monos criados en cautiverio, el último adelanto ha sido la utilización de una línea celular continua, no tumorigena, como las células Vero (118), las cuales son células de riñón de Mono Verde Africano.

En la figura 9 se presenta el diagrama de flujo para la producción de la vacuna de poliovirus inactivados a escala industrial. Las células Vero, tomadas de una ampollita del Banco celular de fabricación (en el cual se conserva a -70°C todo el material celular obtenido por subcultivos en serie de células procedentes de tejido normal de riñón de Mono Verde Africano), se siembran en un volumen de un litro de medio de cultivo celular de Eagle (24),

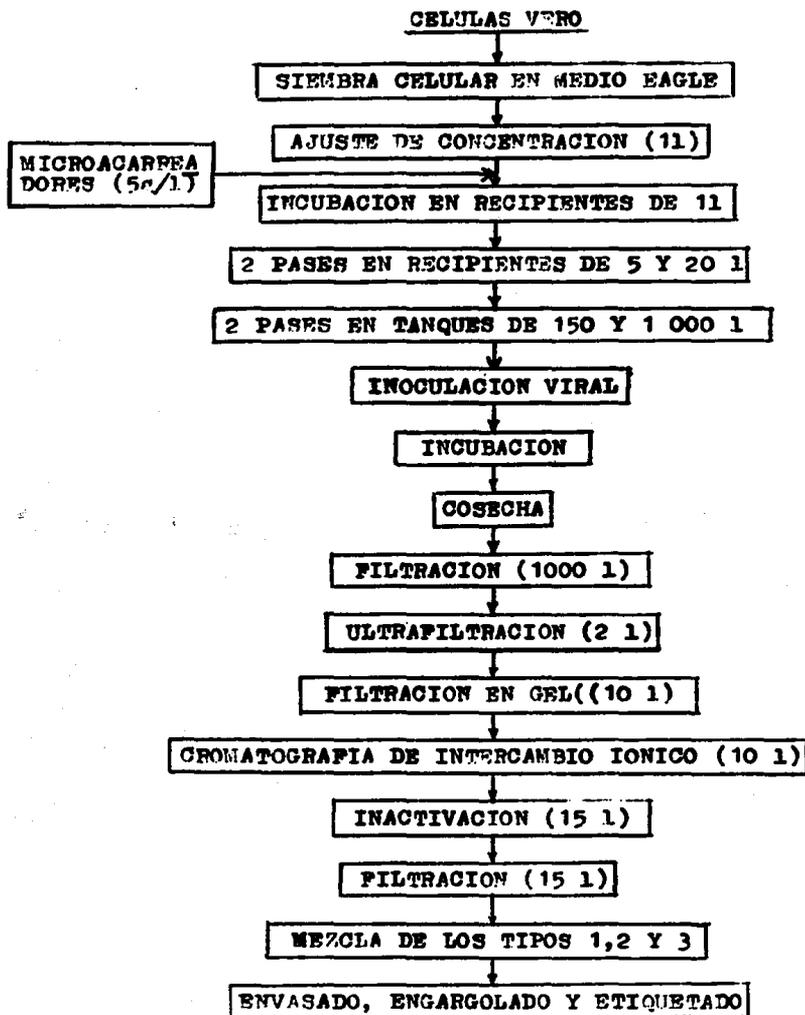


FIGURA 9. PROCESO DE PRODUCCION DE VACUNA ANTIPOLIOMIELITICA DE VIRUS INACTIVADOS EN SIEMBRAS CELULARES (CELULAS VERO).

adicionando de una solución que contiene 0.1mm de aminoácidos no esenciales, 0.2 mM de prolina y serina, 5% de suero fetal de ternera y 9% de suero de ternera recién nacida (ver anexo). La concentración celular inicial se ajusta a 10^8 células Vero/ litro de medio de cultivo y se adicionan los microcarreadores (Cytodex 1), previamente hidratados en solución salina y esterilizados en autoclave (115°C, 15 psi, 15 minutos), en concentración de 5 mg/ml de medio de cultivo (83,87). Los cultivos se incuban a 36°C con agitación suave (60rpm) en un matraz de un litro. Se efectúan pases sucesivos (recambiando constantemente el medio de cultivo) hasta obtener un volumen de cultivo de 20 litros en el tercer pase. Posteriormente, las células se cultivan en un tanque de 150 litros y para el último pase (5°) se utiliza un tanque de 1000 litros, obteniéndose un rendimiento de 1.5×10^{12} células (87,153). Los cultivos celulares se inoculan por separado con cada uno de los tres tipos de poliovirus mencionados en el capítulo 2. 1.1 y se incuban a 36°C. Una vez que se observa efecto citopático total, la suspensión viral se concentra mediante ultrafiltración y se purifica mediante filtración en gel en Sepharose CL-6B, seguida de cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Dextran-Spherosil (87). Posteriormente el virus se inactiva mediante incubación con formalina 1:4000 a 37°C durante 13 días (153), y la vacuna se envasa en frascos ampula de vidrio del tipo 1 (136). En la tabla 1 se presentan las características generales de la vacuna antipoliomielítica inactivada producida en cultivos de células Vero utilizando microcarreadores, las cuales son iguales a las descritas para la vacuna producida por el método convencional.

El empleo de cultivos celulares con microcarreadores tiene muchas ventajas (83), entre las cuales se encuentran principalmente las siguientes:

- a) Elevada capacidad de producción de la vacuna debido a la gran superficie de cultivo, por lo cual además de proporcionar altos rendimientos celulares y virales utilizando relativamente bajos volúmenes de cultivo, se evita el empleo de metodologías tediosas, equipo complicado y grandes áreas destinadas a la fabricación de la vacuna. Estos sistemas de cultivo compactos son especialmente útiles cuando se manejan microorganismos patógenos.

- b) Homogeneidad del sistema de cultivo ya que se pueden controlar fácilmente parámetros tales como osmolaridad, pH, presión de gases, etc, además de que las células muertas pueden separarse fácilmente del cultivo (flotan en la superficie), permitiendo el enriquecimiento con células vivas.
- c) Simplificación del proceso de cosecha debido a que los microcarrieres con las células adheridas en su superficie, sedimentan por gravedad, lo cual evita la utilización de procesos de filtración, centrifugación o prolongados tiempos de sedimentación.
- d) Disminución del riesgo de contaminación, ya que el empleo de microcarrieres requiere de pocos pasos, espacio y material.

La controversia principal de este proceso de producción de la vacuna en gran escala se refiere a la inocuidad de las células Vero que se utilizan, ya que dichas células son generalmente anormales desde el punto de vista cariológico, por lo cual se ha establecido que la vacuna no debe contener macromoléculas biológicamente activas derivadas del sustrato celular, y por lo tanto, los procedimientos de concentración y purificación deben eliminar completamente el ADN celular. En el anexo se presenta un resumen de las pruebas que deben practicarse a las líneas celulares para su empleo como medio de propagación viral en la producción de la vacuna (104, 118).

La vacuna de poliovirus inactivados obtenida por este nuevo proceso es viable a escala industrial y se ajusta a las normas de la O.M.S., por lo cual el método fue autorizado desde 1982 (87).

3.1.2 Vacuna antinoliomielítica de virus vivos atenuados.

En cuanto al proceso de producción de la vacuna tipo Sabin el avance notable consiste en el tipo de sustrato celular empleado para la propagación del virus. Por lo demás, el proceso es básicamente igual al descrito originalmente por el Dr. Sabin (capítulo 2.1.2).

Actualmente se tiende a utilizar cultivos de células de células mu

mas para propagar el virus, en vez de los cultivos de células renales de mono ya que estos últimos presentan grandes inconvenientes:

- a) El escaso suministro de células para preparar los cultivos. El mono Cercopithecus, originalmente encontrado en Africa, fue introducido en el Caribe por marinos mercantes hace unos 300 años, y utilizado posteriormente para la producción de la vacuna antipoliomielítica. Sin embargo, la necesidad de disponer de manera continua de un gran número de monos para la fabricación de la vacuna, ha causado que el suministro de monos sea cada vez menor (151).
- b) Presencia de un gran número de agentes extraños en los monos. Los resultados de la producción de vacuna antipoliomielítica obtenida en cultivos de células renales de mono han puesto de manifiesto que muchos de esos tejidos están contaminados con uno o varios de los siguientes virus símicos: SV40, herpesvirus cercopitécido 1 (virus B), virus "espumoso", virus de Merbugo y virus de la viruela del mono (105). Esto implica pérdidas en la producción, ya que los tejidos contaminados deben ser desechados, además del riesgo existente en el manejo de estas células (11).

Por consiguiente, en la fabricación de vacunas más recientes se ha optado por utilizar cultivos de células diploides humanas, las cuales se obtienen de tejido pulmonar embrionario (50,57). En la figura 10 se presenta el diagrama de flujo del proceso de producción, el cual, como ya se ha mencionado, no difiere mayormente del descrito originalmente por Sabin, excepto por el empleo de diferente cultivo celular. Las células, ya sea de la cepa WI-38 o de la cepa MRC-5, tomadas de una ampollita del Banco Celular de Fabricación (en el cual se conserva a -70°C todo el material celular obtenido por subcultivos en serie de fibroblastos de pulmón humano), se siembran en medio de Eagle (29) adicionado de suero de ternera (ver anexo). La concentración celular se ajusta a 600 000 células/ml y los cultivos se incuban a 37°C durante 6 a 7 días. Posteriormente, los cultivos se inoculan por separado con las tres cepas de polio-

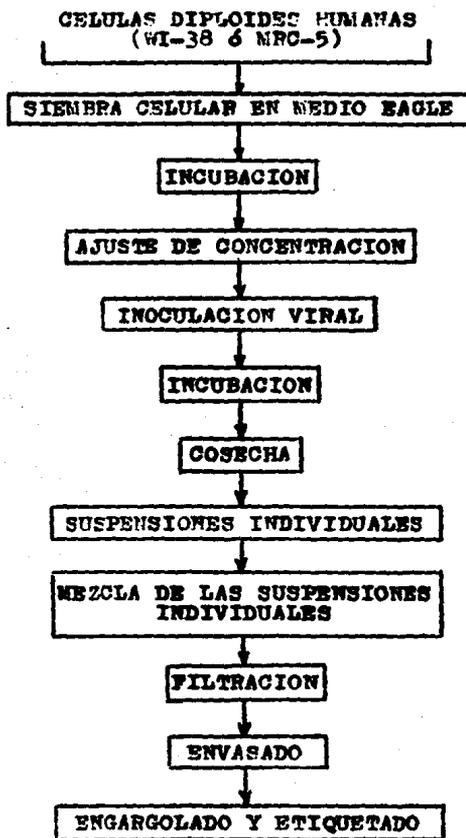


FIGURA 10. PROCESO DE PRODUCCION DE VACUNA ANTIPOLIOMIELITICA DE VIRUS VIVOS ATENUADOS EN CELULAS DIPLOIDES HUMANAS.

virus indicadas anteriormente en el capítulo 2.1.2. y los cultivos celulares se incuban a una temperatura comprendida entre 33 y 35°C. Una vez que el efecto citopático es completo, se procede a cosechar los virus y a preparar la vacuna trivalente tal y como se describió para el método convencional. La vacuna antipoliomielítica de virus vivos atenuados preparada en cultivos de células diploides humanas, presenta las características generales indicadas en la tabla 2. La utilización de células diploides humanas para la fabricación de la vacuna resuelve los problemas asociados con las células renales de mono, ya que son abundantes y exentas de agentes extraños. Además, aportan las ventajas de un sistema de lotes de siembra primario, tanto al sustrato celular como a los virus de siembra, permitiendo la consistencia y estandarización de los cultivos virales durante la fabricación de la vacuna, lo cual es importante para asegurar las condiciones necesarias para mantener la selección del virus atenuado.

Las vacunas antipoliomielíticas de virus inactivados y de virus vivos atenuados analizadas en el presente capítulo, aunque son altamente eficaces, todavía plantean problemas característicos de cada vacuna (155). Esos problemas se podrían eliminar mediante la fabricación de vacunas consistentes en preparaciones purificadas de proteínas o péptidos inmunogénicos (9). Los estudios realizados en este campo han estado enfocados principalmente a los siguientes aspectos:

- a) Biosíntesis de proteínas virales mediante la clonación de una porción del genoma viral en bacterias.

Se ha logrado realizar la síntesis de una de las proteínas de la cápside (VP1) de distintas cepas de poliovirus en bacterias. Sin embargo, los niveles de proteína que se han obtenido han sido demasiado bajos, lo cual es una limitación para la producción de vacunas (2, 92, 122, 123).

- b) Síntesis química de oligopéptidos.

Se han sintetizado químicamente péptidos de diferentes regiones de la proteína de la cápside VP1. Los experimentos preliminares indican que algunos de estos oligopéptidos, unidos a una proteína portadora, son aparentemente más inmunogénicos

que una masa equivalente de la proteína VP1 aislada del virus, estimulan la producción de anticuerpos neutralizantes, y protegen contra la inoculación del virus a animales de laboratorio (31, 111, 155).

c) Mutagénesis dirigida.

Se ha determinado la secuencia completa de nucleótidos y la de polipéptidos de los tres tipos de poliovirus que se emplean en la fabricación de la vacuna tipo Sabin (2,92,111). El conocimiento de la relación existente entre la estructura del genoma viral y su función biológica, permite la construcción de nuevas cepas vacunales que no recuperen su virulencia, para lo cual se emplean métodos basados en la supresión de la información genética. En el futuro, se planea la realización de experimentos en los cuales el ARN de los poliovirus quede mutagenizado para generar mutantes de poliovirus con alteraciones específicas en el genoma. La existencia de esas mutantes permitirá fabricar vacunas totalmente atenuadas que no sufran una virulencia regresiva después de su utilización clínica (122,123).

La producción de vacunas subunitarias contra la poliomiелitis mediante la aplicación de los métodos de Ingeniería Genética o síntesis química, así como la producción de vacunas atenuadas empleando la mutagénesis específica, se encuentra aún en etapa de experimentación, sin embargo, todos estos métodos ofrecen a futuro la fabricación de vacunas contra la poliomiелitis más inocuas, estables y eficaces a un menor costo de producción (111).

3.2 VACUNA ANTISARAMPIONOSA.

Durante mucho tiempo, la vacuna contra el sarampión se ha producido en cultivos celulares de embrión de pollo. En la actualidad, la tecnología más novedosa consiste en propagar el virus en cultivos de células diploides humanas. En algunos países, tales como Irán, México y Yugoslavia, ya se ha utilizado con éxito este medio de propagación para la fabricación (16, 85, 115, 135).

Se han utilizado células de la estirpe MRC-5 (57) y diferentes cepas adaptadas, tales como: AIK, Edmonston-Zagreb y Zagreb (tabla 3). En la figura 11 se presenta el diagrama de flujo del proceso. Del Banco de células diploides MRC-5 (en el cual se conserva a -70°C todo el material celular obtenido por subcultivos en serie de células fibroblásticas de pulmón humano), se toma una ampollita conteniendo las células y éstas se siembran en medio de Eagle (29) adicionado con aminoácidos, nucleósidos y suero bovino fetal (ver anexo), para el inicio de la producción de un lote. Las células se incuban a 37°C durante 6 a 7 días, tiempo en el cual la pared interna de las botellas que las contienen queda recubierta de células. Posteriormente, las células se desprenden, se transfieren a otras botellas con medio nutritivo, se incuban, y así sucesivamente hasta tener entre 500 y 1000 botellas con células (es importante no pasar de la generación 28 ó 29 en el momento de la inoculación del virus, ya que existiría el riesgo de que las células se alteren). Una vez que se tiene una concentración de 600 000 células viables por mililitro de medio de cultivo en cada botella, se inocula el virus y los cultivos se incuban a la temperatura óptima de la cepa que se emplee. Una vez que el efecto citopático es completo, se cosecha el líquido que baña a las células, se mezclan los líquidos recolectados de todas las botellas y se envasan en frascos ampulador ámber. Posteriormente se liofilizan, se engargolan y se estiquetan (135). En la tabla 10 se presentan las características generales de la vacuna antisarampionosa preparada en células diploides humanas (134, 135).

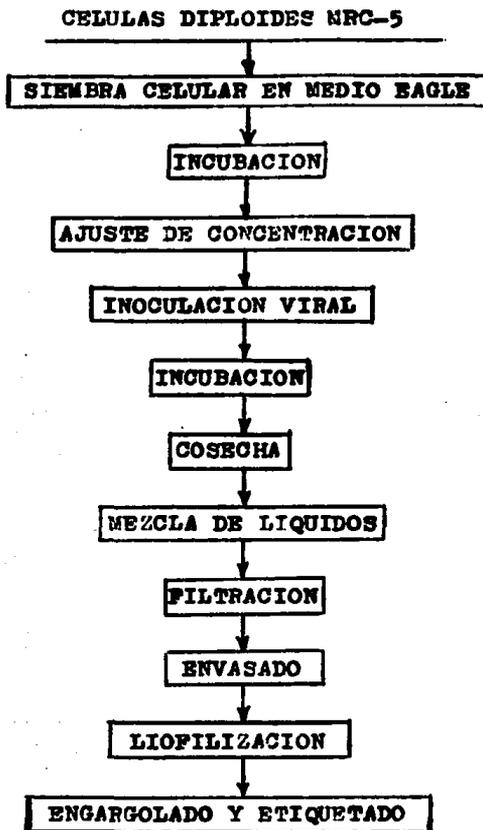


FIGURA 11. PROCESO DE PRODUCCION DE VACUNA ANTISARAMPIONOSA EN CELULAS DIPLOIDES HUMANAS.

FORMULA:	Cada frasco contiene: Vacuna antisarampionosa producida en células diploides humanas, con 1 000 DICT ₅₀ .
DOSIS:	Unica de 0.5 ml.
VIA DE ADMON.:	Subcutánea.
PRESENTACION:	Frasco ampula con suspensión inyectable liofilizada para 3, 5 ó 10 dosis. El empaque contiene agua destilada estéril para la rehidratación.
CONSERVACION:	En refrigeración entre 2 y 8°C, protegida de la luz.

TABLA 10. CARACTERISTICAS DE LA VACUNA ANTISARAMPIONOSA PREPARADA EN CULTIVOS DE CELULAS DIPLOIDES HUMANAS.

La vacuna preparada en células diploides humanas, tiene la ventaja sobre la vacuna producida en fibroblastos de embrión de pollo de que no causa las reacciones alérgicas (fiebre y exantema) que ocasionalmente pueden presentarse tras la aplicación de esta última debido a las proteínas de las células de embrión de pollo. Sin embargo, el manejo de cultivos de células diploides humanas implica algunas dificultades técnicas, ya que se requiere personal altamente especializado y capacitado para descartar cultivos con anomalías citológicas. El proceso descrito en el presente capítulo es tan novedoso que las Normas que la O.M.S. publica para la vacuna antisarampionosa, no contemplan el empleo de cultivos de células diploides humanas actualmente. Por tanto, en nuestro país, el control de calidad del producto se efectúa en base a las Normas para la vacuna antipoliomielítica, las cuales se encuentran resumidas en el anexo.

En la actualidad, las investigaciones para el desarrollo de mejores vacunas contra el sarampión se encuentran enfocadas, más que a los métodos de producción, a resolver algunos de los principales problemas prácticos que se presentan con la aplicación de las vacunas que se encuentran disponibles. Dichos problemas se refieren fundamentalmente a la estabilidad y a la administración de la vacuna.

a) Estabilidad.

El problema de la estabilidad de la vacuna antisarampionosa, es especialmente importante en zonas tales como los países en desarrollo, en donde muchas veces es difícil el mantenimiento de la refrigeración de las vacunas, las cuales se descomponen por la acción del calor, causando pérdidas económicas considerables. Para solucionar este problema se han utilizado algunos agentes químicos como estabilizantes, tales como el sulfato de magnesio o la sacarosa. Recientemente se ha desarrollado un estabilizador mucho más eficaz que otros utilizados anteriormente, compuesto por una mezcla de gelatina parcialmente hidrolizada, un medio de cultivo celular (Medio 199, Medio Basal de Eagle o medio de Eagle modificado por Dulbecco) y un alcohol polihídrico (sorbitol, manitol o dulcitol) en solución amortiguadora de fosfatos (77). El empleo de este nuevo agente estabilizador permite mantener la potencia de la vacuna durante un periodo de hasta siete días a una temperatura de 37°C (77).

b) Administración.

Una consideración importante en el esfuerzo para reducir el mínimo el efecto mundial del sarampión, ha sido la selección de la edad óptima para la vacunación de los lactantes. La vacuna antisarampionosa debe administrarse a los niños antes de que tengan el riesgo de contraer una infección con sarampión natural, lo cual puede ocurrir incluso a los cuatro meses de edad. En un estudio realizado en nuestro país (14) se determinó que los lactantes menores de ocho meses de edad presentan títulos de anticuerpos maternos residuales de 1:20 a 1:640. Estos anticuerpos impiden que se produzca la inmunización contra la enfermedad cuando los lactantes reciben la vacuna antisarampionosa viva por vía subcutánea(3).

Este problema podría solucionarse con una vacuna que sea inmunogénica incluso cuando estén presentes anticuerpos maternos residuales.

En un ensayo clínico realizado en México (120), la vacuna antisarampionosa viva, administrada en forma de aerosol por vía intranasal, indujo una respuesta inmune en niños de cuatro a seis meses de edad que presentaban antes de la vacunación títulos de anticuerpos de origen materno de 1:25.

Sin embargo, se requieren investigaciones adicionales para le mostrar la inocuidad de la vacuna aerosolizada, ya que, aunque hasta el momento no se han presentado reacciones adversas debidas a su aplicación, podría presentarse una progresión neurológica directa del virus desde la mucosa nasal al cerebro por vía olfativa, trigeminal o a través de las neuronas autonómicas(3). Además, se requiere de más información acerca de la facilidad de la administración, estabilidad y costo de la vacuna.

La aplicación de esta vacuna puede no ser útil en países desarrollados o en países en los cuales la vacuna antisarampionosa se administra combinada con la vacuna contra la rubeola o contra la parotiditis (o ambas) (112,125). Sin embargo, la utilización de vacuna antisarampionosa aerosolizada en los países en desarrollo especialmente, tendría la ventaja de dar a los programas de inmunización un período más largo durante el cual vacunar a los niños antes de que presentaran un riesgo de enfermedad natural, complicaciones y muerte (127).

En el futuro es posible que se disponga de otros métodos de producción de la vacuna antisarampionosa, por ejemplo mediante la Tecnología de ADN recombinante (115). Sin embargo, con las vacunas de que se dispone actualmente, es tecnológicamente posible la vacunación mundial contra el sarampión.

3.3 VACUNA ANTIRRÁBICA.

Desde que se comprobó que el virus de la rabia puede propagarse en cultivos de células, se iniciaron trabajos tendientes a obtener una vacuna que no causara reacciones secundarias adversas. El Comité de Expertos de la O.M.S. en Patrones Biológicos (98), sugiere que no se utilice tejido nervioso de animales adultos para la producción de la vacuna antirrábica, y en su lugar se emplee tejido nervioso de animales recién nacidos o, mejor aún, cultivos celulares. Se han utilizado cultivos de células de riñón bovino, de riñón de perro, de riñón de hamster, de embrión de pollo o de pato y células diploides humanas (6,47).

En la figura 12 se presenta el diagrama de flujo del proceso de producción de la vacuna antirrábica preparada en cultivos de células diploides humanas. Del Banco de células diploides WI-38 (en el cual se conserva a -70°C todo el material celular obtenido por subcultivos en serie de células fibroblásticas de pulmón humano(50)), se toma una ampolleta conteniendo las células, y éstas se siembran en Medio Esencial Mínimo de Eagle (29) enriquecido con suero de ternera al 10% y con 5×10^7 UI/l de clorhidrato de tetraciclina (ver anexo), para el inicio de la producción de un lote. Las células se incuban a 37°C durante 7 días, tiempo después del cual se retira el medio de cultivo y se adiciona medio de Eagle nuevo (sin suero de ternera) ajustando la concentración a 600 000 células viables por mililitro de medio de cultivo.

Las células se inoculan con la cepa Pitman Moore de virus rábico (con un título de infectividad de $10^{6.7} \text{DL}_{50}/\text{ml}$), para que los cultivos se infecten a razón de $10 \text{DL}_{50}/\text{célula}$. Se adicionan $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ de DEAE-dextrano y los cultivos se incuban durante una hora a 36°C para que el virus se adsorba. Posteriormente se retira el virus de siembra y las células se lavan dos veces con solución salina amortiguada con fosfatos. Se adiciona Medio de Eagle con doble cantidad de bicarbonato de sodio y 0.2% de albúmina sérica humana, y los cultivos se incuban durante 4 días a una temperatura de 32.5°C (66). Posteriormente se recoge el líquido infeccioso y se clarifica me -

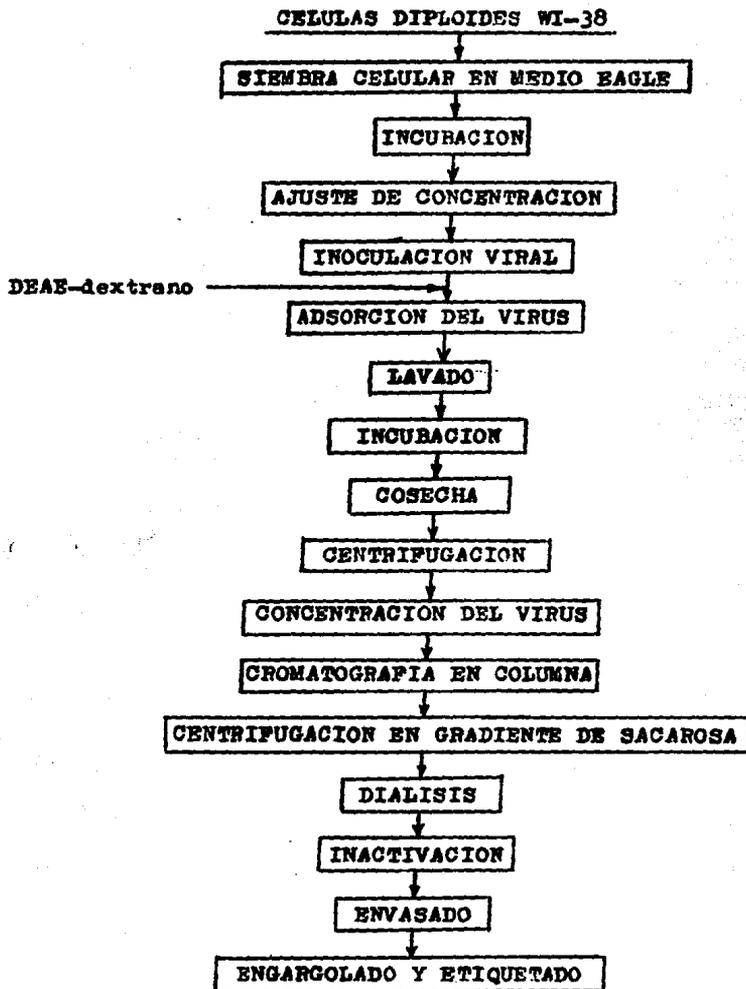


FIGURA 12. PROCESO DE PRODUCCION DE VACUNA ANTIRRABICA EN CELULAS DIPLOIDES HUMANAS.

diente centrifugación durante 20 minutos a 2000 rpm. Después, el virus se concentra utilizando alguno de los tres métodos siguientes(14):

1) Precipitación con acetato de zinc.

A 50 partes del líquido infeccioso de cultivo tisular a pH = 7, se agrega una parte de solución 1M de acetato de zinc a pH = 5. La mezcla se deja en reposo durante 12 horas, y después se recoge el precipitado formado, centrifugando durante 40 minutos a 2000 rpm. El precipitado se resuspende en solución saturada de sal disódica de EDTA y se clarifica por centrifugación durante 20 minutos a 2000 rpm.

2) Sedimentación por centrifugación a gran velocidad.

El líquido infeccioso se centrifuga a 4°C durante 60 minutos, a una velocidad de 22 000 rpm utilizando un rotor de portatubos basculantes SW 25.1 de una centrífuga Spinco. El virus rábico, cuyo coeficiente de sedimentación es 600 s, se recoge en el precipitado, el cual se resuspende en solución amortiguadora de cloruro de sodio 0.13M, Tris 0.05 M y EDTA 0.001M.

3) Ultrafiltración.

El líquido conteniendo el virus, se filtra en una membrana de nitrocelulosa con poros de 0.01µm a 0.015µm, utilizando un aparato de filtración con filtro Sartorius SM12 133. Posteriormente la suspensión se esteriliza con formaldehído al 2% y se lava con una solución salina amortiguada con fosfatos. Finalmente se clarifica por centrifugación durante 20 minutos a una velocidad de 2000 rpm.

El virus concentrado se purifica mediante el método de cromatografía de tamiz molecular, en columnas de Sephadex G-75, para separar los viriones de las impurezas de bajo peso molecular y de la albúmina. La suspensión se centrifuga en un gradiente de sacarosa de 10 a 55% y después se dializa (121, 144).

Finalmente el virus se inactiva con betapropiolactona 1:4000 durante 18 horas a 4°C y 2 horas a 37°C. La inactivación también puede efectuarse mediante radiación con luz ultravioleta (capítulo 2.3).

La vacuna, adicionada con 150µg/ml de neomicina, se envasa en frascos ampulados. Las características como las de esta vacuna se presentan en la tabla 11.

FORMULA:	Cada dosis contiene:
DOSIS:	Entre $10^{6.4}$ y $10^{7.2}$ UFP, (2.5 U.I.) En caso de pre-exposición: Tres inyecciones de 1 ml los días 0, 7 y 21 ó 28. En caso de post-exposición: Cinco inyecciones de 1 ml los días 0, 3, 7, 14 y 28.
VIA DE ADMON.:	Subcutánea.
PRESENTACION:	Fresco ampula con una dosis.
CONSERVACION:	En refrigeración, entre 2 y 8°C.

TABLA 11. CARACTERISTICAS GENERALES DE LA VACUNA ANTIRRABICA PREPARADA EN CULTIVOS DE CELULAS DIPLOIDES HUMANAS.

Las vacunas producidas en cultivos celulares son inocuas y tienen un elevado poder antigénico, lo cual permite disminuir el número de dosis para la vacunación en el hombre, siendo ésta una ventaja importante en comparación con otras vacunas fabricadas mediante métodos convencionales, con las cuales los largos esquemas de inmunización requeridos (14 inyecciones) resultan bastante molestos para los pacientes.

Sin embargo, existen algunas dificultades técnicas en el manejo de cultivos celulares, ya que se requiere personal altamente especializado y capacitado para descartar cultivos de células diploides con anomalías citológicas. Además, el costo de la vacuna es elevado, ya que en el proceso de producción se utilizan métodos de purificación y concentración costosos debido a los bajos rendimientos del virus que se obtienen. No obstante, en algunos países, como Francia y la República Federal Alemana, se produce comercialmente una vacuna preparada en cultivos de células diploides humanas (98).

Actualmente, la vacuna producida en células diploides humanas se utiliza en varios países, entre los que se encuentran Estados Unidos de América, Reino Unido, Francia, la República Federal Alemana y la República Democrática Alemana (95, 126). En Francia se produce también una

na vacuna antirrábica utilizando cultivos de células renales de embrión bovino, en los Países Bajos la vacuna se produce en cultivos de células de riñón de perro, en Japón se utilizan cultivos de células de embrión de pollo, y en la Unión de Repúblicas Socialistas Soviéticas y otros países del este de Europa y de Asia se utilizan cultivos primarios de células de riñón de hámster (98).

En el último decenio, las actividades de investigación encaminadas al desarrollo de vacunas antirrábicas subunitarias mediante la Ingeniería Genética han conseguido progresos notables. Se ha podido determinar la composición del ácido nucleico y de las cinco proteínas (G, N, M₁, M₂ y L) del virus de la rabia (98). Se han clonado todos los genes de las proteínas estructurales, exceptuando el que codifica para la síntesis de la proteína L. El gen de la glucoproteína se ha podido insertar con éxito en E. coli, en el virus de la vaccinia y en el virus del papiloma bovino (63, 156). Aunque estos análogos de la glucoproteína han demostrado tener actividad semejante a la glucoproteína viral auténtica en ensayos in vitro, aún es necesario efectuar estudios para demostrar su inocuidad y efectividad mediante pruebas de protección en animales contra el virus de prueba letal.

Por otro lado, se han sintetizado aproximadamente 26 péptidos, los cuales representan varios segmentos de secuencias de aminoácidos del virus rábico. Aunque varios de los péptidos son inmunogénicos en animales de laboratorio, hasta ahora ninguno ha podido dar protección contra una inoculación de prueba del virus (98, 111). En los Estados Unidos de Norteamérica, se utiliza una vacuna subunitaria preparada mediante la ruptura del virus por un tratamiento con tri-n-butilfosfato y polisorbato 80, inactivada químicamente con betapropiolactona (125).

La producción de vacunas antirrábicas subunitarias mediante la biosíntesis de proteínas antigénicas y la síntesis química de péptidos, ofrece a futuro un producto inocuo, efectivo, de bajo costo y de alta calidad.

3.4 VACUNA ANTI-HEPATITIS B.

El más reciente avance en la producción de vacunas virales, consiste en el empleo de la Ingeniería Genética, el cual ha permitido, mediante la tecnología de ADN recombinante y la síntesis química de péptidos, el desarrollo de procesos de producción de vacunas virales totalmente innovadores.

En el caso de la hepatitis B, este avance es especialmente importante puesto que el virus es difícil de cultivar in vitro, el número de especies susceptibles a la infección es reducido y el método convencional de producción de la vacuna, en el cual se aislaba el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B a partir de plasma humano, presenta grandes dificultades en cuanto a la obtención de materias primas y a la purificación adecuada de la vacuna, además de que el proceso de fabricación es muy largo (65 semanas) y el costo de la vacuna es elevado(111).

Gracias a la Ingeniería Genética, mediante la tecnología de ADN recombinante, estos problemas son ampliamente superados, ya que el método es relativamente sencillo, no es riesgoso porque no se trabaja con el virus infectante, es económico y se obtienen altos rendimientos. Además, la vacuna fabricada utilizando esta nueva tecnología, es igualmente inmunogénica que la obtenida de plasma humano y resulta muy refinada en cuanto a su componente activo, pues se excluyen especies contaminantes que se encuentran en las vacunas elaboradas por el método tradicional. La ausencia del virus de la hepatitis B intacto y de proteínas humanas, elimina la posibilidad de que se presenten infecciones secundarias o reacciones de autoinmunidad como resultado de la administración de la vacuna(25).

La producción de vacunas mediante la tecnología de ADN recombinante, consiste de las siguientes etapas (148):

a) Aislamiento de genes y clonación molecular.

El gen que codifica para la síntesis del antígeno, se aisla del virus (150) y posteriormente se inserta en un vector molecular para que pueda introducirse en un sistema de transformación celular que permita su expresión.

Se han utilizado como vectores: plásmidos bacterianos, plásmidos de levaduras y algunos virus, tales como el virus del papiloma bovino y el virus SV40 (63).

- b) Transformación de las células huésped con los vectores recombinantes.

El genoma viral integrado al vector molecular, denominado vector recombinante, se pone en contacto con un cultivo celular adecuado para que se introduzca en las células huésped y pueda expresarse posteriormente (111).

Como sistemas de transformación pueden emplearse células de bacterias, levaduras, animales o vegetales (88).

- c) Expresión del antígeno.

Para que el antígeno, cuya información genética se ha integrado al genoma de una célula huésped, pueda expresarse al replicarse las células, se requiere un gen promotor, es decir, una región del ADN celular que la ARN polimerasa de la célula huésped debe reconocer para iniciar la transcripción. Como promotor puede utilizarse una región del ADN de la célula que codifique para la síntesis de una de sus proteínas (88).

- d) Extracción de proteínas y purificación de la vacuna.

Una vez que las células se han multiplicado y han producido una cantidad adecuada del antígeno proteico, se procede a aislar éste último, para lo cual las células se colectan por centrifugación y se lisan mediante homogeneización del cultivo, empleando pequeñas esferas de cristal. Las proteínas liberadas por las células se purifican utilizando un método altamente específico, como la cromatografía de inmunoespecificidad (75).

En el método de síntesis química, se aislan las proteínas inmunogénicas del virus utilizando anticuerpos monoclonales, y se determina su secuencia de aminoácidos. Una vez conocida dicha secuencia, las proteínas (o péptidos) que formarán la vacuna, se sintetizan directamente, o bien se sintetiza el gen que codifica para la proteína basándose en la secuencia de ésta y posteriormente el gen sintético se clona mediante la tecnología de ADN recombinante. La tecnología de ADN recombinante y el método de síntesis química para la producción de vacunas subunitarias, se ilustran en la figura 14.

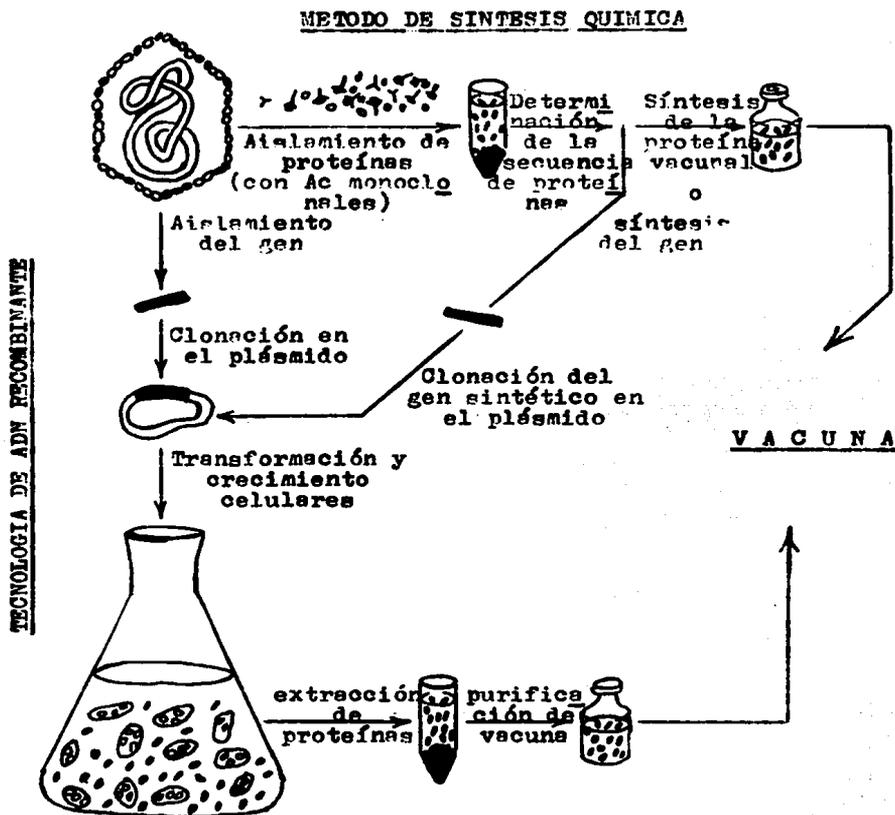


FIGURA 13. PRODUCCION DE VACUNAS SUBUNITARIAS MEDIANTE TECNOLOGIA DE ADN RECOMBINANTE Y SINTESIS QUIMICA.

Los adelantos en Ingeniería Genética han permitido la clonación y secuenciación del genoma viral completo del virus de la hepatitis B (150), y los genes que codifican para la síntesis de los diferentes antígenos han sido identificados abriendo la posibilidad de la expresión de estos mediante diversos sistemas de transformación. Las etapas del proceso de producción de la vacuna anti-hepatitis B mediante la tecnología de ADN recombinante se presentan en la figura 14. Para la preparación de la vacuna se utiliza el subtipo adw del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B, y se produce en cultivos de fermentación de Saccharomyces cerevisiae empleando un vector de expresión que usa la región 5' vecina del gen de la deshidrogenasa alcohólica I de la levadura como promotor (75). La secuencia de nucleótidos que codifica para la síntesis del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B, fue aislada de un fragmento TaqI-Hpa I de 835 pares de bases (74,150). Este fragmento contiene 26 pares de bases precedentes al triplete AUG, el cual codifica para la síntesis del aminoácido terminal N-metionina del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B maduro. El fragmento de gen del antígeno de superficie del virus, va enlazado al gen promotor de la deshidrogenasa alcohólica de la levadura (DHAI).

El plásmido recombinante está formado por las siguientes regiones, las cuales se esquematizan en la figura 15:

- vector pBR322 de E. coli
- un origen de replicación derivado del plásmido de 2 μ de la levadura (2 μ ORI)
- el gen trp 1, el cual es un marcador de auxotrofia al triptofano, utilizado en la selección de células transformadas de levadura.
- el promotor DHAI insertado en la región que contiene la ia formación de resistencia a la tetraciclina (tet^r) del pBR322.
- el gen que codifica para la síntesis del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg).

Las células de la cepa XV610-80 de la levadura, se transforman utilizando el plásmido recombinante descrito (pHBS-16), en el cual el gen del antígeno de superficie del virus se encuentra en la ig

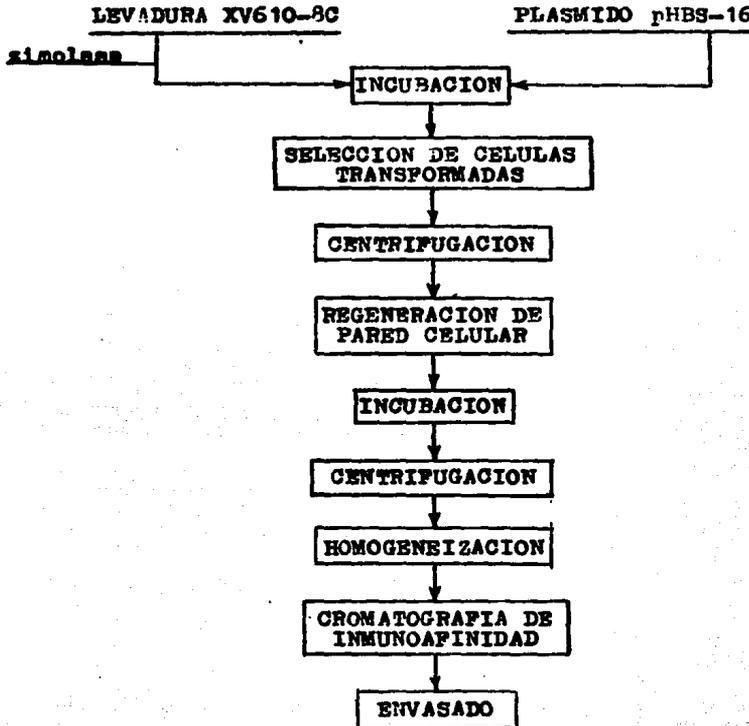


FIGURA 14. PROCESO DE PRODUCCION DE VACUNA ANTI-HEPATITIS B MEDIANTE LA TECNOLOGIA DE ADN RECOMBINANTE.

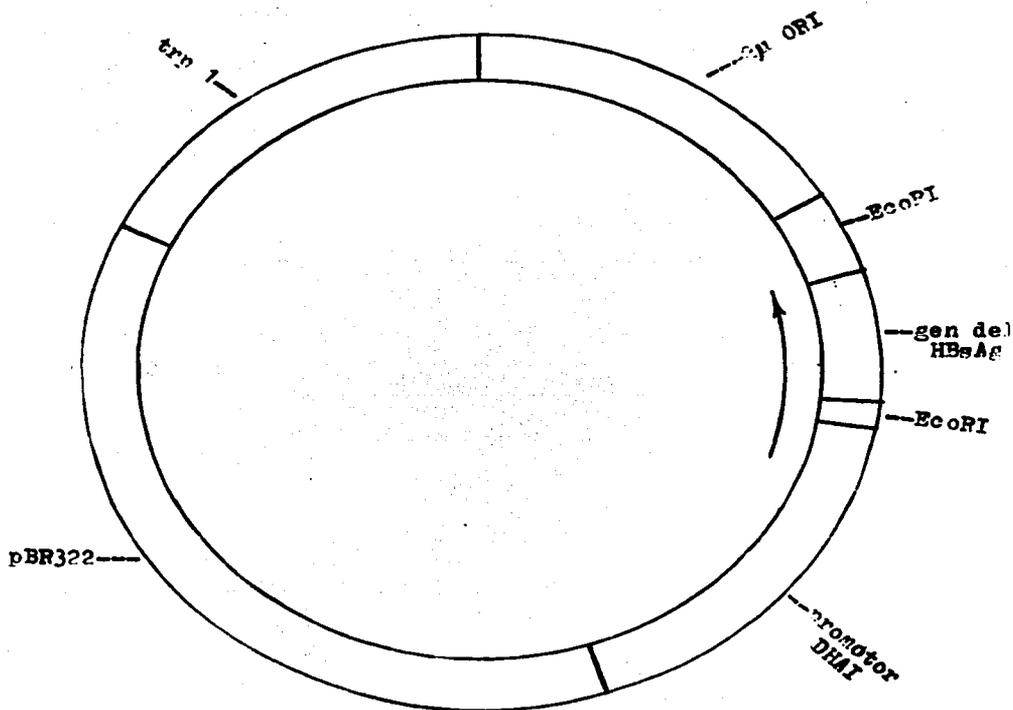


FIGURA 15. PLASMIDO UTILIZADO PARA LA EXPRESION DEL ANTIGENO DE SUPERFICIE DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B EN LEVADURAS.

na orientación (5° - 3°) que el gen promotor DHAI. Para efectuar la transformación, las levaduras se tratan con zimolasa y los esferoplastos resultantes se incuban con el vector pHBSS-16 en solución de polietilenglicol y cloruro de calcio. Para seleccionar las células ya transformadas, la levadura se incuba en un medio exento de triptofano, compuesto por 0.67% de extracto de levadura, 0.5% de ácidos cassámnicos y 2% de glucosa. Las levaduras transformadas se colectan por centrifugación y se someten a un tratamiento de regeneración de la pared celular (88). Cuando las células se encuentran en la mitad de la fase logarítmica de crecimiento, se colectan por centrifugación y se lisan mediante homogeneización con esferas de cristal de 0.45 a 0.50 mm de diámetro (150).

Las partículas de antígeno superficial del virus de la hepatitis B liberadas, se purifican del extracto clarificado mediante cromatografía de inmunosfinidad utilizando anticuerpos contra el antígeno de superficie del virus aislado de sangre humana, obtenidos en cabras (75).

El rendimiento obtenido es de 2 a 5 μ g de antígeno de superficie de la hepatitis B por cada 200 ml de cultivo de levadura, calculado mediante el método de Radioinmunoanálisis (150).

La forma predominante del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B producido en levaduras, es como partículas esféricas de 20 nm, con densidad, coeficiente de sedimentación y propiedades inmunogénicas iguales al antígeno de superficie obtenido de plasma humano. El antígeno obtenido en levadura es una proteína no glicosilada, con peso molecular de 23 000 daltons, pero la glicosilación no es necesaria para conferir propiedades inmunogénicas a la partícula (150). Se requieren aún ensayos clínicos para probar la efectividad e inocuidad de la vacuna contra la hepatitis B producida mediante la tecnología de ADN recombinante, pero se calcula que en un futuro cercano se fabricarán vacunas altamente purificadas, seguras, efectivas y económicas en gran escala (148).

Se ha reportado el empleo de otros vectores que utilizan como promotores los genes de la fosfatasa ácida represible (86,90) o de la 3-fosfoglicerato cinasa (54) de Saccharomyces cerevisiae; obteniéndose partículas inmunogénicas de 22 nm del antígeno de superficie de la hepatitis B.

También se han intentado utilizar como sistema de transformación, células de E. coli y células de mamíferos. (25,86), pero el rendimiento de antígeno obtenido es muy bajo, además de que el producto es inestable y puede causar efectos adversos en el organismo. Recientemente, se ha desarrollado una vacuna viva recombinante(6) utilizando el virus de la vaccinia, el cual no es patógeno para la especie humana. El gen que codifica para la síntesis del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B, se enlaza al gen de un fuerte promotor del virus de la vaccinia. Este ADN recombinante se inserta en el virus de la vaccinia, con lo cual, durante cada ciclo de multiplicación de éste, el gen del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B se expresa bajo el control del promotor del virus de la vaccinia, con lo cual se tiene una vacuna "viva" que sintetiza y secreta el HBsAg (148). Esta vacuna "viva" tiene la ventaja de que se imita la infección natural pero sin causar la enfermedad, además de que la dosis requerida es menor que la que se necesita utilizar con la vacuna obtenida en lavaduras, ya que esta última permanece menos tiempo en el organismo debido a que no se autoreplica. Sin embargo, hay ciertos problemas éticos más que técnicos por los cuales la O.M.S. desaprueba la utilización de la vacuna "viva"(63), entre los cuales se encuentran los siguientes:

- a) Aún se conoce muy poco acerca del mecanismo de atenuación del virus de la vaccinia.
- b) El virus de la vaccinia infecta a un gran número de huéspedes, y sus manifestaciones clínicas varían mucho y de manera impredecible de especie a especie, por lo cual la transmisión del virus puede ocurrir de animales al hombre y viceversa.
- c) Con base en lo anterior, no puede permitirse la deliberada diseminación de un organismo recombinante en el ambiente. Aunque la vacuna "viva" puede proporcionar grandes ventajas, aún es necesario efectuar investigaciones adicionales que permitan determinar la seguridad de su utilización.

4. DISCUSSION

Las vacunas virales son materiales biológicos susceptibles de perfeccionar con la finalidad de obtener productos altamente inmunogénicos que no causen reacciones adversas debidas a su aplicación. Los avances en el campo de producción de vacunas virales han permitido el desarrollo de nuevos procesos, los cuales han superado a los métodos convencionales en cuanto a la actividad, inocuidad, estabilidad, disminución de efectos secundarios y costo de las vacunas. A continuación se analizan los aspectos específicos más relevantes concernientes a cada vacuna:

a) Vacuna antipoliomielítica.

Existen dos tipos de vacuna antipoliomielítica: de virus inactivos (tipo Salk) y de virus vivos atenuados (tipo Sabin). El método convencional de producción de ambas vacunas utiliza tejido renal de mono como medio de propagación viral. Sin embargo, la dificultad cada vez mayor de conseguir a los monos, y especialmente, el elevado riesgo de contaminación del producto debido a la gran variedad de virus presentes en los monos, son factores que han sido determinantes en el desarrollo de nuevos métodos que superen estas dificultades.

Para la vacuna tipo Salk, se desarrolló un proceso de producción en gran escala que utiliza como medio de propagación viral una línea celular continua no tumorigena (como las células Vero) cultivada en microcarreadores. Este método permite obtener un elevado rendimiento de la vacuna a bajo costo, sin emplear equipo complicado ni grandes áreas para la fabricación. El producto obtenido es altamente inmunogénico e inocuo, sin embargo, debido a que las líneas celulares continuas utilizadas en la producción son enormes desde el punto de vista citológico, debe efectuarse un riguroso control de calidad que asegure que los métodos de concentración y purificación utilizados eliminen por completo el ADN celular.

Para la vacuna tipo Sabin, el avance notable en el proceso de producción consiste en la utilización de cultivos de células diploides humanas. Lo cual resuelve los problemas asociados con el empleo de las células renales de mono, ya que son abundantes, exentas de agentes extraños y permiten la consistencia y estandarización de los cultivos virales para la fabricación de la vacuna.

b) Vacuna antisarampión.

Para la producción de vacuna antisarampión, tradicionalmente se han empleado cultivos celulares de fibroblastos de embrión de pollo. La vacuna obtenida es eficaz e inocua, aunque en algunos individuos susceptibles pueden presentarse fiebre y exantema como reacciones secundarias a la vacunación. Para evitar dichas reacciones debidas a las proteínas del pollo, el virus se adaptó al desarrollo en cultivos de células diploides humanas. Con esta nueva vacuna se reduce la probabilidad de la aparición de reacciones adversas, sin embargo, el manejo de las células diploides implica algunas dificultades técnicas, ya que se requiere personal altamente especializado y capacitado para descartar cultivos con anomalías cariológicas. Actualmente, las investigaciones para el desarrollo de mejores vacunas contra el sarampión se encuentran enfocadas más que a los métodos de producción, a la resolución de algunos problemas prácticos relacionados con la aplicación de la vacuna, como son: la estabilidad, para lo cual se han desarrollado diversos agentes estabilizadores eficaces, y la administración, para lo cual la vacuna se ha aplicado en forma de aerosol por vía intranasal, obteniéndose una respuesta inmune satisfactoria aún en presencia de anticuerpos maternos residuales, lo cual no ocurre cuando la vacuna se administra por vía subcutánea.

c) Vacuna antirrábica.

Para la producción de vacuna antirrábica, el avance fundamental ha residido en el medio de propagación viral empleado. Inicialmente, el virus se cultivaba en el cerebro de animales adultos susceptibles a la enfermedad, sin embargo, la vacuna puede provocar encefalitis o reacciones locales adversas debido a la presencia de factores neuroparalíticos como la mielina, procedentes del tejido nervioso del animal utilizado; además de que para la administración de la vacuna, se requiere de un gran número de dosis (14 inyecciones). Para reducir el riesgo que presentan las sustancias neuroparalíticas, se introdujo el empleo de tejido nervioso de animales recién nacidos, en los cuales la concentración de dichas sustancias es mínima; sin embargo el número de dosis requerido para la aplicación de la vacuna es alto (14 inyecciones).

Como alternativa para evitar las reacciones adversas producidas por las vacunas preparadas en tejido nervioso de animales, surgió el empleo de huevos embrionados de pato como medio de propagación viral. Sin embargo, la vacuna preparada por este método casi no se utiliza pues es poco inmunogénica, se requiere de un gran número de dosis para su aplicación (14 a 21 inyecciones) y puede provocar reacciones alérgicas debido a las proteínas del huevo.

El proceso de producción de vacuna antirrábica más reciente utiliza cultivos de células diploides humanas como medio de propagación viral. La vacuna obtenida en cultivos celulares es inocua y tiene un alto poder inmunogénico, lo cual permite disminuir el número de dosis para la vacunación del hombre (6 inyecciones), lo cual es una gran ventaja en comparación con los métodos anteriores. Sin embargo, el manejo de cultivos celulares implica la participación de personal altamente especializado y capacitado para descartar cultivos de células diploides con anomalías cariológicas. Por otra parte, el costo de la vacuna es elevado ya que en el proceso de producción se utilizan métodos de concentración y purificación caros debido al bajo rendimiento viral que se obtiene.

d) Vacuna anti-hepatitis B.

El proceso tradicional de producción de la vacuna contra la hepatitis B consiste en aislar el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B a partir de la sangre de portadores de la enfermedad. La vacuna es inmunogénica, sin embargo presenta algunas desventajas entre las cuales se encuentran: la dificultad para conseguir un suministro adecuado de plasma, el lento proceso de fabricación (65 semanas), el elevado costo de la vacuna y, principalmente, el riesgo de contaminación con microorganismos procedentes de la sangre de los donadores.

El virus de la hepatitis B no se ha podido cultivar en medios celulares, sin embargo los avances en Ingeniería Genética han permitido el desarrollo de una vacuna subunitaria, lo cual ha venido a revolucionar por completo los métodos convencionales de producción de vacunas virales. Esta nueva vacuna, obtenida mediante la biosíntesis del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B en levaduras, es igualmente inmunogénica que la obtenida por el método convencio-

nal, es económica ya que el método es relativamente sencillo y se obtienen altos rendimientos de antígeno y, principalmente, es inocua ya que para su fabricación no se utiliza el virus infectante y se excluyen microorganismos contaminantes y proteínas extrañas que pueden encontrarse en las vacunas elaboradas a partir de sangre humana. Esta nueva tecnología ofrece a futuro la producción en gran escala de vacunas subunitarias eficaces e inocuas a bajo costo, contra las enfermedades causadas por virus.

e) Vacuna antiamarílica.

Cabe mencionar que respecto a la vacuna contra la fiebre amarilla, la cual se prepara tradicionalmente propagando la cepa 17D en huevos embrionados de pollo (103, 125), la utilización de los huevos libres de gérmenes (146) ha constituido un avance de gran importancia en la tecnología de producción de vacunas virales.

Afortunadamente esta enfermedad está próxima a ser erradicada (97) ya que las zonas endémicas de fiebre amarilla se encuentran delimitadas y bajo control.

La información referente a los procesos de producción de esta vacuna no se encuentra disponible en nuestro país por lo cual este tema no se trató ampliamente como en el caso de las otras vacunas presentadas en este trabajo, sin embargo se considera conveniente mencionar este progreso ya que forma parte importante de los avances en la producción de vacunas virales.

5. RESUMEN

Los procesos de producción de vacunas virales que se han desarrollado hasta ahora, básicamente consisten de las mismas etapas: inoculación de la cepa viral en un medio adecuado para su propagación, cosecha del virus, purificación, inactivación (en el caso de vacunas de virus inactivados) y envasado; con excepción del método convencional de fabricación de vacuna anti-hepatitis B, el cual es un proceso totalmente novedoso y diferente en el área de producción de vacunas, y que consiste básicamente en aislar y purificar el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B a partir de la sangre de portadores humanos.

Las diferencias de los métodos reportados para la producción de vacunas se refieren a alguno de los siguientes aspectos:

a) Tipo de vacuna.

Existen vacunas de virus inactivados y de virus vivos atenuados. El proceso de atenuación de la mayoría de las vacunas actuales ha sido empírico, por observación de que los países seguidos y frecuentes de abundante inóculo viral seleccionan mutantes avirulentos. Sin embargo, nuestros conocimientos de Genética Viral están lo suficientemente avanzados para proponer procedimientos racionales que pueden aplicarse a la selección de cepas atenuadas mediante métodos de mutagénesis específica. En el caso de las vacunas de virus inactivados, se han utilizado métodos físicos y químicos que han demostrado ser eficaces para la inactivación de los virus; los primeros parecen conservar mejor las propiedades antigénicas del virus, aunque requieren del empleo de equipo costoso y complicado.

b) Cepa viral.

Se han aislado diversas cepas para la producción de vacu

nes, las cuales difieren entre sí en sus características de inmunogenicidad, grado de atenuación y capacidad de propagación en diversos sustratos celulares.

c) Medio de propagación del virus.

Dado que los virus carecen de maquinaria enzimática propia, es necesario que el medio empleado para su propagación contenga células metabólicamente activas. En el empleo de diversos medios de propagación viral, radica uno de los más importantes avances en la producción de vacunas virales. Los sustratos que se han empleado para el cultivo de virus para la producción de vacunas son:

1. Animales vivos
2. Huevos embrionados de ave
3. Cultivos de tejidos:
 - De células animales o humanas
 - Con microscarradores.

Además se han hecho otros adelantos importantes tales como: aislamiento de cepas más atenuadas y de mayor estabilidad, producción de células en gran escala, empleo de agentes cosadyuvantes y estabilizadores más efectivos y nuevos métodos de purificación.

Los procesos de producción de vacunas más recientes se han desarrollado enfocados hacia:

1. El empleo de medios de propagación viral que disminuyan la posibilidad de que se presenten reacciones adversas debidas a la administración de la vacuna, para lo cual se han utilizado cultivos de células diploides humanas, derivadas de tejido pulmonar embrionario.
2. La mayor producción de células para el cultivo del virus mediante el empleo de microscarradores, los cuales son pequeñas esferas inertes que sirven de soporte para el crecimiento de las células en forma de monocapa y, debido a

la gran superficie de contacto, la capacidad de producción del virus aumenta considerablemente, evitándose el uso de equipo complicado, metodología tediosa y grandes volúmenes de cultivo, lo cual disminuye los costos y el riesgo de contaminación del producto.

A pesar del importante progreso realizado hasta hoy, todavía es necesario mejorar algunas vacunas víricas en cuanto a su actividad, inocuidad, estabilidad, disminución de efectos secundarios y del costo del producto.

Los avances en el campo de la Ingeniería Genética han venido a revolucionar por completo los procesos de producción de vacunas mediante la aplicación de la Tecnología del ADN Recombinante y la Síntesis Química de Oligopéptidos. Hay dos aspectos de la elaboración de vacunas en los cuales dichas técnicas son en potencia útiles:

I. Obtención de cepas atenuadas por mutagénesis específica para la producción de vacunas de virus vivos atenuados inocuos y estables.

II: Producción de componentes antigénicos virales mediante síntesis biológica en bacterias o levaduras, o síntesis química para la elaboración de vacunas subunitarias.

Mediante la Ingeniería Genética se han logrado importantes avances en la producción de vacunas anti-hepatitis B, anti-influenza y antirrábica; y es posible que en un futuro próximo se desarrolle un gran número de vacunas mediante la aplicación de esta nueva tecnología.

6. CONCLUSIONES

Para las campañas de inmunización masiva se recomienda la administración de vacuna antipoliomielítica de virus vivos atenuados preparada en cultivos de células diploides humanas, ya que es altamente inmunogénica, inocua y no presenta problemas respecto a la obtención de materias primas, lo cual es una gran ventaja en comparación con la vacuna fabricada en cultivos de células de mono, además de que estos últimos frecuentemente se encuentran contaminados con una gran variedad de microorganismos de origen símico.

El proceso de producción de la vacuna antipoliomielítica de virus inactivados ha tenido un avance notable de gran utilidad para su producción en gran escala. Sin embargo, el uso de esta vacuna se limita para personas que presentan inmunodeficiencia y en las cuales es riesgosa la aplicación de vacuna de virus vivos.

La vacuna contra el sarampión preparada en cultivos de células diploides humanas se produce actualmente en nuestro país. Aunque se considera que la probabilidad de causar reacciones secundarias es menor que si se administra la vacuna preparada en cultivos celulares de embrión de pollo, la baja incidencia de dichas reacciones no justifica las dificultades y el costo que implica el manejo de las células diploides humanas.

En el caso de la vacuna antirrábica, el método de producción en cultivos de células diploides humanas tiene las grandes ventajas de que se elimina la posibilidad de que se presenten reacciones adversas debidas a la vacunación, y dado que el producto es altamente inmunogénico, el número de dosis para la vacunación del hombre es menor de la mitad del número requerido por las vacunas producidas por métodos tradicionales, lo cual justifica el empleo de las células diploides humanas.

El avance más sobresaliente en el área de producción de vacunas virales es el desarrollo de vacunas subunitarias mediante la Ingeniería Genética. La utilización de esta nueva tecnología para la pro-

ducción de vacunas es especialmente importante en el caso de enfermedades como la hepatitis B, en la cual el virus es altamente infeccioso y difícil de cultivar in vitro, el número de especies susceptibles a la enfermedad es reducido y el método convencional de producción, además de ser lento y costoso, presenta algunas dificultades en cuanto a la obtención de materias primas y a la purificación adecuada de la vacuna.

Mediante esta nueva tecnología, ha sido posible el desarrollo de vacunas contra la hepatitis B, la rabia y la influenza (125, 150, 156), y se están efectuando estudios tendientes a producir vacunas subunitarias contra la poliomielitis y enfermedades causadas por herpesvirus (92, 148).

En el futuro, la Ingeniería Genética ofrece la posibilidad de producir en gran escala y a bajo costo, vacunas subunitarias eficaces e inocuas, contra un gran número de enfermedades virales. Esta es una área interesante de investigación para todos aquellos profesionales - tas relacionados con las Ciencias de la Salud.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Albrecht, P., Van Steenis, G., Van Nabel, A. L., Salk, J. "Estandarización de las pruebas de anticuerpos de neutralización del poliovirus". O.P.S. Publicación Científica N° 484: 354-360 (1984).
2. Almond, J. W., Jann, A. J., Minor, P. D., Reeve, P., Schild, G. U., Hauptmann, R., Stanway, G. "Secuencias de nucleótidos de cepas no virulentas y atenuadas de poliovirus del tipo 3". O.P.S. Publicación Científica N° 484: 281-289 (1984).
3. Amler, R. W., Orenstein, W. A., Bart, K. J. "La vacuna antisarampionosa aerosolizada: editorial". O.P.S. Publicación Científica N° 477: 181-183 (1985).
4. André, F. "Termodegradación de las vacunas antisarampionosas liofilizadas". O.P.S. Publicación Científica N° 477: 192-196 (1985).
5. Arnon, R., Sela, M. "Los antígenos y las vacunas sintéticas". Mundo Científico, N° 25 (1983).
6. Atanasiu, P. "Consideraciones sobre los nuevos tipos de vacunas antirréticas". Salud Pública de México XVI (3): 437-442 (1974).
7. Atanasiu, P., Perrin, P., Delagneseu, J. F., "Titrage immunoenzymatique de la glycoprotéine, une technique in vitro pour l'appréciation de l'activité des vaccins antirétiques". J. of Biol. Stand. 10:289-296 (1982).
8. Bailey, J. E., Ollis, D. F. Biochemical Engineering fundamentals. U. S. A., Mc Graw Hill Book Co, 1977.
9. Baltimore, D. "Genética molecular de los poliovirus" O.P.S. Publicación Científica N° 484: 277-280 (1984).
10. B.B.L. Manual de procedimientos de laboratorio y de productos. 5a edición. Editores Asociados, S.A. México, 1971.
11. Beale, A. J. "Live attenuated oral poliovirus vaccine: problem areas in production". Rev. Infect. Disess. 6:5334 (1984).
12. Beltrán Flores, C. "Sistema Cartilla Nacional de Vacunación". Salud Pública de México. XXV (2): 211-214 (1983).
13. Böttiger, L. "Inmunidad de larga duración después de la vacunación con vacuna antipoliomielítica muerta en Suecia". O.P.S. Publicación Científica N° 484: 306-372 (1984).

14. Calderón, E., Martín-Sosa, S., Milovanovic, M.T., Alvarez, A., De la O, L. "Inmunidad contra el sarampión en binomios madre-hijo". Bol. Méd. Hosp. Infant. (Méx.) 34:1-12 (1977).
15. Chambon, P. "Split genes". Sci. Am. 244(5):60-71 (1981).
16. Cisneros, I. "El nuevo Instituto Nacional de Virología". Salud Pública de México. XXII (1): 27-31 (1970).
17. Code of Federal Regulations. F.D.A. Biologicals. Title 21, Chap. 1, Part 600-630, 1985.
18. Cohen, H., Nagel, J. "Dos inyecciones de vacuna antipoliomielítica -diftérica-tetánica-tosferínica como base de un plan simplificado de inmunización en los países en desarrollo". O.P.S. Publicación Científica N° 484: 74-75 (1984).
19. Colinet, G., Rossignol, J., Peetermans, J. "A study of the stability of a bivalent measles-mumps vaccine". J. of Biol. Stand. 10: 341-346 (1982).
20. Colinet, G., Peetermans, J. "Behaviour of 5 commercial measles vaccines in an accelerated stability tests". J. of Biol. Stand. 10: 241-247 (1982).
21. Granic, R., Blondel, B., Horsud, P. "La variación antigénica de los poliovirus estudiada mediante los anticuerpos monoclonales". O.P.S. Publicación Científica N° 484: 347-353 (1984).
22. Jreese, A., Henderson, R. "Cost-benefit analysis in immunization programmes". Bull. of the W.H.O. 58(3): 491-497 (1980).
23. Dalskas, M., Sever, J., Madden, D. "Atrofia muscular tardía posterior a la poliomieltis". O.P.S. Publicación Científica N° 484: 387-395 (1984).
24. Damude, D., Campos, J. "Medidas de control de la rabia". Salud Pública de México. XVI(3):511-512 (1974).
25. Dawes, I.W. "Saccharomyces cerevisiae shows its worth in hepatitis vaccine production". Trends in Biotech. 2:30 (1984).
26. "Del 24 al 28 será la campaña de vacunación contra la polio". No vedades, 12 de ene. de 1987.
27. DeQuadros, C., Jones, S. "Uso de tecnologías apropiadas para extender los servicios de inmunización" O.P.S., 1977.

28. Dirección General de Investigación en Salud Pública. Instructivo para el manejo y aplicación de vacunas. México, 1975.
29. Eagle, H. "Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture". *Science* 122(3166):501-504 (1955).
30. Elisberg, B. "Estandarización de las pruebas de inocuidad y actividad de las vacunas contra la poliomielitis". O.P.S. Publicación Científica N° 484:324-329 (1984).
31. Emini, E., Jameson, B., Wimmer, E. "Priming of and induction of anti poliovirus neutralizing antibodies by synthetic peptides". *Nature* 304: 699-703 (1985).
32. Enders, J. "Techniques de culture de tissus appliquées actuellement a l'étude des virus poliomyelitiques". W.H.O. Monograph Series N° 26:208 (1955).
33. "Epidemiologic Notes and reports:measles". *Morbidity and Mortality Weekly report*. 27:6 (1978).
34. Fenner, F., White, D. *Virología Médica*. La Prensa Médica Mexicana. México, 1978.
35. Ferguson, M., Minor, P.D., Magrath, D.J., Spitz, M., Schild, G.C. "Caracterización antigénica del poliovirus tipo 3 utilizando anticuerpos monoclonales". O.P.S. Publicación Científica N° 484:311-315 (1984).
36. Fox, J. "Modes of action of poliovirus vaccines and relation to resulting immunity". *Rev. Infect. Disess.* 6:5352-5355 (1984).
37. Fudenberg, H., Stites, S. *Manual de Inmunología Clínica*. 5a. ed. El Manual moderno, S.A. México, 1985.
38. Fuenzalida, E. "Suckling mouse brain vaccine". W.H.O. Monograph Series N° 23:216-220 (1973).
39. Fuenzalida, F. "Consideraciones sobre la vacuna en cerebro de ratón lactante". *Salud Pública de México XVI(3):443-450 (1974)*.
40. Fujigaki, A. "Vacunas tradicionales". *Salud Pública de México. XIII(5):531-536 (1930)*.
41. Furesz, J., Armstrong, R., Contreras, G., Wachmann, B. "Caracterización genética de muestras aisladas de poliovirus en el Canadá". O.P.S. Publicación Científica N° 484:337-346 (1984).
42. Gispén, R. "Suckling rabbit vaccine". W.H.O. Monograph Series N° 23:211-217 (1973).

43. González Pacheco, M. "Control de calidad de los productos biológicos elaborados por la S.S.A." Salud Pública de México XXI(4): 421-427 (1979).
44. González Pacheco, M. "Producción de biológicos en México". Salud Pública de México XXIII(6):539-543 (1981).
45. Greco, E. Solís, J. Proyecto de un manual de lectura previa para el estudio de la producción y control de sueros y vacunas. Tesis, Facultad de Química, U.N.A.M. México, 1979.
46. Grenier, B., Hamms, B., Hiron, G., Xueref, J., Viarme, P., Roumiantseff, N. "Seroinmunidad en lactentes después de la vacunación con una vacuna de poliovirus inactivados preparada en células VERO". O.P.S. Publicación Científica N° 484:361-365 (1984).
47. Habel, K. "General considerations in rabies vaccine production". W.H.O. Monograph Series N° 23:189-191 (1973).
48. Habel, K. "Ultraviolet light irradiation for inactivation of vaccine". W.H.O. Monograph Series N° 23: 228-234 (1973).
49. Habel, K. "Vaccine safety and potency tests". W.H.O. Monograph Series N° 23: 271-286, 292-296 (1973).
50. Hayflick, L. Experimental Cell Research. 37:614 (1965).
51. Hilleman, M.R. "Vacuna antisarampionosa estabilizada en un nuevo sistema de administración de dosis única". O.P.S. Publicación Científica N° 477:165-167 (1985).
52. Hinman, A. "Vaccine preventable diseases and child day care". Rev. Infect. Disess. 3:573-583 (1986).
53. Hirayama, M. "Vacunas antisarampionosas utilizadas en el Japón". O.P.S. Publicación Científica N° 477:143-154 (1985).
54. Hitzeman, R., Chen, C.Y., Magie, P.E. Nucleic Acids Research. 11: 2745 (1983).
55. Horstmann, D. Immunization against viral infections. W.H.O. Geneva, 1983.
56. Hoskins, J. "Duck-embryo vaccine". W.H.O. Monograph Series N° 23 243-255 (1973).
57. Jacobs, J., Jones, J., Seille, J. "Characteristics of a human diploid cell designated MRC-5". Nature 227:108-110 (1970).

58. Jeffrey, C. "Synthesis of hepatitis B surface and core antigens in *E. coli*". *Nature* 291:503-506 (1981).
59. Jianzhi, C., Zhihui, Ch. "La vacuna antisarampionosa en la República Popular China". O.P.S. Publicación Científica N° 477:158 (1985).
60. Johnson, R. "Progresión tardía de la poliomiелitis paralizante". O.P.S. Publicación Científica N° 404:396-399 (1984).
61. Junqueira, L. *Biología Celular*. La Prensa Médica Mexicana, S.A. México, 1981.
62. Kerekujumcan, M. "Suckling rat brain vaccine". W.H.O. Monograph Series N° 23: 213-215 (1973).
63. Keus, J. "An accidental human trial of recombinant vaccinia virus". *Trends in Biotech.* 4(5(28)):105-106. (1986).
64. Kew, O., Nottay, B. "Epidemiología molecular de los poliovirus". O.P.S. Publicación Científica N° 484:297-304 (1984).
65. Kirk-Othmer. *Encyclopedia of Chemical Technology*. 3rd. ed. Vol. 23, Vaccine Technology. Ed. Wiley. New York, 1978.
66. Koprowsky, H. "Vaccine for man prepared in human diploid cells". W.H.O. Monograph Series N° 23:256-260 (1973).
67. Krugman, S. "Vacunas antisarampionosas más atenuadas: características y utilización". O.P.S. Publicación Científica N° 477:117-123 (1985).
68. "La Farmacopea Nacional, fundamental para el desarrollo científico: S.S.A". *Excelsior*. Año LXX. 23 de oct. de 1986.
69. Laver, W. *Towards a universal influenza vaccine. The replication of negative strand viruses*. Elsevier. North Holland, 1981.
70. Lerner, R. "Synthetic vaccines". *Sci. Am.* 66:74 (1983).
71. López Fintado, F. "Producción de vacunas antirrábicas en ratón lactante". *Salud Pública de México*. XVI(3):451-463 (1974).
72. Makino, S. "Desarrollo y características de la vacuna antisarampionosa viva AIK-C: un breve informe". O.P.S. Publicación Científica N° 477: 155-157 (1985).
73. Mann, G.F., Allison, L.M.O., Lloyd, J.S., Tam, P., Suckerman, A.J., Perkins, F.P. "Estabilidad de las vacunas antisarampionosas más atenuadas". O.P.S. Publicación Científica N° 477:124 (1985).
74. Maxam, A., Gilbert, W. *Meth. Enzym.* 65:499-560 (1980).

75. Mc Aleer, W.J., Buynak, E.B., Maigetter, R.Z., Wampler, D.E., Miller, W.J., Killeman, W.R. "Human hepatitis B vaccine from recombinant yeasts". *Nature* 307:178-180 (1984).
76. Mc Aleer, W.J. "Novel single-dose delivery system for vaccines". *J. of Biol. Stand.* 10:329-333 (1982).
77. Mc Aleer, W.J., Markus, H.Z. (Merck & Co, INC). Vaccine Stabilizer. U.S. Pat. 4 147 772. 23 Apr., 1973.
78. McBean, A.M., Thoms, W.L., Johnson, R.H., Gadless, B.R., MacDonald, B. "Una comparación entre las respuestas serológicas a las vacunas antipoliomielíticas". O.P.S. Publicación Científica N° 484: 373-378 (1984).
79. Mc Graw Hill. *Encyclopedia of Science and Technology*. 3rd. ed. Vol. 2, Biologicals. Mc Graw Hill, U.S.A., 1971.
80. Melnick, J. "Advantages and disadvantages of killed and live poliovaccines". *Bull. of the W.H.O.* 56(1):21-38 (1978).
81. Melnick, J., Dreesman, G.R., Hollinger, F.B. "Approaching the control of viral hepatitis type B". *J. of Infect. Diseases.* 133:210 (1976).
82. Melnick, J. "Vacuna oral de poliovirus atenuados". O.F.S. Publicación Científica N° 484: 33-39 (1984).
83. *Microcarrier Cell Culture. Principles and Methods.* Pharmacia Fine Chemicals. Sweden, 1981.
84. Minor, P.D., Evans, D.M.A., Schild, G.C., Ferguson, M., Almond, J.W. "Identificación de un punto de localización antigénico en la neutralización del virus poliomiélfico del tipo 3". O.P.S. Publicación Científica N° 484:319-323 (1984).
85. Mirchamsy, H. "Inmunización contra el sarampión en el Irán". O.P.S. Publicación Científica N° 477:137-142 (1985).
86. Miyahara, A. Toh-E, A., Nozaki, Ch., Hameda, F., Ohtomo, N., Matsubara, K. "Expression of hepatitis B surface antigen gene in yeasts". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:1-5 (1983).
87. Montagnon, B.J., Tangot, A., Vincent-Pelquet, J.C. "Industrial scale production of inactivated poliovirus vaccine prepared by culture of Vero cells on microcarrier". *Rev. Infect. Diseases.* 6: 2541-2544 (1984).

88. Montiel Aguirre, F. Técnicas especiales de estudio (Tecnología de ADN recombinante). Curso de Organización Molecular de la Célula. Facultad de Química, U.N.A.M. México, 23 de mar., 1987.
89. Moynihan, M., Petersen, I. "The durability of inactivated polio-virus vaccine studies on the stability of potency". J. of Biol. Stand. 10:261-263 (1982).
90. Murray, E., Bruce, S.A., Hinnen, A., Wingfield, P. *EMBO J.* 3: 645-650 (1984).
91. "New approaches to vaccine development". Bull. of the W.H.O. 63:479-484 (1985).
92. Nomoto, A., Toyoda, H., Katsuka, Y., Kohara, M., Suganuma, T., Omata, T., Imura, N. "Métodos para la elaboración de nuevas vacunas antipoliomielíticas basadas en la Genética Molecular". O.P.S. Publicación Científica N° 484:290-296 (1984).
93. Norrby, E. *Messles vaccines New trends and developments in vaccines*. Ed. Voller and Friedman, University Park Press. Baltimore, 1978.
94. Norrby, E. Summary: Vaccines 85. Cold Spring Harbor Lab., U.S.A., 1985.
95. O.M.S. Biologicals: International list of availability of vaccines and sera. Geneva, 1984.
96. O.M.S. Certificados de vacunación exigidos y consejos de salud para los viajes internacionales.
97. O.M.S. Comité de Expertos de la O.M.S. en fiebre amarilla. Serie de Informes Técnicos N° 479, 1971.
98. O.M.S. Comité de Expertos de la O.M.S. sobre rabia. Serie de Informes Técnicos N° 709, 1984.
99. O.M.S. Consultation. "Quality control of biologicals produced by recombinant DNA techniques". Bull. of the W.H.O. 61(6): 897-911 (1983).
100. O.M.S. hepatitis vírica. serie de Informes Técnicos N° 570, 1975.
101. O.M.S. Normas Generales de Esterilidad para Sustancias Biológicas. Serie de Informes Técnicos N° 530, 1975.
102. O.M.S. Normas Generales para Fábricas y Laboratorios de Inspección. Serie de Informes Técnicos N° 523, 1980.
103. O.M.S. Normas para la vacuna antiamarilla. Serie de Informes Técnicos N° 594, 1973.

104. O.M.S. Normas para la vacuna antipoliomielítica (inactivada). Serie de Informes Técnicos N° 673, 1982.
105. O.M.S. Normas para la vacuna antipoliomielítica (oral). Serie de Informes Técnicos N° 687, 1983.
106. O.M.S. Normas para la vacuna antirrábica de uso médico. Serie de Informes Técnicos N° 658, 1981.
107. O.M.S. Normas para la vacuna antisarampionosa viva y para la vacuna antisarampionosa inactivada. Serie de Informes Técnicos N° 329, 1966.
108. O.M.S. Normas para la vacuna antisarampionosa (viva). Addendum de 1981. Serie de Informes Técnicos N° 673, 1982.
109. O.M.S. Normas para la vacuna contra la hepatitis (viva). Serie de Informes Técnicos N° 725, 1985.
110. O.M.S. Progresos en el estudio de la hepatitis vírica. Serie de Informes Técnicos N° 602, 1977.
111. O.M.S. Vacunas de virus y medicamentos antivíricos. Serie de Informes Técnicos N° 693, 1983.
112. O.P.S. "Enfermedades prevenibles por vacunación e inmunizaciones" Publicación Científica N° 472:5-10 (1984).
113. O.P.S. "Guías para la vigilancia, prevención y control de la fiebre amarilla". Publicación Científica N° 410 (1981).
114. Parkman, P.D., Hopps, H.E., Albrecht, P.E., Meyer, H.M. "Administración simultánea de vacunas". Publicación Científica (OPS), 451:68-84 (1983).
115. Parkman, P.D. "Las vacunas antisarampionosas: resumen". Publicación Científica (OPS) 477:197-200 (1985).
116. Peradze, P., Smorodinstev, A. "Epidemiología y profilaxis específica del sarampión". O.P.S. Publicación Científica 477:184-189 (1985).
117. Peretz, M. "Perspectivas del suministro futuro de vacunas". O.P.S. Publicación Científica 477:184-189 (1985).
118. Perkins, F. "La estandarización de las vacunas". O.P.S. Publicación Científica 454:330-332 (1984).
119. Perkins, F. "Las vacunas antisarampionosas: consideraciones". O.P.S. Publicación Científica 477:190-191 (1985).

120. Perkins, F. "Licensed vaccines". Rev. Infect. Diseases. 7:573-576 (1985).
121. Plotkin, S. "Rabies vaccine prepared in human cell cultures: Progress and Perspectives". Rev. Infect. Diseases. 2:433-448 (1980).
122. Racaniello, V., Baltimore, D. "Cloned poliovirus complementary DNA is infectious in mammalian cells". Sci. 214:916-918 (1981).
123. Racaniello, V. "Estudio del poliovirus con ADNc clónico infeccioso". O.P.S. Publicación Científica 484:316-318 (1984).
124. Remington Pharmaceutical Science. 16th. ed. Mack Pub. Co. Chap. 73, Immunizing agents and diagnostic antigens. U.S.A., 1980.
125. Remington Pharmaceutical Science. 17th. ed. Mack Pub. Co. Chap. 74, Immunizing agents and diagnostic skin antigens. U.S.A., 1985.
126. Sabin, A.B., Fernández de Castro, J., Flores Aréchiga, A., Sever, J., Madden, D., Shekerchi, I. "Clinical trial of inhaled aerosol of human diploid and chick embryo measles vaccines". The Lancet II:504 (1980).
127. Sabin, A.B. "Inmunización contra el sarampión mediante aerosol". O.P.S. Publicación Científica 477:168-180 (1985).
128. Salido, F. "Vacunas antirrábicas". Salud Pública de México. XVI (3):489-494 (1974).
129. Salk, J. "Inmunización de una dosis contra la poliomielitis paralítica utilizando vacuna no infecciosa". O.P.S. Publicación Científica 484:209-219 (1984).
130. Seagroatt, V., Magrath, D. "A WHO Collaborative study of in vitro and in vivo methods for the assay of yellow fever vaccines". J. of Biol. Stand. 11:47-54 (1983).
131. Secretaría de Salubridad y Asistencia. Cuadro Básico de Medicamentos. México, 1984.
132. Secretaría de Salubridad y Asistencia. Guía temática de educación para la salud y la nutrición. México, 1983.
133. Secretaría General de Asistencia. "Ley General de Salud". Diario Oficial del 7 de Feb., de 1984.
134. Secretaría de Salud. Gerencia General de Biológicos y Reactivos. Lista de precios al sector público y privado de las vacunas, sueros, reactivos y hemoderivados. México, 1986.

120. Perkins, F. "Licensed vaccines". *Rev. Infect. Diseases.* 7:573-576 (1985).
121. Plotkin, S. "Rabies vaccine prepared in human cell cultures: Progress and Perspectives". *Rev. Infect. Diseases.* 2:433-448 (1980).
122. Racaniello, V., Baltimore, D. "Cloned poliovirus complementary DNA is infectious in mammalian cells". *Sci.* 214:916-918 (1981).
123. Racaniello, V. "Estudio del poliovirus con ADNc clónico infeccioso". O.P.S. *Publicación Científica* 484:316-318 (1984).
124. *Remington Pharmaceutical Science.* 16th. ed. Mack Pub. Co. Chap. 73, Immunizing agents and diagnostic antigens. U.S.A., 1980.
125. *Remington Pharmaceutical Science.* 17th. ed. Mack Pub. Co. Chap. 74, Immunizing agents and diagnostic skin antigens. U.S.A., 1985.
126. Sabin, A.B., Fernández de Castro, J., Flores Aréchiga, A., Sever, J., Madden, D., Shekerchi, I. "Clinical trial of inhaled aerosol of human diploid and chick embryo measles vaccines". *The Lancet* II:504 (1986).
127. Sabin, A.B. "Inmunización contra el sarampión mediante aerosol". O.P.S. *Publicación Científica* 477:168-180 (1985).
128. Salido, F. "Vacunas antirrábicas". *Salud Pública de México.* XVI (3):489-494 (1974).
129. Salk, J. "Inmunización de una dosis contra la poliomiелitis paralítica utilizando vacuna no infecciosa". O.P.S. *Publicación Científica* 484:209-219 (1984).
130. Seagroatt, V., Magrath, D. "A WHO Collaborative study of in vitro and in vivo methods for the assay of yellow fever vaccines". *J. of Biol. Stand.* 11:47-54 (1983).
131. Secretaría de Salubridad y Asistencia. *Cuadro Básico de Medicamentos.* México, 1984.
132. Secretaría de Salubridad y Asistencia. *Guía temática de educación para la salud y la nutrición.* México, 1983.
133. Secretaría General de Asistencia. "Ley General de Salud". *Diario Oficial* del 7 de feb., de 1984.
134. Secretaría de Salud. *Gerencia General de Biológicos y Reactivos.* Lista de precios al sector público y privado de las vacunas, sueros, reactivos y hemoderivados. México, 1986.

135. Secretaría de Salud. Instituto Nacional de Higiene. Dirección General de Control de Calidad y Desarrollo. Seminario: sarampión. Oct. 10, 1986.
136. Seefried, A.V., Chun, J.H., Grant, J.A., Letvenuk, L., Pearson, E. "Inactivated poliovirus vaccine and test development at Connaught Laboratories LTD". Rev. Infect. Diseases. 6:5345 (1984).
137. Seligman, B. "Simple type vaccine". W.H.O. Monograph Series N° 23:192-198 (1973).
138. Selimov, M., Morogova, V. "Phenolized, freeze dried sheep brain vaccine". W.H.O. Monograph Series N° 23:201-212 (1973).
139. "Se podrá exportar la vacuna contra el sarampión:S.S.A.". Ex-celsior. Año LXX, tomo 5 (Oct. 21, 1986).
140. Sever, J. "Infectious diseases and immunization". Rev. Infect. Diseases. 4:136-146 (1982).
141. Shaouyan, W., Xiuqing, X., Yihao, Z., Shuwang, S., Haijiang, L., Jingcai, L., Bincheng, H., Hongye, X., Tengxiao, L. "An investigation of the causes of failures in measles". J. of Biol. Stand. 10:197-203 (1982).
142. Shepherd, W., Langford, D., Kelly, A. "A single-blind placebo controlled comparison of the reactivity and antigenicity of trivalent oral poliovirus vaccine". J. of Biol. Stand. 11:29-33 (1983).
143. "Síntesis: Campaña de vacunación antipolio". Novedades. México. Ene. 12, 1987.
144. Sokol, F. "Purificación de virus rábico y aislamiento de sus componentes". O.M.S. Serie de monografías N° 23 (1973).
145. Spence, L. "Observaciones sobre el uso de vacunas orales de poliovirus en el Caribe y en Canadá". O.P.S. Publicación Científica N° 484:45-48 (1984).
146. Tauraso, M. Proc. Soc. Exp. Biol. (New York) 127:1116-1120 (1968).
147. "Transfer of technology for production of rabies vaccine". Bull. of the W.H.O. 63:661-666 (1985).

148. U.S. Congress. Office of Technology Assessment (OTA). Commercial Biotechnology. Washington, D.C., 1984.
149. "Vaccine related issues". Rev. Infect. Diseases. 4:972-977 (1982).
150. Valenzuela, P., Medina, A., Rutter, W. "Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast". Nature, 298:347-350 (1982).
151. Vallancourt, F. "Current poliovirus vaccines". Rev. Infect. Diseases. 6:5320-5330 (1984).
152. Valtueña, J. "Las vacunaciones". Rassegna. 5:19-26 (1981).
153. Van Mezel, A.L., Van Steenis, G., Van-Der-Marel, P., Osterhaus, A. "Inactivated poliovirus vaccine". Rev. Infect. Diseases. 6:5335-5340 (1984).
154. Weibel, R. "Obtención y evolución de la vacuna antisarampionosa". Publicación Científica 301:9-13 (1975).
155. Wimmer, E., Emini, E., Jameson, B. "Preparación mediante péptidos de una respuesta inmunitaria neutralizante contra el poliovirus". Publicación Científica (OPS) 484:305-310 (1984).
156. Yelverton, E., Norton, S., Obijeski, J., Goeddel, D. "Rabies virus glycoprotein analogs". Science 219:614-620 (1983).
157. Zuckerman, A. "Hepatitis vaccine". Nature 255:104-105 (1975).

8. ANEXO

8.1 NORMAS PARA LA VACUNA ANTIPOLIOMIELITICA INACTIVADA.

8.1.1 Definiciones.

Se entenderá por Vaccinum poliomyelitidis inactivatum una suspensión acuosa de virus poliomiélfíticos tipos 1,2 y 3 obtenidos en cultivos celulares, e inactivados.

8.1.2 Normas generales de fabricación.

Los locales de fabricación se descontaminarán antes de su empleo y no debe haber más cultivos que los que hayan sido aprobados para utilizarlos en la producción de la vacuna. El personal debe ser sano e inmune a los tres tipos de poliovirus.

8.1.3 Inspección de la producción.

a) Inspección de las materias primas.

La producción de la vacuna se basará en un sistema de lotes de siembra. Podrá utilizarse cualquier cepa siempre que la vacuna se ajuste a las presentes normas. El virus de siembra no deberá haber sufrido más de 10 pases a partir del lote de siembra utilizado para la producción de la vacuna.

Si se emplean cultivos de células renales de mono como medio de propagación viral, deberán utilizarse monos sanos, de una especie aprobada por la Secretaría de Salud y que no hayan sido utilizados previamente con fines experimentales. Si se utilizan células diploides humanas o líneas celulares continuas, las células deberán ser registradas por lo que respecta a sus características de proliferación, genealogía, cariólogía y viabilidad durante el almacenamiento.

El suero empleado para la propagación celular deberá ser probado a fin de demostrar la ausencia de bacterias, hongos, micoplasmas y gérmenes patógenos de la especie de origen del suero. No se empleará penicilina en ninguna etapa de la producción.

b) Cultivos celulares utilizados como testigos.

De la suspensión celular destinada a la producción de la vacuna, se tomará una muestra para preparar cultivos celulares testigos, es decir, no inoculados, con objeto de descubrir la pre

sencia de los siguientes agentes extraños: virus hemadsorben-
tes, herpesvirus símicos (virus B) y virus SV40.

c) Precauciones que deben tomarse en la fabricación.

Si se utiliza suero para la propagación de cultivos celular -
res, la concentración del mismo en la vacuna no será superior
a 1 ul/l. No deberá emplearse penicilina en el medio de cul-
tivo celular ni en el vírico.

d) Inspección en las fases monovalentes del producto.

Quando las pruebas en las células testigo han demostrado que
las células son satisfactorias, pueden mezclarse las suspen-
siones individuales víricas de esas células y tomarse mues-
tras para practicar las siguientes pruebas:

1. Identificación de virus SV40.

Se cultivan muestras de cada mezcla monovalente produci-
da en cultivos celulares de riñón de mono, en cultivos
celulares de Cerconithacus para detectar la presencia
de virus SV40 o de otro agente extraño.

2. Identificación de virus B.

Se inoculan muestras de cada mezcla monovalente produci-
da en cultivos celulares de riñón de mono, en conejos a
dultos y sanos para detectar la presencia de herpesvi-
rus símicos.

3. Prueba de identificación.

Se identifica el virus en la mezcla monovalente median-
te prueba de neutralización con antisuero específico.

4. Pruebas de esterilidad.

Se determina la esterilidad bacteriana y micótica de ca-
da mezcla monovalente mediante incubación de éstas en me-
dio fluido con tioglicolato de sodio y medio Sabouraud
líquido, respectivamente.

5. Titulación del virus.

Cada mezcla debe presentar un título no menor a 10^7 DICT₅₀
por mililitro utilizando un lote de cultivo tisular de
sensibilidad normal.

6. Prueba de inactivación.

Se toman muestras de cada mezcla monovalente y se inocu-
lan en cultivos tisulares para comprobar la ausencia de
virus poliornielíticos infectantes.

e) Inspección del preparado trivalente a granel.

Para formar un producto trivalente a granel sólo se unirán las mezclas monovalentes que según se haya comprobado, sean satisfactorias. Se verificarán las pruebas de inactivación y de esterilidad descritas anteriormente. Si se añaden agentes conservadores y otros aditivos, no deberán ejercer efecto perjudicial sobre la inmunogenicidad del preparado trivalente a granel.

8.1.4 Envasado y recipientes.

Los envases serán de vidrio incoloro y completamente transparente para que pueda apreciarse cualquier cambio de aspecto de la vacuna. Pueden usarse envases de una o varias dosis.

8.1.5 Inspección del producto final.

Del lote de envasado se tomarán muestras para realizar las siguientes pruebas:

1. Pruebas de identificación y actividad.

Cada vacuna se someterá a un ensayo in vitro para determinar el contenido de antígeno y una valoración in vivo para establecer la respuesta inmunitaria. La valoración in vitro puede efectuarse mediante fijación del complemento, ELISA, difusión en gel, inmunodifusión radial o valoración radioinmunitaria. El ensayo in vivo puede efectuarse mediante inoculación en ratas.

2. Pruebas de esterilidad.

Se determinará la esterilidad bacteriana y micótica de cada lote de envasado, mediante incubación de estos en medio fluido con tioglicolato de sodio y medio Sabouraud líquido, respectivamente.

3. Prueba de inocuidad.

La toxicidad de la vacuna definitivamente envasada se comprobará mediante pruebas en el cobayo y el ratón.

4. Contenido de nitrógeno proteico.

El contenido total de nitrógeno proteico de la vacuna antipoliomiélfítica (inactivada) no debe exceder de 10 ug por dosis humana.

8.2 NORMAS PARA LA VACUNA ANTIPOLIOMIELITICA ORAL.

8.2.1 Definiciones.

Se entenderá por Vaccinum poliomyelitis perorale una preparación de virus poliomiélfíticos, vivos y atenuados de los tipos 1, 2 y 3, obtenidos en cultivos in vitro de células idóneas, elaborada en forma adecuada para la administración oral.

8.2.2 Normas generales de fabricación.

Los locales de fabricación se descontaminarán antes de iniciar la producción de la vacuna. El personal debe ser sano e inmune a la poliomiélfitis. En los locales de producción sólo se podrán introducir los cultivos celulares que hayan sido a probados para su empleo en la producción de la vacuna.

8.2.3 Inspección de la producción.

a) Inspección de las materias primas.

La producción de la vacuna deberá basarse en el sistema de lotes de siembra del virus, el cual deberá estar exento de virus extraños perceptibles. Las cepas empleadas en la preparación de la vacuna deben ser inmutógenas e inocuas; en la actualidad se utilizan principalmente las cepas Sabin.

Si se emplean cultivos de células renales de mono como medio de propagación viral, deberán utilizarse monos sanos, de una especie aprobada por la Secretaría de Salud y que no hayan sido utilizados previamente con fines experimentales. Si se utilizan cultivos de células diploides humanas, la cepa celular aceptada y de la cual se hayan derivado las células de siembra, ha de estar identificada en lo que se refiere a genealogía, características de multiplicación, marcadores genéticos, susceptibilidad viral, condiciones de almacenamiento y cariología; y deberá comprobarse que está libre de cualquier agente extraño mediante pruebas en animales, huevos embrionados y cultivos celulares.

b) Precauciones que deben tomarse en la fabricación.

Si se utilizan cultivos de células renales de mono para la propagación del virus, éstos no deberán haber sido obtenidos por propagación en serie. Si se utiliza suero animal para la

propagación de las células, no deberá estar presente en el medio de mantenimiento después de la inoculación del virus. Sólo se inocularán con el virus los cultivos celulares que estén exentos de signos de degeneración. Se dejarán cultivos celulares sin inocular (testigos) para investigar la presencia de agentes extraños, tales como herpesvirus cerpitécido 1 o virus hemadsorbentes.

Si se utilizan cultivos de células diploides humanas para la propagación del virus, sólo se emplearán cultivos de células derivadas de una siembra celular exenta de anomalías citológicas. Se harán pruebas para la investigación de virus extraños, bacterias, hongos y micoplasmas presentes en los cultivos de producción, y pruebas de investigación de virus hemadsorbentes presentes en los cultivos testigos.

c) Inspección de las suspensiones individuales.

Las suspensiones de virus se recolectarán en los 4 días siguientes a la inoculación viral y nunca más tarde. En muestras de cada suspensión individual se harán las siguientes pruebas:

1. Pruebas de esterilidad.

Se determina la esterilidad bacteriana y micótica de cada suspensión individual mediante incubación de éstas en medio fluido con tioglicolato de sodio y medio Sabouraud líquido, respectivamente. En cada suspensión individual debe investigarse también la presencia de M. tuberculosis y micoplasmas mediante métodos autorizados por la Secretaría de Salud.

2. Identificación de virus SV40.

Se inoculan muestras de cada suspensión individual en cultivos de células renales de monos de la misma especie y de otra diferente de la empleada para la producción de la vacuna, y en cultivos de células humanas (si la vacuna se produce en cultivos de células diploides humanas), para investigar la presencia de virus SV 40 o de otro agente extraño.

3. Identificación de virus B.

Se inoculan muestras de cada suspensión individual en

cultivos de células renales de conejo para investigar la presencia de herpesvirus cercopithecino 1 (virus B) y de otros virus extraños.

4. Pruebas en animales.

Las suspensiones individuales se inoculan en conejos, cobayos, ratones lactantes y ratones adultos para investigar la presencia de virus B, M. tuberculosis y agentes extraños patógenos para el ratón, respectivamente.

5. Agentes conservadores y estabilizadores.

Los agentes conservadores o estabilizadores que se agreguen a las suspensiones individuales o a la suspensión a granel no deben menoscabar la inocuidad ni la potencia de la vacuna.

d) Inspección de la suspensión a granel.

En la preparación e inspección del producto acabado a granel, se tomarán las precauciones necesarias para evitar su contaminación y se someterá a las siguientes pruebas:

1. Pruebas en animales.

Cada suspensión a granel se someterá a las pruebas en animales descritas anteriormente para investigar la presencia de agentes extraños, a no ser que ya se hayan efectuado dichas pruebas en las suspensiones individuales.

2. Prueba de identificación.

El tipo de virus poliomiélfítico contenido en la suspensión a granel se identificará por métodos serológicos, u tilizando sueros monoespecíficos.

3. Titulación del virus.

Se determinará la concentración de virus poliomiélfítico infectante en la suspensión a granel filtrada utilizando cultivos celulares y expresando el resultado en UFP por mililitro o D_{50} por mililitro.

4. Pruebas para verificar la constancia de las características del virus.

El virus poliomiélfítico de la suspensión a granel se someterá a pruebas comparativas con el lote de muestra con el fin de verificar que el virus no ha sufrido modifica-

ciones en el curso de su multiplicación durante la preparación de la vacuna. Las pruebas que se realizan son las siguientes:

a) Prueba de neurovirulencia.

En esta prueba se compara la patogenicidad del virus de la suspensión a granel con el virus de referencia, en lo que respecta al número y tipo de lesiones producidas en el sistema nervioso de monos Maca o Cercopithecus. Las observaciones clínicas e histopatológicas no deben revelar una diferencia significativa de patogenicidad entre el virus y el material de referencia.

b) Pruebas in vitro.

El virus de la suspensión a granel se incuba a las temperaturas de 36°C y 40°C, para evaluar su capacidad de reproducción en comparación con el lote de siembra. El título determinado a 36°C, tanto en el caso del virus de la suspensión a granel como en el del material de referencia, debe ser al menos 100 000 veces mayor que el determinado a la temperatura más alta.

5. Pruebas de esterilidad.

Se determina la esterilidad bacteriana y micótica de la suspensión a granel en medio líquido con tioglicolato y medio Sabouraud líquido, respectivamente.

8.2.4 Envasado y recipientes.

La vacuna deberá envasarse en frascos ampula ámbar. El envasado se llevará a cabo de manera que no produzca ninguna contaminación o alteración del producto.

8.2.5 Inspección del producto acabado.

Se tomarán muestras de cada lote de llenado para someterlas a las siguientes pruebas:

1. Prueba de identificación.

Los tipos de virus poliomiélfíticos contenidos en el producto final se identificarán mediante pruebas serológicas utilizando sueros específicos.

2. Pruebas de esterilidad.

Se determinará la esterilidad bacteriana y micótica de la vacuna líquida, mediante incubación en medio fluido con tinglicolato de sodio y medio Sabouraud líquido.

3. Titulación del virus.

Se determinará la concentración de cada tipo de virus poliomiélfítico por separado en cultivos celulares, previamente neutralizando los otros dos tipos de poliovirus con sus ros monoespecíficos.

4. Pruebas de inocuidad.

La inocuidad se verificará mediante pruebas hechas en la inyección parenteral de la vacuna al ratón, al cobayo o al conejo.

5. Estabilidad.

La vacuna se someterá a una prueba acelerada de estabilidad, incubándola a 37°C durante 7 días, determinando el tí tulo de virus antes y después de la incubación.

8.3 NORMAS PARA LA VACUNA ANTISARAMPIONOSA VIVA.

8.3.1 Definiciones.

Se entenderá por Vaccinum morbillorum vivum una preparación de virus sarampionoso vivo atenuado, obtenido en un cultivo de tejidos primario.

8.3.2 Normas generales de fabricación.

Los servicios de producción e inspección deben ser independientes y sus respectivas funciones estarán perfectamente delimitadas. En los locales de fabricación no se autorizará la introducción de estirpes celulares continuas.

8.3.3 Inspección de la producción.

a) Inspección de las materias primas.

La producción de la vacuna se basará en el sistema de lotes de siembra. Las cepas de virus del sarampión utilizadas para la producción de la vacuna no deben haber sufrido ningún pase en estirpes celulares continuas y deben estar exentas de neurovirulencia. Los animales utilizados para preparar los cultivos celulares, ya sea que se empleen cobayos, bovinos, perros o embriones de pollo, deben estar exentos de agentes patógenos.

Cada lote de siembra se someterá a las pruebas necesarias para comprobar que está exento de cualquier agente microbiano viable extraño. El virus de la vacuna acabada no deberá estar separado por más de diez pases en cultivo tisular del virus utilizado para la preparación de la vacuna.

b) Precauciones que deben tomarse en la producción.

Del tejido utilizado para cultivar el virus sarampionoso se prepararán cultivos testigo, es decir, no inoculados, con objeto de descubrir la presencia de agentes extraños mediante las siguientes pruebas:

1. Identificación de virus hemadsorbentes.

Las capas celulares formadas en un cuarto a un tercio de los recipientes testigo se pondrán en contacto con hemafías de cobayo para descubrir la presencia de virus sensibles a la hemadsorción.

2. Pruebas de los cultivos de tejidos.

De la mezcla de líquidos procedentes de los cultivos testigo se tomarán muestras para investigar la presencia de agentes extraños mediante inoculación en cultivos de células de hombre y de mono y en el sistema de cultivos tisulares para la producción de la vacuna.

3. Pruebas complementarias.

Si se utilizan cultivos de embrión de pollo para la producción de la vacuna, en una muestra de la mezcla de líquidos tomados de los cultivos testigo se investigará la presencia de virus de la leucosis aviar.

Si se utilizan otros tejidos para la fabricación de la vacuna, deberá investigarse la presencia de agentes extraños típicos de las especies de que procede el tejido cultivado.

Los tejidos usados para la producción de la vacuna se cultivarán en condiciones asépticas. El medio de mantenimiento de las células no deberá contener proteínas, suero humano ni penicilina. En el momento de la recolección del líquido de los cultivos de virus, se tomarán muestras para efectuar pruebas de esterilidad y titulación del virus, las cuales se describen más adelante.

c) Inspección de las mezclas de virus antes de la clarificación.

La mezcla de virus se preparará a partir de una suspensión individual o de una mezcla de suspensiones individuales y se someterá a las siguientes pruebas:

1. Pruebas de esterilidad.

Se determinará la esterilidad bacteriana y micótica de cada mezcla de virus mediante incubación en medio líquido con tioglicolato de sodio y medio Sabouraud, respectivamente. Deberá investigarse también la presencia de micoplasmas mediante un método autorizado por la Secretaría de Salud, así como la presencia de M. tuberculosis de origen humano, bovino y aviar.

2. Pruebas en cultivos de tejidos.

En una muestra de cada mezcla de virus se investigará la presencia de agentes extraños mediante inoculación en cultivos de células de mono, de humano y del tipo utilizado para la preparación de la mezcla de virus.

3. Pruebas en animales.

Cada mezcla de virus se inocula en cobayos, ratones a dultos y lactantes, y huevos embrionados de gallina, con objeto de descubrir la presencia de M. tuberculosis, agentes extraños patógenos para el ratón y agentes extraños atribuibles a la mezcla de virus, respectivamente.

4. Pruebas complementarias.

Cada mezcla de virus se someterá a las pruebas complementarias descritas anteriormente.

d) Clarificación e inspección de la mezcla de virus clarificada.

La mezcla de virus se clarificará por un método que asegure la eliminación de todas las células intactas. Además pue de hacerse a la mezcla la prueba en el mono para investigar la presencia de agentes neurotrops.

e) Inspección de la suspensión acabada a granel.

La suspensión acabada a granel se preparará a partir de una o más mezclas de virus clarificadas. Pueden añadirse agentes estabilizadores o diluyentes que no sean nocivos so bre el producto en las concentraciones utilizadas. Deberán practicarse las pruebas de esterilidad mencionadas previamente en cada suspensión acabada a granel.

8.3.4 Envasado y recipientes.

El envasado se efectuará en condiciones asépticas. Pueden utilizarse envases individuales o de varias dosis.

8.3.5 Inspección del producto final.

Del lote de envasado se tomarán muestras para realizar las siguientes pruebas:

1. Prueba de identificación.

La prueba de identificación se efectuará al menos en

un recipiente de cada lote de llenado, mediante la prueba de neutralización en cultivo de tejidos o la de inhibición de la hemaglutinación con inmunosueros específicos.

2. Pruebas de esterilidad.

Se determinará la esterilidad bacteriana y micótica de cada lote de envasado, mediante incubación en medio fluido con tioglicolato de sodio y medio Sabouraud líquido, respectivamente.

3. Titulación del virus.

En cada lote de llenado se determinará la concentración de virus vivos por titulación en un sistema de cultivo tisular apropiado. El título no debe ser inferior a 10^3 DICT₅₀.

4. Pruebas de inocuidad.

La inocuidad del lote de llenado se comprobará mediante pruebas de inoculación por vía parenteral en el cobayo y el ratón.

5. Contenido de proteínas.

Si se utiliza un suero animal en alguna fase de la fabricación, su concentración en la vacuna reconstituida no debe exceder de una parte por millón.

6. Inspección de los recipientes definitivos.

Todos los recipientes del lote de llenado serán objeto de una inspección visual y se desecharán todos aquellos que presenten anomalías.

7. Prueba de estabilidad.

La vacuna se someterá a una prueba acelerada de estabilidad, incubándola a 37°C durante 7 días, determinando el título viral antes y después de la incubación.

8.4 NORMAS PARA LA VACUNA ANTIRRÁBICA DE USO HUMANO.

8.4.1 Definiciones.

Se entenderá por Vaccinum rabiei (ad usum humanum) una preparación líquida o desecada de virus rábico "fijo" cultivado en tejido nervioso de animales, en huevos embrionados de pata o en cultivos celulares, e inactivado por un método adecuado.

8.4.2 Normas generales de fabricación.

En la producción de vacuna antirrábica sólo intervendrá personal que no haya manipulado otros microorganismos infecciosos, ni animales en el mismo día de trabajo. Los miembros de ese personal habrán sido declarados sanos después de pasar por un examen médico y deberán ser vacunados contra la rabia.

8.4.3 Inspección de la producción.

a) Inspección de las materias primas.

La preparación de la vacuna deberá basarse en el empleo de un sistema de lotes de siembra de virus. Se utilizará una cepa "fija" de virus rábico, la cual se caracteriza por tener un periodo de incubación corto, estable y reproducible cuando se inyecta por vía intracerebral en animales idóneos.

Como medio de propagación viral para la producción de la vacuna pueden utilizarse animales, huevos embrionados de pata o cultivos celulares. Si se utilizan animales, sólo se emplearán aquellos que estén exentos de todo signo de enfermedad, lo cual se determinará manteniendo a los animales en cuarentena antes de la inoculación del virus de siembra. Si se utilizan huevos embrionados, estos deberán obtenerse de criaderos sanos y las aves deberán estar exentas de infecciones por Salmonella, Mycobacterium avium y otros microorganismos patógenos para los patos. Si se empleen cultivos celulares, estos deberán hacerse con tejidos procedentes de animales sanos, y libres de agentes infecciosos típicos de la especie de que se trate (pollo, perro, bovino o hámster). Si se utilizan células diploides humanas, deberán haber sido caracterizadas respecto a su genealogía, características de proliferación, viabilidad, citología y estar exentas de agentes extraños detectables.

El suero utilizado para la propagación de células deberá analizarse para demostrar que está libre de bacterias, hongos, micoplasmas y gérmenes patógenos de las especies de origen del suero.

Los lotes de siembra de virus de trabajo no deben estar separados por más de 5 pases del lote de siembra primario, y se deberán someterse a las siguientes pruebas:

1. Prueba de esterilidad.

Se determinará la esterilidad bacteriana y micótica de cada lote de siembra mediante incubación en medio fluido con tioglicolato de sodio y medio Sabouraud, respectivamente. Deberá investigarse también la presencia de micoplasmas.

2. Titulación del virus.

Se determinará el contenido de virus de cada lote de siembra mediante la inoculación intracerebral de ratones.

3. Pruebas en animales.

En el caso de vacunas producidas en cultivos celulares, deberá probarse que cada lote de siembra se encuentra exento de agentes patógenos para el ratón y M. tuberculosis mediante la inoculación en ratones lactantes y adultos y cobayos, respectivamente.

4. Pruebas en cultivos celulares

En el caso de vacunas producidas en cultivos celulares, deberá verificarse que el virus de siembra está exento de virus extraños mediante inoculación de cultivos celulares.

b) Producción de vacuna.

No deben utilizarse preparados de penicilina ni estreptomocina en ninguna etapa de la elaboración de la vacuna o menos que los antibióticos sean totalmente eliminados por lavado de las células antes de sembrar el virus, o eliminados de la suspensión viral mediante un proceso de purificación.

Si la vacuna se produce en tejido nervioso de animales o en huevos embrionados de pato, estos deben ser sanos y estar exentos de agentes patógenos característicos de su especie.

Si la vacuna se produce en cultivos celulares, deberán prepararse cultivos celulares testigo, es decir, no inoculados, para la detección de virus extraños. Al terminar el periodo de observación, deberán examinarse las células de los cultivos testigo para investigar la presencia de virus hemadsorbentes, utilizando hematies de cobayo. Además deberán efectuarse pruebas adicionales para investigar la presencia de virus específicos de la especie de la cual proceden los cultivos utilizados en la producción de la vacuna, y pruebas de vigilancia cromosómica en el caso en que se empleen cultivos de células diploides humanas.

c) Inspección del material a granel.

Para preparar el material a granel, sólo podrán mezclarse los materiales víricos recolectados que satisfagan las pruebas de esterilidad bacteriana y micótica.

El material a granel, una vez inactivado, se someterá a pruebas de inoculación intracerebral en ratones para verificar la inactivación del virus.

d) Preparación e inspección del producto final a granel.

Al preparar el producto final a granel sólo deberán añadirse agentes conservadores u otras sustancias que no reduzcan la inocuidad ni la eficacia de la vacuna en las cantidades utilizadas. Cada producto acabado a granel deberá probarse para determinar su esterilidad bacteriana y micótica.

8.4.4 Envasado y recipientes.

Los recipientes de vacuna desecada deberán ser sellados herméticamente al vacío o después de haberlos llenado con nitrógeno puro, anhidro y exento de oxígeno, o con algún otro gas inofensivo para la vacuna.

8.4.5 Inspección del producto acabado.

1. Pruebas de identificación y actividad.

Antes de ejecutar la prueba en cada lote de envasado, deberá reconstituírse la vacuna desecada a la forma en que vá a usarse en el ser humano. La prueba consiste en inmunizar ratones y subsecuentemente inyectarles virus rábico, practicando dicha prueba paralelamente con una vacuna de referencia.

2. Pruebas de esterilidad.

Se practicará una prueba en cada lote de envasado para determinar la esterilidad bacteriana y micótica, mediante incubación en medio fluido con tioglicolato de sodio y medio Sabouraud líquido, respectivamente.

3. Pruebas de inocuidad.

En cada lote de envasado se investigará la presencia de toxicidad anormal mediante pruebas apropiadas, aplicando inyecciones parenterales a ratones y cobayos.

4. Pruebas de estabilidad.

La vacuna liofilizada se someterá a una prueba de degradación acelerada para comprobar su estabilidad, almacenando muestras de ésta durante cuatro semanas a 37°C.

5. Pruebas de humedad residual.

En el caso de algunas vacunas desecadas, es posible conseguir la deshidratación hasta una humedad residual inferior al 1% sin deteriorar la estabilidad ni la actividad del producto.

6. Inspección de los envases definitivos.

Todos los envases de cada lote de llenado se someterán a una inspección y se desechará todo envase que presente anomalías.

7. Prueba de pirogenicidad.

Las vacunas preparadas en cultivos celulares se probarán mediante inoculación en conejos para investigar la presencia de pirógenos.

8. Concentración sérica.

Se determinará la concentración del suero en las vacunas preparadas en cultivos celulares. El límite máximo aceptable será establecido por la Secretaría de Salud.

8.5 NORMAS PARA LA VACUNA ANTI-HEPATITIS B.

8.5.1 Definiciones.

Se entenderá por Vaccinum hepatitis B ex plasma humanum, una preparación purificada de antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) que ha sido inactivada de forma que mueran todos los virus que hayan pasado el proceso de separación con el HBsAg no infeccioso.

8.5.2 Normas generales de fabricación.

Los locales de producción deberán ser descontaminados antes de utilizarlos para fabricar la vacuna antihepatitis B. Se utilizarán locales independientes para las operaciones de separación e inactivación. El personal encargado de la producción de vacuna antihepatitis B no deberá haber manejado otros microorganismos o animales infecciosos durante la misma jornada de trabajo. Dicho personal será objeto de un reconocimiento médico para comprobar su buen estado de salud y que no hay portadores de hepatitis B.

8.5.3 Inspección de la producción.

a) Toma de sangre y plasma.

Las materias primas para elaboración ulterior se obtienen de donaciones de sangre o plasma. Los criterios médicos para aceptar donantes deben ser los mismos para los donadores de componentes de sangre entera que para los de componentes sanguíneos obtenidos por plasmaféresis, excepto que los donantes tienen que ser antigenémicos.

Un médico autorizado determinará la aptitud física de cada donante. Los donadores deberán ser personas asintomáticas, de 18 a 65 años de edad, de cualquier sexo, pero exceptuados aquellos cuyos pruebas de función hepática den resultados que excedan los límites de la normalidad. Antes de cada donación se realizará una historia clínica que permita determinar que el donante carece de síntomas y no ha padecido ninguna enfermedad grave. El peso, la presión arterial, el número de pulsaciones y la temperatura de los donantes estarán dentro de los límites normales. La concentración de hemoglobina no será in-

ferior a 125 g/l de sangre en las mujeres y a 135 g/l de sangre en los hombres.

b) Pruebas en plasma de donante único.

En cada donación única deberá determinarse el título de HBsAg empleando un método aprobado por la Secretaría de Salud. En algunos países se determina también el subtipo de HBsAg. Además, el plasma de una sola donación deberá someterse a pruebas de esterilidad bacteriana y micótica, incubando muestras en medio fluido con tioglicolato de sodio y en medio líquido de Sebouraud, respectivamente.

c) Pruebas en mezclas de plasmas.

Los plasmas que hayan pasado satisfactoriamente las pruebas anteriores, se mezclarán y someterán a las siguientes determinaciones:

1. Pruebas de esterilidad.

Deberá comprobarse la esterilidad bacteriana y micótica de un volumen mínimo de diez mililitros de plasma. En algunos países se exige también que en cada mezcla de plasmas se investigue la posible presencia de micobacterias humanas.

2. Pruebas para virus extraños.

Cada mezcla de plasma deberá probarse mediante inoculación intracerebral de ratones adultos y ratones lactantes para investigar la presencia de agentes extraños patógenos para el ratón.

Otra muestra de cada mezcla de plasma se probará inoculando huevos embrionados de gallina para determinar la presencia de agentes extraños atribuibles a dicha mezcla. De cada mezcla de plasma deberá probarse una muestra para investigar la presencia de agentes extraños mediante la inoculación en cultivos de células de simios y en cultivos de células dióides humanas.

En algunos países se realizan pruebas para detectar la presencia de ADN o ADN polimerasa del virus de la hepatitis B, así como de transcriptasa inversa.

d) Concentración, purificación e inactivación.

Antes de su inactivación, todas las mezclas de plasma serán sometidas a procedimientos de concentración y purificación. Tras la purificación, se valorará el contenido de proteínas tanto totales como específicas de HBsAg; en las preparaciones purificadas, la proteína de HBsAg equivaldrá al menos al 95% de las proteínas totales.

e) Pruebas en lotes de HBsAg purificado e inactivado.

1. Pruebas de esterilidad.

Se comprobará la esterilidad bacteriana y micótica en un volumen mínimo de diez mililitros de cada lote de antígeno como se ha indicado anteriormente.

2. Determinación del HBsAg.

Deberá determinarse el contenido de HBsAg por comparación con una preparación de referencia mediante una prueba serológica. La Secretaría de Salud deberá determinar el límite mínimo de concentración permitido.

3. Pruebas para sustancias extrañas.

Deberán practicarse pruebas para determinar la presencia de sustancias propias de grupos sanguíneos y otras proteínas sanguíneas, inclusive proteínas de membrana específicas del hígado, así como de ADN o polimerasa de ADN del virus de la hepatitis B, utilizando métodos aprobados por la Secretaría de Salud.

4. Prueba de pureza antigénica.

Deberá practicarse una prueba de pureza del HBsAg mediante electroforesis en gel de polisacrilamida.

5. Pruebas para el agente empleado en la purificación.

Deberá practicarse una prueba para determinar la presencia de cualquier sustancia química que pudiera ser peligrosa y que se haya empleado en el proceso de purificación del HBsAg. La Secretaría de Salud deberá aprobar el método empleado y la concentración permitida.

6. Prueba para los agentes inactivadores.

Si el antígeno se ha tratado con formaldehído o con otros agentes inactivadores, será preciso someter el material a

pruebas que permitan detectar la presencia de formaldehído o de otros agentes libres. La Secretaría de Salud deberá aprobar el método empleado y la concentración permitida.

f) Producto acabado acuoso a granel.

El producto acabado acuoso a granel, consistente de uno o más lotes de HBsAg purificado, concentrado e inactivado, se someterá a las siguientes pruebas:

1. Prueba en chimpancés.

El producto acabado acuoso a granel deberá probarse mediante inoculación en chimpancés, para detectar la posible presencia de virus infecciosos de la hepatitis.

2. Pruebas de esterilidad.

Deberá probarse un volumen de diez mililitros por lo menos del producto acabado a granel para investigar su esterilidad bacteriana y micótica como se ha indicado previamente.

3. Determinación de HBsAg.

Se determinará en el producto acabado a granel la cantidad de proteínas de HBsAg por comparación con las proteínas totales, utilizando un método serológico cuantitativo. La Secretaría de Salud establecerá el límite inferior de proteínas de HBsAg y de proteínas totales.

4. Prueba de pirogenicidad.

Deberá investigarse la pirogenicidad en cada lote de producto acabado a granel mediante su inyección por vía intravenosa en conejos.

g) Producto acabado a granel.

1. Adición del coadyuvante.

Si el producto acabado a granel contiene un coadyuvante, la Secretaría de Salud habrá de aprobar el coadyuvante y la concentración que se emplee. Si se agregan sales de aluminio, la concentración de éste no deberá ser superior a 1.25 mg por cada dosis médica.

2. Pruebas de esterilidad.

Deberá probarse un volumen de diez mililitros por lo me-

nos del producto acabado a granel para investigar su esterilidad bacteriana y micótica como se ha indicado anteriormente.

3. Pruebas para agentes conservadores.

En el producto acabado a granel deberá investigarse la presencia de agentes químicos de conservación. La Secretaría de Salud deberá aprobar el método empleado y la concentración permitida.

8.5.4 Envasado y recipientes.

El material del que esté fabricado el recipiente que contendrá la vacuna, no deberá perjudicar al HBsAg en las condiciones de almacenamiento recomendadas ($5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$).

8.5.5 Inspección del producto acabado.

De cada lote del producto acabado se tomarán muestras para practicar las siguientes pruebas:

1. Prueba de esterilidad.

Deberá probarse la esterilidad bacteriana y micótica del lote del producto acabado como se ha indicado anteriormente.

2. Pruebas de inocuidad.

Deberá probarse la inocuidad de cada lote del producto acabado mediante inoculación parenteral en ratones y cobayos.

3. Pruebas de actividad y de identidad.

Deberá practicarse una valoración cuantitativa de la actividad en cada lote de producto acabado, comparando con la de una preparación de referencia calibrada en unidades internacionales, mediante la determinación de anticuerpos contra el HBsAg en ratones o cobayos inmunizados con la vacuna.

4. Pruebas para agentes químicos.

En cada lote de producto acabado deberá determinarse el contenido de sustancias utilizadas como conservadores o coadyuvantes. La Secretaría de Salud deberá aprobar el método empleado y la concentración permitida.

8.6 CELULAS DIPLOIDES HUMANAS.

El aislamiento de células diploides humanas ha sido descrito por Hayflick, L. y Moorhead, P. (50), quienes obtuvieron la cepa WI-38, y por Jacobs, P. et al (57), cuyo grupo aisló la cepa de células MRC-5.

Las células diploides humanas se derivan de tejido pulmonar fetal tomado de un feto de catorce semanas de gestación, abortado por razones psiquiátricas, por una mujer con una historia familiar genéticamente normal y sin signos de enfermedad neoplásica en el aborto ni durante los tres años posteriores al mismo. Las células se propagan en serie (50) y una vez que alcanzan el 8° (cepa WI-38) ó 70° (cepa MRC-5) pase por duplicado, todas las células, excepto las de algunos cultivos que se continúan pasando para determinar su longevidad in vitro y otras características, se cosechan y congelan a -80°C para formar la estirpe celular correspondiente.

Las células utilizadas para obtener la estirpe se cosechan y se suspenden en un medio de preservación constituido por 75 partes de Medio Basal de Eagle (29), 17 partes de suero de ternera sin calentar y 8 partes de dimetil sulfoxido, sin antibióticos. La composición del Medio Basal de Eagle se presenta en la tabla 12. La concentración celular se ajusta a 3×10^6 células por mililitro de medio de cultivo, y la suspensión se distribuye en alícuotas de un mililitro, las cuales se almacenan congeladas a una temperatura correspondiente a -80°C en nitrógeno líquido.

La estabilidad e integridad de las cepas WI-38 y MRC-5 de células diploides humanas, así como su susceptibilidad a infecciones de virus humanos, explican el valor de éstas en el aislamiento de virus y desarrollo de vacunas virales.

A continuación se presentan las Normas establecidas por la O.M.S. (104, 105) que deben cumplir las células diploides humanas que se utilizan en la producción de vacunas virales.

COMPONENTE	CONCENTRACION (mg/l)
NaCl	6800.0
KCl	400.0
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	140.0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	200.0
CaCl_2	200.0
Glucosa.	1000.0
Clorhidrato de L-arginina	21.0
L-cistina	12.0
L-tirosina	18.0
L-histidina	8.0
L-isoleucina	26.0
L-lisina	26.0
L-metionina	7.5
L-fenilalanina	16.5
L-treonina	24.0
L-triptofano	4.0
L-valina	23.5
Biotina	1.0
Acido fólico	1.0
Cloruro de colina	1.0
Nicotinamida	1.0
D-partotenato cálcico	1.0
Clorhidrato de piridoxal	1.0
Clorhidrato de tiamina	1.0
Riboflavina	0.1
i-inositol	1.8
L-glutamina	292.0
NaHCO_3	2200.0

TABLA 12. MEDIO BASAL DE BACLE.

8.7 NORMAS PARA CELULAS DIPLOIDES HUMANAS UTILIZADAS EN LA PRODUCCION DE VACUNAS VIRALES.

8.7.1 Definiciones.

Siembra celular. Una cantidad de células derivadas de un solo tejido humano, congeladas a una temperatura máxima de -70°C .

Banco celular de fabricación (BCF). Una cantidad de células derivadas de una parte alícuota de la siembra celular y de composición uniforme.

Cultivo celular de producción. Una colección de cultivos celulares en el nivel de duplicación de la población utilizado para la propagación de virus que se han derivado de una parte alícuota del BCF.

8.7.2 Normas generales de fabricación.

En la zona de producción no se introducirá ni manipulará ningún cultivo celular aparte de los aprobados por la Secretaría de Salud para la producción de la vacuna apropiada.

8.7.3 Inspección de la producción.

a) Siembra celular.

La utilización de cultivos de células diploides humanas para fabricar vacunas deberá fundarse en el sistema de siembra celular. La siembra celular utilizada para la producción de vacunas deberá ser aprobada y registrada por la Secretaría de Salud. La cepa celular aceptada de la cual se haya derivado la siembra celular deberá haber sido registrada por lo que respecta a genealogía, características de proliferación, marcadores genéticos (HLA), susceptibilidad vírica, condiciones de almacenamiento y cariólogía, y mediante pruebas en animales, nuevos y cultivos celulares, deberá haberse demostrado que está exenta de agentes extraños.

1. Pruebas para investigar agentes extraños.

Deberán inocularse por vía intramuscular los siguientes animales, utilizando 10^7 células viables divididas en partes iguales: 2 camadas de 10 ratones lactantes cada una, 10 ratones adultos, 5 cobayos y 5 conejos.

Deberán inyectarse también por lo menos 10^6 células viables en la cavidad alantoides de cada uno de 10 huevos embrionados de pollo de 9 a 11 días de edad. Después de 3 días, los líquidos alantoides deberán probarse con hemetífes de cobayo y pollo para investigar la presencia de hemaglutininas.

Las células son idóneas para la producción de vacunas si por lo menos 80% de los animales o huevos inoculados continúan sanos y sobreviven al período de observación (4 semanas y 3 días, respectivamente), y si ninguno de los animales o de los huevos muestra manifestaciones de la presencia de algún agente extraño en los cultivos celulares.

2. Tumorigenicidad

Sólo deberán usarse las siembras celulares que se compruebe que no son tumorigenas, mediante la inoculación de 10^6 células viables obtenidas de cultivos en el mismo número de pase que las utilizadas para la producción de vacunas, en ratones o hámsters recién nacidos tratados con suero antilinfocítico, en ratones atímicos o en ratones timectomizados irradiados y médula ósea reconstituida. Deben inocularse algunos del mismo grupo de animales con una dosis semejante de células HeLa o KB, y ha de comprobarse que la formación tumoral se debe a la inoculación del tejido neoplásico, demostrando así la capacidad de los animales para producir tumores. Los animales inoculados con las células diploides humanas, no deberán presentar la formación de tumores tras un período de observación de 3 semanas.

3. Caracterización y vigilancia cromosómicas.

Para determinar el carácter general de cada mezcla en el BCF, deberá examinarse un mínimo de 500 células en metafase durante la etapa de producción para investigar anomalías cromosómicas. Para la producción de vacunas generalmente se practica el examen de las células entre la 27a. y 33a. duplicación de población, y sólo se utilizan las mezclas celulares del BCF que tengan cariotología normal. Los límites de aceptabilidad para anomalías en muestras de 1000 y 500 células (cepas WI-38 o MRC-5), son los siguientes:

Anormalidad	1000 células	500 células
Rupturas de cromátidas y cromosomas	47	26
Anormalidades estructurales	17	10
Hiperploidía	8	5
Hipoploidía	180	90
Poliploidía	30	17

4. Pruebas de identificación de las células.

En algunos países se practican pruebas para caracterizar los antígenos periféricos HLA.

b) Producción de cultivos celulares.

En la producción de vacunas sólo se emplearán cultivos de células diploides humanas derivadas de una siembra celular (BCF) aprobada por la Secretaría de Salud. Sólo se emplearán cultivos celulares cuyas características de multiplicación no hayan experimentado ningún cambio y en los que no se haya observado ninguna anomalía cariológica. En la preparación de cultivos testigo deberá usarse un mínimo de 5% de la suspensión celular de la concentración empleada para sembrar los cultivos destinados a la producción de vacuna. Estos cultivos deberán incubarse en las mismas condiciones que los cultivos inocula-

dos durante un mínimo de dos semanas. Al final del periodo de observación, los cultivos celulares testigo se examinarán para investigar alteraciones citopáticas producidas por algún agente extraño. Si se determina la presencia de algún agente extraño en un cultivo testigo, el virus desarrollado en los cultivos inoculados correspondientes no se utilizará para la producción de la vacuna.