

21
2 Gen.



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

**“Cuantificación de Anticuerpos para Poliovirus Tipo 1
por los Métodos de Neutralización y E.L.I.S.A.
en una Población de Tlalpan, D. F.”**

T E S I S

Que para obtener el título de:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P r e s e n t a :

LUZ ELENA CERVANTES VILLAR

1 9 8 5



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

I N D I C E

OBJETIVOS	1
INTRODUCCION	2
GENERALIDADES	
- Poliovirus	5
- Importancia de la poliomiелitis en México	23
- ELISA	35
MATERIAL Y METODOS	46
RESULTADOS	61
DISCUSION	77
CONCLUSIONES	81
ANEXO	82
BIBLIOGRAFIA	85

O B J E T I V O S

- Desarrollar un método inmunoenzimático para la cuantificación de anticuerpos del tipo IgG para poliovirus tipo 1.
- Comparar el método inmunoenzimático con uno clásico para la determinación de anticuerpos virales, como lo es la neutralización en cultivo celular.
- Determinar, en la población estudiada, el porcentaje de seroconversión en función de las dosis recibidas de vacuna Sabin.

I N T R O D U C C I O N

Si bien es cierto que en algunos países la poliomielitis es un problema probablemente tan remoto como la muerte negra, en otros, como el nuestro, el padecimiento paralítico aún florece. Por mucho tiempo ha sido una de las enfermedades más temidas por las secuelas que ocasiona debido al daño irreversible de las neuronas motoras (29, 63).

Ya en la antigüedad se reconocía su efecto devastador, como lo muestran las estelas egipcias de la Dinastía XVIII (1580-1350 A.C.) donde se representan las deformaciones características de las extremidades. No fué sino hasta el siglo XIX cuando Heine, un ortopedista alemán, describió las manifestaciones clínicas del padecimiento; y cuando se reconoció en forma epidémica por Medin, quien en 1890 esquematizó la historia natural de la enfermedad (45, 87). Cuatro años más tarde Caverly (87) describe el primer brote epidémico en Norteamérica, específicamente en Vermont con un total de 132 casos.

Algunos años después, en 1908, Landstainer y Popper (45, 87) demuestran que su etiología es viral y por ende su naturaleza infecciosa. Pero el descubrimiento más importante lo realizan Enders, Weller y Robbins en 1949, (18) al propagar el virus in vitro en cultivos de células de tejidos embrionarios humanos de origen no neuronal.

A partir de ese año se inicia la carrera para describir y explicar la patogénesis de la poliomielitis; investigadores como Sabin, Bodian, Melnick y otros (30) se enfrascan en la tarea de dilucidar la vía de transmisión y el sitio de replicación del virus, su modo de diseminación dentro del organismo, sus órganos blanco y en general los me-

canismos por los que es capaz de dañar a su huésped al multiplicarse.

Por otro lado, Salk y Sabin (29, 69, 70, 71) encabezan una segunda línea de investigación también muy importante, encaminada a la producción de una vacuna cuyo propósito es mantener al padecimiento bajo control, y de ser posible, lograr la erradicación del virus paralitogénico.

A partir de 1952, Salk (72, 73, 74) inicia el desarrollo de una vacuna antipoliavirus, mediante un tratamiento químico con formol al 0.4% durante 13 días a 37°C logró -- eliminar la infectividad de los virus propagados en cultivos de riñón y de testículo de mono, sin destruir su poder antigénico. Las pruebas de campo para verificar la seguridad de la vacuna se efectuaron en monos *Cynomolgus*; el ensayo en seres humanos se inició en 1954 y demostró su seguridad así como su capacidad para conferir inmunidad, por lo que finalmente en 1955 se autorizó oficialmente su producción y aplicación en gran escala. La rápida declinación del número de casos demostró su eficacia.

Por otro lado Sabin, Koprowski y Cox (36, 62, 65, 66) desarrollan una vacuna con virus vivos atenuados. En la primera etapa se seleccionaron cepas altamente paralitogénicas que después de algunos pases no produjeran parálisis por inyección intratálámica, pero que por vía oral o intramuscular produjeran una infección inmunogénica en monos *Cynomolgus*. Después de excesivas pruebas en animales y voluntarios de una penitenciaría federal de Ohio, los laboratorios Merck, Sharp and Dohme comenzaron a producir la vacuna en gran escala con las cepas desarrolladas por Sabin, que se utilizó en ensayos de campo en Estados Unidos, la URSS, México y otros, el éxito logrado provocó que en 1961 se aceptara oficialmente por la OMS. Por su parte, los la

boratorios Lederle desarrollaron la vacuna con las cepas de Koprowski y Cox, pero se demostró que estaban mucho menos atenuadas que las de Sabin por lo que no tuvieron la misma aceptación. Con la administración de la vacuna oral a partir de 1962 se logró una reducción mayor en el número de casos.

No obstante, la poliomiелitis sigue siendo un tema de actualidad, ya que una mala cobertura en la inmunización contra este padecimiento podría dar origen a unos cuantos casos, los que a su vez podrían causar una epidemia (25, 61).

Desde que se iniciaron las campañas de vacunación antipoliomiелítica se observó un descenso importante en las tasas de morbi y mortalidad (71). Sin embargo, en algunos países del tercer mundo, con condiciones socioculturales similares a las nuestras, se ha observado que la frecuencia de poliomiелitis no ha disminuido en forma similar a lo que sucede en los países desarrollados (3, 61). Es por ello necesario establecer el estado actual de la inmunidad contra la poliomiелitis en la República Mexicana.

Este trabajo es una contribución al mejor conocimiento de la situación actual de este problema en nuestro país.

GENERALIDADES

A) Poliovirus:

En 1909 se descubrió que el agente causal de la poliomielitis es el poliovirus, ya que Landstainer y Popper (45, 87) pudieron aislar el virus en monos a los que les habían provocado poliomielitis al inocularles por vfa intracerebral, tejidos emulsificados del sistema nervioso central - de un niño de nueve años muerto por poliomielitis paralítica.

En 1939, Armstrong probó la adaptación de los poliovirus a la rata del algodón y diez años más tarde, en 1949, Enders, Weller y Robbins (18) demostraron que el poliovirus era capaz de replicarse en cultivos de células no neuronales humanas o de mono. Tal descubrimiento, que les valió el Premio Nobel, permitió el estudio más profundo del virus y de la enfermedad que ocasiona.

Clasificación:

Los virus están agrupados en familias con base a características generales como son su tamaño, tipo de ácido nucleico y otras características medibles y comprobables. Dentro de cada familia la clasificación en géneros se basa en propiedades más específicas, como podrían ser sus propiedades antigénicas (44).

Los poliovirus pertenecen a la familia Picornaviridae; la palabra picorna proviene de la raíz en latín "pico" que significa pequeño, y "RNA" indicando que su genoma contiene ácido ribonucleico. En cuanto al género se integran en

los enterovirus, ya que infectan invariablemente el tracto digestivo (56, 87).

Morfología:

Por microscopía electrónica se ha determinado que el tamaño del virión completo es de 27 a 28 nm. En general, se dice que los poliovirus son partículas esféricas de ribonucleoproteína. El core o núcleo denso del virión, que contiene el genoma de ácido ribonucleico, mide 16 nm; está cubierto por la cápside, de simetría icosaédrica y constituida por 32 capsómeros de 6 nm de diámetro cada uno (8, 9).

Composición química:

El genoma del poliovirus tiene un peso molecular de 2.5×10^6 Daltones y representa el 30% del peso total del virión; está constituido por una sola molécula de RNA de cadena sencilla, infecciosa por sí misma y cuya composición de bases es de 46 moles % de guanina y citosina (56).

El 70% restante del peso del virión está dado por las proteínas. Los resultados de los estudios de las características electroforéticas de los poliovirus indican una estructura proteínica compleja (35, 56).

Por isoelectroenfoco y velocidad de corrimiento contra un gradiente de pH, se demostró que los poliovirus tienen 2 puntos isoeléctricos y que por ello pueden presentar dos estados conformacionales distintos; el estado A, cuyo pI es 7.1 y el estado B, cuyo pI es 4.5. Se demostró también que ambos estados son interconvertibles dependiendo del pH; así, a pH mayor de 7 presentarán estado A, a pH me

nor de 4 estado B, y a pH entre estos dos valores ambos es tados se encuentran en equilibrio. Es importante hacer no tar que el estado B es más estable y que la neutralización con los anticuerpos específicos lleva al poliovirus a tal estado (35).

Por electroforesis en gel de poliacrilamida y utilizando dodecil sulfonato de sodio como agente de disocia---ción, se ha podido determinar que las cápsides virales están compuestas de 4 polipéptidos distintos nombrados como VP_1 , VP_2 , VP_3 y VP_4 (35). Diversos estudios han indicado que en el virión se encuentran 60 copias de cada uno de ta les polipéptidos; sin embargo, por electroforesis en gel - de dos dimensiones se ha observado que para el poliovirus tipo 1 ésto no se cumple (56). Además, en preparaciones vi rales con alto grado de pureza, se han encontrado pequeñas cantidades de un quinto polipéptido llamado VP_0 ; se sabe - que VP_2 y VP_4 se obtienen por el desdoblamiento de este po lipéptido, pero no se sabe cual es su papel en el virión - completo (56).

Existe otra pequeña proteína llamada VP_g que se encuen tra unida covalentemente a la terminal 5' del RNA del po-- liovirus. Esta proteína se encuentra presente en casi to-- dos los RNA virales, incluyendo las formas replicativas in tracelulares y los intermediarios replicativos (57).

Se cree que la adición de VP_g ocurre en uno de los -- primeros pasos durante la síntesis de todo el RNA viral y se ha sugerido que la proteína funciona como un iniciador de la síntesis del RNA. Por electroenfoque se han descri-- to 2 especies de VP_g , aunque una de ellas es claramente do minante en el virión completo (57). Se ha descrito tam--- bién la actividad de una RNA polimerasa codificada por el virión (5).

Es importante saber que por carecer de glicoproteínas, los poliovirus no presentan propiedades de hemaglutinación; además de que, por no tener envoltura lipídica, son más estables que otros virus (16).

Características físicas:

Los poliovirus son uno de los tipos virales más estables que se conocen; son capaces de mantener su infectividad durante períodos relativamente largos en drenajes, -- aguas clorinadas, leche y otros alimentos, y aún a temperaturas tan bajas como -20°C . A nivel laboratorio, pueden conservarse por lapsos hasta de 8 años a -76°C en soluciones de glicerol al 50% (24).

Resisten pH considerablemente ácidos, a las enzimas proteolíticas y a la bilis del contenido intestinal, de ahí que puedan infectar el tracto intestinal. Sus características morfológicas y antigénicas se conservan en un rango amplio de pH, entre 3 y 9 (83).

Su inactivación puede lograrse sometiendo a temperaturas de 60°C por 30 minutos; sin embargo, cuando se adicionan de MgCl_2 1 M soportan este calentamiento, ya que la sal estabiliza las uniones intracapsoméricas, aumentando su estabilidad térmica (81).

Otros agentes inactivantes que no destruyen su antigenicidad, a bajas concentraciones, son: formaldehído, algunos agentes oxidantes, luz UV y el bombardeo con electrones.

La masa de la partícula vírica es de 1.1×10^{-17} g y el coeficiente de sedimentación es de 157-160 S_{20} .

Propiedades antigénicas:

Se han identificado tres tipos de poliovirus inmunológicamente distintos, utilizando para ello pruebas tales como la neutralización y la fijación de complemento (31, 45).

Por medio del fraccionamiento por ultracentrifugación de concentrados virales obtenidos de cultivos de riñón de mono, y por ensayos de infectividad y serológicos de tales fracciones, se determinó que en cada tipo de poliovirus -- existen dos antígenos diferentes denominados D (o N) y C - (o H) (31, 46, 58).

Los poliovirus intactos exhiben antigenicidad D y su coeficiente de sedimentación es de 160 S; su desnaturalización suave con calor, urea, álcalis o diversas combinaciones de estos agentes causan la liberación del RNA viral -- así como de VP₄, dando origen a partículas vacías que poseen antigenicidad C y cuyo coeficiente de sedimentación es de 80 a 90 S (46, 58). Sin embargo, por estudios al microscopio electrónico, hay evidencia de que la conversión de la antigenicidad D a C puede no ser absolutamente dependiente de la liberación del genoma viral (56).

Se cree que las partículas vacías con antigenicidad C son precursoras de los viriones que no han sido aún acoplados totalmente, dado que carecen de VP₂ y VP₄, pero poseen el polipéptido VP₀ que es el precursor de los dos anteriores (54, 56).

Las reacciones de los poliovirus con anticuerpos neutralizantes específicos o receptores celulares también causan el cambio antigénico de D a C. (46).

No ha sido posible asociar los determinantes antigéni

cos con polipéptidos específicos de la cápside. El hecho de que VP_4 parece perderse cuantitativamente durante la adhesión inicial a los receptores celulares, sugirió que este polipéptido debería ser el determinante antigénico D, hipótesis apoyada por el hallazgo de Breindl (10) de que los anticuerpos anti-D reaccionaban con VP_4 .

Lund y cols. (56) realizaron estudios sobre estos polipéptidos como determinantes antigénicos. Prepararon un conjunto de anticuerpos contra los cuatro polipéptidos de la cápside viral y efectuaron pruebas de neutralización y fijación de complemento; encontraron que sólo anti- VP_1 poseía actividad neutralizante. Los anticuerpos anti- VP_2 no eran neutralizantes, pero reaccionaban con el virión y esto se detectaba por fijación de complemento. Los anticuerpos anti- VP_3 y anti- VP_4 reaccionaban con sus respectivos polipéptidos pero no con los viriones intactos. Por esto concluyeron que, al parecer, D es un antígeno estructural, el cual está determinado al menos en parte por VP_1 , y VP_4 puede requerirse para una conformación correcta de esta determinante antigénica.

En cuanto a la respuesta provocada por C y D, mientras que los anticuerpos anti-D son neutralizantes, los anti-C no lo son y no reaccionan con los viriones intactos, pero tienen la capacidad de aglutinar específicamente a las partículas vacías, ya sean producidas natural o artificialmente (45, 46).

Replicación y efecto citopático:

Los poliovirus se replican en el citoplasma de la célula huésped, independientemente del DNA celular.

La presencia de receptores específicos en la membrana

de la célula es uno de los factores determinantes en la -- susceptibilidad a la infección; los receptores para los po liovirus son complejos de glicoproteínas y lipoproteínas (28, 37).

Una vez que el virus se adhiere y penetra se efectúa la liberación del ácido nucleico infeccioso por sí mismo; el RNA del virión tiene polaridad positiva y por ello actúa como mensajero. Mediante una RNA-replicasa se forma el intermediario replicativo compuesto por una cadena complementaria la que, a su vez, produce las cadenas de RNA vírico de la progenie con la intervención de una RNA-polimerasa codificada por el virus (56). Las cadenas de RNA son liberadas y pueden funcionar subsecuentemente como templados de RNA (replicación), ocuparse en la síntesis de -- proteínas (traducción) o bien, asociarse con las proteínas de la cápside y formar un virión completo.

La síntesis de proteínas se realiza a partir de un polipéptido gigante que al escindirse enzimáticamente da origen a tres polipéptidos estructurales VP_0 , VP_1 y VP_3 ; VP_2 y VP_4 se producen por el desdoblamiento de VP_0 al final -- del proceso de replicación, cuando el genoma finalmente es encapsidado para formar un virión (41, 56).

La morfogénesis del virión provoca la supresión irreversible de las funciones celulares que inevitablemente -- lleva a la célula a la muerte (1). En cultivos celulares el daño causado por el virus se conoce como efecto citopático, que se manifiesta inicialmente por cambios notables en la morfología celular y termina con la muerte de la célula por lisis (1, 17, 28).

Tipo de huésped:

El virus de la poliomiелitis afecta a un grupo de -- huéspedes mucho más limitado que el de otros virus, siendo el hombre su único huésped natural (34).

Los monos Rhesus, *Cynomolgus*, *Cercopithecus*, *Erythrocebus* y otros pueden ser infectados por las vías intraespinal, intranasal o intracerebral; aún más, ciertas cepas de poliovirus pueden infectar monos por inyección intradérmica o intramuscular, pero ninguno adquiere la infección naturalmente (37).

En general, los roedores son resistentes a la infección, pero por pases se ha logrado adaptar el virus a la rata del algodón y al ratón lactante y adulto en los que causa parálisis flácida (28, 45).

Patogénesis:

La patogénesis de la poliomiелitis está dada por:

- a) Entrada del virus en el tracto alimentario.
- b) La fuente y el significado de la viremia.
- c) El modo de invasión del Sistema Nervioso Central (SNC)
- d) Los factores que determinan la invasión y variaciones en el grado en que se encuentre involucrado el SNC.

Las hipótesis propuestas para explicar esta serie de hechos han sido varias; la primera aseveraba que la poliomiелitis era una infección en la que el virus se multiplicaba en la nariz y nasofaringe, y de ahí se diseminaba al -- SNC a través de la ruta olfatoria y de la barrera hematoencefálica (33). Esta idea se rechazó, ya que el bloqueo ol-

fatorio fallaba para prevenir la enfermedad en seres humanos.

En 1944 Sabin propuso su hipótesis; el virus entra -- por la boca, se localiza en varios niveles del tracto alimentario e invade incidentalmente los nódulos linfáticos, sangre, vísceras y ocasionalmente el SNC a lo largo de las rutas neurales conectadas con los sitios periféricos de -- multiplicación viral (29, 30, 64).

Poco después Bodian (7, 64) indicó que el virus pasa ba de la sangre al SNC a través de zonas vasculares modifi cadas y precisó que a partir de ese punto se diseminaba -- por rutas neurales específicas. Algunos autores sugieren que la viremia es el resultado de la continua absorción de los virus excretados a nivel de los linfáticos del tracto digestivo, pudiendo causar la invasión directa de la médu- la espinal (64); así mismo proponen que los anticuerpos -- presentes en la sangre, aún en cantidades mínimas, ejercen un efecto modificante sobre la infección previniendo la in vasión del SNC y la consecuente parálisis (21, 30).

De acuerdo con lo anterior, el SNC podría ser invadi- do algunas veces por rutas neurales y otras directamente a través de los vasos sanguíneos.

Actualmente se acepta que la infección se inicia por la ingestión de material contaminado. El virus ingerido - se implanta y replica en tejidos susceptibles de la farín- ge o del tubo digestivo distal. Aunque no se ha precisado si la replicación inicial se efectúa en las células de la mucosa epitelial o en las células de la lámina propia, sí se ha establecido que la replicación mayor se realiza en - el tejido linfoide, especialmente en las placas de Peyer - del ileon y en las amígdalas, detectándose 1 a 3 días des-

pués de la ingestión del virus (21, 29, 30, 83, 87).

Cuando las dosis infectivas ingeridas son mayores de 10^6 DICT₅₀ el individuo excreta el virus tanto en las secreciones orofaríngeas como en las heces, mientras que con dosis menores de 10^5 DICT₅₀ sólo se observa excreción fecal. Más aún, la cantidad de virus recuperable de las amígdalas es mucho menor que la de las placas de Peyer, donde puede alcanzar de 10^7 a 10^8 DICT₅₀ por gramo de tejido. La duración máxima de la excreción viral es de 1 a 2 semanas en la farínge y de 6 a 7 semanas ó más por las heces. Estas observaciones sugieren que los poliovirus se replican más eficientemente en el intestino delgado inferior, especialmente en la porción distal (64).

El virus pasa después a los ganglios linfáticos profundos (cervicales y mesentéricos) dando lugar a una "viremia menor" transitoria, generalmente no detectable. El virus puede diseminarse por vía hematógena a tejidos extraneurales susceptibles. En las infecciones subclínicas, que son las más comunes, la replicación cesa en este punto o es contenida por los mecanismos de defensa del huésped. Sin embargo, en un pequeño número de personas infectadas, alrededor del 2%, el virus pasa a la sangre, con lo que se origina una "viremia mayor", que a diferencia de la primera es persistente y fácilmente detectable. Así el virus puede alcanzar el SNC, ya sea a través de la barrera hematoencefálica, o a través de la pared de los capilares; ésta se considera la vía más importante de penetración aunque no se descarta la posibilidad de que el virus sea transmitido a lo largo de las fibras nerviosas y a partir de los ganglios periféricos. El grado en que se ve afectado el SNC dependerá también del estado inmune del huésped, de la presencia o ausencia de anticuerpos específicos (21, 29, 30, 45, 83, 87).

Manifestaciones clínicas:

Las manifestaciones clínicas de la infección por poliovirus son extremadamente variables, oscilando desde una infección inaparente hasta la parálisis o la muerte. Los poliovirus causan cinco cuadros básicos de infección: infección inaparente, poliomielitis abortiva, poliomielitis no paralítica, poliomielitis paralítica espinal y poliomielitis paralítica bulbar.

a) Infección inaparente:

Aproximadamente el 95% de las infecciones por poliovirus son subclínicas, detectándose solamente por el aislamiento del virus o bien, serológicamente por un título elevado de anticuerpos. Este tipo de infecciones reviste gran importancia desde el punto de vista epidemiológico, ya que representa una fuente no reconocida de diseminación del virus, y puede conferir inmunidad (83, 87).

b) Poliomielitis abortiva:

Una pequeña proporción de casos, del 4 al 8%, se presenta como una enfermedad menor también conocida como "gripe de verano"; sus síntomas principales son inflamación de la faringe, cefalea, fiebre, dolor abdominal, anorexia y ocasionalmente vómito. Tal padecimiento dura menos de 48 horas y no se distingue clínicamente de muchas otras infecciones virales, a menos que se trate de una epidemia en la que algunos de los casos cursan hasta el síndrome clínico paralítico (11, 87).

c) Poliomiелitis no parálitica:

Ocurre en aproximadamente el 1% de todas las infecciones por poliovirus, caracterizándose por presentar signos de irritación meníngea por lo que comúnmente se le llama meningitis aséptica. Su inicio es abrupto con cefalea, vómito, pirexia y rigidez del cuello y la espalda; clínicamente no puede diferenciarse de otros tipos de meningitis causados por distintos enterovirus. Generalmente los síntomas desaparecen en una semana y la recuperación del enfermo es total (87).

d) Poliomiелitis parálitica espinal:

En el 0.1% de las infecciones se presenta el cuadro paralítico clásico, que se desarrolla en gran medida de acuerdo con la edad del paciente.

En niños se observa un proceso bifásico caracterizado por una enfermedad menor y una enfermedad mayor; la primera coincide con la viremia y semeja una poliomiелitis abortiva, durando de 1 a 3 días. La enfermedad mayor se inicia abruptamente después de 2 a 5 días en los que el paciente parecía estar recuperándose, sus síntomas principales son meningitis con cefalea, fiebre, vómito, elevación de la temperatura a 39°C, escalofríos y rigidez del cuello. Esta fase meningítica dura de 1 a 2 días antes del decaimiento franco e inicio de la parálisis.

En los adultos se encuentra una sola fase con un prodromo más prolongado antes del inicio gradual de la parálisis y con dolores musculares espontáneos en la región lumbar, flancos, abdomen y extremidades. En esta etapa el virus ya está diseminado ampliamente en la neuraxis, por lo

que la parálisis ocurrirá en aquellas regiones cuyas funciones están bajo control de las neuronas destruidas. La parálisis es flácida, afectando principalmente piernas y brazos; la rapidez con que se manifiesta es muy variable, mientras que en algunos casos requiere de pocas horas para pasar del decaimiento a la parálisis en otros, los más comunes, tarda de 2 a 3 días para manifestarse. En ambos casos su progresión se detiene cuando el paciente se torna afebril.

e) Poliomielitis paralítica bulbar:

Se caracteriza por la parálisis de los grupos musculares inervados por los nervios craneales; su frecuencia varía entre 5 y 35% de los casos paralíticos, siendo más común en los adultos.

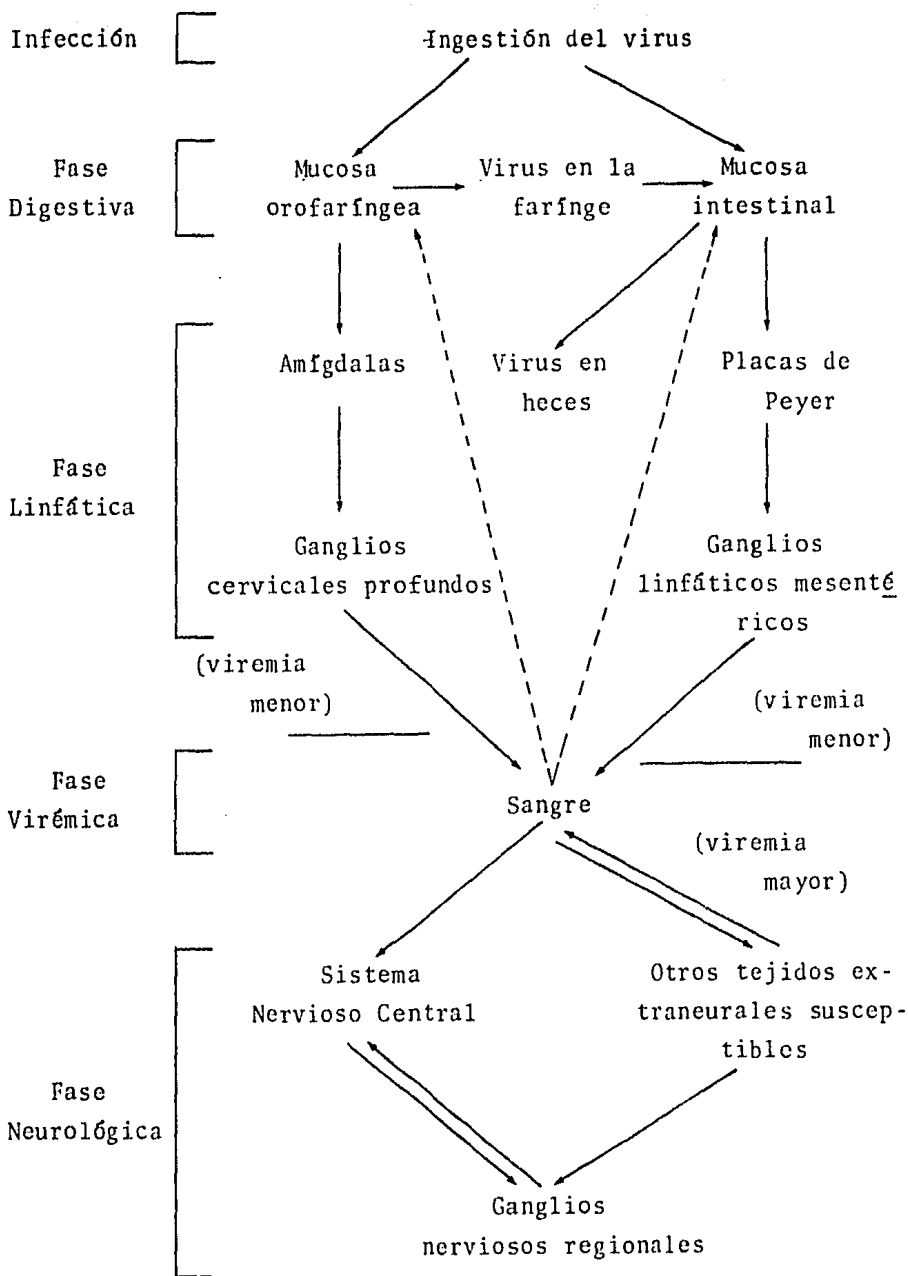
Los nervios craneales noveno y décimo son los implicados más frecuentemente, originando parálisis faríngea que provoca incapacidad para deglutir y respirar por la abundante secreción producida, y por los espasmos de la glotis. La complicación del quinto nervio craneal se traduce en dificultad en la masticación, sobre todo si se llega al trismus.

Aunque se pueden involucrar otros centros nerviosos, esto rara vez representa una amenaza para la vida; así ha podido observarse parálisis ocular y disturbios pupilares en el 11% de los casos, paresis de los nervios faciales en aproximadamente el 50% de los pacientes y sordera bilateral en algunos casos.

La poliomielitis bulbar que involucra los centros respiratorios y vasomotores es poco común pero muy peligrosa. La complicación vasomotora se manifiesta por colapso circulatorio.

latorio severo con disturbios del ritmo cardiaco como taquicardia, bradicardia, etc.; las lesiones del centro respiratorio producen irregularidades en el ritmo y la profundidad de la respiración; usualmente aumenta el pulso y la presión sanguínea lo que se asocia con hipoxia. Su progresión lleva a confusión, delirio, coma y finalmente la muerte, por la parálisis de los músculos respiratorios.

La mortalidad total es del 7 al 10%, siendo más alto (20%) en los adultos jóvenes, en quienes se han observado los casos más severos (87).



Esquema de la patogénesis de la poliomielitis.

(De Davis et al.: Tratado de Microbiología, 2a. Edición, - Salvat: pág. 1314).

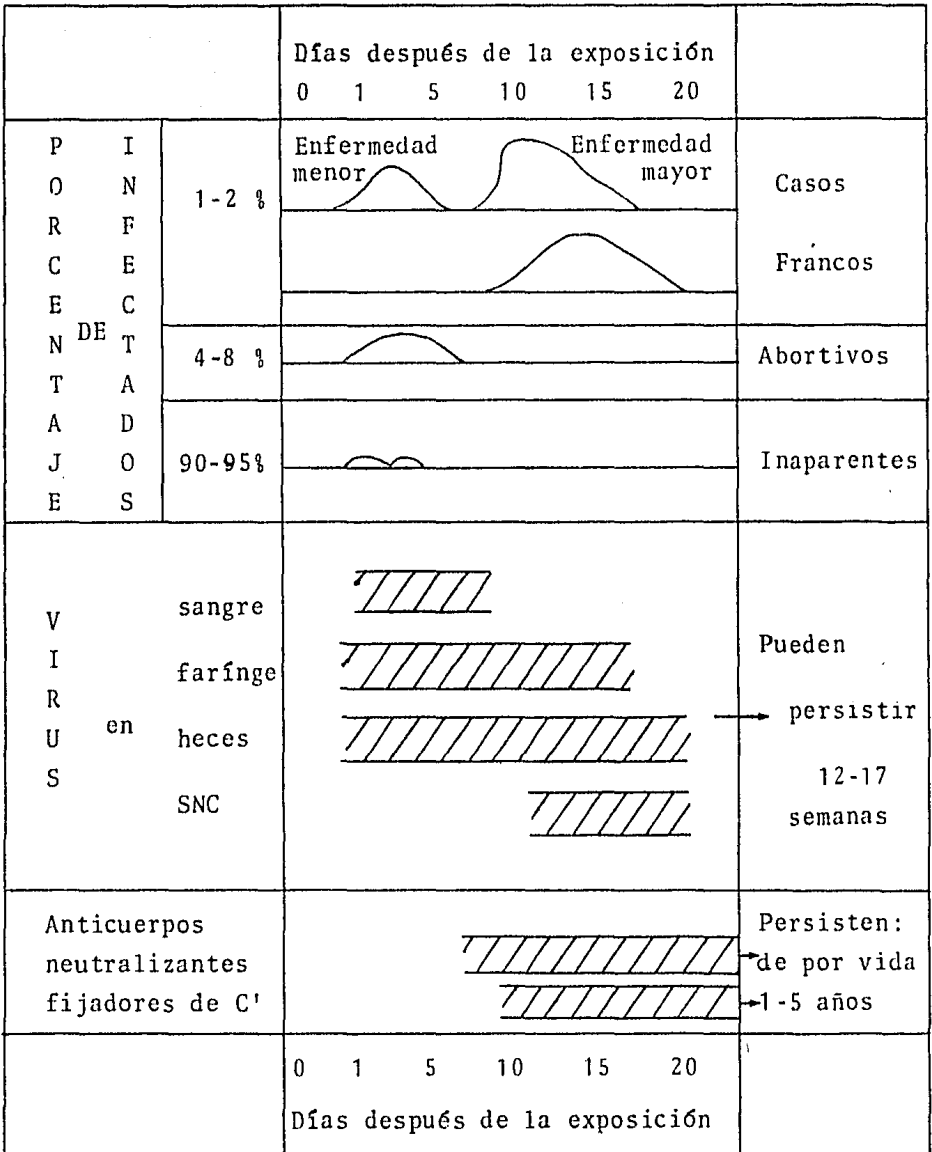


Diagrama esquemático del tiempo al que aparecen las distintas formas clínicas de poliomielitis, correlacionado con la presencia del virus en varios sitios y la persistencia de anticuerpos.

(De Davis et al.: Tratado de Microbiología, 2a. Edición, - Salvat pág. 1307).

Inmunidad:

La infección por poliovirus induce el desarrollo tanto de anticuerpos séricos de las clases IgG, IgM e IgA como de anticuerpos secretores del tipo IgA.

El predominante, y que proporciona inmunidad permanente es de la clase IgG. La IgAs es producida por células plasmáticas del tejido linfoide en el intestino, principalmente de las placas de Peyer; una vez que las células plasmáticas son estimuladas circulan por la sangre periférica antes de localizarse en la lámina propia de la mucosa.

La IgAs está presente en todas las secreciones mucosas, pero lo más importante es que se encuentra recubriendo la superficie mucosa de las células epiteliales, forma una capa que se adhiere firmemente a la célula y la protege de la penetración viral.

La protección adquirida por la infección natural normalmente es homotípica (21).

Diagnóstico:

Como en otras infecciones virales, el diagnóstico se realiza por el aislamiento e identificación del virus en cultivos celulares, o bien, por estudios serológicos durante las fases aguda y convaleciente del padecimiento (45).

Los métodos más utilizados son la neutralización, fijación de complemento, inmunofluorescencia y técnicas de inmunoperoxidasa. La más confiable en cuanto a los resultados obtenidos es la neutralización, pero requiere de tiempo, 7 días como mínimo y es costosa; la fijación de com

plemento es más rápida pero menos específica, y las dos últimas requieren de juicios un tanto subjetivos para su interpretación. De aquí se desprende la importancia del desarrollo de técnicas rápidas y reproducibles como es el ensayo inmunoenzimático (27).

Prevención:

Se cuenta con dos tipos de vacunas para prevenir la poliomielitis: la vacuna de virus vivos atenuados desarrollada por Sabin y la vacuna de virus inactivados creada por Salk; ambas inducen inmunidad permanente y son efectivas, pero sus mecanismos de acción son diferentes (29, 69, 70, 71).

Vacuna tipo Salk: estimula la aparición de IgG, IgM e IgA en suero, pero no de IgAs en la faringe o en el intestino delgado, por lo que es capaz de prevenir la enfermedad pero no así la infección. Se administra por vía parenteral (21, 29).

Vacuna tipo Sabin: induce la formación de anticuerpos humorales, y dado que el virus se replica en el intestino delgado provoca la aparición de anticuerpos del tipo IgAs, por lo que actúa como si se tratara de una infección natural. Su transmisión oro-fecal puede conferir inmunidad a personas no vacunadas. Se administra por vía oral (21, 29).

Por las ventajas que presenta, en México se utiliza la vacuna tipo Sabin en tres dosis: la primera dosis de tipo trivalente se aplica a los tres meses de edad, las dosis restantes son monovalentes y se aplican a los 3 y 6 a 7 años de edad.

B) Importancia de la poliomiélitis en México:

En México la poliomiélitis ha sido un problema de salud pública determinado por diversos factores geográficos, económicos, socioculturales, etc.; y los obstáculos que se han presentado en el esfuerzo por controlarlo son enormes. Para solucionar tales dificultades se requiere la comprensión de la epidemiología y patogénesis de la infección y de los diferentes mecanismos por los que la vacuna empleada induce protección contra ella (20, 26, 49, 60).

Aunque se sabe bien que la información sobre poliomiélitis paralítica varía en cada país de acuerdo con la calidad de los servicios de salud con que cuenta, el impacto total de la enfermedad se mide mejor por su incidencia promedio anual durante períodos de cinco años. En el cuadro No. 1 se compara el número de casos de poliomiélitis reportados por algunos países americanos en el período de 1971 a 1975. Cabe hacer notar que países como Chile, Uruguay, Puerto Rico y Cuba parecen tener ya al padecimiento bajo control, mientras que México se encuentra aún en el grupo problema (3, 67).

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud -- (OMS) y su publicación anual sobre la situación de la poliomiélitis en el mundo, en América se distinguen dos regiones de acuerdo con la incidencia del padecimiento: La región I integrada por 27 países donde la poliomiélitis está bajo control y cuya incidencia global es de 0.02 casos/100,000 hab.; y la región II, formada por catorce naciones donde la enfermedad sigue siendo un problema de salud pública, pues la tasa general es de 1.6. México forma parte de la región II aún cuando la tasa media anual es de 1.3 casos/100,000 hab. En el cuadro No. 2 se registran las tasas de morbilidad y el número de casos reportados en el país de 1968 a 1980 (3, 55, 84).

Es pertinente señalar que en México, en 1979, se presentó el 17.7% del total de casos reportados en América, ocupando el 2o. lugar en la tasa de incidencia después de Brasil en el que se presentó el 51.5% de los casos (55,84).

La gráfica No. 1 muestra los índices de morbilidad de 1968 a 1980 y los de mortalidad de 1968 a 1975. En ella se aprecia un pico sobresaliente en 1970 y dos más en las epidemias de 1975 y 1977, la primera en Jalisco (24) y la segunda en Coahuila (48), en los últimos años se observa una tasa de morbilidad más o menos constante (60).

La distribución de los casos de poliomiélitis en nuestro país no es uniforme, hay que tomar en cuenta que las 32 entidades federativas que comparten una superficie de 1,958,201 Km² poseen diferente densidad de población, distinta conformación geográfica y étnica además de distintos grados de evolución social (55). En el cuadro No. 3 se consignan los casos de poliomiélitis notificados a la Dirección General de Epidemiología de la SSA por entidades federativas de 1978 a 1980 (55).

Incidencia promedio anual por millón de
población total hasta mediados de
1975 en relación con la tasa
de mortalidad infantil.

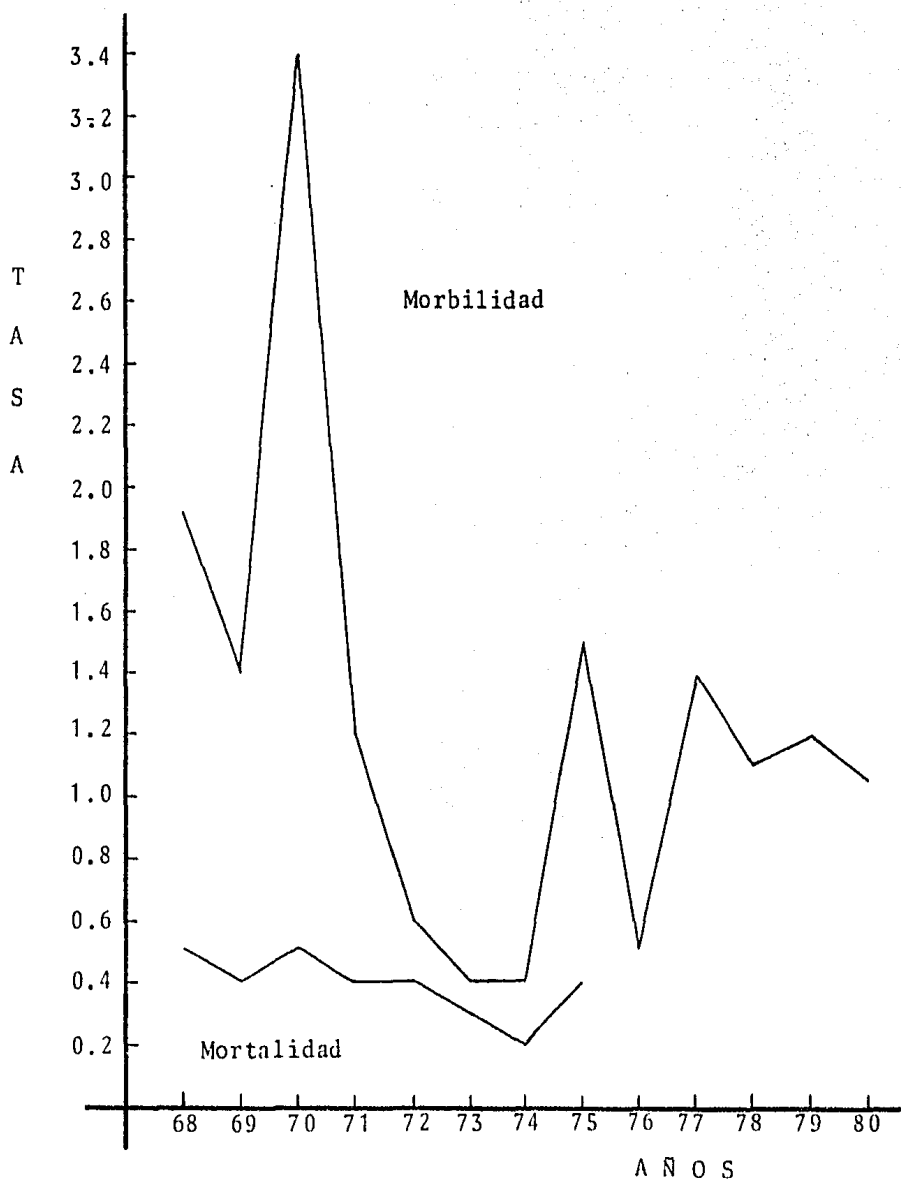
Pafs	Población millones	Poliomielitis No./millón	Mortalidad infantil No./1000
Brasil	100	78	94
Nicaragua	2	34	123
El Salvador	4	21	58
Guatemala	6	20	79
Colombia	26	15	76
Ecuador	7	14	78
Honduras	3	12	115
Venezuela	12	10	50
Perú	15	9	110
México	59	7	61
Argentina	25	4	60
Chile	10	1.5	71
Uruguay	3	0.3	40
Puerto Rico	3	0.3	24
Cuba	10	0.1	25

Cuadro No. 1.- Casos de poliomiélitis reportados por algunos países americanos, 1971-1975. Datos del WHO Weekly - Epidemiological Record del 23 Dic. 1977.

FRECUCENCIA EN LA REPUBLICA MEXICANA

AÑOS	No. de Casos	Indice de morbilidad por 100,000 hab.
1968	850	1.9
1969	679	1.4
1970	1662	3.4
1971	630	1.2
1972	309	0.6
1973	221	0.4
1974	231	0.4
1975	931	1.5
1976	292	0.5
1977	907	1.4
1978	707	1.1
1979	827	1.2
1980	735	1.02

Cuadro No. 2.- Casos notificados de poliomiелitis e indices de morbilidad en el país por años. Datos de la OMS.



Gráfica No. 1.- Morbilidad y mortalidad por poliomiéлитis período 1968 a 1980, en la República Mexicana.

Entidad	1978		1979		1980	
	Casos	Tasa	Casos	Tasa	Casos	Tasa
Aguascalientes	4	0.9	1	0.2	1	0.2
Baja California N.	17	1.2	2	0.1	2	0.1
Baja California S.	2	1.0	1	0.5	2	1.4
Campeche	9	2.5	4	1.1	25	6.3
Coahuila	36	2.6	17	1.2	18	1.2
Colima	19	5.4	10	2.8	9	2.4
Chiapas	43	2.1	7	0.3	30	1.4
Chihuahua	26	1.2	12	0.6	3	0.1
Distrito Federal	49	0.5	13	0.1	23	0.2
Durango	26	2.2	2	0.2	18	1.4
Guanajuato	36	1.2	129	4.2	85	2.7
Guerrero	39	1.8	37	1.7	23	1.0
Hidalgo	5	0.3	2	1.7	19	1.2
Jalisco	37	0.8	230	5.0	35	0.7
México	39	0.5	65	0.9	73	0.9
Michoacán	26	0.9	79	2.6	36	1.2
Morelos	6	0.6	1	0.4	13	1.3
Nayarit	18	2.4	6	0.8	10	1.2
Nuevo León	18	0.7	16	0.6	11	0.4
Oaxaca	8	0.3	1	0.0	9	0.4
Puebla	12	0.4	13	0.4	11	0.3
Querétaro	--	---	1	0.2	9	1.2
Quintana Roo	1	0.7	2	1.3	13	8.2
San Luis Potosí	26	1.6	13	0.8	21	1.2
Sinaloa	57	3.1	75	3.9	47	2.3
Sonora	13	0.9	20	1.3	8	0.5
Tabasco	28	2.4	28	2.3	16	1.3
Tamaulipas	33	1.6	9	0.4	27	1.2
Tlaxcala	--	---	--	---	--	---
Veracruz	47	0.9	20	0.4	38	0.7
Yucatán	19	2.0	4	0.4	91	9.0
Zacatecas	8	0.7	4	0.4	8	0.7
Total	707	1.1	827	1.2	735	1.02

Cuadro No. 3.- Casos de poliomieltitis notificados en México (1978-1980). Datos de la Dirección General de Epidemiología.

En el cuadro No. 4 se reúnen los estados que han informado el mayor número de casos de 1976 a 1980 (55), entre ellos se destaca Jalisco, donde la distribución de la poliomiélitis parálítica es predominantemente urbana, iniciando en municipios densamente poblados, con zonas pobres y en malas condiciones higiénicas, como ocurre en los suburbios de Guadalajara, Zapopan y Tlaquepaque (24).

Por otro lado, en el cuadro No. 5 se presentan los estados con menor número de casos reportados en el mismo lapso (55), en este grupo sobresale Tlaxcala que no presenta ningún caso desde 1978. En algunos estados la tasa de morbilidad es baja, pero no en forma consistente, lo que hace pensar que las variaciones no dependen tan sólo de las vacunaciones realizadas, sino que la inmunidad por infección natural desempeña un papel tan importante como los programas de inmunización (50).

Entidad	1976	1977	1978	1979	1980
Distrito Federal	17	30	49	13	23
Guanajuato	18	75	129	85	2
Jalisco	10	137	37	230	35
México	24	63	39	65	73
Michoacán	6	74	26	79	36
Sinaloa	29	45	57	75	47
Tabasco	23	16	28	28	16
Veracruz	17	14	47	20	38
Yucatán	18	10	19	4	91
Coahuila	4	95	36	17	14

Cuadro No. 4.- Los diez estados con mayor número absoluto de casos de poliomiélitis notificados a la D.G.E. 1976-1980.

Entidad	1976	1977	1978	1979	1980
Colima	0	31	19	10	9
Morelos	0	2	6	4	13
Baja California Norte	1	9	17	2	2
Baja California Sur	1	-	2	1	2
Tlaxcala	1	2	-	-	-
Hidalgo	2	1	5	2	19
Querétaro	2	-	-	1	9
Quintana Roo	9	2	1	2	13
Aguascalientes	3	6	4	1	1
Durango	5	27	5	2	18

Cuadro No. 5.--Los diez estados con menor número absoluto de casos de poliomiélitis notificados a la D.G.E. 1976-1980.

Otro aspecto importante en la epidemiología de la poliomiélitis es su variación estacional, se han señalado como favorecedores de su incidencia durante el período cálido de agosto a septiembre, diferentes factores de índole climático como son la temperatura, la presión atmosférica, la humedad y la evaporación (22, 23, 24). Sin embargo, puede presentarse durante el resto del año, como se muestra en el cuadro No. 6 (32).

Mes	No. de casos	Mes	No. de casos
Enero	92	Julio	58
Febrero	63	Agosto	73
Marzo	73	Septiembre	83
Abril	52	Octubre	41
Mayo	40	Noviembre	40
Junio	45	Diciembre	47

Cuadro No. 6.- Casos notificados de poliomiélitis por meses durante 1978 en México. Datos de la Dirección General de Epidemiología.

Aunque la poliomielitis es predominantemente un padecimiento infantil, su incidencia depende de los niveles de higiene y de los mecanismos que permitan su transmisión -- (vía orofecal). Hace algunos años se presentaba una incidencia mayor en niños preescolares (11), actualmente ha venido a ser más frecuente en aquellos de 5 a 9 años de edad (20). En nuestro medio, sigue siendo más frecuente en niños cuyas edades fluctúan de 6 meses a 2 años (19). La distribución de la morbilidad por grupos de edad en nuestro país en 1978, se muestra en el cuadro No. 7 (32).

Grupo de edad	Casos	Tasa específica (por 100,000 hab.)
0 - 5 meses	29	2.5
6 - 11 meses	204	17.6
1 año	261	11.3
2 años	102	4.4
3 años	41	1.8
4 años	26	1.1
5 - 9 años	27	0.3
10 - 14 años	13	0.1
15 - 19 años	3	0.04
20 y más años	1	0.0

De acuerdo con los resultados de sus estudios en Toluca, Sabin y col. (68) indicaron que cuando los programas de vacunación en ciudades subtropicales grandes sólo inmunizan a una pequeña fracción de la población susceptible, la diseminación del virus vacunal tiene poca o ninguna influencia (mecanismos de interferencia) en la diseminación de las cepas silvestres de poliovirus por lo que no evitan tales infecciones. Por otra parte, en esas poblaciones --

son muy frecuentes las infecciones por otros entérovirus, lo cual constituye otro mecanismo de interferencia, cuya consecuencia es que las cepas vacunales no se implantan en los tractos digestivos ya ocupados.

En el cuadro No. 8 se presentan los casos de polio---mielitis, en relación a las dosis recibidas de vacuna Sabin durante 1978 (32). Cabe hacer notar que en ese año -- fueron administradas aproximadamente 7,000,000 de dosis ti po 1 a niños menores de 6 años, que es el serotipo más frecuente en la República Mexicana.

Cuadro No. 8.- Casos de poliomiелitis según dosis recebidas de vacuna Sabin, por entidades federativas en 1978. Datos del programa Nacional de Vigilancia Epidemiológica, D.G.E.

Entidad	Ninguna	Dosis recibidas			Se ignora	Total de Casos
		1	2	3 y más		
Aguascalientes	--	1	1	1	1	4
Baja California N.	8	5	1	3	-	17
Baja California S.	1	1	-	-	-	2
Campeche	4	2	-	1	2	9
Coahuila	13	9	5	6	3	36
Colima	4	3	5	5	2	19
Chiapas	24	8	3	3	5	43
Chihuahua	4	7	2	5	8	26
Distrito Federal	16	11	7	13	2	49
Durango	9	5	3	3	6	26
Guanajuato	13	8	4	7	4	36
Guerrero	21	5	6	4	3	39
Hidalgo	3	1	-	-	1	5
Jalisco	14	3	4	6	10	37

México	19	8	1	6	5	39
Michoacán	17	3	3	1	2	26
Morelos	2	1	-	1	2	6
Nayarit	3	4	5	5	1	18
Nuevo León	2	3	6	6	1	18
Oaxaca	4	2	-	-	2	8
Puebla	-	-	1	-	2	12
Querétaro	-	-	-	-	-	-
Quintana Roo	-	1	-	-	-	1
San Luis Potosí	7	6	4	6	3	26
Sinaloa	27	11	5	7	7	57
Sonora	2	5	2	3	1	13
Tabasco	7	8	2	4	7	28
Tamaulipas	9	8	7	6	3	33
Tlaxcala	-	-	-	-	-	-
Veracruz	16	10	5	5	11	47
Yucatán	6	1	4	8	-	19
Zacatecas	6	-	-	-	2	8
Total	270	140	86	115	96	707

La cuestión crítica que debe ser contestada acerca de los niños con bajos niveles de anticuerpos y una historia de inmunización previa es si son o no susceptibles a una re infección con poliovirus silvestre (50, 76). Es común predecir que tal reinfección podría provocar una rápida elevación de anticuerpos, una viremia limitada y una escasa probabilidad de manifestaciones clínicas. No obstante, estos niños pueden excretar el virus y llegar a ser una fuente de infección para otras personas susceptibles en su medio ambiente (13, 20, 25).

Otro grupo de población con gran riesgo de infección lo constituyen las mujeres embarazadas (12), aún cuando en México no existen reportes de la frecuencia de la poliomi-

litis en este grupo, numerosas fuentes indican una incidencia tres veces mayor que la observada en mujeres no embarazadas. Algunos autores sugieren que las hormonas estrogénicas son las responsables del incremento en la susceptibilidad y otros más aseguran que el embarazo actúa como un factor de stress similar a la fatiga o sobreexcitación (12).

Ahora bien, ¿cuál es el papel que la madre desempeña en el enfrentamiento del niño con el poliovirus?, al respecto se sabe que:

-- La poliomiелitis clínicamente reconocida en recién nacidos de madres infectadas es poco común; sin embargo, algunos estudios sugieren que la infección subclínica en estos niños es considerablemente frecuente (12).

-- Aycocck, Kramer y Svennerholm (12, 43, 75) han sugerido la posible influencia de los anticuerpos maternos -- transferidos pasivamente sobre la resistencia del recién nacido frente al padecimiento.

-- Brown y Smith indicaron que el nivel y duración de anticuerpos pasivos en el infante durante los primeros dos a seis meses de vida van en función directa del título de anticuerpos en la sangre de sus madres (12, 75).

-- Se sabe también que la leche materna contiene IgA secretora y otros factores que pueden desarrollar cierta actividad antiviral, los que protegen a los pequeños contra infecciones con virus que causan padecimientos del tracto digestivo, o como en el caso de poliovirus, que inician su replicación a ese nivel (42, 43, 51, 75).

C) ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay):

Historia:

El desarrollo de los ensayos inmunoenzimáticos ha tenido mayor auge en la última década; aunque ya en 1967 Nakane y Pierce habían indicado que un método directo inmunoenzimático, análogo a la inmunofluorescencia indirecta, era factible. Tales métodos dependerían de que se pudieran marcar antígenos o anticuerpos con enzimas de actividad altamente específica, y que los conjugados así formados mantuvieran tanto la actividad enzimática como la inmunológica.

Posteriormente, Sternberg, Hardy y sus colaboradores realizaron la primera detección cuantitativa de anticuerpos empleando el ensayo directo, aún cuando los resultados los evaluaban visualmente con un microscopio ordinario.

Entre 1969 y 1971, y ante la necesidad de crear una técnica más accesible que el radioinmunoensayo (RIA), varios grupos de investigadores se avocaron a desarrollar y perfeccionar los métodos inmunoenzimáticos. Así, Avramea en Francia, Engvall y Perlmann en Estados Unidos, y Van Weemeny Schurs en Holanda, finalmente dieron a conocer un nuevo método al que llamaron ELISA.

El método de ELISA reúne las ventajas del RIA y de la inmunofluorescencia en cuanto a especificidad y sensibilidad, además de que no implica riesgos a la salud ya que los reactivos utilizados son inocuos; el ensayo es objetivo y puede ser automatizado resultando económico; puede adaptarse a trabajos a gran escala como son las encuestas seroepidemiológicas (38, 78, 85, 86).

Fundamento:

La técnica se basa en una reacción inmunológica en la que el antígeno ha sido adsorbido previamente a una fase sólida, poniéndolo de manifiesto con la adición de un conjugado enzima-anticuerpo y el substrato específico para la enzima. La hidrólisis de dicho substrato, medida espectrofotométricamente, será proporcional a la concentración del antígeno en la muestra (80, 86).

Este tipo de ensayo inmunoenzimático ha sido ampliamente utilizado para detectar tanto antígenos microbianos como diversos tipos de anticuerpos contra una gran variedad de agentes infecciosos, utilizando para ello diversos fluidos biológicos (86).

Consideraciones generales:

a) Fase sólida:

La adsorción del antígeno o del anticuerpo a la fase sólida se lleva a cabo por interacciones hidrofóbicas, o bien por enlaces covalentes.

Los soportes que se han utilizado como inmunoadsorbentes incluyen poliacrilamida, celulosa, tubos de polipropileno, geles como Sefarosa y placas de microtitulación. Se ha comprobado que las placas de microtitulación hechas de nylon, poliestireno, polivinilo ó polipropileno son las más adecuadas, ya que tales plásticos están cargados negativamente y favorecen el enlace electrostático con la mayoría de las moléculas de los anticuerpos animales que están cargadas positivamente (79).

La adsorción del antígeno al soporte se llama comúnmente sensibilización y se realiza generalmente bajo las

siguientes condiciones: Concentración de proteína de 1-10 $\mu\text{g/ml}$ en solución amortiguadora de carbonatos-bicarbonatos con pH 9.6, temperatura de 4°C ó 37°C y tiempo variable de 1 a 24 horas.

Comúnmente las condiciones óptimas como pH, tiempo y temperatura se determinan por el método de ensayo y error, y la concentración de antígeno haciendo titulaciones en forma de tablero de ajedrez contra un suero negativo y uno positivo.

El grado de pureza del antígeno o del anticuerpo determina la especificidad del método (78, 85, 86).

b) Conjugado:

La sensibilidad del ELISA está determinada primordialmente por la preparación del conjugado enzima-anticuerpo ó enzima-antígeno y su capacidad de mantener alta actividad enzimática e inmunológica (4, 86).

Para lograr el acoplamiento entre una enzima y una proteína se requiere de un agente bifuncional que efectúe un enlace cruzado con los grupos funcionales de las proteínas y las enzimas; tal agente no debe eliminar la actividad biológica de ninguna de las dos.

Los reactivos que se utilizan más frecuentemente para la preparación de conjugados son:

- Glutaraldehído.
- Benzoquinona.
- p,p-difluoro-m,m'-dinitrofenilsulfona.
- Cloruro de cianógeno.
- Diisocianato de tolueno.
- O-dianisidina tetraazotizada.

- Carbodiimidias hidrosolubles.
- N,N'-o-fenilendimaleimida.
- n-periodato de sodio.

Se han descrito dos tipos de reacciones de conjugación (4):

1) Procedimiento en un paso: se mezclan la enzima, el anticuerpo y el agente acoplante, se incuba la mezcla por un período corto y una vez efectuada la reacción de acoplamiento se dializa.

El método es sencillo y el conjugado obtenido proporciona resultados reproducibles, pero dado que en este procedimiento la reacción no puede controlarse, pueden formarse dímeros y polímeros que no son capaces de actuar como conjugados activos enzima-anticuerpos. Al obtenerse conjugados heterogéneos y emplear esos polímeros puede disminuir la sensibilidad del ensayo.

2) Procedimiento en dos pasos: primero se trata la enzima con el agente acoplante y después se le adiciona el anticuerpo, o bien se trata la enzima con un exceso del reactivo; después de la reacción y de haber eliminado ese exceso se adiciona el anticuerpo.

Este método tiene la ventaja de que la reacción es equimolecular obteniéndose principalmente complejos enzima proteína homogéneos, aumentando con ello su eficiencia ya que su actividad es diez veces mayor que la de los conjugados heterogéneos (86).

c) Antisueros:

Se obtienen mejores resultados cuando las preparaciones de anticuerpos para la conjugación son derivadas de un

suero hiperinmune ya que, además de que permite utilizar el conjugado más diluído, contiene gran cantidad de anticuerpos de alta avidéz que son los más adecuados para el marcaje con la enzima (79).

d) Enzima y substrato:

Dado que una sola molécula de enzima puede reaccionar con un gran número de moléculas de substrato, el uso del conjugado amplía el grado de apreciación de la reacción inmunológica (85, 86).

Las enzimas deben ser seleccionadas de acuerdo con los siguientes criterios:

- Que posea alta actividad específica.
- Que sea estable a temperatura ambiente.
- Que no presente pérdida substancial de la actividad después de la conjugación.

Así mismo, los substratos deben reunir las siguientes características:

- Ser accesibles y de bajo costo.
- Ser seguros y fáciles de usar.
- Ser soluble antes y después de la hidrólisis.

Los substratos son generalmente cromogénicos, inicialmente poco coloridos pero el producto de la hidrólisis enzimática es fuertemente colorido y nos indica el punto final del ensayo.

Las enzimas más utilizadas, su fuente de obtención y el substrato que utilizan se muestran en la siguiente tabla (79, 86):

Enzima	Fuente (s)	Substrato (s)
- Fosfatasa alcalina	<u>E. coli</u> Intestino de pollo Mucosa intestinal de bovino	p-nitrofenilfosfato
- Peroxidasa	Rábano	o-fenilendiamina H_2O_2 + ac. 5-aminosalicílico
- Bgalactosidasa	<u>E. coli</u>	nitrofenilgalactosa
- Glucosa oxidasa	<u>Aspergillus niger</u>	glucosa + ac. 5-amino salicílico glucosa + cloruro de p-nitroazul de - tetrazolio glucosa + azul de tiazol zolio
- Catalasa	Hígado de bovino	H_2O_2 (medido espectro- fotométricamente a 240 nm)

e) Muestra:

Las muestras más comúnmente empleadas son suero y plasma, aunque puede utilizarse cualquier fluido biológico como por ejemplo saliva, leche, líquido cefalorraquídeo, etc.

Es esencial hacer diluciones de la muestra en una solución amortiguadora (p.ej. PBS) que contenga un agente tensioactivo (p.ej. Tween) para evitar adsorciones inespecíficas.

ficas a la fase sólida. En algunos casos es necesario incluir una proteína adicional (p.ej. albúmina bovina) para reducir el desprendimiento inespecífico de los reactivos - ya adsorbidos a la fase sólida (78, 79).

f) Lavados:

Los ensayos inmunoenzimáticos consisten en una serie de incubaciones con diferentes reactivos, por ello es necesario que se elimine el exceso de un reactivo antes de adicionar otro. Los lavados tienen esa función y se realizan con una solución amortiguadora que contiene el agente tensoactivo. Se deja la solución en contacto con la placa -- por unos cuantos minutos y después se desecha sacudiéndola enérgicamente; ésto se repite tres veces en cada paso, con lo cual se eliminan reacciones inespecíficas (79).

g) Interpretación de resultados:

El resultado final puede ser evaluado visualmente o - medido en un espectrofotómetro. Los resultados positivos están indicados por un producto de reacción colorido cuya absorbancia debe estar entre 0.2 y 1.0 por razones de linealidad, y entre 400 y 500 nm porque los colores desarrollados por los substratos presentan absorbancias máximas - en ese rango de longitud de onda.

Los resultados podrán ser expresados como:

- Positivo o negativo, determinando previamente el valor umbral de absorbancia. Probando un gran número de -- muestras negativas se considerará tal valor como el máximo dado por ellas; así, todas las muestras que den lecturas - mayores a ese valor se consideran positivas.

- Valor de absorbancia, cuando se efectúa el ensayo -

incluyendo muestras de referencia de absorbancia conocida.

- "Título". La muestra se diluye en forma seriada y se ensaya, el título será la última dilución que presente un valor superior al proporcionado por las muestras negativas.

- En términos de muestras de referencia, elaborando una curva estándar e interpolando en ella el valor obtenido con la muestra problema (85).

Aspectos metodológicos:

Existen tres variantes principales del método de ELISA:

1.- Método competitivo: para la detección y cuantificación de antígeno. Es semejante al RIA ya que el antígeno problema compite con el antígeno marcado para unirse al anticuerpo adsorbido al soporte; por ello, la cantidad de substrato hidrolizado es inversamente proporcional a la concentración del antígeno problema.

2.- Método indirecto: específico para la detección y cuantificación de anticuerpos, es el más utilizado.

3.- Método del doble sandwich: para la determinación y cuantificación de antígeno; es el más empleado ya que, a diferencia del competitivo, no requiere del antígeno marcado.

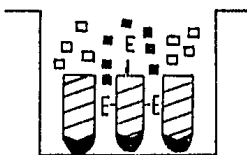
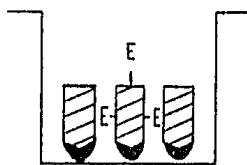
En las páginas siguientes se esquematizan cada uno de los métodos citados. (79).

Método competitivo.

Adsorción del anticuerpo al soporte.

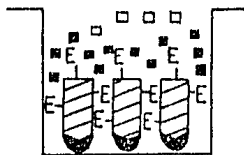
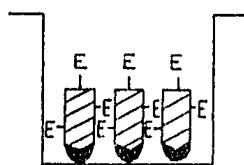


Adición del antígeno
marcado con enzima
+ antígeno problema



A

Adición del antígeno
marcado con enzima



B

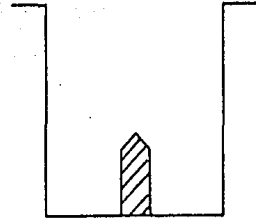
Adición
de
substrato

La cantidad de sustrato hidrolizado es directamente proporcional a la cantidad de antígeno marcado.

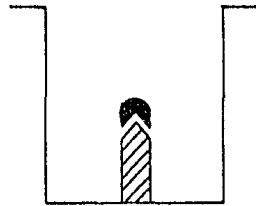
La diferencia entre A y B es igual a la concentración del antígeno problema.

Método indirecto.

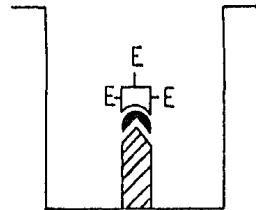
1.- Adsorción del antígeno a la placa.



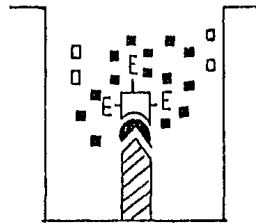
2.- Adición de la muestra problema (anticuerpo).



3.- Adición de antiglobulina marcada con enzima.



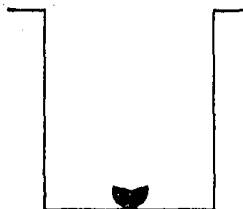
4.- Adición del sustrato.



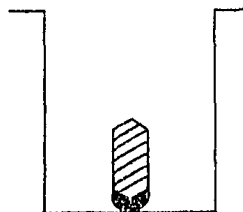
La cantidad de sustrato hidrolizado es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpo presente en la muestra.

Método del doble sandwich.

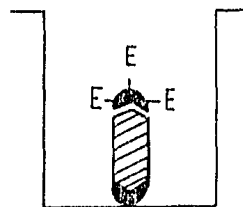
1.- Adsorción del anticuerpo al soporte.



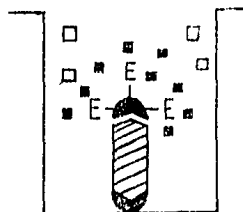
2.- Adición de la muestra problema (antígeno).



3.- Adición del anticuerpo específico marcado con enzima.



4.- Adición del substrato.



La cantidad de hidrólisis es directamente proporcional a la cantidad de antígeno presente en la muestra.

M A T E R I A L Y R E A C T I V O SEquipo:

Agitador magnético "Corning".
Celda para ultrafiltración AMICON con membrana de exclusión PM 10,000.
Balanza analítica "Mettler".
Balanza granataria "Ohaus".
Cámara de Neubauer.
Campana de flujo laminar de seguridad biológica "VECO".
Centrífuga refrigerada "Sorvall RC-5B".
Espectrofotómetro "Gilford".
Incubadora "National" a 37°C.
Lavador manual de placas de microtitulación.
Lector para placas de ELISA.
Micropipeta manual de 10 a 100 μ l "Eppendorf".
Micropipeta manual de 100 a 1000 μ l "Eppendorf".
Micropipeta manual multicanal de 0 a 250 μ l "Dynatech".
Microscopio de luz invertido "Seiwa Optical".
Microscopio óptico "Carl Zeiss".
Potenciómetro "Corning".
Ultracentrífuga "Beckman L50".

Material de laboratorio:

Barra magnética.
Bolsas para diálisis.
Celdas de cuarzo.
Membranas filtrantes Millipore de 0.22 μ m de poro.
Frascos de cultivo celular de 25 y 75 cm² de poliestireno.
Filtros tipo Swinex Millipore de 25 y 47 mm de diámetro.
Puntas para micropipeta.
Selladores de plástico.

Tubos de nitrato de celulosa.
Viales.

Material de vidrio:

Botellas Broadway.
Jeringa hipodérmica de 50 ml.
Matraces Erlenmeyer de 250, 500 y 1000 ml.
Matraces volumétricos de 50, 100, 250, 1000 y 2000 ml.
Pipetas Pasteur.
Pipetas serológicas de 1, 5 y 10 ml.
Probetas graduadas de 100 y 1000 ml.
Tubos de ensayo de 13 x 100 mm.

Material biológico:

Albúmina sérica bovina libre de gammaglobulinas.
Anti - IgAs humana.
Anti - IgG humana.
Células HEp-2c.
Cepa vacunal de poliovirus tipo 1. (Sabin, LSc2ab).
Conjugado de inmunoglobulinas de conejo - fosfatasa alcali
na.
Fosfatasa alcalina;
Gentamicina.
IgAs humana.
IgG humana.
Suero fetal de bovino.

Medio para cultivo celular:

Eagle - Diploide.

Reactivos:

Glutaraldehído.

Percoll:

p-nitrofenilfosfato.

Soluciones:

Solución amortiguadora de carbonato-bicarbonato 0.05 M, pH 9.6.

Solución amortiguadora de dietanolamina 0.05 M, pH 9.6.

Solución amortiguadora de fosfatos-tween 20 0.05 M, pH 7.4.

Solución amortiguadora Tris-HCl 0.01 M, pH 8.0 y 7.4.

Solución de azul tripán al 0.05% en solución salina isotónica.

Solución de EDTA al 0.03% en solución salina isotónica.

Solución de NaOH 3 M.

Solución de NaHCO₃ al 7.5%.

Solución de sacarosa 2.5 M en sol. amortiguadora Tris, pH 7.4.

Solución salina al 0.85%, pH 7.4 y 6.8.

Solución de tripsina en EDTA al 0.03%, 1/40.

M E T O D O S

Población: En este estudio se incluyeron 25 niños recién nacidos a través del centro de salud "Dr. Gustavo Rovirosa". De cada niño se obtuvieron en promedio 6 muestras de sangre, la primera de cordón umbilical y las siguientes al 10., 30. y 60. mes, al año y a los dos años de vida.

Como en todo estudio longitudinal se trató de tener el mayor control posible sobre los niños, efectuándose un control médico a través del centro de salud y de una trabajadora social que periódicamente visitaba a los niños en su casa.

Cabe hacer notar que inicialmente eran 33 los niños elegidos, pero tuvieron que descartarse 8 debido a que no proporcionaron el número de muestras requeridas o bien, a que no se conocía su esquema de vacunación.

A) Antígeno

La cepa empleada de poliovirus tipo 1 fué cedida por el Dr. Baltasar Briseño de los Laboratorios Nacionales de Salud Pública, cuya $DICT_{50}/ml$ era $10^{7.95}$.

a) Propagación del virus:

Se cultivaron células HEp-2c en botellas Broadway con medio Eagle-Diploide, con 0.2% de $NaHCO_3$ y suplementado con 5% de Suero Fetal de-Bovino (SFB); incubándose a 37°C hasta obtener una capa monocelular completa. El virus fué inoculado en las monocapas celulares a una multiplicidad de infección de $0.2DICT_{50}/célula$, incubándose hasta obser-

var efecto citopático completo.

Para cosechar el virus, los restos celulares se rompieron por congelación y descongelación brusca, en REVCO a -70°C y en la estufa a 37°C . El volumen total cosechado de las botellas fué centrifugado para eliminar detritus celulares a 2000 rpm durante 10 minutos en una centrífuga refrigerada, colectando el sobrenadante y ajustando su pH a 7.4. Previa titulación del virus se conservó finalmente a -20°C para posterior purificación.

b) Purificación:

La purificación comprende dos etapas: ultrafiltración y ultracentrifugación.

Ultrafiltración:

El sobrenadante de la cosecha se pasó a través de un equipo AMICON con una membrana de exclusión PM 10,000, manteniendo la temperatura del sistema a 4°C . El concentrado obtenido, aproximadamente 40 ml, fué esterilizado por filtración en un swinex con membrana Millipore de poro de $0.22\mu\text{m}$.

Ultracentrifugación:

En tubos de nitrato de celulosa se colocaron 11 ml de la solución de percoll pH 7.2 (ver anexo) y aproximadamente 2 ml del concentrado viral. Se ultracentrifugó a 30,000 rpm durante dos horas a 8°C en una ultracentrífuga Beckman L50, utilizando un rotor de ángulo fijo tipo 40ti, logrando así un gradiente de percoll "in situ" (53). Recolectándose por separado las distintas bandas obtenidas, las cuales fueron probadas en cultivos celulares para determinar cual banda correspondía al poliovirus purificado.

Las fracciones virales de posteriores centrifugaciones se concentraron en un total de 6 ml, para finalmente tomar -- alícuotas y conservarlas a -70°C hasta su uso.

c) Titulación:

La titulación fué realizada por la técnica de la microplaca con células HEp-2c; las suspensiones virales probadas fueron el sobrenadante de la cosecha y la mezcla obtenida de la purificación, realizándose diluciones seriadas en medio Eagle-Diploide sin SFB, desde 10^{-1} hasta 10^{-10} .

Suspensión celular:

La suspensión celular se obtuvo de un cultivo en condiciones óptimas de desarrollo, ajustándola a una concentración de 250,000 células viables por ml. Las células se desprendieron por tripsinización con una solución 1:40 de tripsina en EDTA al 0.03% y resuspendiéndose en un ml de medio Eagle-Diploide con 1.5% de SFB. Para determinar la viabilidad celular empleamos azul tripán al 0.5% en solución salina isotónica, contándose en la cámara de Neubauer las células no teñidas de los cuadrantes externos. La fórmula aplicada fué:

$$\text{Dilución} = \frac{\frac{\text{No. de células vivas}}{\text{No. de Cuadrantes}} \times \text{Factor de dil. (10)} \times \text{Factor de conversión de la cámara (10,000)}}{\text{No. de células deseadas por ml.}}$$

Llenado de la placa de microtitulación:

Empleamos placas de microtitulación de fondo plano -- con 96 pozos, en los que se colocaron $50\mu\text{l}$ de la suspen--

ción celular; posteriormente se adicionaron las diluciones virales, 5 pozos por dilución con $100 \mu\text{l}$ cada uno. Los pozos controles contenían $50 \mu\text{l}$ de suspensión celular y $100 \mu\text{l}$ de medio de cultivo sin SFB.

Interpretación del ensayo:

Las placas se incubaron de 5 a 7 días como máximo, observándose en este tiempo el efecto citopático que se inicia por arredondamiento celular y finaliza con la lisis de la célula, utilizando para ello un microscopio óptico invertido. Se registró el número de pozos con efecto citopático por cada dilución viral y se calculó el título mediante el método de Karber.

B) Neutralización:

En la neutralización no se utilizó virus purificado - por lo que el antígeno fué el sobrenadante de la cosecha viral.

Al mismo tiempo que se realizó el ensayo de neutralización, titulamos el virus para comprobar que se estaba empleando la concentración correcta.

La suspensión viral tenía una concentración de 100 -- DICT_{50} por ml; si el título del virus era $10^{-7.3}$ quiere decir que:

$$1 \text{ DICT}_{50} = 10^{-7.3} \quad 100 \text{ DICT}_{50} = 10^{-5.3}$$

De cada suero por probar se hicieron ocho diluciones seriadas, desde $1/2$ hasta $1/256$; a cada una de ellas se le adicionó un volumen igual de la dilución viral.

La mezcla de reacción virus-suero se incubó a 37°C durante una hora, con agitación suave cada 10 minutos para permitir que se llevara a cabo la reacción antígeno-anticuerpo.

Llenado de la placa de microtitulación:

En cada pozo se colocaron 50 μ l de la suspensión celular, cuya concentración también se ajustó a 250,000 células viables por ml. Se probaron dos sueros por placa como se indica:

	Suero 1					Suero 2						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1/4						C o n t r o l						C o n t r o l
1/8												
1/16												
1/32												
1/64												
1/128						E C P						E C P
1/256												
1/512					(-)							

Control de células.- Efecto citopático negativo, sólo se adicionó medio de cultivo a los pozos, con suspensión celular.

Control de virus.- Efecto citopático positivo, se adicionó a cada pozo 100 μ l de la dilución viral ($10^{-5.3}$).

Interpretación del ensayo:

Al igual que las placas de titulación, las de neutralización se incubaron de 5 a 7 días, considerando un resultado positivo cuando las células conservaban su morfología normal, es decir, que no presentaran efecto citopático. - El título de anticuerpos se determinó por el método de Karber, contando el número de pozos que no presentaron ECP -- por cada dilución.

C) E.L.I.S.A.

Para la realización del ensayo inmunoenzimático se requirió la preparación de:

a) Suero hiperinmune antipoliavirus tipo 1:

Inmunizamos conejos jóvenes raza Nueva Zelanda de 1.5 Kg de peso aproximadamente.

El esquema de inmunización constó de 6 inoculaciones aplicadas con intervalos de una semana; la primera de ellas fué por vía intraperitoneal así como por vía intramuscular con adyuvante completo de Freund, las cinco restantes sólo por vía intraperitoneal. En cada ocasión se administraron $10^{5.7}$ DICT₅₀.

Después de transcurrido un mes del último estímulo antigénico el conejo fué sangrado a blanco. El suero obtenido fué probado por neutralización en cultivo celular revelando un título de 1:2000.

b) Conjugado:

El conjugado se preparó por el método en dos pasos --

con glutaraldehído, utilizando fosfatasa alcalina de intestino de ternera y antigammaglobulina humana del tipo IgG de fuente comercial.

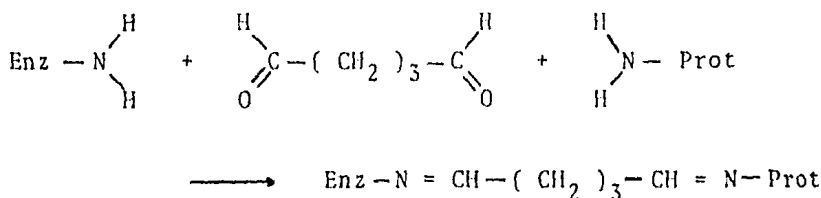
La antiIgG se reconstituyó en solución salina al 0.85% y pH 6.8, dializándose a 4°C durante toda la noche y finalmente se le determinó concentración de proteínas por el método Bio-Rad (6).

La enzima, mientras tanto, se homogenizó y centrifugó a 8,000 rpm durante 20 minutos a 4°C, disolviéndose en solución salina y dializándose en las mismas condiciones.

La relación de conjugación es de 1 mg de proteína por 3 mg de enzima, por lo que para 10 mg de enzima se requirieron 3.3 mg de antiIgG.

En un tubo protegido de la luz se colocó la enzima, -- adicionándose 20 μ l de glutaraldehído al 25%, y se dejó reposar por dos horas a temperatura ambiente. Una vez activada la enzima se adicionó la antiimmunoglobulina y se incubó durante dos horas más, agitando levemente cada 15 minutos. Finalizada la reacción dializamos en contra de solución amortiguadora Tris base 0.05 M pH 8.0, durante toda la noche a 4°C. Al dializado se le adicionó un volumen -- igual de la solución amortiguadora Tris base con NaN_3 al 0.02% y albúmina bovina libre de gammaglobulinas al 1% para neutralizar los sitios activos que no reaccionaron.

La conformación del conjugado así obtenido es:



La actividad del conjugado fué valorada mediante el método de ELISA directo, de la siguiente manera:

Se sensibilizó una placa con IgG humana normal, con 100 ng/ml en solución amortiguadora de carbonato-bicarbonato y colocando 200 μ l por pozo, incubándose a 37°C durante 18 horas en cámara húmeda.

Las placas se lavaron con PBS/Tween, colocándose por duplicado las diluciones seriadas del conjugado, desde 1/500 hasta 1/16,000, incubándose durante dos horas a 37°C.

Previo lavado de las placas adicionamos el sustrato, p-nitrofenilfosfato, incubando nuevamente a 37°C durante 30 minutos. La reacción enzimática se detuvo con solución de NaOH 3 M y se leyó la absorbancia a 405 nm.

La dilución óptima fué aquella que proporcionó una lectura de 1.5 de absorbancia. Figura No. 1.

Estandarización de la técnica:

El ensayo inmunoenzimático directo fué estandarizado con el suero hiperinmune de conejo mediante el método de tablero de ajedrez.

- Sensibilización de la placa:

Depositamos 100 μ l por pozo de las diluciones seriadas del poliovirus purificado en solución amortiguadora de carbonato-bicarbonato desde 10^{-1} hasta 10^{-6} . La adsorción se efectuó a 37°C o bien, a 4°C durante 18 horas.

- Muestras:

Del suero hiperinmune diluido desde 1/50 hasta 1/2000, depositamos por duplicado $100\mu\text{l}$ por pozo. Las placas se sellaron con tiras plásticas e incubaron a 37°C durante -- dos horas.

- Conjugado:

Adicionamos $100\mu\text{l}$ por pozo del conjugado antiinmuno-globulinas de conejo -- fosfatasa alcalina diluido 1/500 - en PBS-Tween, incubándose a 37°C por dos horas.

- Sustrato:

El sistema se reveló con p-nitrofenilfosfato en solución amortiguadora de dietanolamina (mg/ml), se incubó a - 37°C durante 30 minutos. La reacción enzimática se paró - con solución de NaOH 3 M.

- Absorbancia:

Se leyó la absorbancia a 410 nm, considerando como resultado positivo una lectura mayor o igual de 0.2, en un - rango de 0 a 1.0.

Quando la placa se sensibilizó a 4°C por 18 horas, -- con una concentración de 10^4 DICT₅₀/ml, los resultados fue ron óptimos, determinándose así el punto medio del tablero de ajedrez. Por lo que el método empleado fué:

- Sensibilizar la placa con una dilución 1/10,000 del virus purificado en solución amortiguadora de carbonato-bi carbonato, con $100\mu\text{l}$ por pozo.

-Incubar la placa sellada a 4°C durante 18 horas.

-Lavar tres veces con solución PBS-Tween, dejándola - en contacto con la placa tres minutos cada vez.

-Después de secar perfectamente colocar las muestras en forma seriada y por duplicado. Sellar e incubar a 37°C durante dos horas.

-Lavar nuevamente con PBS-Tween tres veces. Secar.

-Adicionar el conjugado, 100 μ l por pozo de la dilución óptima. Sellar e incubar a 37°C por dos horas.

-Lavar tres veces más. Secar.

-Adicionar el sustrato cuya concentración es de 1 mg/ml de p-nitrofenilfosfato en solución amortiguadora de dietanolamina; 100 μ l por pozo. Incubar a 37°C por 30 minutos.

-Detener la reacción con NaOH 3 M, 50 μ l por pozo.

-Leer absorbancia a 410 nm.

Para corroborar las condiciones establecidas se tomó sangre de un grupo de voluntarios adultos, los sueros se probaron por duplicado a una dilución única (1/200) obteniéndose los siguientes resultados:

Voluntario	A ₁	A ₂	Amedia	Resultado
GPR	0.353	0.340	0.346	+
AOR	0.294	0.243	0.268	+
LGR	0.235	0.211	0.223	+
RA	0.232	0.223	0.227	+
RMM	0.593	0.608	0.600	+
SCG	0.223	0.164	0.193	-
JTL	0.642	0.736	0.689	+
FHR	0.140	0.187	0.163	-
FM	0.356	0.433	0.394	+
NTH	0.266	0.237	0.251	+
ALR	0.427	0.476	0.451	+
EZD	0.406	0.431	0.418	+
ALQ	1.027	0.994	1.010	+

RMO	0.169	0.168	0.1685	-
EBR	0.286	0.302	0.294	+
SC	0.114	0.115	0.1145	-
ERB	0.304	0.303	0.3035	+
YLV	0.468	0.400	0.434	+
LEC	0.202	0.202	0.202	+
LCM	0.267	0.243	0.255	+

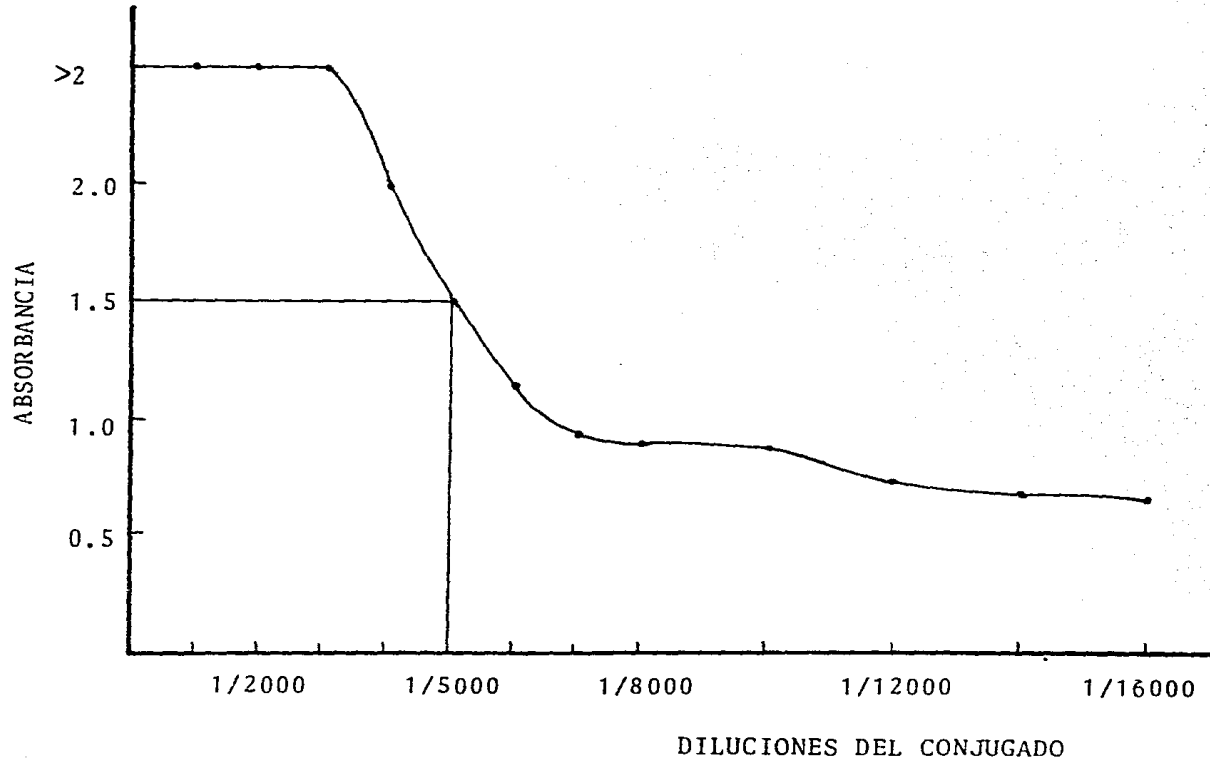
Por lo que para ensayos posteriores el suero de ALQ fué el control positivo, y el de SC el control negativo.

El control negativo se utilizó en la dilución ya probada de 1:200, obteniéndose una lectura promedio de absorbancia de 0.115. Por otro lado, del suero control positivo se hicieron tres diluciones más, 1:400, 1:800 y 1:1600, -- probándose nuevamente; se eligió la dilución 1:800 que nos proporcionó una lectura promedio de absorbancia de 0.450.

La inclusión de controles en cada ensayo nos aseguró la reproducibilidad de los resultados.

Inicialmente todos los sueros de los niños se probaron a una dilución única de 1/50; todos aquellos que dieron -- una lectura de absorbancia mayor de 0.2 y que por ende fueron positivos, se diluyeron en forma seriada desde 1/50 hasta 1/400 y se procesaron nuevamente para llevar a cabo la titulación a punto final.

FIG. 1 Determinación de la dilución óptima del conjugado.



R E S U L T A D O S

La purificación del virus la realizamos con base a -- dos de sus propiedades físicas:

- Su peso molecular mayor de 10,000 Daltons; que permitió retenerlo en el proceso de ultrafiltración, logrando así una mayor concentración al reducir el volumen de medio.

- Su densidad de flotación, que permitió separarlo en un gradiente de densidad formado "in situ", observándose - como una banda bien definida.

Los títulos obtenidos para las dos suspensiones virales, antes y después de la purificación fueron:

- Sobrenadante de la cosecha: $10^{7.3}$ DICT₅₀/ml.

- Concentrado de las bandas: $10^{8.3}$ DICT₅₀/ml.

De los 25 niños incluidos en el estudio se obtuvieron 137 muestras, a las que se les determinó su título de anticuerpos tanto por ELISA como por neutralización. En el -- cuadro de resultados se marca, para cada niño, el número - de suero y su fecha de obtención, así como las fechas en - que recibió las diferentes dosis de vacuna Sabin.

Con tales resultados se procedió a determinar el grado de correlación entre los dos métodos, mediante procesos estadísticos de correlación y regresión (77).

<u>MUESTRAS</u>		<u>FECHA</u>	<u>ELISA</u>	<u>NEUTRALIZACION</u>
Niño 1	1	5 mayo 80	1:50	1:39
	2	10 julio 80	<1:50	1:17
		28 julio 80	1a. dosis	
	3	6 agosto 80	1:100	1:78
		10 oct. 80	2a. dosis	
4	7 nov. 80	1:100	1:89	
	5 dic. 80	3a. dosis		
5	18 nov. 81	1:200	1:135	
<hr/>				
Niño 2	6	16 abril 80	<1:50	1:26
	7	21 mayo 80	<1:50	1:39
		16 junio 80	1a. dosis	
	8	14 julio 80	<1:50	1:22
		16 julio 80	2a. dosis	
	9	20 oct. 80	<1:50	1:23
		10 nov. 80	3a. dosis	
10	6 feb. 81	<1:50	1:34	
11	19 oct. 81	<1:50	1:39	
<hr/>				
Niño 3	12	22 oct. 80	<1:50	1:22
		24 nov. 80	1a. dosis	
	13	28 nov. 80	<1:50	1:23
		24 dic. 80	2a. dosis	
	14	26 enero 81	<1:50	1:26
		3 feb. 81	3a. dosis	
	15	19 mayo 81	1:100	1:78
16	9 oct. 81	1:100	1:86	
<hr/>				
Niño 4	17	6 oct. 80	1:100	1:78
		6 nov. 80	1a. dosis	
	18	11 nov. 80	1:100	1:135
		9 dic. 80	2a. dosis	
19	13 enero 81	1:50	1:59	

		19 junio 81	3a. dosis	
	20	19 nov. 81	>1:400	1:359
Niño 5	21	12 mayo 80	<1:50	1:13
		11 julio 80	1a. dosis	
	22	22 agosto 80	<1:50	1:17
		6 oct. 80	2a. dosis	
	23	14 nov. 80	<1:50	1:29
		16 marzo 81	3a. dosis	
	24	19 mayo 81	<1:50	1:34
	25	27 oct. 81	1:400	1:203
Niño 6	26	25 junio 80	<1:50	1:39
	27	28 julio 80	1:100	1:59
	28	28 agosto 80	1:100	1:58
	29	25 sept. 80	1:100	1:135
		8 oct. 80	1a. dosis	
	30	9 enero 81	1:100	1:78
	31	6 feb. 81	1:100	1:69
	32	13 feb. 81	1:100	1:78
	33	2 marzo 81	>1:400	1:355
	34	19 marzo 81	>1:400	1:468
		13 abril 81	2a. dosis	
	35	2 julio 81	1:400	1:405
Niño 7	36	9 oct. 80	1:50	1:34
	37	7 nov. 80	1:50	1:25
		30 dic. 80	1a. dosis	
	38	21 enero 81	1:50	1:28
		3 marzo 81	2a. dosis	
	39	23 abril 81	1:50	1:39
		23 julio 81	3a. dosis	
	40	16 oct. 81	1:200	1:117
Niño 8	41	13 oct. 80	1:50	1:19
	42	15 dic. 80	1:100	1:68

		15 dic. 80	1a. dosis	
	43	19 enero 81	<1:50	1:51
		26 feb. 81	2a. dosis	
	44	20 mayo 81	1:200	1:117
		27 mayo 81	3a. dosis	
	45	24 nov. 81	>1:400	1:269
<hr/>				
Niño 9	46	2 julio 80	1:400	1:112
	47	1 agosto 80	<1:50	1:17
	48	2 sept. 80	1:100	1:79
		5 sept. 80	1a. dosis	
	49	3 oct. 80	1:100	1:112
		7 nov. 80	2a. dosis	
	50	5 enero 81	<1:50	1:45
		13 enero 81	3a. dosis	
	51	2 julio 81	1:200	1:117
<hr/>				
Niño 10	52	16 julio 80	<1:400	1:51
	53	10 oct. 80	<1:50	1:15
		14 nov. 80	1a. dosis	
	54	18 enero 81	<1:50	1:15
		9 feb. 81	2a. dosis	
	55	2 marzo 81	<1:50	1:15
		24 abril 81	3a. dosis	
	56	15 sept. 81	<1:50	1:17
	57	18 enero 82	<1:50	1:19
<hr/>				
Niño 11	58	21 nov. 80	1:200	1:117
	59	29 enero 81	1:200	1:135
		4 feb. 81	1a. dosis	
	60	11 mayo 81	<1:50	1:51
		7 abril 81	2a. dosis	
	61	8 junio 81	<1:50	1:42
		11 junio 81	3a. dosis	
	62	1 julio 81	1:100	1:59
	63	24 nov. 81	1:50	1:68

	64	26 mayo 82	1:100	1:78
Niño 12	65	30 sept. 80	<1:50	1:22
		1 oct. 80	1a. dosis	
	66	30 oct. 80	<1:50	1:22
	67	27 oct. 80	1:100	1:26
		9 enero 81	2a. dosis	
	68	28 enero 81	<1:50	1:22
		27 feb. 81	3a. dosis	
	69	11 agosto 81	<1:50	1:26
	70	19 nov. 81	<1:50	1:25
	Niño 13	71	4 sept. 80	1:100
72		26 sept. 80	1:200	1:78
73		3 oct. 80	1:50	1:78
		19 nov. 80	1a. dosis	
74		20 enero 81	<1:50	1:89
		9 feb. 81	2a. dosis	
75		6 marzo 81	<1:50	1:68
		11 junio 81	3a. dosis	
76		3 sept. 81	1:400	1:234
77		4 dic. 81	1:50	1:156
78	17 marzo 82	1:100	1:135	
79	6 sept. 82	1:200	1:178	
Niño 14	80	26 agosto 80	<1:50	1:34
	81	27 oct. 80	<1:50	1:39
		28 nov. 80	1a. dosis	
		3 feb. 81	2a. dosis	
	82	6 marzo 81	1:50	1:45
		7 abril 81	3a. dosis	
	83	17 julio 81	>1:400	1:311
	84	17 marzo 82	1:100	1:115
Niño 15	85	12 agosto 80	<1:50	1:34
		28 oct. 80	1a. dosis	

	86	14 nov. 80	<1:50	1:22
		29 dic. 80	2a. dosis	
	87	6 feb. 81	1:400	1:55
		30 mayo 81	3a. dosis	
	88	3 agosto 81	1:400	1:203
Niño 16	89	11 mayo 81	<1:50	1:28
		8 junio 81	1a. dosis	
	90	19 junio 81	>1:400	1:358
Niño 17	91	1 junio 81	<1:50	1:10
	92	30 junio 81	<1:50	1:15
		26 agosto 81	1a. dosis	
	93	4 sept. 81	1:100	1:78
		4 nov. 81	2a. dosis	
		2 marzo 82	3a. dosis	
	94	10 abril 82	1:400	1:135
Niño 18	95	12 junio 81	<1:50	1:13
	96	11 agosto 81	<1:50	1:15
		11 agosto 81	1a. dosis	
	97	22 sept. 81	<1:50	1:13
		7 dic. 81	2a. dosis	
		23 marzo 82	3a. dosis	
	98	11 julio 82	1:200	1:178
	99	2 sept. 82	1:200	1:201
Niño 19	100	1 julio 81	<1:50	1:39
	101	3 agosto 81	<1:50	1:33
		29 sept. 81	1a. dosis	
	102	5 oct. 81	1:50	1:59
		3 dic. 81	2a. dosis	
	103	7 enero 82	1:200	1:155
		12 feb. 82	3a. dosis	
	104	21 abril 82	1:400	1:269

Niño 20	105	24 julio 81	1:100	1:57
	106	18 sept. 81	<1:50	1:25
		29 sept. 81	1a. dosis	
	107	27 oct. 81	<1:50	1:26
		3 dic. 81	2a. dosis	
	108	7 enero 82	1:200	1:135
	109	2 feb. 82	1:200	1:178
		12 feb. 82	3a. dosis	
	110	26 mayo 82	1:200	1:230
	111	24 junio 82	1:400	1:355

Niño 21	112	23 sept. 81	<1:50	1:10
	113	6 nov. 81	1:50	1:13
	114	15 nov. 81	1:50	1:15
		13 enero 82	2a. dosis	
	115	26 enero 82	1:200	1:115
	116	12 marzo 82	1:400	1:127
		12 marzo 82	3a. dosis	
	117	4 junio 82	>1:400	1:311

Niño 22	118	16 abril 82	<1:50	1:28
	119	18 mayo 82	1:50	1:34
		14 junio 82	1a. dosis	
	120	17 junio 82	1:100	1:68
	121	17 agosto 82	1:100	1:59
		26 agosto 82	2a. dosis	
	122	6 sept. 82	1:50	1:52
	123	20 sept. 82	1:100	1:76

Niño 23	124	20 abril 82	<1:50	1:15
	125	21 mayo 82	<1:50	1:18
		25 mayo 82	1a. dosis	
	126	21 junio 82	<1:50	1:17
	127	6 julio 82	<1:50	1:25
		20 agosto 82	2a. dosis	
	128	23 agosto 82	1:100	1:78

Niño 24	129	19 abril 82	<1:50	1:45
	130	16 mayo 82	<1:50	1:39
	131	26 mayo 82	<1:50	1:34
		17 junio 82	1a. dosis	
	132	15 julio 82	>1:400	1:304
<hr/>				
Niño 25	133	24 junio 82	<1:50	1:22
		23 sept. 82	1a. dosis	
	134	4 oct. 82	1:100	1:59
	135	14 oct. 82	<1:50	1:26
	136	11 nov. 82	<1:50	1:29
	137	22 nov. 82	<1:50	1:39
<hr/>				

Determinación del grado de correlación entre los dos métodos.

a) Diagrama de dispersión:

En la figura No. 2 se muestra el diagrama de dispersión de los títulos obtenidos, marcando los determinados por ELISA en el eje de las abscisas y los determinados por neutralización en el eje de las ordenadas.

b) Cálculo del coeficiente de correlación "r":

ELISA	NEUTRALIZACION
x	y
n = 137	n = 137
$\sum x = 19575$	$\sum y = 12201$
$\bar{x} = 142,88$	$\bar{y} = 89,05$
$\sum x^2 = 8316875$	$\sum y^2 = 2249809$
$\frac{(\sum x)^2}{n} = 2796938,8$	$\frac{(\sum y)^2}{n} = 1086601,4$

$$\sum (x-\bar{x})^2 = \sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n} = 5519936.2$$

$$\sum (y-\bar{y})^2 = \sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n} = 1163207.6$$

$$\sum xy = 4233175$$

$$\frac{(\sum x)(\sum y)}{137} = 1743318.066$$

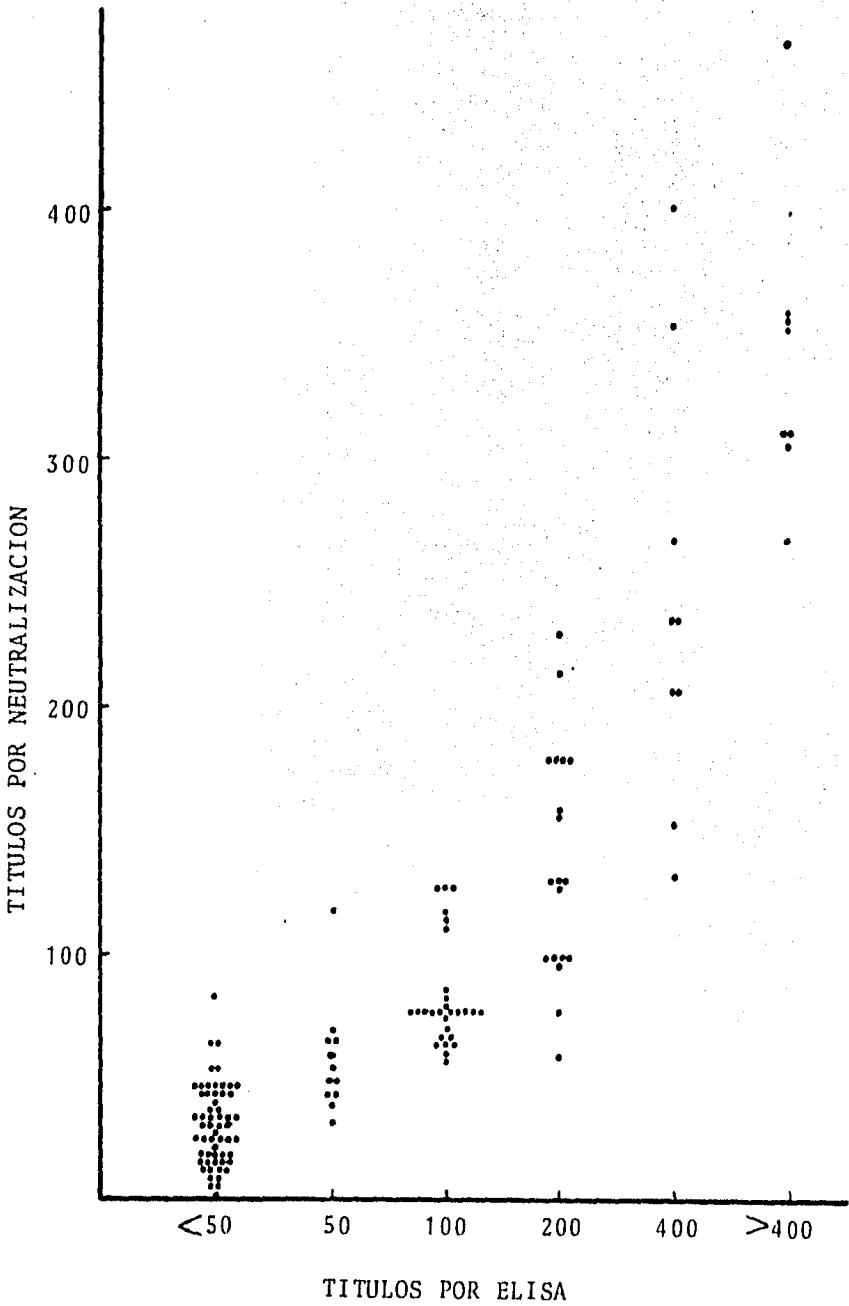
$$\sum (x-\bar{x})(y-\bar{y}) = \sum xy - \frac{(\sum x)(\sum y)}{n} = 2489856.93$$

$$r = \frac{\sum (x-\bar{x})(y-\bar{y})}{\sqrt{\sum (x-\bar{x})^2 \sum (y-\bar{y})^2}} = \frac{2489856.93}{\sqrt{1163207.6 \times 5519936.2}}$$

$$r = \frac{2489856.93}{2533936.01} = 0.982$$

$$r = 0.982$$

FIG. 2 Diagrama de Dispersión



c) Cálculo del error estándar (t de student).

$$t = r \sqrt{\frac{n-2}{1-r^2}} = 0.982 \times \sqrt{\frac{137.2}{1-(0.982)^2}} = 60.4$$

$$p < 0.001$$

d) Planteamiento de la ecuación de regresión.

$$y = a + bx$$

$$b = \frac{(x-\bar{x})(y-\bar{y})}{(x-\bar{x})^2} ; \quad a = y - bx$$

$$b = \frac{2489856.93}{5519936.2} = 0.451$$

$$a = 89.05 - 0.451(142.88) = 24.60$$

$$y = 24.6 + 0.451x$$

Esta es la ecuación de la recta de correlación entre los dos métodos, por lo que:

$$\text{Si } x = 50, \quad y = 47.15$$

$$x = 200, \quad y = 114.8$$

$$x = 800, \quad y = 385.4$$

Uniendo estos puntos se obtiene la línea de regresión de y sobre x , que se muestra en la figura No. 3.

Seroconversión:

De acuerdo con los datos recabados, el 100% de los niños recibió la primera dosis de la vacuna; el 88% recibió

la segunda y el 76% la tercera.

a) Por ELISA:

Hubo un 12% de seroconversión con la primera dosis, - con una media geométrica de los títulos de 1.69 ± 0.44 ; -- con la segunda dosis seroconvirtió el 36%, con una media - geométrica de 1.86 ± 0.43 y con la tercera dosis la sero-- conversión fué de 68% con una media geométrica de los títu los de 2.26 ± 0.539 . Figura No. 4

b) Por neutralización:

Con la primera dosis la seroconversión observada fué del 12% con una media aritmética de los títulos de 68.08 ± 85.9 ; la segunda dosis reportó un 32% de seroconversión con una media aritmética de 88.6 ± 86.5 ; y con la tercera dosis la seroconversión fué de 68% con una media aritmética de - 164 ± 108.8 . Figura No. 5.

S E R O C O N V E R S I O N

Método	Vacunación		
	1a. No. (%)*	2a. No. (%)	3a. No. (%)
ELISA	3 (12)	6 (36)	8 (68)
Neutralización	3 (12)	5 (32)	9 (68)

* por ciento acumulativo.

FIG. 3 Línea de Regresión

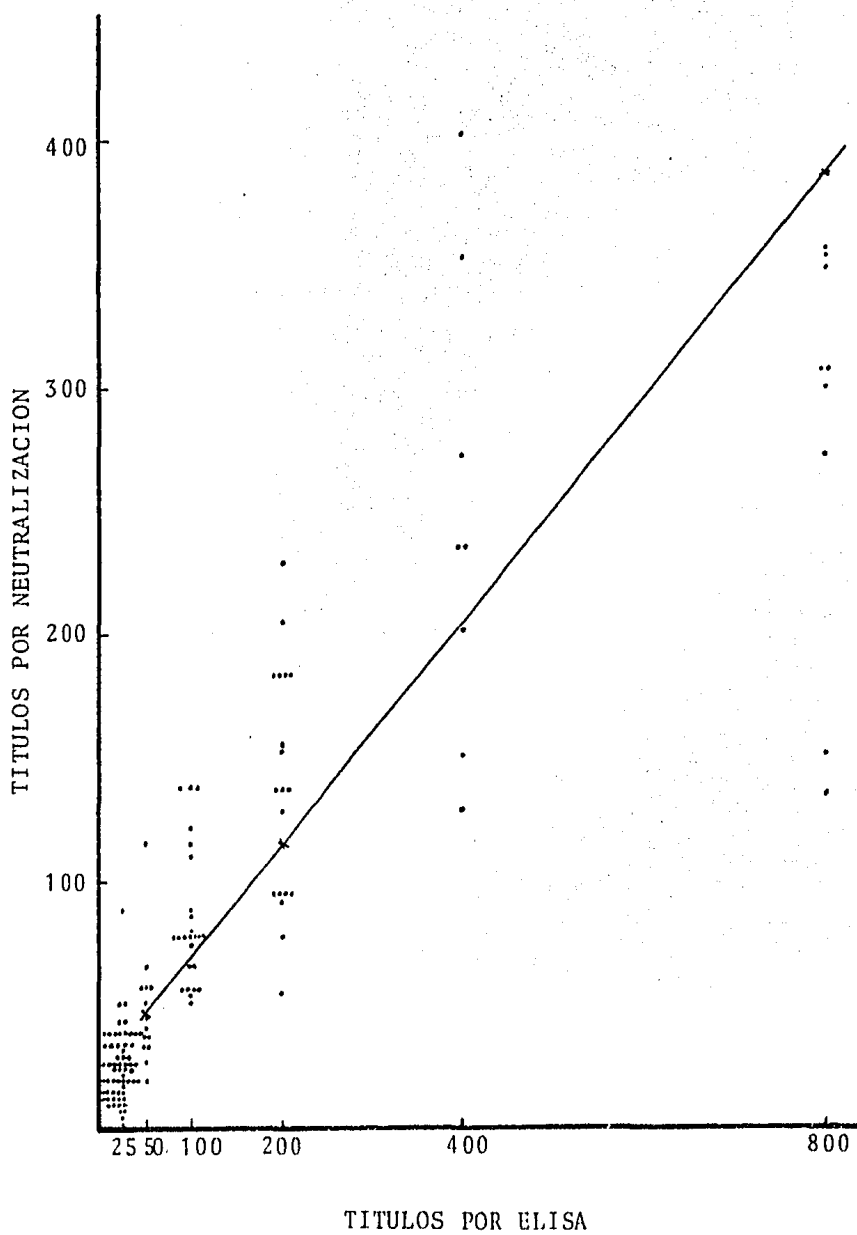


FIG. 4 Título de anticuerpos por ELISA
de acuerdo a las dosis reci-
bidas de vacuna Sabin.

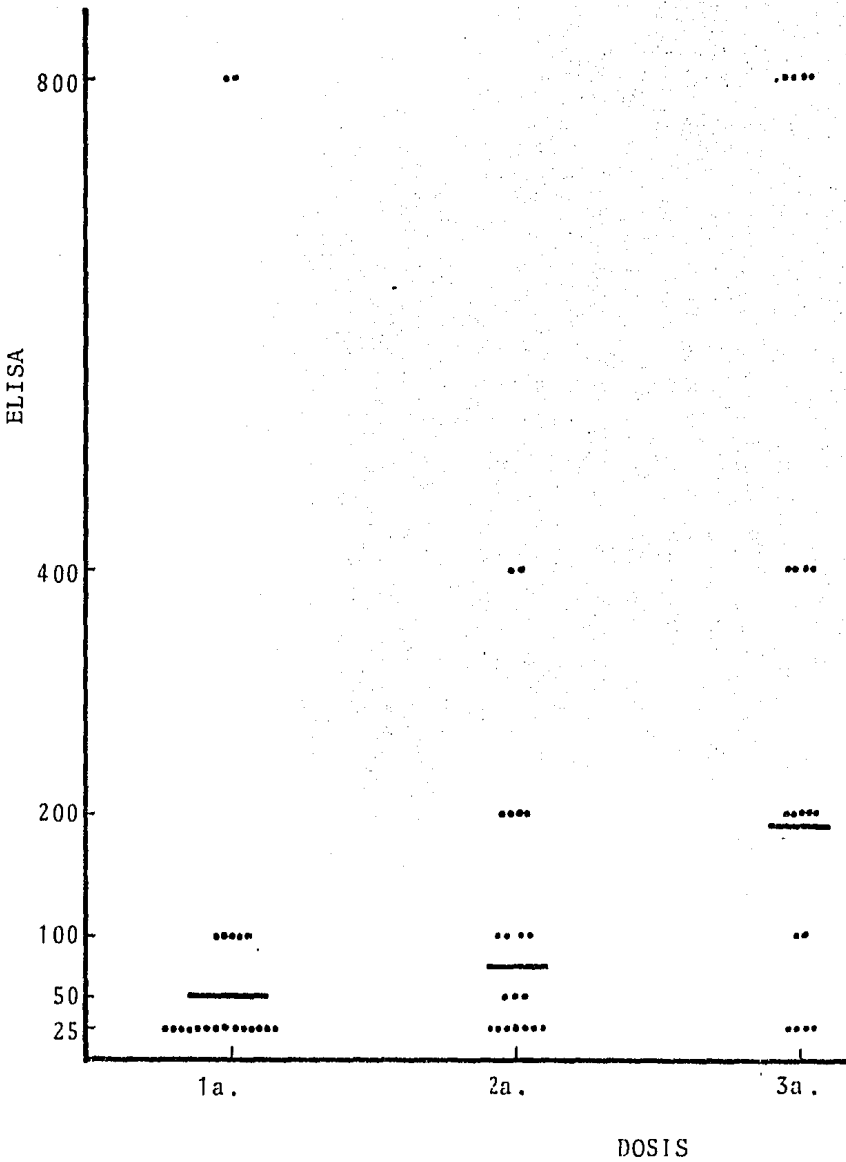


FIG. 5 Título de anticuerpos por neutralización de acuerdo a las dosis recibidas de vacuna Sabin.

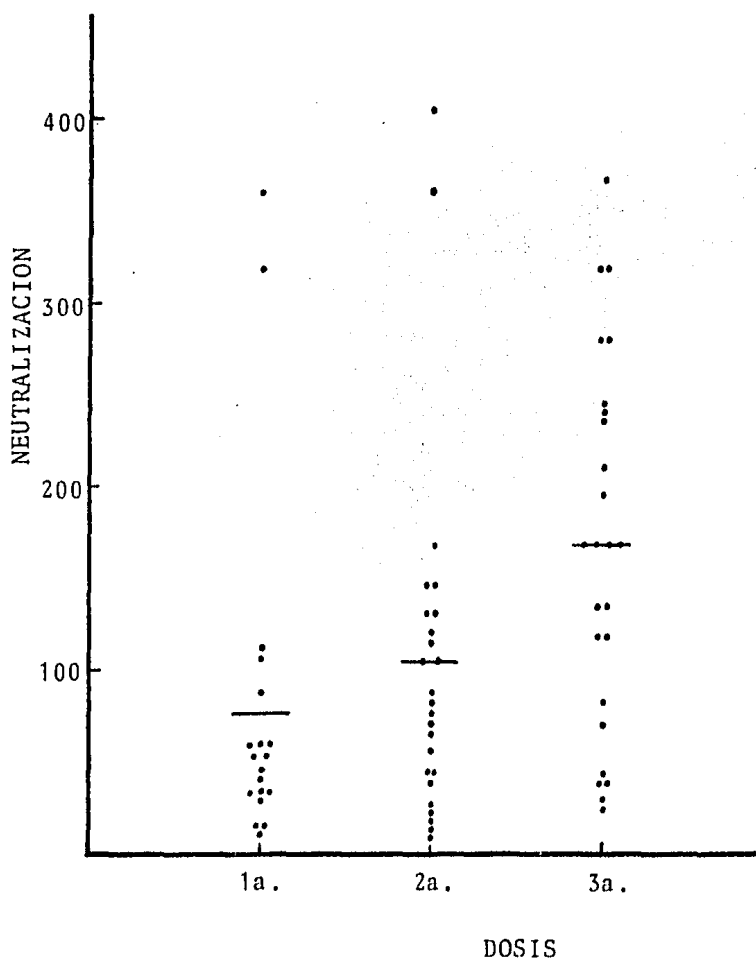
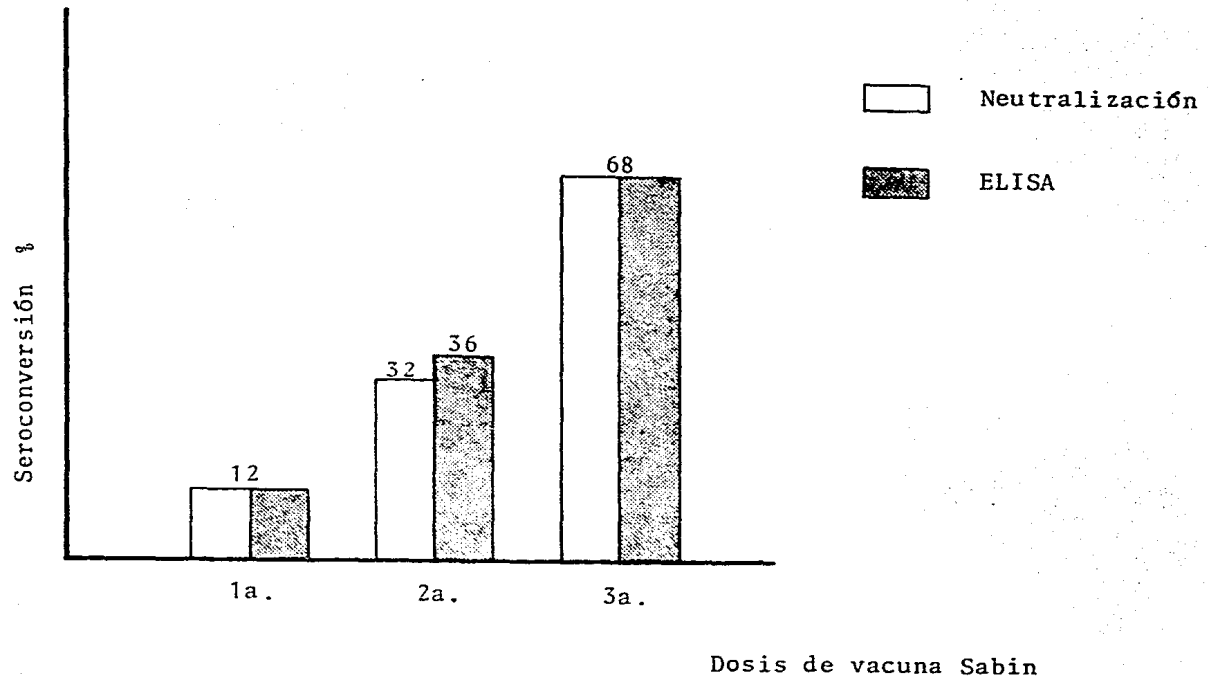


FIG. 6

Seroconversión



D I S C U S I O N

Con el método de purificación fue posible aumentar en un logaritmo la concentración de la suspensión viral, de $10^{7.3}$ DICT₅₀ a $10^{8.3}$ DICT₅₀/ml. Es bien sabido que mientras más puro sea un antígeno, su capacidad de adsorción a las placas de microtitulación es mayor, lo que redundará en una mejor sensibilidad y especificidad del método de ELISA; de ahí su importancia.

Existen otros métodos de purificación con los que se alcanza un mayor grado de pureza, como los descritos por Marongiu y colaboradores (41) y por Phillips y Summers (54), pero que por ser demasiado sofisticados son poco aplicables; para nuestros fines prácticos el método de purificación empleado fué óptimo.

En general, se pudo observar que para una misma muestra el título de anticuerpos determinado por ELISA es mayor que el determinado por neutralización; posiblemente debido a que en el primero se detectan anticuerpos que no necesariamente son neutralizantes. No obstante, la correlación entre los dos métodos es casi completa, ya que el valor obtenido para el coeficiente de correlación $r = 0.982$ es cercano a la unidad que representa el valor de correlación total, además de que es estadísticamente significativo ($p < 0.001$). Es importante hacer notar que de acuerdo con la recta de regresión, la correlación existente entre los dos métodos es positiva.

Ahora bien, existen también grandes diferencias entre ambos a nivel práctico; la principal es el tiempo en que se obtienen resultados, mientras que por ELISA es posible determinar el título de anticuerpos el mismo día en que se

prueba la muestra, por neutralización es necesario esperar de 5 a 7 días.

Para poder realizar la neutralización rutinariamente se requiere mantener en el laboratorio una línea celular, mientras que para ELISA basta obtener la cantidad suficiente del antígeno purificado y mantenerlo en congelación a -70°C .

Si nos referimos al aspecto económico, el método de ELISA resulta más accesible que el de neutralización, ya que en el primero no se requieren medios de cultivo y suplementos que resultan por demás caros, los reactivos empleados se utilizan en pequeños volúmenes conservándose perfectamente en refrigeración por períodos relativamente largos; además de que por el método inmunoenzimático se pueden correr en un mismo día mayor número de placas, y por ello mayor número de sueros que por neutralización.

Sin embargo, la neutralización presenta la ventaja más importante al asegurarnos que los anticuerpos que estamos determinando son neutralizantes, y, por ende, protectores.

En cuanto a la población en estudio encontramos que un porcentaje muy bajo de niños seroconvirtió con la primera y aún con la segunda dosis de vacuna Sabin, aumentado notablemente con la tercera dosis, entendiéndose por seroconversión el aumento en dos títulos de la concentración inicial de anticuerpos.

Se observó una pequeña diferencia en el porcentaje de seroconversión determinado por cada método para la segunda dosis 32% para neutralización y 36% por ELISA, debido posiblemente a que por ELISA se cuantifica mayor número de anticuerpos como ya se había mencionado; no obstante, el porcen

taje final de seroconversión es el mismo.

Las tasas de seroconversión señaladas como deseables después de aplicar 1, 2 ó 3 vacunas orales antipoliomielíticas, cualquiera que sea su composición, es del 68 al 85% (13,76), lo que quiere decir que la tasa presentada en -- nuestra población apenas alcanza el nivel inferior aceptable. En estudios realizados en México, por González Cortés (26) en los estados de Guanajuato, Hidalgo, Puebla y - Nayarit, y por Sabin y col. (68) en Toluca, Edo. de México, se ha observado una respuesta similar y aún más baja como en el caso de González Cortés que reportó un 47% de sero-- conversión para poliovirus tipo 1.

Se pueden dar varias explicaciones al respecto: que - exista un fenómeno de interferencia viral debido a otros - virus entéricos que están diseminados ampliamente en nues- tro país, o bien, que algunos de los lotes del biológico - aplicado hayan sufrido una significativa reducción en su - nivel de potencia probablemente por una mala conservación de la vacuna durante las etapas de distribución o almacenamiento (34, 48).

Un aspecto muy importante que hay que tomar en cuenta es que ninguno de los niños era seronegativo antes de la - aplicación de la vacuna, posiblemente debido a la presen- cia de anticuerpos maternos transferidos pasivamente los - que, en cierta medida, podrían evitar la implantación del virus vacunal en el tracto digestivo y con ello el éxito - de la vacuna.

También se tiene que tomar en cuenta la inmunización natural, como es el caso de los niños 5 y 6, cuya serocon- versión no correspondió a la administración de la vacuna. Este tipo de inmunización, muchas veces causada por la di- seminación de la cepa vacunal reviste gran importancia en

la protección de infantes susceptibles no vacunados; sobre todo en poblaciones de alto riesgo, donde debido a las precarias condiciones de higiene que prevalecen es mayor la posibilidad de que el niño sea infectado por algún tipo de poliovirus silvestre.

C O N C L U S I O N E S

- La combinación de técnicas tales como ultrafiltración y formación de gradientes de densidad por ultracentrifugación, dió como resultado un método de purificación óptimo para nuestros propósitos.

- Se estandarizó un ensayo inmunoenzimático que resultó rápido, confiable y de fácil ejecución; mostrando un grado de correlación enorme ($r = 0.982$) con el proceso clásico para cuantificación de anticuerpos virales como es la neutralización.

- Las ventajas que presenta el método de ELISA en cuanto a tiempo de realización, obtención de resultados y bajo costo relativo, nos permite proponerlo como ensayo de escrutinio en laboratorios de diagnóstico, siendo la neutralización el método de confirmación.

- Puede proponerse también como el método idóneo para la valoración de la eficacia de los programas de inmunización con fines de salud pública, y en general en encuestas de tipo seroepidemiológico.

- El valor total de seroconversión a anticuerpos para poliovirus tipo 1 en los 25 niños estudiados fué del 68%, tasa relativamente aceptable.

- La tasa de seroconversión creció en relación directa con el número de vacunas recibidas.

A N E X O

- Solución amortiguadora de carbonato-bicarbonato 0.05 M, pH 9.6.

Carbonato de sodio (Na_2CO_3)	1.59 g
Bicarbonato de sodio (NaHCO_3)	2.93 g
Azida de sodio (NaN_3)	0.2 g
Agua destilada cbp	500 ml

- Solución amortiguadora de dietanolamina 0.05 M, pH 9.6.

Dietanolamina $[(\text{CH}_3\text{CH}_2)_2\text{NH}]$	97 ml
Azida de sodio (NaN_3)	0.2 g
Cloruro de magnesio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.1 g
Agua destilada	800 ml

Disolver las sales y después adicionar la dietanolamina. Ajustar el pH a 9.6 con HCl 1 M, aforar a 1 litro y guardar a 4°C.

- Solución amortiguadora de fosfatos-Tween 20 0.05 M, pH 7.4.

Cloruro de sodio (NaCl)	16 g
Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4)	5.8 g
Fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4)	0.4 g
Cloruro de potasio (KCl)	0.4 g
Azida de sodio (NaN_3)	0.4 g
Tween 20 (polioxietilensorbitol monolaurato)	1 ml
Agua desionizada cbp	2 L

- Solución amortiguadora Tris-HCl 0.01 M, pH 8.0 y 7.4.

Tris-HCl [Tris-Clorhidrato (hidroxi- metil) aminometano]	31.6 g
Cloruro de sodio (NaCl)	116.8 g
Agua destilada cbp	2 L
Ajustar pH a 8.0 y 7.4	

- Solución de Azul tripán al 0.05% en SSI.

Azul tripán	0.025 g
Solución salina 0.85%	50 ml

- Solución de EDTA al 0.03% en SSI.

EDTA (ácido etilendiaminotetraacético)	0.03 g
Solución salina 0.85%	100 ml

- Solución de sacarosa 2.5 M, en sol. amortiguadora Tris-HCl.

Sacarosa $[C_{12} (H_2O)_{11}]$	85.5 g
Solución amortiguadora Tris-HCl, pH 7.4 cbp	100 ml

- Solución de tripsina en EDTA, 1/40.

Tripsina en PBS al 1%	1 ml
EDTA al 0.03% en SSI	39 ml

Solución de trabajo de Percoll.

Se preparó una solución de Percoll con sacarosa 2.5 M, -- con densidad de 1.149 g/ml. Tomando en cuenta que la densidad del Percoll sin diluir es de 1.130 g/ml y que la de la sacarosa 2.5 M es de 1.316 g/ml, se aplicó la fórmula:

$$\text{VOL} = \text{Vol}_t \left(\frac{\rho - \rho_p}{\rho_{\text{sac}} - \rho_p} \right) = 10 \left(\frac{1.149 - 1.130}{1.316 - 1.130} \right) = 1.02 \text{ ml}$$

así que por cada nueve partes de Percoll se adicionó una parte de la solución de sacarosa.

--Medios de cultivo para células.

Medio Eagle-Diploide	95 ml
Suero fetal de bovino	5 ml
Solución comercial de gentamicina - (10 mg/ml)	0.1 ml

Ajustar pH a 7.4 con solución al 7.5% de NaHCO_3 . Esterilizar por filtración en swinex Millipore con membrana de $0.22 \mu\text{m}$ de poro.

- Todos los medios de cultivo empleados se preparan de manera semejante al anterior, sólo variando la concentración de suero fetal de bovino.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Ackermann W. W., Payne F. and Kutz H.; Concerning the cytopathogenic effect of poliovirus; evidence for an extraviral toxin. Science 81:1=6, (1958).
- 2.- Albrecht P., van Steenis G., van Wezel A. L. and Salk J.: Standardization of poliovirus neutralizing antibody tests Rev. Infect. Dis 6 (Suppl. 2): S540-S544, -- (1984).
- 3.- Assaad F. and Ljungars-Esteves K.: World overview of poliomyelitis: regional patterns and trends. Rev. Infect. Dis. 6 (Suppl. 2): S302-S307, (1984).
- 4.- Avrameas S., Ternynck T. and Guesdon J. L.: Coupling of enzymes to antibodies and antigens. Scand. J. Immunol. 8 (Suppl. 7): 7-23, (1978).
- 5.- Baltimore D. en: The biology of the animal viruses. - Academic Press, New York, (1974).
- 6.- Bio-Rad Protein Assay. Bio-Rad Laboratories. 32nd and Griffin. Richmond, Calif.
- 7.- Bodian D.: Pathogenesis of poliomyelitis. Am. J. Pub. Health 42: 1388-1396, (1952).
- 8.- Boublik M. and Drzeniek R.: Demonstration of a core - in poliovirus particles by electron microscopy. J. -- Gen. Virol. 31: 447-449, (1976).
- 9.- Boublik M. and Drzaniek R.: Structural subunits of - poliovirus particles by electron microscopy. J. Gen. Virol. 37: 127-134, (1977).

- 10.- Breindl M.: VP₄, the D-reactive part of poliovirus. *Virology* 46: 962-964, (1971).
- 11.- Brown E. H. : Enterovirus infections. *British Med. J.* 2: 169-171, (1972).
- 12.- Brown G. C. and Carroll C. J.: Antibody response of pregnant women to poliomyelitis vaccine and passive transfer to infants. *Science* 81: 389-395, (1958).
- 13.- Campillo-Sainz C., Ornelas H. A., De Mucha-Macías J. and Nava S. E.: Immunization of newborn children -- with living oral trivalent poliovirus vaccine. *J. Bacteriol.* 84: 446-452, (1962).
- 14.- Cumming H.: *Virologfa, cultivo de tejidos*. Ed. El Manual Moderno. México, (1975).
- 15.- Cunningham C. H.: *Virologfa práctica*. Ed. Acribia. - España, (1971).
- 16.- Drzeniek R. and Bilello P.: Absence of glycoproteins in poliovirus particles. *J. Gen. Virol.* 25: 125-132, (1974).
- 17.- Enders J. F.: Early observaciones on cytopathogenicity of poliovirus. *Am. J. Clin. Pathol.* 57: 846-847, (1972).
- 18.- Enders J. F., Robbins F. C. and Weller T. H.: The cultivation of the poliomyelitis viruses in tissue culture. *Rev. Infect. Dis.* 2 (3): 493-503, (1980).
- 19.- Fernández de Castro J.: Geonosologfa de la poliomielitis en América. *SPN* 26 (3): 224-253, (1984).

- 20.- Fernández de Castro J. y Fernández de Castro D.: Problemas relativos a la efectividad de la vacuna tipo Sabin en países cálidos. Higiene 27: 149-158, (1977).
- 21.- Fox J. P.: Modes of action of poliovirus vaccines and relation to resulting immunity. Rev. Infect. Dis. 6 - (Suppl. 2): S352-S353, (1984).
- 22.- García de Alba J., Rebolledo A. y Suárez P.: Estacionalidad de la poliomiélitis paralítica en el D.F. Carta Epidemiológica, Soc. Mex. de S. P. 3 (1): 1-3, (1976).
- 23.- García de Alba J., Rebolledo A. y Suárez P.: Influencia del clima y la vacunación en la incidencia de la poliomiélitis. SPM XVIII (3): 509-517, (1976).
- 24.- García de Alba J., Suárez P. y Morán R.: Aspectos Meteoroepidemiológicos de la poliomiélitis paralítica - en la ciudad de Guadalajara, Jalisco, México. SPM XIX (2): 215-226, (1977).
- 25.- Gold E. et. al.: Immune status of children one to four years of age as determined by history and antibody measurement. New Eng. J. Med. 289 (5): 231-235, (1973).
- 26.- González Cortés A., Zárate-Aquino M. L., Fernández de Castro D., Marroquín H. y Guzmán-Bahena J.: Seroconversión insatisfactoria para poliomiélitis y sarampión en niños inmunizados con cinco antígenos. Gac. Med. - Mex. 115 (4): 187-195, (1979).
- 27.- Herrmann J. E., Hendry R. M. and Collins M. F.: Factores involved in enzyme-linked immunoassay of viruses and evaluation of the method for identification of enteroviruses. J. Clin. Microbiol. 10 (2): 210-217, -- (1979).

- 28.- Holland J. J.: Enterovirus entrance into specific -- host cells, and subsequent alterations of cell protein and nucleic acid synthesis. *Bacteriol. Rev.* 28 (1): 3-13, (1964).
- 29.- Horstmann D. M.: Control of poliomyelitis: a continuing paradox. *J. Infect. Dis.* 146 (4): 540-551, -- (1982).
- 30.- Horstmann D. M.: Viral vaccines and their ways. *Rev. Infect. Dis.* 1 (3): 509-516, (1979).
- 31.- Hummeler K. and Hamparian V. V.: Studies on the complement fixing antigens of poliomyelitis. *Science* 81-499-505, (1958).
- 32.- Informe epidemiológico anual, 1978. *SPM XXIII* (3): - 289-339, (1980).
- 33.- Johnson R.T. and Mims C. A.: Pathogenesis of viral infections of the nervous system. *New Eng. J. Med.* - 278 (1): 23-30 y 278 (2): 84-92, (1968).
- 34.- Kado G., Barrón I. y de la Sierra L.: Estabilidad a temperatura de la vacuna antipoliomiélfica de virus atenuados elaborados en el Instituto Nacional de Virología. *SPM XXI* (3): 263-269, (1979).
- 35.- Kew O.M., Pallansch M. A., Omilianowski D. R. and -- Rueckert R. R.: Changes in three of the four coat -- proteins of oral poliovaccine strain derived from type 1 poliovirus. *J. Virol.* 33 (1): 256-263, (1980).
- 36.- Koprowski H., Jervis G. A. and Norton T.W.: Clinical investigations on attenuated strains of poliomyelitis virus: use as method of immunization of children with

- living virus. J. A. M. A. 160: 954-966, (1956).
- 37.- Kunin C. M.: Cellular susceptibility to enteroviruses. Bacteriol. Rev. 28 (4): 382-390, (1964).
- 38.- Leinikki P. and Pässilä S. : Solid phase antibody -- assay by means of enzyme conjugated to anti-immunoglobulin. J. Clin. Path. 29: 1116-1120, (1976).
- 39.- Lennette E. H. : Laboratory diagnosis of viral infections; general principles. Am. J. Clin. Pathol. 57: 737-750 (1972).
- 40.- Mandel B.: Characterization of type 1 poliovirus by electrophoretic analysis. Virol. 44: 554-568, (1971).
- 41.- Marongiu M. E., Pani A., Corrias M. V., Sau M. and - La Colla P. : Poliovirus morphogenesis. J. Virol. 39 (2): 341-347, (1981).
- 42.- Matthews T. H. J., Lawrence M. K., Nair C. D. G. and - Tyrrell D. A. J.: Antiviral activity in milk of possible clinical importance. Lancet Dec.: 1387-1389, --- (1976).
- 43.- Mayer T. R. and Baldfour H. H.: Prevalence of poliovirus neutralizing antibodies in young adult women. JAMA 246: 1207-1209, (1981).
- 44.- Melnick J. L. : Taxonomy of viruses. Prog. Med. Virol 23: 91-96, (1980).
- 45.- Melnick J. L., Wenner H. A. and Phillips C. A.: Enteroviruses in: Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamidial infections. American Public Health Association Inc. Washington, D.C., (1978).

- 46.- Minor P. D., Schild G.C., Wood J. M., Dandwate C. N.:
The preparation of specific immune sera against type
3 poliovirus D-antigen and C-antigen and the demons-
tration of two C-antigenic components in vaccine --
strains populations. *J. Gen. Virol.* 54: 147-156, ---
(1980).
- 47.- Minor T. E., Allen C. I., Tsiatis A. A., Nelson D.B.
and D'alessio D. J.: Human infective dose determina-
tions for oral poliovirus type 1 vaccine in infants.
J. Clin. Microbiol. 13 (2): 388-389, (1981).
- 48.- Mougrabi M., Zárate M. L., Alvarado A., Reyes A. y -
Valdez A.: Estudio epidemiológico de campo de un bro-
te de poliomiелitis ocurrido en el estado de Coahui-
la durante 1977. *SPM XXII* (1): 39-44, (1980).
- 49.- Nathanson N.: Epidemiologic aspects of poliomyelitis
eradication. *Rev. Infect. Dis.* 6 (Suppl. 2): S308- -
S312, (1984).
- 50.- Ogra P. L., Karzon D. T., Righthand F. and MacGilli-
vray M.: Immunoglobulin response in serum and secre-
tions after immunization with live and inactivated
poliovaccine and natural infection. *New Eng. J. Med.*
279 (17): 893-900, (1968).
- 51.- Palmer E. L., Gary G. W., Blak R. and Martin M. L.:
Antiviral activity of colostrum and serum immunoglo-
bulins A and G. *J. Med. Virol.* 5: 123-129, (1980).
- 52.- Pead P. J. and Holley A.: Estimation of virus-neutra-
lizing antibody in microplates. *J. Clin. Pathol.* 26:
17-20, (1973).

- 53.- Percoll: Methodology and applications. Pharmacia Fine Chemicals. Upssala, Sweden.
- 54.- Phillips B. A., Summers D. F. and Maizel J. V.: In vitro assembly of poliovirus: related particles. Virology. 35: 216-226, (1968).
- 55.- Poliomieltis en América durante 1979. Epidemiología, Boletín de la D.G.E., Vol. 1, No. 8, (1981).
- 56.- Putnak J. R. and Phillips B. A.: Picornaviral estructure and assembly. Microbiol. Rev. 45 (2): 287-315, (1981).
- 57.- Richards O. C., Hey T. D. and Ehrenfeld E.: Two forms of VP_g on poliovirus RNAs. J. Virology. 38 (3): 863-871, (1981).
- 58.- Roizman B., Mayer M. and Rapp H. J.: Immunochemical studies of poliovirus. Science 81: 419-425, (1958).
- 59.- Ruiz-Gómez J., Caloca M. A. y Longega P.: Anticuerpos humorales, coproanticuerpos y excreción viral en recién nacidos inmunizados con la vacuna antipoliomieltítica. SPM XXI (2): 127-134, (1979).
- 60.- Ruiz-Gómez J., Gutiérrez G., Alvarez M. y Bustamante M. E. Estado actual de la poliomieltis en México. Gac. Med. Mex. 102: 629, (1981).
- 61.- Ruiz-Gómez J., Sánchez Y., Arrayales F. y Velázquez C.: Respuesta a la revacunación contra polio 1 en niños seronegativos después de haber recibido tres ó más dosis de la vacuna. Gac. Med. Mex. 113 (1): 23-27, (1977).

- 62.--Sabin A. B.: Oral, live poliovirus vaccine for climi
nation of poliomyelitis. Arch. Intern. Med. 106: 5-9,
(1960).
- 63.- Sabin A. B.: Paralytic poliomyelitis:old dogmas and -
new perspectives. Rev. Infect. Dis. 3(3): 543-564, --
(1981).
- 64.- Sabin A. B.: Pathogenesis of poliomyelitis. Science -
123 (3209): 1151-1157, (1956).
- 65.--Sabin A.B.: Present position of immunization against
poliomyelitis with live virus vaccines. British Med.
J. 1: 663-680, (1959).
- 66.- Sabin A.B.: Status of field trials with an orally ad-
ministered, live attenuated poliovirus vaccine. J.A.
M.A. 171: 863-868, (1959).
- 67.- Sabin A.B.: Vacunación contra la poliomiélitis en paí
ses económicamente subdesarrollados. SPM XXI (3): --
237-260, (1979).
- 68.- Sabin A.B. et. al.: Live, orally given poliovirus va-
ccine. Effects of rapid mass immunization on popula-
tion under conditions of massive enteric infection -
with other viruses. JAMA 173 (14): 1521-1526, (1960).
- 69.- Salk D.: Eradication of poliomyelitis in the United -
States. I. Live virus vaccine-associated and wild po-
liovirus disease. Rev. Infect. Dis. 2 (2): 228-242, -
(1980).
- 70.- Salk D.: Eradication of poliomyelitis in the United -
States. II. Experience with killed poliovirus vaccine.
Rev. Infect. Dis. 2 (2): 243-257, (1980).

- 71.- Salk D.: Eradication of poliomyelitis in the United States. III. Poliovaccines - Practical considerations. Rev. Infect. Dis. 2 (2): 258-273, (1980).
- 72.- Salk J. E.: Poliomyelitis vaccine preparation and administration. J. A. M. A. 169: 1829-1838, (1959).
- 73.- Salk J. E.: Present status of the problem of vaccination against poliomyelitis. Am. J. Pub. Health 45: 285-297, (1955).
- 74.- Salk J. E. : Studies in human subjects on active immunization against poliomyelitis. I. A preliminary report of experiments in progress. J. A. M. A. 151 (13): 1081-1098, (1953).
- 75.- Svennerholm A. M. et. al.: Antibody responses to live and killed poliovirus vaccines in the milk of Pakistani and Swedish women. J. Infect. Dis. 143 (5): 707-711, (1981).
- 76.- Swartz T.A., Skalska P., Gerchter C. and Cockburn W. C.: Routine administration of oral poliovaccine in a subtropical area. Factors possibly influencing seroconversion rates. J. Hyg. 70: 719, (1972).
- 77.- Swinscow T. D.: Statistics at square one. British Medical Association. Tavistock Square, London, England.
- 78.- Voller A., Bidwell D.E. and Bartlett A.: Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Theory and practice. Bull. Wld. Hlth. Organ. 53: 55-65, (1976).
- 79.- Voller A., Bidwell D. E. and Bartlett A.: The enzyme-linked immunosorbent assay (E.L.I.S.A.). Nuffield Institute of Comparative Medicine. The Zoological Socie-

- ty of London Regent's Park, London NWL. Dynatech Laboratories, (1977).
- 80.- Voller A., Bidwell D. E. and Bartlett A.: Enzyme-linked immunosorbent assay. Manual of Clinical Immunology. Rose and Friedman. Ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1981, pags. : 359-371.
 - 81.- Wallis C. and Melnick J. L.: Cationic stabilization. A new property of enteroviruses. Virology 16: 504-505, (1962).
 - 82.- Warren J. : Important advances in viral diagnostic -- procedures. Am. J. Clin. Pathol. 57: 814-819, (1972).
 - 83.- Wenner H.: The enteroviruses. Am. J. Clin. Pathol. - 57: 751-761, (1972).
 - 84.- W. H. O.: Poliomyelitis surveillance. Weekly Epidemiological Record. 57: 179, (1982).
 - 85.- Yolken R. H. : Enzyme-linked immunosorbent assay. Hospital practice. Dec., 1978, pags.: 121-127.
 - 86.- Yolken R. H.: Enzyme immunoassays for the detection - of infectious antigens in body fluids:current limitations and future prospects. Rev. Infect. Dis. 4 (1): 35-68, (1982).
 - 87.- Young N. A.: Poliovirus in: Mandel, Infectious disease and their etiologic agents. Part III., pags. 1083-1101.