



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores "Cuautitlán"

**DESARROLLO DE LA TÉCNICA DIFERENCIAL PARA EL
CONTROL DE CALIDAD DE LA VACUNA TRIVALENTE
ANTIPOLIOMIELÍTICA SABIN (ORAL).**

T E S I S

Que para obtener el Título de
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P r e s e n t a

JACQUELINE NAVARRO URIARTE

Director: Q.B.P. Inés Barrón N. y M.V.Z. Gerardo Cruz J.



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE
XXXXXX

" Alegrémonos de la vida, porque nos da la oportunidad de amar, trabajar, jugar y mirar las estrellas "

Henry Van Dyke

[illegible]

	PAGINA
I. INTRODUCCION	
ANTECEDENTES GENERALES	
1. HISTORIA	1
2. AGENTE ETIOLOGICO	5
3. SIGNOS CLINICOS	7
4. PATOGENESIS Y PATOLOGIA	10
5. HISTOPATOLOGIA	12
6. EPIDEMIOLOGIA	14
7. VACUNAS	19
8. DIAGNOSTICO DE LABORATORIO	27
9. AISLAMIENTO DEL VIRUS	29
10. SEROLOGIA	32
11. INMUNOENSAYO ENZIMATICO	33
12. INMUNIDAD	34
13. FUNDAMENTO	39
II. OBJETIVOS	44
III. MATERIAL	45
IV. METODOS	50
V. RESULTADOS	64
VI. DISCUSION	75
VII. CONCLUSIONES	87
VIII. APENDICE	88
IX. BIBLIOGRAFIA	90

HISTORIA.- Aun cuando la poliomiélitis probablemente ha sido un problema infeccioso desde la antigüedad, no se reconoció en toda su amplitud sino hasta finales del siglo XIX, cuando se describieron las primeras epidemias graves en Europa y posteriormente en E. U. A. (20, 48a, 46).

La poliomiélitis no fue reconocida como una entidad clínica distintiva hasta que Michael Underwood, un médico inglés publicó su tratado sobre enfermedades de los niños en 1784. En el principio del siglo XIX, el tratamiento consistía en fuertes purgas, ampollas, sangrías y aun electricidad aplicada a el miembro afectado. Muchos médicos asociaron los dientes con la enfermedad pero esta comunicación no fue apreciada (63).

En 1840 Jacob Heine, un ortopedista alemán y exponente de la medicina física publicó el primer estudio sistemático de " Parálisis Infantil - Espinal ". Cincuenta años más tarde el pediatra Suizo Ivor Wickman nombró a la poliomiélitis enfermedad de Heine-Medin como justificación a Heine, nombrandose de esta manera por 12 años o más (63).

Heine anotó las siguientes características de la enfermedad aguda: - los pacientes tenían de 6 a 36 meses de edad, precedidos de buena salud - antes de la enfermedad. Los pacientes estaban sufriendo manifestaciones irritativas y convulsivas las cuáles en la mayoría de los casos precedían a la parálisis de ambas extremidades inferiores. El concluyó que los signos y síntomas correspondían " a una afección en un punto del sistema nervioso central, nombrado médula espinal " (63).

En 1870 Jean Martin Charcot y su colega A. Joffroy notó cambios microscópicos en el asta anterior de la materia gris de la médula espinal de una víctima de poliomielitis. Charcot reconoció que estas particulares células motoras eran extremadamente vulnerables al " veneno " generado durante la enfermedad aguda confirmando lo dicho por Heine. Los descubrimientos de Charcot y otros establecieron la neuropatología de la poliomielitis y permitieron a los médicos diferenciar esta enfermedad de otras enfermedades del sistema nervioso central (63).

Karl Oskar Medin en 1887 investigó una epidemia de 44 casos de poliomielitis en Suiza. El reconoció que una enfermedad sistémica con fiebre y malestar general podría estar acompañada por la implicación del sistema nervioso central (63).

Después de estudiar una devastadora epidemia Escandinava en 1905, -- Wickman alumno de Medin concluyó que el período de incubación de la enfermedad menor fue de 3 a 4 días y el período de incubación para la enfermedad mayor con fiebre y parálisis fue de 8 a 10 días. El se dio cuenta de que la enfermedad era altamente contagiosa y que a menudo era extendida por individuos infectados subclínicamente. Las implicaciones de la información epidemiológica derivada por los investigadores Suizos no fue apreciada completamente por los Americanos durante muchos años (63).

En diciembre de 1908 en Vienna Karl Landsteiner, el renombrado inmunólogo y su asistente reportaron que la poliomielitis era causada por un

agente filtrable. Ellos mostraron que suspensiones de la médula espinal de un caso de poliomiелitis aguda produjo una enfermedad similar en 2 monos. Un mono murió después de una breve enfermedad y el otro mono desarrolló parálisis, pero ambos animales mostraron cambios característicos en las células de las astas anteriores de la médula espinal (63).

Este descubrimiento inicial implicó un trabajo adicional por Landsteiner y C. Levaditi, el cual mostraba que los virus podrían ser recuperados de amígdalas, secreciones nasales, glándulas salivales y nudos linfáticos mesentéricos de casos humanos fatales de infecciones naturales de poliomiелitis claramente establecidas. Un poco más tarde, Simon Flexner y sus colaboradores en el Instituto Rockefeller pasaron sucesivamente poliovirus de mono a mono. De 1909 a 1912 nuevos descubrimientos fueron hechos en el campo de los poliovirus ambos en los Estados Unidos y Europa. Flexner y Paul experimentaron con anticuerpos de poliomiелitis o sustancias germicidas. A. Netter y Levaditi encontraron anticuerpos neutralizantes en la sangre de humanos recuperados de la poliomiелitis. Flexner en sus experimentos observó el neurotropismo como propiedad de los poliovirus (63).

El concepto de que la infección ocurría vía nasal y que los virus entonces migran a lo largo de los nervios olfatorios al cerebro duro hasta 1952. En aquel año Dorothy M. Horstman mostró que los poliovirus entraban al torrente sanguíneo durante el período de incubación en monos cynomolgus infectados por la vía oral, el descubrimiento de la viremia en la poliomiелitis humana significó que pequeñas cantidades de anticuerpos circuy

lantes podrían probablemente neutralizar el virus antes de que él invada el sistema nervioso central. El interés público en poliomielitis fue estimulado por la elección del Presidente Franklin D. Roosevelt (63).

El desarrollo de una vacuna segura fue a causa del reporte en 1949 -- por John F. Enderds, Thomas H. Weller y Frederick C. Robbins acerca de -- que los poliovirus podrían crecer en cultivos de tejido embrionarios humanos (17 y 63) no nerviosos (2) y producían un característico efecto citopático (3, 17, 28, 37 y 63). Este reporte tuvo indudablemente la más grande influencia sobre el desarrollo de la virología durante las dos décadas siguientes (5). Por su logro a estos investigadores les fue dado el premio nobel en 1954 (17 y 63).

El refinamiento y aplicación general de la técnica de cultivo celular no solamente permitió el descubrimiento de un gran número de virus -- desconocidos hasta ese momento, sino que también facilitó grandemente los estudios fisicoquímicos de los virus y el desarrollo de vacunas profilácticas (2 y 17).

AGENTE ETIOLOGICO.- El poliovirus pertenece a la familia Picornavirus, el nombre fue adoptado por The International Committee of Virus Nomenclature fue derivado de la conjunción " pico " significando muy pequeño y RNA por el tipo de ácido nucleico encontrado en miembros de la familia -- (14 y 21) este ácido nucleico es de una sola tira con un peso molecular de 2 a 2.8×10^6 daltons, constituye alrededor del 30% de la masa de la partícula viral. La nucleocápside posee simetría cúbica, es desnuda careciendo de lípidos esenciales y fluctúa en diámetro de 20 a 30 nm (19, 21, 24).

La maduración del virus tiene lugar en el citoplasma, la familia incluye dos grupos Enterovirus y Rhinovirus, cuyos miembros infectan comúnmente al humano (4, 14 y 21). Los tres serotipos de poliovirus están incluidos en el grupo de los Enterovirus (21) clasificación dada por The Committee on Typing of the National Foundation for Infantile Paralysis -- (1957) para poliovirus (46). El virión es icosaédrico desnudo (4, - 14 y 56) y cápside compuesta de 60 copias o subunidades idénticas, formadas cada una de las cuatro proteínas estructurales o de cubierta (4 y 56) estas proteínas de cubierta son VP 1, VP 2, VP 3 y VP 4 y dos copias de - VP 0 el precursor de VP 2 y VP 4 (27 y 45). Se ha establecido que VP 1 es la proteína de superficie expuesta predominantemente, VP 2 y VP 3 están también localizadas externamente, pero son significativamente menos - extensas que VP 1 mientras que VP 4 parece ser completamente interna (12) y relacionada al RNA viral en asociación (13 y 14).

Químicamente los virus desnudos como el poliovirus están constituidos solamente de proteína y ácido nucleico siendo este el ácido ribonucleico (2) que es inactivado por luz ultravioleta y por desecación generalmente pero preservado por congelación (21 y 24). Los poliovirus son estabilizados a temperaturas altas en concentraciones iónicas molares de cationes divalentes como el $MgCl_2$ (31). Los poliovirus son relativamente estables en pH ácido de 3 a 5 durante 1 a 3 horas (4 y 24) insensibles al éter (24).

El poliovirus se inserta a receptores celulares específicos. La presencia de estos receptores controla la susceptibilidad a la infección viral (24). El cromosoma 19 del humano contiene la información genética para este sitio. Los 3 tipos antigénicos de poliovirus cepas Lansing, -- Brunhilde y León (43 y 63), cada uno de ellos posee dos antígenos distintos que son detectables por fijación de complemento y precipitación. El antígeno D ó N por nativo está asociado con partículas intactas virales infecciosas, en tanto que el C ó H por calentamiento está asociado -- con partículas virales conteniendo poco RNA o sin él no infecciosas (35 y 52).

In Vitro los 3 serotipos crecen solamente en cultivos celulares derivados del hombre y de primates. Solamente el hombre, chimpancés y los monos *Cynomolgus* pueden ser infectados por la vía oral (26).

SIGNOS CLINICOS.- La poliomiелitis fue experimentalmente transmitida a mono en 1903 por K. Landsteiner y E. Popper (2).

La piedra angular de la poliomiелitis paralítica es la parálisis asimétrica y flácida de las extremidades con o sin parálisis bulbar que se desarrolla aproximadamente de 1 a 2 % de todas las infecciones. Estas características son casi siempre únicas para las infecciones por poliovirus sin embargo otras infecciones por enterovirus (Cosackie, entero 71) han sido considerados como causas importantes de este síndrome (20).

Clínicamente después de un período de incubación de 1 a 2 semanas -- (con extremos de 3 a 35 días) las manifestaciones pueden ser:

-

1.- Poliomiелitis Abortiva. Esta es la manifestación más común, caracterizada por malestar, fiebre, dolor de cabeza, letargo, vómito, constipación, dolor de garganta o muscular en varias combinaciones. El paciente se recupera en unos cuantos días, el diagnóstico de la poliomiелitis abortiva sólo puede hacerse cuando se aísla el virus a partir del paciente o cuando se comprueba que ha elaborado anticuerpos (2 y 24).

2.- Poliomiелitis no Paralítica (meningitis aséptica). El paciente usualmente manifiesta los síntomas mencionados en poliomiелitis abortiva y entonces desarrolla meningitis aséptica con rigidez, dolor en el cuello y espalda. La enfermedad normalmente dura de 2 a 10 días y el paciente se recupera rápida y completamente (2). En una pequeña proporción de enfermos la enfermedad evoluciona hasta la parálisis. En ausencia de ---

diagnóstico virológico debe sospecharse la presencia de poliovirus si la enfermedad se presenta en personas asociadas a pacientes que presentan la forma paralítica (24).

3.- La poliomiелitis Paralítica. Solamente pequeños porcentajes de pacientes con poliomiелitis no paralítica o abortiva desarrollan parálisis. Ocasionalmente la parálisis es manifestada sin una fase antecedente. La característica clínica predominante es una parálisis flácida resultado de lesiones causadas en las motoneuronas (2); sin embargo también puede ocurrir una incoordinación consecutiva a la invasión del tallo encefálico, así como espasmos dolorosos de los músculos no paralíticos, puesto que -- las células de las astas anteriores de la médula espinal son invadidas -- por los virus. La cantidad de daño varía grandemente (24).

Menos frecuentemente, la parálisis puede ocurrir en músculos que están enervados de la médula. Esta es llamada parálisis bulbar y puede tener un grado de severidad, debilidad o parálisis de solamente ciertos músculos por ejemplo, músculos faciales, implicación de los centros vasomotores o respiratorios. La muerte por poliomiелitis es debida usualmente a la implicación de las células de las astas anteriores de las cuales los nervios frénicos e intercostales son derivados (2). La afección de los músculos generalmente es máxima dentro de los primeros días después de la iniciación de la fase paralítica (24), la máxima recuperación es observada dentro de los seis meses, pero ocasionalmente puede tomar de 1 a 2 a ños. El ataque de la enfermedad es a menudo abrupto en niños; en adultos

el ataque es gradual y la enfermedad es más severa con una proporción de mortalidad que aumenta con la edad (2).

PATOGENESIS Y PATOLOGIA.- Los virus son parásitos obligados intracelulares. Los virus entran al huésped susceptible por varios mecanismos y se multiplican en varios tejidos sobre su camino a el órgano seleccionado u órganos blancos. Aquí el virus invasivo se multiplica a un nivel crítico, con acompañamiento de necrosis celular, antes que la enfermedad se manifieste. El huésped sucumbe a la infección o se recupera en el último caso usualmente con inmunidad durable (2 y 24).

Los virus entran al huésped a través de la cavidad oral y la multiplicación primaria ocurre en la bucofaringe o el intestino. El virus esta presente con regularidad en la faringe y en las heces antes que la enfermedad se establezca clínicamente, se multiplica en las amígdalas, ganglios linfáticos cervicales y placas de Peyer. Posteriormente los virus multiplicados pasan a través de los ganglios linfáticos al torrente sanguíneo produciendo viremia, siendo favorecida por la probabilidad de que las células del sistema reticulo-endotelial experimente también multiplicación viral lo cual ocasiona la prolongación del estado virémico. Las vías por las cuales el poliovirus alcanza al sistema nervioso central --- (SNC) no han sido elucidadas sin embargo, se cree comúnmente que los virus pueden alcanzar el SNC por vía hematógena y por viajar a lo largo de los axones de los nervios periféricos. La diseminación viral por transmisión directa sangre-SNC se ve favorecida por pequeñas cantidades (no proporcionando protección eficaz) de anticuerpos circulantes en el sistema circulatorio, mientras que el poliovirus después de diseminarse a lo largo de los axones de los nervios periféricos hacia el SNC y de allí conti-

nuar a lo largo de las fibras de las motoneuronas afectando en forma creciente la médula espinal o el encéfalo. También se ha observado que la amigdalectomía (la cuál presumiblemente expone los nervios terminales), inadvertidamente realizada durante el período de incubación del virus ha precipitado la parálisis. Se ha sugerido que el trauma local induce aumento del flujo sanguíneo al área correspondiente de la médula espinal y que cuando esto ocurre durante el estado virémico de la infección el virus tiene más oportunidad de invadir la médula espinal (2 y 24).

HISTOPATOLOGIA.- En las virosis que afectan al SNC las células nerviosas infectadas cesan frecuentemente de multiplicarse y sufren una lisis como se ve en las secciones histológicas de los casos fatales de poliomiелitis (2). La síntesis de proteínas es inhibida en las células invadidas por el poliovirus (19 y 49), cuando esto sucede hay cambios estructurales en la membrana celular (7) y una rápida inhibición de -- síntesis (27, 37 y 50).

Los poliovirus invaden preferentemente las células nerviosas especialmente las células de las astas anteriores de la médula espinal. Sin embargo, en casos severos las astas posteriores también están involucradas, además de que los poliovirus son observados en el tallo cerebral -- hasta el hipotálamo. El nervio del núcleo craneal generalmente muestra cambios degenerativos. Por la formación reticular el núcleo vestibular y el núcleo cerebeloso profundo son las áreas más severamente afectadas del cerebro (2).

La mas difusa infiltración perivascular focal de linfocitos y algunos polimorfos es observada; células plasmáticas y microglia son características constantes del ataque viral sobre células nerviosas. Las células de las astas anteriores muestran primero cromatolisis (disolución de la sustancia de Nissel) e hinchazón o tumefacción. Los núcleos son entonces desplazados y muestran pérdida de tinción empezando a ser picnoticas siendo destruidas eventualmente. Finalmente la célula infectada -- es fragmentada, eliminada a través de neurofagia y remplazada por una cicatriz astroglial. Además del daño nervioso celular se puede observar -

en algunos casos miocarditis, ulceración de las placas de Peyer, hiper--
plasia linfática y prominencia de folículos, expansión de ganglios linfá-
ticos y esplénicos (2, 19 y 49).

EPIDEMIOLOGIA.- La poliomiелitis se transmite principalmente por - las vías feco-oral en medio insalubre pero también puede haber diseminación por contacto o aerosol.

Los virus aun estan diseminados mundialmente, especialmente en países en vías de desarrollo incluyendo a México (particularmente infecciones de tipo 1) o en asociación con vacunas de virus vivos (20). Cerca del 90% de infecciones en Norteamérica y Europa Occidental son causadas por el poliovirus tipo 1 y esporádicamente por el virus tipo 3. El poliovirus tipo 2 es el menos involucrado en las áreas anteriormente mencionadas pero en otras áreas como el Medio Oriente a ocasionado infecciones severas.

El tracto alimentario del hombre, especialmente niños preescolares son los reservorios del virus. La enfermedad es más frecuente durante - el verano y en los trópicos que en zonas templadas y climas fríos aunque se ve favorecida al contacto humano ampliando la diseminación del virus a niños y personas susceptibles. Durante las epidémias muchas especies de moscas pueden servir como portadores mecánicos de los virus y así contaminar alimentos y agua consumidos por individuos susceptibles (48).

La poliomiелitis fue una enfermedad endémica en climas templados -- que afectaba solamente a niños hasta que las epidémias fueron reportadas mas tarde en el siglo XIX en Suecia y en los Estados Unidos. George Colmer describe cerca de 10 casos en una comunidad de Louisiana en 1841. - Después 2 médicos de Boston reportan 26 casos en 1893.

En 1916 la parte noroeste de los Estados Unidos fue afectada por una devastadora epidemia de poliomielitis, en New York solamente hubo -- cerca de 9 000 casos (2).

Se pueden considerar tres fases epidemiológicas principales de la poliomielitis; la endémica, la epidémica y la posvacunal. Todas estas -- fases coexisten actualmente en diferentes regiones del mundo.

Comportamiento Endémico. En algunas áreas en desarrollo sobrepobladas principalmente en los trópicos, la poliomielitis paralítica continúa siendo una enfermedad de la infancia (verdadera "Parálisis Infantil"), de la que se ve sólo algún caso raro y esporádico en otras edades. En estas poblaciones virtualmente todos los niños de mas de cuatro años de edad ya estan inmunizados. Debido a la presencia casi universal de anticuerpos contra los tres tipos de virus poliomielíticos entre mujeres de edad fértil, se produce una transferencia de inmunidad pasiva de madres a hijos de modo que muchos recién nacidos experimentarán sus primeras infecciones cuando aun estaban protegidos parcialmente por los anticuerpos maternos. Además los recién nacidos y niños pequeños tienen una frecuencia de infecciones no manifiestas mucho más alta en relación con las manifiestas, de modo que la parálisis en estas condiciones es relativamente rara y no ocurren epidémias a pesar del hecho de que los virus de la poliomielitis circulan abundantemente. La rareza de la poliomielitis -- clínica en los trópicos ha hecho creer en el pasado que en esas áreas no había infección poliomielítica. La poliomielitis era muy endémica sólo que las infecciones eran casi totalmente asintomáticas. En 1974 en Gha-

na, se encontró una proporción de 7 por 1 000 niños en edad escolar padeciendo cojera, aunque no había evidencia de que hubieran ocurrido epidemias en los años inmediatamente precedentes (31), y se estimó que la incidencia anual de la enfermedad sería de cuando menos 28 por cada ---- 100 000 habitantes, cifras comparables a las obtenidas en Europa (2) y Estados Unidos de América antes de la introducción de la vacuna.

Comportamiento Epidémico. Durante los primeros 50 a 60 años del si glo XX en los países desarrollados la poliomielitis experimentó una ---- transición de la fase endémica a otra en la que ocurrieron epidemias pro gresivamente mayores y más graves de la enfermedad paralítica. La expli cación aceptada y confirmada por estudios es que la mejoría de las condi ciones sanitarias e higiénicas redujo las oportunidades de que los niños pequeños contrajeran la infección y en consecuencia un número creciente de personas tuvo su primer encuentro con el virus de la polio siendo ya niños mayores o siendo adultos cuando es más probable que la infección - poliomielítica adopte la forma paralítica. El retardo en la adquisición de la infección favorecía el progresivo aumento de personas susceptibles hasta ser suficiente para una amplia y rápida propagación del virus. Es to fue el inicio de las epidemias a veces con aparición abrupta y otras veces después de aumentos graduales de la frecuencia anual de casos "esporádicos" de poliomielitis. Durante las epidemias la mayor incidencia se observaba entre las edades de cinco a nueve años, y alrededor de un -- tercio de casos, dos tercios de las muertes ocurrían en personas de más de 15 años de edad. Esto constituyó una variación notable con respecto a la gran epidemia de 1916 en la que aproximadamente el 80 % de los pa--

cientes fueron niños menores de cinco años (31).

En la primera mitad del siglo XX se registró el mayor número de casos en naciones desarrolladas y en los sectores con niveles socioeconómicos mas altos de estas naciones sufrieron poliomielitis epidémica. Dentro de la misma ciudad, la diseminación mas amplia de los virus de la polio en las áreas de condiciones sanitarias e higiénicas inferiores provocó infecciones inmunizantes a una temprana edad en mayor número de niños y así redujo sus probabilidades de llegar a desarrollar la forma parálitica de la enfermedad.

Comportamiento en la Era Posvacunal. Comenzó para la mayor parte - de los países de Europa, América del Norte y Oceanía, lo mismo que de algunas otras regiones del mundo cuando fue introducida en 1955 la vacuna elaborada con virus muertos y luego continuó a partir de los años de --- 1959 a 1961, cuando estuvieron disponibles en gran escala las vacunas a base de virus vivos atenuados. De inmediato se experimentó una notable reducción en la incidencia de la poliomielitis en estas áreas.

Actualmente están surgiendo formas epidemiológicas posvacunales en las áreas geográficas consideradas como adecuadamente inmunizadas por vacunación. Estas formas son diferentes de un país a otro y en cierto grado aun dentro de un mismo país. Los virus vacunales se excretan abundantemente en las heces de los vacunados y entonces infectan a los contactos no vacunados. Los casos raros de poliomielitis que aparecen en estas circunstancias, pudieran atribuirse a virus silvestres importados, -

pero quizás en algunos casos pueden asociarse con las mismas vacunas ---
(31).

VACUNAS.- En la actualidad existen dos tipos de vacunas eficaces, la de virus muerto que se administra por inyección y la de virus vivo -- que se emplea por vía oral (25). El acontecimiento que abrió el camino para el desarrollo de una vacuna segura fue el reporte en 1949 por John F. Enderds y colaboradores en el cual demostraron que el poliovirus crecía sobre cultivo de tejidos humanos embrionarios y producía un característico efecto citopático (17).

a). Vacuna de Virus Muerto. En 1953 Jonas Salk reportó la efectividad de una vacuna inactivada con formalina sobre 100 voluntarios (63). Esta vacuna es llamada de virus muerto y se prepara a partir de poliovirus que se multiplican en cultivo de tejido renal de mono (31). Se -- dispone de ella desde 1955 año en el cual le fue dada la licencia por el Servicio Público de Salud para usarla ampliamente para proteger a niños - en numerosos países donde existían epidémias graves de poliomielitis las cuales se vieron disminuidas con la vacunación (63).

La vacuna contra la poliomielitis a base de virus inactivados se -- utiliza en Finlandia, Suecia, Holanda y algunas regiones de Canada, de-- mostrando ser muy eficaz (20 y 31). La vacuna se administra mediante una inyección subcutánea (20).

Se requieren cuatro inoculaciones para lograr la inmunización primaria; las tres primeras se administran a intervalos de 4 a 6 semanas, y -- la cuarta se aplica entre 6 y 12 meses después (31). La vacunación -- primaria produce respuesta de anticuerpos de todos los serotipos de po--

liovirus en más del 95% de los receptores. Con el fin de conservar la -
inmunidad, generalmente se considera necesario emplear dosis de refuerzo
en períodos de 5 años hasta que el individuo tenga 18 años (20).

Actualmente se estudian algunas nuevas técnicas para mejorar la ca-
lidad de las vacunas de virus muerto. Un enfoque consiste en obtener --
una concentración de virus sumamente elevada, purificarla y preparar a -
continuación una vacuna subunitaria que no contiene ácido nucleico del -
virus, sino ciertos polipéptidos seleccionados que poseen actividad antí-
genica. Tal vacuna sería elaborada a partir de un componente antigénico
purificado, que casi no contendría materiales extraños, sino sólo inte--
grantes precisos para producir una inmunidad de grado satisfactorio.

CUADRO Nº 1

VACUNA DE VIRUS MUERTO

VENTAJAS

1. Da una inmunidad humoral a un número satisfactorio de vacunados si se administran suficientes dosis.
2. Se puede incorporar en los programas ordinarios de inmunización pediátrica junto a otras vacunas (DPT).
3. La inactivación permite que se use en individuos con deficiencias inmunitarias o bajo tratamientos inmunosupresores, así como en sus familiares.
4. La inactivación evita la posibilidad de mutaciones y la aparición de virulencia.
5. Al parecer, ha reducido considerablemente la propagación de los poliovirus en países pequeños donde se ha usado adecuadamente -- (vacunación amplia y frecuente).
6. Puede resultar especialmente útil en algunas regiones tropicales.

CUADRO Nº 1a

VACUNA DE VIRUS MUERTO

PROBLEMAS

1. Estudios anteriores indicaron que el número de vacunados que produjo anticuerpos después de tres dosis fue decepcionante._a
2. En general se requieren dosis de refuerzo para conservar concentraciones de anticuerpos detectables._a
3. No produce inmunidad local (intestinal) en los vacunados.
4. Es mas costosa que la vacuna de virus vivo.
5. Existen problemas en su preparación debido a la creciente escasez de monos.
6. El empleo de poliovirus infectantes como punto de partida de la vacuna podría dar lugar a una desgracia si ocurriera un fracaso en la inactivación del virus.

Nota: _a Algunos de los resultados decepcionantes obtenidos en los primeros diez años posteriores a la introducción de la vacuna de virus muerto pueden haberse debido, en parte a problemas que en la actualidad se encuentren resueltos (31).

b). Vacunas de Virus Vivo. Entre 1952 y 1955 varios investigadores lograron preparar ciertas formas de vacunas de virus vivo atenuado - mediante pases seriados en cultivo de tejido (31).

Uno de estos investigadores fue H. Koprowski quien desarrollo una - vacuna atenuada (viva) de poliovirus tipo 2. Otras cepas atenuadas de los tres tipos de poliovirus crecidos en cultivos celulares, fueron subsecuentemente desarrolladas por A. B. Sabin en 1955-1957 (2 y 47).

La vacuna viva de poliovirus atenuados fue introducida a partir de 1961 y ha remplazado grandemente a la vacuna de Salk en los Estados Unidos y en la mayoría de los países del mundo (2). La vacunación primaria produce anticuerpos a todos los tres serotipos, en más del 95% de - los receptores estos anticuerpos permanecen durante varios años igual - que con la vacuna inactivada, se recomiendan dosis de reactivación para mantener concentraciones adecuadas de anticuerpos.

Las ventajas principales de la vacuna oral incluyen la facilidad - de la administración y el hecho de que los virus de vacuna desaparecen en el aparato intestinal dando por resultado inmunización secundaria de algunos contactos no inmunizados (25). En las campañas de vacunación realizadas con virus vivo, durante los primeros años casi siempre se -- emplearon vacunas monovalentes que incorporaban cada serotipo por separado, pero en la actualidad se utilizá ampliamente la vacuna trivalente. Con las vacunas trivalentes el programa de vacunación estipula que la --

primera dosis debe ser administrada a niños de dos meses de edad; la segunda y tercera dosis se aplica con intervalos de dos meses, y a los 18 meses de edad se da una cuarta dosis. Se debe administrar una dosis de refuerzo alrededor de los seis años de edad y no se considera necesario aplicar nuevos refuerzos en la mayor parte de los casos (31).

c). Efectos Colaterales en Reacciones Adversas de las Vacunas de poliovirus. Vacuna de poliovirus inactivada, debido a que contienen cantidades detectables de estreptomycin y neomicina existe la remota posibilidad de que se presenten reacciones de hipersensibilidad en personas susceptibles a los antibióticos.

Vacuna de poliovirus por vía oral, la enfermedad paralítica asociada con la vacunación se considera que es de frecuencia de uno en aproximadamente 3.7 millones de dosis distribuidas (20).

CUADRO Nº 2

VACUNA DE VIRUS VIVO

VENTAJAS

1. Proporciona inmunidad humoral e intestinal, del mismo modo que la infección natural.
2. La inmunidad que produce puede durar toda la vida.
3. Induce la producción de anticuerpos con suma rapidez en una gran proporción de los vacunados.
4. La administración por la vía oral es más aceptable y fácil de lo grar que la inyección.
5. No se requiere personal especialmente adiestrado para adminis--- trarla.
6. Cuando se la prepara en su forma estabilizada puede conservar su potencia en condiciones de campo difíciles, con poca refrigera--- ción y sin congelación.
7. En casos de epidemia, no solo induce la producción rápida de an- ticuerpos, sino también infecta con prontitud el tubo digestivo con lo que se evita la propagación del virus causante de la epi- demia.
8. Los costos de producción y administración son relativamente redu- cidos y no se requiere la aplicación de dosis de refuerzo poste- riores.
9. Se la puede preparar en células humanas, y de este modo no depen- de del suministro continuó de monos en cantidades grandes.

CUADRO Nº 2a

VACUNA DE VIRUS VIVO

PROBLEMAS

1. Puesto que la vacuna se elabora con virus vivos, puede haber mutaciones, que en algunos casos raros han dado origen a neurovirulencia suficiente para causar poliomielitis paralítica en los vacunados o individuos con quienes han tenido contacto.
2. La progenie del virus de la vacuna se propaga por contacto a los familiares del vacunado. _a
3. La progenie del virus de la vacuna también se propaga a individuos de la misma población que no han aceptado ser vacunados. _a
4. En algunos países de clima cálido ha resultado difícil lograr la producción de anticuerpos en proporciones satisfactoriamente altas en los vacunados, a menos que se repitan las dosis de vacuna. -- En ciertas regiones, aun la inoculación repetida ha sido ineficaz.
5. Esta contraindicada en individuos con enfermedades que producen deficiencias inmunitarias y sus contactos familiares así como entre quienes están sometidos a tratamientos inmunosupresores.

Nota. _a Algunos investigadores consideran que la propagación de la progenie del virus de la vacuna es conveniente, pero con frecuencia es este virus que excretan y diseminan los vacunados, ha sufrido mutaciones. Como resultado, en este caso ya no se trata de una vacuna que pueda ser sometida a pruebas de seguridad y aprobada para su empleo general (19 y 31).

DIAGNOSTICO DE LABORATORIO.- El diagnóstico viral incluye pruebas - serológicas, determinación de enzimas virales, técnicas microscópicas, radioinmunoensayo e inmunoensayo enzimático.

Muestras. El líquido cefaloraquídeo muestra un aumento en el número de leucocitos generalmente entre 10 y 200 (rara vez mas de $500/\text{cm}^3$). - En la etapa temprana de la enfermedad, la relación de polimorfos nucleares con respecto a linfocitos es alta pero a los pocos días la relación - se invierte. La cuenta total de células baja lentamente hasta el valor - normal. El contenido de proteínas de líquido cefaloraquídeo esta ligeramente elevado (con un promedio de 40 a 50 mg/ml), pero pueden ocurrir - cifras altas persistiendo durante semanas. La cifra de glucosa en líquido cefaloraquídeo es normal (24).

Para el aislamiento de enterovirus, raspados rectales y/o heces son las muestras seleccionadas. Fluidos cerebroespinales (LCR) y/o exudados faríngeos también pueden ser utilizados. Estas muestras pueden ser inocu ladas en cultivos de tejido de células de cultivo primario de mono y/o lí neas celulares humanas; RhMK o GMK Africano, Patas MK, HeLa y Hep-2 res-- pectivamente.

El suero de convalecientes y de pacientes con enfermedad aguda son - usados para determinaciones de anticuerpos.

CUADRO Nº 3

AISLAMIENTO			
GRUPO DE VIRUS SOS PECHOSO	ENFERMEDAD CLINICA COMUNEMENTE ASOCIADA	MUESTRAS CLINICAS PARA AISLAMIENTO DEL VIRUS	MATERIALES POST MORTEM
Enterovirus	Poliomielitis, meningitis aséptica, miocarditis, pericarditis.	Heces, raspados rectales, exudados faríngeos, -- LCR, sangre.	Médula espinal y otros tejidos del SNC, sangre, -- fluido pericardial, tejidos con lesiones patológicas.

AISLAMIENTO DEL VIRUS.- Efecto citopático (ECP) en cultivos. La observación del ECP es el mas sensible y rápido método para el reconocimiento de enterovirus. Muchos tipos de cultivos de tejido son altamente susceptibles a poliovirus. La destrucción celular extensa ocurre usualmente de 24 a 48 horas después de la inoculación en sistemas celulares -- como RhMK y Hep-2.

Formación de placas líticas en células cultivadas en botellas, las placas de poliovirus son grandes y claras en cultivos de RhMK y patas -- MK (21).

CUADRO Nº 4

SISTEMAS " IN VITRO " E " IN VIVO " PARA AISLAMIENTO DE VIRUS											
GRUPO	" IN VITRO "									" IN VIVO "	
	<u>EFEECTO CITOPATICO</u>										
	<u>Cultivos celulares primarios</u>					<u>Líneas celulares</u>					
	HEK	RhMK	Patas	RK	CE	Cepa	Hep-2	BSC	BHK	Ratones Lactantes	Huevos
VIRUS	o	o									
	HAM	GMK	MK			Celular	HeLa	o			Embrionados
						WI-38	KB	Vero			
ENTERO											
POLIO	++	++	++	-	-	++	++	++	-	-	-

Sistemas altamente sensibles ++ No sensibles -

Cultivos Celulares Primarios

(HEK) Riñón de embrión humano
 (HAM) Amnion humano
 (RhMK) Riñón de Mono Rhesus
 (GMK) Riñón de Mono Verde
 (patas MK) Riñón de Mono Patas
 (RK) Riñón de Conejo
 (CE) Fibroblastos de Embrión de Pollo

Cepa Celular Diploide

(WI-38) Pulmón de embrión humano

Líneas Celulares Heteroplóides

(Hep- 2) Carcinoma epidermico de la ríngue humano
 (HeLa) Carcinoma de Cervix Humano
 (KB) Carcinoma de Nasofaringe H.
 (BSC-1) Riñón de Mono Verde Afric.
 (Vero) " " " " "
 (BHK) Riñón de Hamster Lactante.

TECNICAS DE LABORATORIO PARA AISLAMIENTO VIRAL



A. CULTIVO DE TEJIDO PARA ECP



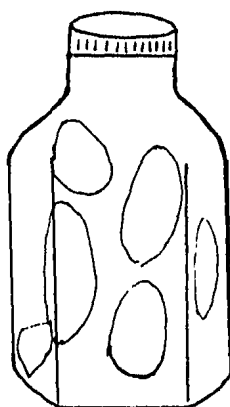
B. INOCULACION DE HUEVOS

EMBRIONADOS



C. INOCULACION DE RATONES

LACTANTES



D. SISTEMA DE CULTIVO DE TEJIDO PARA FORMACION DE

PLACAS

SEROLOGIA.- La identificación final de los virus puede ser hecha por comparación con antisueros conocidos por medio de neutralización y otras pruebas serológicas (9, 21).

Son necesarias dos muestras de suero, la primera de las cuales debe obtenerse tan pronto como sea posible a partir de la iniciación de la enfermedad, la segunda debe obtenerse de 3 a 4 semanas después para mostrar una elevación del título de anticuerpos.

Al principio de la fase aguda los sueros contienen únicamente anticuerpos C, 1 a 2 semanas después se encuentran tanto anticuerpos C como N y en los sueros de la convalecencia tardía sólo están presentes los anticuerpos N. Solamente la primera infección con poliovirus produce respuestas de Fijación del Complemento estrictamente específicas de tipo. Infecciones subsecuentes con poliovirus heterotípicos vuelven a inducir la producción de anticuerpos, fundamentalmente contra el grupo de antígenos termoeestables compartidos por los tres tipos de poliovirus.

Los anticuerpos neutralizantes, aparecen pronto, es posible ponerlos de manifiesto en el momento en que el paciente es hospitalizado. Los anticuerpos neutralizantes aparecen también en la orina. Los anticuerpos específicos de tipo precipitantes del virus, de corta duración, se producen durante la convalecencia. La prueba de microprecipitación es menos útil que las pruebas de neutralización Nt y de fijación de complemento FC, (24).

INMUNOENSAYO ENZIMATICO.- El inmunoensayo enzimático es una técnica de diagnóstico viral rápido, es mas sensible y puede ser automatizada o aplicarse a un gran número de muestras.

Las desventajas del inmunoensayo incluyen la carcinogenicidad de algunos sustratos enzimáticos y el gasto del equipo automatizado.

El inmunoensayo enzimático para determinación de antígeno tiene muchos formatos (36), el mas común de los cuales se utiliza un anticuerpo - capturado enlazado a una fase sólida, usualmente un pozo de microtitulación o cámara de plástico. La incubación con una muestra clínica resulta en el enlace del antígeno viral presente en la muestra al anticuerpo y -- así a la fase sólida. El antígeno viral enlazado es entonces determinado con otro anticuerpo, el cual está conjugado a una enzima ya sea directamente o por medio de una técnica indirecta de sandwich. La enzima enlazada es entonces determinada y cuantificada por el desarrollo de color o -- fluorescencia cuando un sustrato apropiado es añadido. Este ensayo puede realizarse con maquinaria automática, los resultados se leen en segundos por espectrofotómetros especialmente diseñados y los datos colectados rápidamente y analizados por computadora.

Tales ensayos han sido desarrollados para la determinación de varios virus patógenos de los tractos gastrointestinales y respiratorios (20, - 42).

INMUNIDAD.- La capacidad del cuerpo humano para resistir las infecciones virales dependen básicamente de dos mecanismos. Estos son la inmunidad natural o innata y la adquirida o inmunidad inducida.

Inmunidad natural. Este tipo de inmunidad es inespecífica y depende de una variedad de factores.

1. Resistencia de especies. Ha sido sugerido que la resistencia de especies depende de la ausencia de receptores celulares específicos para la infección viral.

2. Edad. El feto humano y los neonatos son particularmente susceptibles a agentes virales, debido a la inmadurez del sistema inmune y la incapacidad para producir interferón que son mecanismos que están involucrados en este fenómeno, aun no totalmente esclarecidos.

3. Barreras mecánicas. En suma secreciones normales tales como sudor, lágrimas, secreciones sebáceas y mucosas tienen una clara acción en el epitelio ciliado del tracto respiratorio jugando importantes papeles defensivos (2).

4. Factores bioquímicos. En suma un número no específico de inhibidores virales normalmente presentes en el suero juegan un papel en el mecanismo de defensa del huésped. Ejemplo son el complemento, la opsonización, properdina y ciertas proteínas lábiles al calor y complejos de proteínas. Ciertas hormonas corticosteroides, baja natural debido a embarazo y condiciones experimentales ejercen un efecto depresor sobre la resistencia natural (2).

5. Factor celular. Los macrofagos del sistema reticulo endotelial - como células de Kuffer pueden ingerir y destruir las partículas virales - invasivas, Sin embargo ciertos virus virulentos no son destruídos por macrofagos y pueden multiplicarse en estas células y aun utilizarlas para - alcanzar los órganos blancos.

6. Temperatura del cuerpo. Este factor juega un papel en la adquisición del resfriado común, donde los rinovirus crecen mejor a 33-35 °C, - el frío puede precipitar la enfermedad por las bajas temperaturas en el - epitelio respiratorio (2).

Inmunidad adquirida. Este tipo de inmunidad es específica y es inducida ya sea por infección (con o sin manifestación clínica) o vacunación. Depende primeramente sobre la presencia de anticuerpos circulantes y su rápida eficiente producción sobre la reexposición al mismo agente infeccioso. El papel de infecciones subclínicas (inaparentes) debe ser enfatizado como un significativo porcentaje de individuos susceptibles que adquieren inmunidad a una variedad de enfermedades virales, ejemplo de -- ello es la poliomielitis.

Los anticuerpos producidos por el huésped en respuesta a un virus invasivo (como antígeno) son esencialmente de tres tipos:

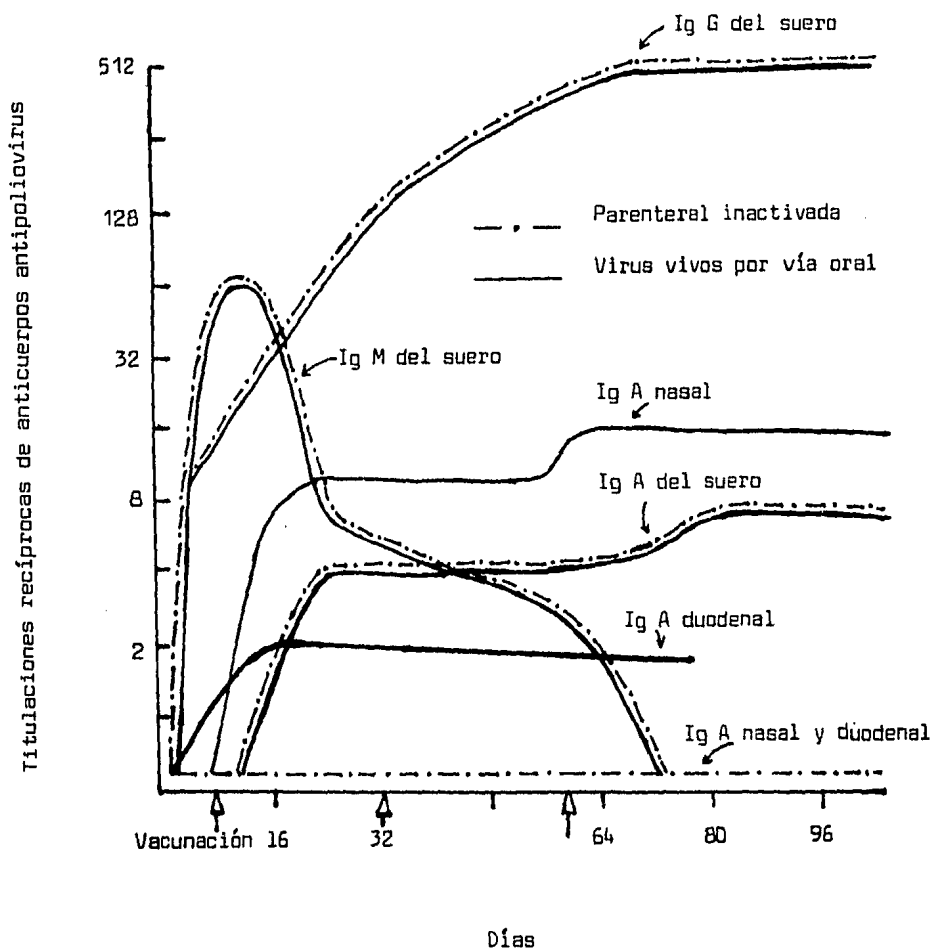
IgM es el primero en aparecer después de la estimulación antigénica. Es un anticuerpo altamente eficiente pero tiene una vida media de 5 días y no cruza la barrera placentaria. IgG es la inmunoglobulina predominante en el suero y es solamente la única que cruza la placenta, tiene una -

vida media de 23 días. El tercer tipo, nombrada IgA es encontrada primariamente en saliva y otras secreciones del cuerpo, juega su papel inmune en infecciones respiratorias e intestinales, tiene una vida media de 5 -- días. Cuando una dosis es dada (reexposición al mismo virus), el nivel de IgG aumenta marcadamente mientras que la IgM permanece esencialmente - al mismo nivel (2).

Ciertos factores locales (humoral o celular) pueden también ser responsables de la resistencia. Después de una infección natural o inmunización con la vacuna de polio viva, la resistencia a la infección de polio-virus puede ser mediada a través del desarrollo local de anticuerpos en - los tejidos linfáticos de la faringe e intestino.

Los anticuerpos específicos circulantes se combinan con los virus invasivos neutralizandolos (por bloqueo de sitios receptores del virus), la inmunidad adquirida puede también depender de la respuesta celular y la producción de interferon. Cuando este aparece facilita la neutraliza-ción de las partículas invasivas por los anticuerpos y son mas rápida y - eficazmente ingeridos y destruidos por los macrofagos (2).

Es muy claro que cualesquiera de las vacunas (virus vivo o muerto) cuando se administra a las dosis recomendadas así como a sus intervalos - de tiempo, son eficaces para inducir la inmunidad protectora (2).



Graf. 1. Respuesta de los anticuerpos séricos y secretores a la administración por vía oral de la vacuna de poliovirus vivos atenuados y a la inoculación intramuscular de la vacuna inactivada antipolio (20).

La inmunidad protectora se correlaciona bien con la presencia de anticuerpos neutralizantes circulando para los tres serotipos de poliovirus. Tanto la vacuna por vía oral como la de virus inactivado pueden inducir rápidamente la producción de anticuerpos, los que se pueden detectar desde los tres días posteriores de la vacunación. Las titulaciones máximas de anticuerpos, por lo general se desarrollan de 2 a 4 semanas o mas después de la vacunación. Habiendo pasado 5 años de una vacunación primaria, los anticuerpos al tipo 1 se pueden detectar de 92 a 98%, los de tipo 2 - en 98% y el tipo 3 de 84 a 87% (20).

Aun cuando las titulaciones de anticuerpos disminuyen a niveles no detectables, la protección puede existir (31), ya que la reinmunización suele provocar una elevación de anticuerpos rápida y vigorosa. Sin embargo, para asegurar la protección continua se recomienda la revacunación periódica (20 y 31).

La inmunidad intestinal inducida por la vacuna por vía oral, puede consistir en anticuerpo IgA secretorio específico y mecanismos de inmunidad mediada por células, ya que se sabe que ambos se desarrollan satisfactoriamente (20).

La inmunidad protectora se correlaciona bien con la presencia de anticuerpos neutralizantes circulando para los tres serotipos de poliovirus. Tanto la vacuna por vía oral como la de virus inactivado pueden inducir rápidamente la producción de anticuerpos, los que se pueden detectar desde los tres días posteriores de la vacunación. Las titulaciones máximas de anticuerpos, por lo general se desarrollan de 2 a 4 semanas o mas después de la vacunación. Habiendo pasado 5 años de una vacunación primaria, los anticuerpos al tipo 1 se pueden detectar de 92 a 98%, los de tipo 2 en 98% y el tipo 3 de 84 a 87% (20).

Aun cuando las titulaciones de anticuerpos disminuyen a niveles no detectables, la protección puede existir (31), ya que la reinmunización suele provocar una elevación de anticuerpos rápida y vigorosa. Sin embargo, para asegurar la protección continua se recomienda la revacunación periódica (20 y 31).

La inmunidad intestinal inducida por la vacuna por vía oral, puede consistir en anticuerpo IgA secretorio específico y mecanismos de inmunidad mediada por células, ya que se sabe que ambos se desarrollan satisfactoriamente (20).

FUNDAMENTO.- Los aspectos importantes en el Desarrollo de la Técnica Diferencial para la vacuna trivalente poliomielítica estan basados sobre la actividad viral en sustratos celulares y en la reacción inmunológica de neutralización; en este caso tratándose de poliovirus la neutralización del efecto citopático (ECP) por los sueros antipoliomielíticos correspondientes a cada uno de los serotipos (29 y 61).

La actividad viral es determinada cuantitativamente (17) por dosis infectivas a través de técnicas de microtitulación. Se define $DICT_{50}/ml$ (dosis infectiva en cultivo de tejido 50 por mililitro) como aquella -- cantidad de suspensión viral la cual inducirá cambios citopáticos en la mitad de los cultivos celulares a los cuales es añadida (17).

Estos aspectos se ven influidos por varios factores siendo mencionados algunos de ellos. El ECP es la manifestación del poliovirus (1, 3, 17, 21 y 28) en cultivos celulares sensibles (17) a éste, para la realización de este trabajo se utilizó la línea celular Hep-2C por su alta sensibilidad (1 y 18).

Después de la adsorción específica de poliovirus a receptores (26) sobre la membrana celular de la célula, aproximadamente 50% de las proteínas capsídicas virales son detectables intracelularmente y permanecen --- allí en una forma estable. Es concebible que las proteínas virales interfieren con los procesos de la síntesis macromolecular de la célula infectada (27).

También con la definición de dosis infectiva de virus es posible medir la capacidad neutralizante de suero antipoliomielítico para determinar la cantidad menor de un suero que prevendría la actividad citopatogénica de una cantidad conocida de virus (17).

Estudios diversos (9, 12, 14 y 30a) han sido publicados para definir y localizar los sitios sobre la superficie del poliovirión que son los responsables para dar una respuesta alta de anticuerpos neutralizantes. La identificación de estos sitios es un importante prerrequisito para la comprensión del mecanismo de neutralización (12). El anticuerpo neutralizante es una de las principales armas de inmunidad protectora y es el tipo de inmunidad la cual usualmente resulta de la vacunación (11 y 17).

Se han planteado dos mecanismos de neutralización viral, nombrados modelo de un sólo efecto y modelo de multi-efecto respectivamente.

Debido a que la reacción entre virus y anticuerpo resulta en la formación de un complejo (30), la inactivación de infectividad del virus es el resultado directo de la combinación con anticuerpos neutralizantes (11, 17, 23), el mecanismo que comprende la pérdida de infectividad viral no está completamente comprendido (30).

El modelo de un sólo efecto propone que la neutralización de la partícula viral se lleva a cabo por una única molécula de anticuerpo y el modelo multi-efecto propone que son varias moléculas de anticuerpo en la superficie de una partícula del virus (9, 23 y 30a).

Resultados obtenidos con anticuerpos policlonales y confirmados posteriormente por anticuerpos monoclonales sugieren que la neutralización requiere unas pocas moléculas de anticuerpo las cuales podrían bloquear solamente algunos de los sitios de enlaces del virus. Por lo cual el mecanismo de neutralización dependiera de la célula, el virus y la clase de anticuerpo neutralizante.

El trabajo con anticuerpos policlonales sugiere que la cápside de poliovirus sufre cambios conformacionales durante la neutralización lo cual impide transcribir (6 y 8). Icenogle propone que el anticuerpo monoclonal enlaza subunidades pentaméricas de la cápside del virus e interfiere en las funciones esenciales del virus por esta vía (23).

Por lo anterior se sugiere que hay mas de un mecanismo de neutralización, anticuerpos que impiden o no la adhesión viral a las células y causan o no causan cambio en la conformación viral.

El poliovirus silvestre oscila entre dos formas isoelectricas (41 y 62) con puntos isoelectricos (PI) de 7 para el estado A y 4 para el estado B, de los cuales el estado A es infeccioso. La conformación del estado A es ligeramente diferente para cada tipo de poliovirus; cerca de 7.0 para tipo 1, cerca de 6.8 para tipo 2, cerca de 6.6 para tipo 3 y -- cerca de 7.4 para Sabin tipo 1, cepa vacunal. El estado B parece ser -- más variable y heterogéneo que el estado A (9 y 30a).

Después de ser el virus neutralizado con el anticuerpo el PI del estado

8 un poliovirión ha perdido su capacidad para iniciar un ciclo infeccioso (16).

Estudios con anticuerpos monoclonales a la proteína cápsidica VP 1 - del poliovirus Tipo 1 confirman que un cambio en el PI acompaña la neutralización. Sin embargo algunos anticuerpos monoclonales neutralizantes para VP 1 del Tipo 3 de poliovirus impidieron la adhesión a las células --- mientras otros no (10).

En recientes reportes se publicó que se prepararon anticuerpos específicos neutralizantes (policlonales) para VP 1, VP 2 y VP 3 y se observaron las variaciones de la neutralización, especialmente con el anti----VP 3 que neutraliza pero no varía el PI (12 y 15).

El suero natural policlonal contiene anticuerpos para varios diferentes epítopes. La evidencia que surgió es que se puede tratar de una neutralización cooperativa en la cual la interacción combinada de anticuerpo resulta en una más grande pérdida de infectividad (11 y 22).

No teniendo todas las bases hoy día de una teoría general de neutralización excepto en el sentido que es un proceso altamente específico, -- ocurriendo solamente cuando el anticuerpo es enlazado a ciertos determi--nantes antigénicos (22), las conclusiones serían prematuras y casi ex--clusivamente para IgG (11).

El mecanismo específico implicado en la neutralización no ha sido es

clarecido. Una principal dificultad inherente en estos estudios ha sido el uso de sueros hiperinmunes que contienen una mezcla de anticuerpos de los cuales no todos neutralizan y los cuales son dirigidos contra diferentes epítopes de viriones intactos (15 y 22).

Enders publicó que con suero de monos las reacciones de neutralización fueron claramente tipo específicas. En contraste el suero humano -- reaccionó con los tres tipos de antígeno aunque era conocido que contenían anticuerpo neutralizante específico para un sólo tipo (17).

La caracterización intratípica de poliovirus de los serotipos 1, 2 y 3 aislados con respecto a sus propiedades biológicas, antigénicas, físico químicas y bioquímicas es de principal importancia para el reconocimiento epidemiológico de la poliomielitis y para estudios de la seguridad y eficacia de vacunas poliomielíticas vivas (39 y 52).

Por lo cual tomaremos en cuenta las características antigénicas de poliovirus para la determinación individual de un sólo serotipo de virus en una mezcla trivalente.

XXXXXXXXXX

Joan Báez

[illegible]

1. APLICAR LOS CONOCIMIENTOS TANTO TEORICOS COMO PRACTICOS DE LOS SIGUIENTES METODOS PARA LA TITULACION DIFERENCIAL.
 - 1.1 DESCONGELACION, CULTIVO SERIADO Y CONSERVACION DE CELULAS POR CONGELACION; PREPARACION DE MICROPLACAS PARA METODOS DE MICRONEUTRALIZACION Y MICROTITULACION.
 - 1.2 MICROTITULACION DE SUEROS HIPERINMUNES CONTRA POLIOVIRUS T-1, T-2 y T-3 EN PRESENCIA DEL VIRUS CONCENTRADO CORRESPONDIENTE; TITULACION DEL VIRUS DE REFERENCIA COMO CONTROL DE SENSIBILIDAD DE CELULAS POR MICROTITULACION.
2. DESARROLLAR LA TECNICA DE TITULACION DIFERENCIAL PARA LA VACUNA TRIVALENTE ANTIPOLIOMIELITICA SABIN (ORAL).

XXXXXXXXXX

William Bernbach

[illegible]

MATERIAL BIOLÓGICO

1. VIRUS

- a). Virus de la poliomiелitis, cepas Sabin, propagados en cultivos primarios de riñón de mono Erythrocebus patas y mantenidos a - 70 °C, los cuales se usan como referencias en el Departamento de Control de Vacuna Antipoliomielítica (DCVA) - del Instituto Nacional de Virología (INV) S. S.

Polio Tipo I cepa LSc 2ab codificada como REF. 487

Polio Tipo II cepa P712, ch2ab codificada como REF. 681

Polio Tipo III cepa León 12 ab codificada como REF. 963

- b). Vacuna Trivalente de Referencia, elaborada de una mezcla -- de vacuna antipolio trivalente de diferentes lotes. Estos lotes se prepararon con graneles que fueron producidos en - tejido renal de mono utilizando las cepas virales mencionadas en el inciso anterior. Fecha de elaboración de la Vacuna Trivalente de Referencia, 19/III/84.

- c). Lotes de Vacunas Trivalentes elaboradas por el INV, codificadas como:
- Fecha de caducidad Febrero de 1987.

VT 677 VT 692 VT 693

VT 678 VT 694

VT 687 VT 695

2. CELULAS

Línea de células Hep-2C (Cincinnatti) obtenidas de un carcinoma de laringe que fueron donadas por el Dr. A. Sabin y mantenidas en el banco de Células del Depto. de Control del INV.

3. SUEROS

Los sueros fueron obtenidos en base a un esquema de inmunización aplicado tanto a conejos como a caballos con sus respectivas diferencias.

Estos sueros antipoliomielíticos se encuentran en el congelador del DCVA a - 20 °C codificados de la manera siguiente:

	Obtenido de:	Título	Fecha	Sangrado
Antipolio Tipo I	Caballo 300	1:400	25/IV/83	1º
Filtrado e Inactivado				
Antipolio Tipo II	Caballo 328	1:1400	26/XI/82	1º
Filtrado e Inactivado				
Antipolio Tipo III	Caballo 92	1:800	19/IV/83	2º
Filtrado e Inactivado				
Antipolio Tipo I	Conejo 1/82	1:800	26/I/82	-
Filtrado e Inactivado				
Antipolio Tipo II	Conejo 2/81	1:2000	15/IX/81	-
Filtrado e Inactivado				
Antipolio Tipo III	Conejo 3/81	-	27/X/81	-
Filtrado e Inactivado				

REACTIVOS Y MATERIAL PARA EL CULTIVO DE CELULAS Y TITULACIONES

1. MEDIOS

- a). Medio Basal de Eagle Diploid (MBED) base de sales Earle.

Lote: 60N6804-1 L:D-134-B 16/X/84

Difco.

- b). Medio Earle 0.5% HLA.

Codificación S:61 A:1 L:22

2. SUPLEMENTOS

- a). Suero Fetal de Ternera (S. F. T.). In Vitro S. A.

Lote 83108

S. F. T. Gibco

Lote 13P7143.

Concentración: Indicada en cada caso.

- b). Mezcla Tripsina-Verseno.

Tripsina 1:250 preparada en PBS Sol. A 5%. Difco

Empleada a una concentración de 0.05% en E. D. T. A.

(verseno) al 0.05% de PBS Sol. A. L:8418-2 A-7.

- c). Bicarbonato de Sodio (NaHCO_3). Merck.

Elaborado al 4.4%.

d). Antibióticos. Mezcla Penicilina-Estreptomicina (PES).
Lakeside. Concentraciones finales empleadas de 100 U. I/ml
y 100 mcg/ml respectivamente.

e). Dimetil Sulfoxido (DMSO). Merck

f). Cristal violeta al 0.1% en 0.1 M de Ac. Cítrico. Merck.

3. COMPOSICION DE LOS MEDIOS DE CRECIMIENTO CELULAR Y TITULACIONES RESPECTIVAMENTE PARA 100 ml.

a). Medio para crecimiento celular.

S. F. T. al 10%	10 ml
NaHCO ₃ (4.4%) al 0.11%.....	2.5 ml
PES	0.1 ml
MBED	<u>87.4 ml</u>
	100.0 ml

b). Medio para titulaciones.

NaHCO ₃ (4.4) al 0.22%	5 ml
PES	0.1 ml
Medio Earle 0.5% HLA	<u>94.9 ml</u>
	100.0 ml

4. LOS CULTIVOS DE CELULAS SE PREPARARON SEGUN NECESIDADES EN:

- a). Botellas de vidrio neutro Brockway de 150 cm² de superficie de crecimiento.
- b). Botellas de plástico. Falcon Plastics, Div. Becton Dickinson Oxnad. (U. S. A.). Bot. de 75 cm² de superficie de -- crecimiento y 250 ml de capacidad.
- c). Microplacas de Plástico de 96 pozos fondo plano, para cultivo de células. Falcon Plastics, Div. Becton Dickinson Oxnad. (U. S. A.).

XXXXXXX

George Bernard Shaw

[illegible]

I. METODO DE DESCONGELACION CELULAR PARA OBTENER LOS CULTIVOS

Se saca una ampolleta que contiene células congeladas a -196°C del tanque de nitrógeno líquido. Se descongela rápidamente (58) sumergiéndola en un baño de agua a 37°C , agitando suavemente, el exterior de la ampolleta se desinfecta con alcohol al 70% (5) y se abre en condiciones asépticas, se adiciona a la misma 1 ml de medio (MBED) con 0.11% de NaHCO_3 , 10% de S. F. T. y antibióticos, para las células Hep-2C (40, 58, 59).

La suspensión celular se transfiere a un recipiente pequeño adicionando paulatinamente volúmenes al doble del medio de crecimiento hasta -- obtener aproximadamente 20 ml siendo pasados enseguida a una botella Brokway de cultivo de 150 cm^2 de superficie de crecimiento hasta completar -- el volumen requerido en este caso 100 ml para tener una relación gas-me--dio de 9:1.

Las células son incubadas a 36.5°C durante 24 horas al término de -- las cuales el medio se desecha (eliminación de DMSO) y se reemplaza por medio de crecimiento fresco para proseguir la incubación a 36.5°C hasta alcanzar la confluencia (59).

Se obtiene la monocapa celular, ésta es subcultivada según los requere--
rimiento de trabajo (40).

II. METODO ENZIMATICO DE DISGREGACION CELULAR Y SUBCULTIVO O PASE CELULAR

El medio de crecimiento se desecha por la cara opuesta a la monocapa y se adicionan 10 ml de mezcla tripsina-verseno en PBS Sol. A pH 7.2. La mezcla se deja actuar aproximadamente 10 segundos al término de los cuales se decanta por la cara opuesta a la monocapa.

La botella de cultivo se incuba a 36.5 °C (58) de 5 a 10 minutos con la mezcla residual tripsina-verseno. Al ser observada la disgregación celular se homogeniza por pipeteo suave con 10 ml del medio de crecimiento (MEED). Con esta suspensión celular se preparan nuevos cultivos en relación de pase 1:4 donde la suspensión es distribuida a las botellas de cultivo conteniendo el medio de crecimiento necesario (40) y posteriormente son incubadas a 36.5 °C. Se recomienda cambiar el medio a los 3 días de sembrados si al cabo de ese tiempo no son utilizados.

El subcultivo puede llevarse a cabo semanalmente, prosiguiendo -- así hasta obtener un abasto suficiente para congelación de células como reserva.

III. METODO DE CONGELACION DE CELULAS

Los cultivos confluentes de células Hep-2C, cultivados en botellas Brockway o Falcon se disgregan de acuerdo al método enzimático descrito con anterioridad y se resuspenden las células en medio de crecimiento - (10 ml por c/botella Brockway y 5 ml por c/botella Falcon). Se centrifuga la suspensión de células a 60 g durante 10 minutos en centrifuga refrigerado 4 °C, se decanta el sobrenadante y el paquete de células Hep-2C se resuspende con medio para congelación en un volumen tal que - la concentración celular sea de 7×10^6 a 10^7 células/ml (efectuar una cuenta celular). El medio de congelación es MBED complementado con -- 0.11% de NaHCO_3 , 15% de S. G. T. y PES. Posteriormente las suspensiones celulares son mantenidas en refrigeración durante una hora, al término de la cual las células se homogenizan por pipeteo suave, colocándose en un baño de hielo, adicionando a dicha suspensión el DMSO en una concentración final de 7% (40) y homogenizar. Finalmente la suspensión se distribuye en ampolletas estériles de 2 ml a razón de 1 ml en cada una, sellándolas a la flama.

Las ampolletas perfectamente rotuladas son colocadas en una caja de poliestireno con paredes de 1 cm de grosor para que la velocidad de descenso de la temperatura sea de 1 °C por minuto (40 y 58), al colocar la caja de poliestireno en un congelador Revco a - 70 °C.

Las ampolletas se mantienen a -70°C durante un lapso de tiempo de 72 horas a una semana al término de la cual son transferidas rápidamente a un tanque de nitrógeno líquido a -196°C donde se preservan indefinidamente (58).

IV. METODO DE PREPARACION DE MICROPLACAS Y CUENTA CELULAR

El cultivo confluyente de células Hep-2C de una botella Brockway o - Falcon (35), se disgrega por el método enzimático. El paquete celular se homogeniza perfectamente con 10 ml del siguiente medio: DMED suplementado con 0.11% de NaHCO_3 , 6% de S. F. T. y antibióticos PES (58). - De la suspensión celular se toma una alícuota de 0.5 ml en un tubo de -- 13 X 100 mm a él cual se adiciona un volumen igual de cristal violeta al 0.1% en ácido cítrico 0.1 M. Se homogeniza bien la mezcla colorante-células y con ayuda de una pipeta se llena la cámara de Neubauer (cuenta globulos).

Se cuentan las células de las cuatro áreas correspondientes a la -- cuenta de leucocitos o globulos blancos, para determinar la concentra--- ción celular por ml; una vez conocida la concentración celular, se prepara la suspensión a una concentración celular de 2.5×10^5 cels./ml con - el medio mencionado anteriormente.

Las células son sembradas en las microplacas usando ya sea una pipeta de 5 ml y colocando una gota (aprox. de 0.05 ml) en cada pozo o una jeringa de tipo Repette. Se tapan con 1 tapa de plástico sin sellar --- (40). Se incuban en una estufa a 36.5 °C y pasados 30 minutos se inoculan los pozos con 0.1 ml de cada dilución, dejando las dos hileras de 8 pozos c/u para controles sin inocular. Las microplacas se sellan con

con una película adhesiva transparente, se marcan y se incuban a 36.5 °C por 7 días al término de los cuales se dará la lectura final del efecto citopático (3, 21, 28 y 37).

V. METODO DE NEUTRALIZACION DE VIRUS POR INHIBICION DE EFECTO CITOPATICO (ECP) EN CULTIVO DE TEJIDO (CT) CELULAS Hep-2C.

- a). Método para la evaluación de la potencia de los sueros antipoliomielíticos utilizados (cuantificación de anticuerpos).

En este método se hacen las diluciones del suero correspondientes para cada tipo de suero antipoliomielítico y el virus agregado a concentración constante.

Se mezclan 0.5 ml de c/u de las diluciones de cada suero con 0.5 ml de virus concentrado ($10^{7.8}$ DICT₅₀/ml para T-1, --- $10^{7.0}$ DICT₅₀/ml para T-2 y $10^{8.15}$ DICT₅₀/ml para T-3). Cada suero con el virus respectivo.

Se incuban las mezclas durante 3 horas a 36.5 °C y una noche a 4 °C. Las diluciones finales de los sueros se calcularan tomando en cuenta la relación 1:2 al añadir el virus.

Se inoculan células Hep-2C en microplaca con 0.1 ml de cada mezcla suero-virus, 5 pozos por dilución (58). Las microplacas son incubadas durante 7 días, al término de los cuales se observa usando un microscopio invertido (Olympus) y registrar los pozos con ECP.

El título del suero antipoliomielítico se calcula con la última dilución en la que el efecto citopático fue inhibido.

b). Método utilizado para determinar la dilución adecuada de la mezcla de sueros en la cual la relación antigénica entre los 3 serotipos es menor o nula, evitando en lo posible las reacciones cruzadas intertipicas.

1. Las 3 referencias de virus 497 T-1, 681 T-2 y 963 T-3 se diluyeron aproximadamente a las concentraciones requeridas - de c/u para la vacuna trivalente, $10^{6.4}$ DICT₅₀/ml, $10^{5.7}$ ----- DICT₅₀/ml y $10^{6.18}$ DICT₅₀/ml respectivamente. Se elaboraron volúmenes de 10 ml de cada tipo de virus.

2. Las mezclas de sueros se elaboraron a diferentes diluciones.

3. Se mezclan 0.5 ml de c/u de los pares de diluciones de sueros antipolio con 0.5 ml de las suspensiones virales mencionadas anteriormente.

Ejemplo:

Diluciones de la mezcla de sueros antipolio T-2 + T-3			Suspensiones virales con- centración constante ----		
			con	$\log_{10} \text{DICT}_{50}/\text{ml}$	
T-2	+	T-3		T-1	T-2 T-3
1:10	+	1:20		6.4	5.7 6.18
1:100	+	1:200		"	" "
1:1000	+	1:2000		"	" "

4. Se incuban las mezclas durante 3 horas a 36.5 °C y --
una noche a 4 °C (1).

5. Se inoculan 5 pozos por dilución, 0.1 ml de la mezcla
suero-virus en una microplaca (mp) con células Hep-2C.

6. Las microplacas se incuban durante 7 días al término
de los cuales se observan los pozos con ECP.

7. La interpretación es que se selecciona la dilución por
ejemplo 1:100 para T-2 y 1:200 para T-3 a la cual el efecto ci-
topático se manifestó en la presencia de la suspensión viral --
T-1 y este mismo efecto se vio inhibido cuando la dilución de -
sueros fue puesta en contacto con las suspensiones de T-2 y T-3
respectivamente.

c). Método de Neutralización para determinación del grado de cruzamiento para la evaluación de los serotipos (determinación de antígeno).

1. Se diluye la suspensión viral desde 10^{-3} a $10^{-6.5}$.

2. Esta suspensión es colocada con la mezcla de sueros antipoliomielíticos (concentración constante) no correspondientes al serotipo de la suspensión.

3. Se incuban a 36.5°C durante 3 horas y a 4°C una noche (1).

4. Se inoculan 5 pozos por dilución con 0.1 ml de la mezcla virus-suero en una mp con células Hep-2C y otra mp es inoculada con solamente la suspensión viral.

5. Las microplacas son incubadas durante 7 días al término de los cuales se observa el grado de inhibición de los sueros antipoliomielíticos sobre la suspensión viral y se compara con la microplaca que fue inoculada solamente con la suspensión viral. Tomandose la diferencia como el grado de cruzamiento de los sueros con el serotipo de la suspensión viral.

VI. TITULACION DEL VIRUS DE LA POLIOMIELITIS POR EL METODO DE MICROENSA
YO (PUNTO FINAL 50%).

Se toman 2 ampollitas con aproximadamente 0.7 ml de la suspensión -
de virus de la poliomiélitis y se mezclan para preparar dos series de -
diluciones decimales de 10^{-1} a 10^{-5} y con intervalos de $0.5 \log_{10}$ de ---
 $10^{-5.5}$ hasta 10^{-9} para las referencias monovalentes 497, 681 y 963. Las
diluciones se hacen con medio Earle suplementado con 0.22% de NaHCO_3 y
PES.

A partir de $10^{-5.5}$ para las referencias 497 y 963, y de 10^{-5} para -
la ref. 681 se toman alícuotas de 0.1 ml de cada dilución y se inoculan
en cada uno de los 5 pozos teniendo las dos hileras centrales de las mps
(8 pozos por c/hilera) como controles no siendo inoculados con virus.

Las microplacas se cubren con una película de plástico adhesiva se
incuban a 36.5°C durante 7 días, se observa al término de estos con un
microscopio invertido (Olympus) y se registran los pozos con efecto --
citopático.

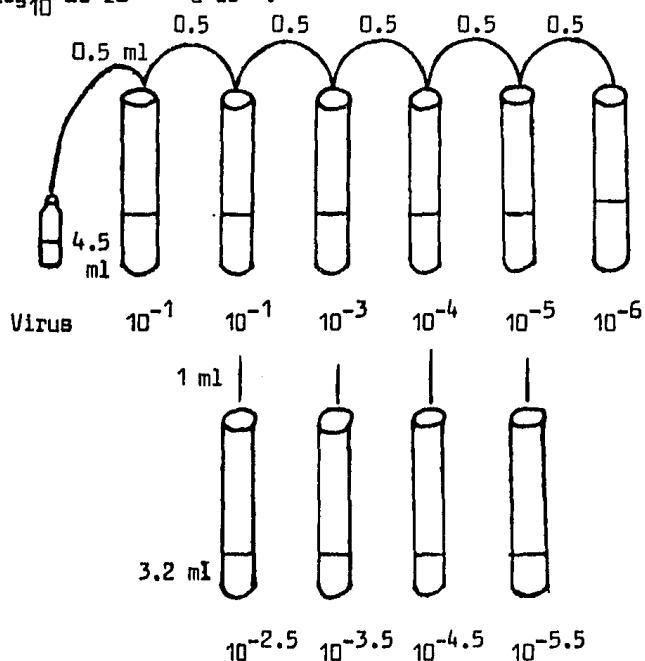
El título se calcula en dosis infectivas para cultivo de tejido 50%
por mililitro ($\text{DICT}_{50}/\text{ml}$) por el método de Spearman-Kärber.

VII. METODO PARA LA TITULACION DIFERENCIAL PARA LA VACUNA TRIVALENTE AN
TIPOLIOMIELITICA SABIN (ORAL).

En este método se utiliza la combinación de la neutralización con -
la titulación del virus por la técnica de microensayo, quedando de la ma
nera siguiente:

1. Se toman 2 ampolletas con aproximadamente 0.7 ml de la suspen--
sión de la vacuna de referencia trivalente, estas son mezcladas para pre
parar dos series de diluciones.

Se hacen diluciones decimales de 10^{-1} a 10^{-6} y con intervalos de --
 $0.5 \log_{10}$ de $10^{-2.5}$ a 10^{-6} .



2. Se toma una suspensión de la ref. 497 T-1 que es diluida de 10^{-1} a 10^{-3} y con intervalos de $0.5 \log_{10}$ de $10^{-3.5}$ a $10^{-6.5}$ esta servira como control de cruzamiento para la determinación de T-1 (met. Vc.)

3. Los lotes de vacunas trivalentes son diluidos de 10^{-1} a 10^{-3} , en diluciones decimales y con intervalos de $0.5 \log_{10}$ de $10^{-3.5}$ a $10^{-6.5}$.

4. Se tienen preparadas o se preparan las mezclas de sueros antipoliomielíticos como sigue:

Tipo de sueros antipolio mezclados	Diluciones Iniciales (conc. constante).	Serotipo Determinado
Tipo 2 + Tipo 3	1:2 500 + 1:1 500	Tipo 1
Tipo 1 + Tipo 3	1:1 000 + 1:1 500	Tipo 2
Tipo 1 + Tipo 2	1:1 500 + 1:2 500	Tipo 3
Tipo 1 + Tipo 2 + Tipo 3	1:1 000 + 1:2 500 + 1:1 500	Ninguno

5. Utilizando tubos de 13 X 100 mm con tapón se realizan las mezclas para incubación, 0.5 ml de cada una de las diluciones de las vacunas de referencia trivalente, lotes de vacuna trivalente c/u de ellas con 0.5 de la mezcla de sueros antipoliomielíticos para la determinación del sero tipo respectivo.

Tipo de sueros antipolio mezclados	Diluciones Finales (concentración cte.)	Serotipo Determinado
Tipo 2 + Tipo 3	1:5 000 + 1:3 000	Tipo 1
Tipo 1 + Tipo 3	1:2 000 + 1:3 000	Tipo 2
Tipo 1 + Tipo 2	1:3 000 + 1:5 000	Tipo 3
Tipo 1 + Tipo 2 + Tipo 3	1:2 000 + 1:5 000 + 1:3 000	Ninguno

6. Las mezclas virus-suero son incubadas a 36.5 °C durante 3 horas y una noche a 4 °C (1).

7. Se prepara una suspensión de células Hep-2C conteniendo 250 000 células por ml que serán sembradas en microplacas 0.05 ml por pozo (método IV).

8. Se inoculan 5 pozos por dilución de la mezcla virus-suero. Se sellan con una película adhesiva.

9. Se rotulan e incuban las microplacas a 36.5 °C por 7 días.

10. Se registra el efecto citopático al cabo de los 7 días de incu bación y se calcula el título de cada serotipo de la vacuna de referen- cia trivalente tanto como en los lotes de vacuna trivalente por el méto do de Spearman-Kärber.

11. El título es dado en dosis infectivas para cultivo de tejido -- 50% por mililitro ($DICT_{50}/ml$).

XXXXXXXXXXXX

José Martí

[illegible]

CUADRO Nº 1

FORMULACION REQUERIDA POR EL INV PARA LA VACUNA TRIVALENTE ANTIPOLIOMIELITICA SABIN (ORAL)		
SEROTIPOS DEL POLIOVIRUS	TITULO ($\log_{10} \text{DICT}_{50}/\text{ml}$)	%
TIPO 1	6.4	56
TIPO 2	5.7	11
TIPO 3	6.18	33
TIPO 1 + TIPO 2 + TIPO 3	6.65	100

CUADRO Nº 2

CONTROL DE SENSIBILIDAD CELULAR				
REF. 963 TIPO 3 MG	Nº DE PRUEBAS	DESVIACION MAX. Y MIN. CON RES- PECTO A MG	$\alpha = 0.05$ $t = 2.11$	$\alpha = 0.01$ $t = 2.898$
8.15	11	+ 0.3 - 0.2	8.15 + 0.114 - 0.114	8.15 + 0.156 - 0.156

MG = MEDIA GEOMETRICA

 α = NIVEL DE SIGNIFICANCIA

t = t DE STUDENT (TAB.)

DILUCIONES OBTENIDAS POR EL MET. Vb

MET: NEUTRALIZACION EN MICROENSAJO.

SISTEMA: CELULAS Hep-2C, RANGO DE PASES DEL 156 AL 168

TEMPERATURAS DE INCUBACION PARA NEUTRALIZACION 36.5 °C y 4 °C.

TEMPERATURA DE INCUBACION DE MICROPLACAS 36.5 °C

MEDIO: EARLE LACTO AL 0.22% DE NaHCO_3 y PES.

PERIODO DE INCUBACION DE MICROPLACAS 7 DIAS

CUADRO Nº 3

DILUCIONES APROPIADAS DE LOS SUEROS ANTIPOLIOMIELITICOS PARA LA TITULACION DIFERENCIAL		
SUEROS ANTIPOLIO MEZCLADOS	DILUCIONES FINALES DE LOS	SEROTIPO DETERMINADO
TIPO 2 + TIPO 3	1:5 000 + 1:3 000	TIPO 1
TIPO 1 + TIPO 3	1:2 000 + 1:3 000	TIPO 2
TIPO 1 + TIPO 2	1:3 000 + 1:5 000	TIPO 3
TIPO 1 + TIPO 2 + TIPO 3	1:2 000 + 1:5 000 + 1:3 000	NINGUNO

CONTROL DE LA RELACION INTERTIPICA ENTRE SEROTIPOS

METODOS Vc Y VI

SISTEMA: CELULAS Hep-2C, RANGO DE PASE DEL 156 AL 168

TEMPERATURAS DE INCUBACION PARA NEUTRALIZACION 36.5 °C Y 4 °C

TEMPERATURA DE INCUBACION DE MICROPLACAS 36 °C

MEDIO: EARLE LACTO AL 0.22% DE NaHCO_3 Y PES.

PERIODO DE INCUBACION DE MICROPLACAS, 7 DIAS

CUADRO Nº 4

GRADO DE CRUZAMIENTO DE LA MEZCLA DE SUEROS ANTIPOLIO TIPO 2 Y TIPO 3 CON EL SEROTIPO 1			
TITULO ($\log_{10} \text{DICT}_{50}/\text{ml}$).			
REF. 497 TIPO 1	REF. 497 T-1 EN PRESEN- CIA DE LA MEZCLA DE SUE- ROS ANTIPOLIO T-2 + T-3	GRADO DE CRUZAMIENTO O DISMINUCION DEL TITULO ORIGINAL	MG
1. 6.15	5.45	0.7	0.75*
2. 6.15	5.35	0.8	
3. 6.25	5.15	1.1	1.1 *
4. 6.15	5.05	1.1	

*NOTA: SEPARADOS POR LOTES DE PREPARACION.

MG = MEDIA GEOMETRICA

TITULACION DIFERENCIAL

METODOS: TITULACION Y NEUTRALIZACION POR MICROENSAYO

SISTEMA: CELULAS Hep-2C, RANGO DE PASE DEL 156 AL 168

TEMPERATURAS DE INCUBACION PARA NEUTRALIZACION 36.5 °C y 4 °C

TEMPERATURA DE INCUBACION DE MICROPLACAS 36 °C

MEDIO: EARLE LACTO AL 0.22% DE NaHCO_3 Y PES

PERIODO DE INCUBACION DE MICROPLACAS, 7 DIAS

CUADRO Nº 5

TITULACION DIFERENCIAL DE LA VACUNA TRIVALENTE DE REFERENCIA ANTIPOLIOMIELITICA (V. T. R.)					
TITULO ($\log_{10} \text{DICT}_{50}/\text{ml}$)					
V.T.R. SEROTIPOS PRESENTES	SEROTIPOS DETERMINADOS	Nº DE PRUEBAS	MEDIA GEOMETRICA DEL TITULO (MGT)	DESVIACION MAXI- MA Y MINIMA CON RESPECTO A MGT	MEZCLA DE SUEROS ANTIPOLIO
T-1 + T-2 + T-3	TIPO 1	18	(5.02) 5.77*	+ 0.33 - 0.47	TIPO 2 + TIPO 3
" " "	TIPO 2	18	4.85	+ 0.33 - 0.60	TIPO 1 + TIPO 3
" " "	TIPO 3	18	5.17	+ 0.18 - 0.22	TIPO 1 + TIPO 2
" " "	T-1 + T-2 + T-3	18	5.92	+ 0.23 - 0.17	NINGUNA
" " "	NINGUNO	18	0	0	T-1 + T-2 + T-3

*NOTA: AGREGADO 0.75 COMO FACTOR DE CORRECCION DE ACUERDO AL CONTROL DEL CUADRO Nº 4.

CUADRO Nº 6

TITULACION DIFERENCIAL DE 7 LOTES DE VACUNA TRIVALENTE ANTIPOLIOMIELITICA SABIN (ORAL) V. T.					
V. T. Nº DE LOTE	TIPO 1	TIPO 2	TIPO 3	T-1 + T-2 + T-3	NINGUNO
677	(5.65) 6.4*	5.85	6.15	6.65	0
678	(5.45) 6.2*	5.75	6.15	6.55	0
687	(5.15) 5.9*	5.35	5.65	6.25	0
692	(4.55) 5.65*	5.35	5.65	6.20	0
693	(4.75) 5.85*	5.55	5.85	6.35	0
694	(4.75) 5.85*	5.55	5.75	6.25	0
695	(5.05) 6.15*	5.45	5.95	6.45	0

NOTA: * PARA LOS LOTES 677, 678 Y 687 EL FACTOR DE CORRECCION FUE DE 0.75 Y PARA LOS LOTES 692, 693, 694 Y 695 FUE DE 1.1.

CUADRO Nº 7

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS TÍTULOS DE C/U DE LOS SEROTIPOS EN LA V. T. R. POR EL MÉTODO DE t DE STUDENT			
SEROTIPOS DEL POLIOVIRUS	TÍTULOS ($\log_{10} \text{DICT}_{50}/\text{ml}$) MGT $\pm \sigma$		C. V. %
	$\alpha = 0.05 \quad t = 2.11$	$\alpha = 0.01 \quad t = 2.898$	
TIPO 1	$(5.02) \pm 0.104$ 5.77 ± 0.104	$(5.02) \pm 0.14$ 5.77 ± 0.14	3.63
TIPO 2	4.86 ± 0.11	4.86 ± 0.16	4.73
TIPO 3	5.17 ± 0.07	5.17 ± 0.096	2.7
TIPO 1 + TIPO 2 + TIPO 3	5.92 ± 0.073	5.92 ± 0.1	2.89

 α = NIVEL DE SIGNIFICANCIA

t = t DE STUDENT (TABLAS)

C. V. = COEFICIENTE DE VARIACION

CUADRO Nº 8

ANALISIS DE LOS TITULOS DE LOS SEROTIPOS DE LA V. T. R. EN BASE A LAS PROPORCIONES DE C/U DE ELLOS				
TITULO ($\log_{10} \text{DICT}_{50}/\text{ml}$)				
	TIPO 1	TIPO 2	TIPO 3	T-1 + T-2 + T-3
(O)	(5.02) 5.77 *	4.86	5.17	5.92
(E)	5.67	4.96	5.44	5.92
(O - E)	(-0.65) +0.1	- 0.1	- 0.27	0

(O) = OBSERVADOS

(E) = ESPERADOS

(O - E) = OBSERVADOS MENOS ESPERADOS. DIF.

CUADRO Nº 9

VARIACIONES NO SIGNIFICATIVAS PARA LA FORMULACION ESTABLECIDA EN BASE AL ANALISIS ESTADISTICO DE LA V. T. R. POR t DE STUDENT				
TITULO ($\log_{10} \text{DICT}_{50}/\text{ml}$) $\pm \sigma_{\text{MG}}$				
SERO TIPOS DEL POLIOVIRUS	$\alpha = 0.05$ $t = 2.11$	$\alpha = 0.01$ $t = 2.898$	INTERVALO	
			$\alpha = 0.05$	$\alpha = 0.01$
TIPO 1	6.4 ± 0.104	6.4 ± 0.14	$6.3 > X < 6.5$	$6.26 > X < 6.5$
TIPO 2	5.7 ± 0.11	5.7 ± 0.16	$5.59 > X < 5.81$	$5.54 > X < 5.86$
TIPO 3	6.18 ± 0.07	6.18 ± 0.09	$6.11 > X < 6.25$	$6.084 > X < 6.276$
T-1 + T-2 + T-3	6.65 ± 0.073	6.65 ± 0.1	$6.577 > X < 6.723$	$6.55 > X < 6.75$

 α = NIVEL DE SIGNIFICANCIA

t = t DE STUDENT (TABLAS)

CUADRO Nº 10

ANALISIS DE LOS TITULOS DE LOS SEROTIPOS EN LOTES DE V.T.

TITULOS ($\log_{10} \text{DICT}_{50}/\text{ml}$)				
V. T. 677	TIPO 1	TIPO 2	TIPO 3	T-1 + T-2 + T-3
	(5.65)			
(O)	6.4*	5.85	6.15	6.65
(E)	6.4	5.7	6.18	6.65
(O - E)	(-0.75)			
	0	+ 0.15	- 0.03	0
V. T. 678				
	(5.45)			
(O)	6.2*	5.75	6.15	6.55
(E)	6.4	5.7	6.18	6.65
	(-0.95)			
(O - E)	- 0.2	+ 0.05	- 0.03	- 0.1
V. T. 687				
	(5.15)			
(O)	5.9	5.35	5.65	6.25
(E)	6.4	5.7	6.18	6.65
	(-1.25)			
(O - E)	- 0.5	- 0.35	- 0.53	- 0.4

CUADRO Nº 10 CONT.

LOTES	TIPO 1	TIPO 2	TIPO 3	T-1 + T-2 + T-3
V. T. 692	(4.55)			
(O)	5.65*	5.35	5.65	6.20
(E)	6.4	5.7	6.18	6.65
	(-1.85)			
(O - E)	- 0.75	- 0.35	- 0.53	- 0.45
V. T. 693	(4.75)			
(O)	5.85*	5.55	5.85	6.35
(E)	6.4	5.7	6.18	6.65
	(-1.65)			
(O - E)	- 0.55	- 0.15	- 0.33	- 0.3
V. T. 694	(4.75)			
(O)	5.85*	5.55	5.75	6.25
(E)	6.4	5.7	6.18	6.65
	(-1.65)			
(O - E)	- 0.55	- 0.15	- 0.43	- 0.4
V. T. 695	(5.05)			
(O)	6.15*	5.45	5.95	6.45
(E)	6.4	5.7	6.18	6.65
	(-1.35)			
(O - E)	- 0.25	- 0.25	- 0.23	- 0.2

(O) = OBSERVADOS (E) = ESPERADOS

XXXXXXXXXX

Albert Einstein

[illegible]

Como se ha mencionado anteriormente la Titulación Diferencial tiene su fundamento en el efecto citopático que causa el virus poliomielítico y en la reacción inmunológica de neutralización, estos aspectos se ven - influidos por la temperatura, pH, viabilidad de las células que son utilizadas como sustrato al ser descongeladas, medios tanto de crecimiento como de mantenimiento que proporcionan los requerimientos para el metabolismo celular (40, 58 y 59), condiciones de esterilidad en todo el proceso, así como en el manejo de la técnica de microtitulación para la evaluación de las vacunas.

El buen manejo de los parámetros anteriores es de suma importancia para la evaluación de la potencia de las vacunas como una medida de Control de Calidad de éstas.

En este trabajo se utilizó la REF. 963 del virus de polio tipo 3 como control de sensibilidad celular (Cuadro Nº 2), se encontró que la media de la REF. esta dentro del rango establecido por la O. M. S. para preparaciones monovalentes, y que es de $\pm 0.5 \log_{10}$.

Los antisueros hiperinmunes inhiben la penetración viral. Esta observación permite especular que la adsorción y penetración son mediadas por dos diferentes sitios sobre el virión, y posiblemente por dos diferentes receptores celulares (15, 23 y 38).

Los sueros antipoliomielíticos hiperinmunes utilizados en este caso fueron obtenidos de caballos debido a que fueron los apropiados para el desarrollo de la titulación diferencial según se observa en los resultados del cuadro Nº 3, además de que se tenía la cantidad suficiente para la realización de la titulación y para posterior utilización; no resultando así con los antisueros de conejo que aunque se intento, el título de algunos de ellos era menor que el del obtenido de los caballos y la cantidad de suero no fue suficiente.

Las cepas de poliovirus son identificadas por pruebas de neutralización por antisueros monoespecíficos para cada uno de los 3 tipos de poliovirus, en una dilución que no muestre reacción cruzada con tipos heterólogos (61). En base a esto se obtuvieron las diluciones adecuadas - del cuadro Nº 3 con la variante de que son diluciones de dos o tres sueros antipolio mezclados, se logró diluyendo los sueros hasta ser suficientes para evitar la infección viral de los serotipos requeridos por ejemplo T-1 + T-2 y permitir sólo la manifestación del T-3 por ECP que nos interesaba determinar y así con cada uno de ellos.

La posesión de proteínas específicas de cubierta de los viriones da la capacidad a los determinantes antigénicos de estimular la producción de anticuerpos específicos. Las proteínas de la cápside viral son virus específica (29 y 61).

Se ha establecido que VP 1 es la proteína de superficie expuesta --

predominante, VP 2 y VP 3 estan también localizadas externamente, pero son significativamente menos extensas que VP 1.

.

Los poliovirus fueron clasificados en 3 serotipos de acuerdo a la capacidad del suero tipo específico para neutralizar su infectividad reportandose que en varios animales inmunizados con poliovirus nativos de un serotipo producían anticuerpos neutralizantes contra el tipo solamente (53 y 57). También se determinó que la adición de suero tipo específico al cultivo celular antes de que el virus sea inoculado protege a las células del efecto destructivo. La demostración del efecto inhibitorio del suero homólogo no solamente da evidencia convincente que los cambios citopáticos observados fueron causados por el virus sino también indican que podría ser posible determinar in vitro el tipo antigénico de virus de la poliomiелitis (17) como se realizó en este trabajo, tanto como la presencia de anticuerpos tipo específico en suero humano y animal (determinación de anticuerpos, potencia de sueros hiperinmunes). (17).

La proteína capsídica de los poliovirus esta constituida usualmente en cuatro componentes por electroforesis en gel de poliacrilamida (VP 1, VP 2, VP 3 y VP 4), (47, 53, 55 y 57).

En una electroforesis normal fueron separados los componentes de los tres serotipos de poliovirus tanto virulentos como atenuados ambos no incluyendo el polipéptido VP 4. Las cepas virulentas fueron Mahoney

tipo 1, MEF-1 tipo 2 y Saukett tipo 3 y las cepas atenuadas fueron las de la vacuna oral Sabin designadas como Sa-1, Sa-2 y Sa-3.

La electroforesis normal mostró patrones electroforéticos similares de VP 1, VP 2 y VP 3 con solamente diferencias menores en los pesos moleculares de polipéptidos homólogos entre atenuadas y virulentas excepto Sa-1. El polipéptido patrón de Sa-1 consistió solamente de VP 2 y VP 3, con el primero estando presente en gran exceso, aunque la ausencia de VP 1 fue aparente (55a, 55b) ya que al realizar una electroforesis pH-gradiente (55 a), todas las cepas incluyendo Sa-1 produjeron todos los patrones, este hallazgo sugirió que VP-1 no faltaba de Sa-1 pero que comigra con VP-2 en electroforesis normal (55b).

La proteína VP 1 de la cepa atenuada corre diferentemente que la VP 1 de la Mahoney y LSC 2ab (Sa-1) revelando que la VP 1 es un polipéptido menor en la atenuada. Esto sugiere una relación (mutaciones posibles) entre la apariencia de la alterada VP 1 y la pérdida de neuvirulencia para el poliovirus tipo 1 atenuado por el proceso de Sabin (32, 33).

A pesar de su estrecha relación, los patrones electroforéticos de Mahoney y LSc 2ab mostraron diferencias con las otras cepas de poliovirus así examinadas. Movilidades diferentes también fueron vistas en VP 2, VP 3 y VP 4 (38).

Las diferencias de movilidad en las proteínas entre las cepas de -- tipo 1 puede ser atribuido posiblemente a sustituciones de aminoácidos - de los cuales en el caso de Mahoney y LSc 2ab (Sa-1) representan cerca de 1 al 2% de los residuos totales (38).

El conocimiento detallado de las secuencias del genoma de poliovi-- rus pueden también contribuir a el desarrollo de mejorar las vacunas de virus vivos, con determinantes genéticos optimizados para antigenici-- dad y estabilizados para atenuación (33, 34).

Un importante paso en esta dirección es la determinación de la se-- cuencia del genoma total de la Sabin tipo 1 cepa vacunal atenuada cuando al ser comparada con la cepa Mahoney virulenta, el genoma de la derivada atenuada contenía 57 sustituciones de bases (genoma total = 7 441 nu--- cléotidos), 21 resultando en cambios de aminoácidos, 12 de las mutaciones ocurridas en las proteínas capsídicas y que se encuentran extensamente agrupadas en VP 1, elevando la posibilidad de que la atenuación en - parte implica modificación de la superficie del virión (34).

Un número de estudios han recientemente sido publicados para defi-- nir y localizar los sitios sobre la superficie del poliovirus responsa-- ble para dar una respuesta de anticuerpos neutralizantes prerequisite - para entender el mecanismo de neutralización y la genética de resisten-- cia a la neutralización por anticuerpos definidos (12). La evidencia también sugiere un importante papel para VP 1 en la antigenicidad de po-

liovirus, aunque la estructura antigénica del virus parece ser bastante compleja.

Se ha observado que polipéptidos aislados de poliovirus VP 1, VP 2 y VP 3 fueron cada uno capaz de inducir bajos niveles de anticuerpos neutralizantes en animales (10, 12 y 34).

Se ha mostrado que al menos dos epítopes de neutralización están localizados sobre VP 1 (13 y 14). Se define N-Ep epítope de neutralización como la conformación de un elemento estructural en la superficie de un virus en el cuál un anticuerpo monoespecífico puede enlazarse, una interacción induciendo la neutralización del virus y se define N-Ag sitio antigénico de neutralización como un agrupamiento de N-Eps (14).

Las observaciones indican que VP 1 porta al menos 3 sitios de neutralización antigénicos y que de estos hay un sitio antigénico que parece ser el principal o inmunodominante del poliovirus tipo 1. Este sitio sobre VP 1 revela varios rasgos característicos: a) la región está compuesta de una extensión de aminoácidos hidrofílicos, así como se esperaría de un sitio expuesto sobre la superficie del virión. b) Una considerable variación de la secuencia de aminoácidos está presente cuando los sitios homólogos de los 3 serotipos de poliovirus son comparados. Finalmente una estructura curvada de la proteína está presente sobre un lado del sitio. Tales estructuras son caracterizadas por la presencia de resíduos de prolina y otros aminoácidos característicos tales como aspara-

gina. Esta curva en la proteína puede ser útil para exponer la secuencia de aminoácidos al exterior del virión.

Alguna porción de VP 2 esta expuesta al exterior del virión y ha mostrado que contiene N-Ags virales. Se analizó también la secuencia de aminoácidos de VP 2 del poliovirus tipo 1 (Mahoney) encontrándose las mismas características descritas anteriormente para el principal -- sitio antigénico neutralizante de VP 1 (14).

También fueron examinados los tres serotipos de poliovirus con --- sueros antipolio policlonales para poliovirus tipo 3 concluyéndose que VP 1 posee determinantes antigénicos comunes para los tres tipos de poliovirus tanto como determinantes tipo específicos. Romanova y col. -- 1981 han también mostrado reactividad cruzada intertipica entre los tipos de poliovirus por técnicas de inmunoprecipitación con sueros antipolio los cuales habían mostrado ser tipo específicos (43, 53) aunque - hay frecuente interferencia entre ellos a pesar de sus diferentes características antigénicas (44).

Es por ésto que al tratar de determinar un solo tipo antigénico de poliovirus en una vacuna trivalente que contiene los tres serotipos con sueros hiperinmunes policlonales representa tener cuidado en la metodología a seguir para lograr resultados lo más adecuados posibles.

El serotipo que presento problema para su determinación fue el ti-

po 1 como se observa en los resultados. En el cuadro Nº 4 se puede --- ver que hay un grado de cruzamiento de los sueros antipolio tipo 2 y ti po 3 con el serotipo 1. En este cuadro se tienen 4 valores, los cuales estan separados por lotes de preparación de sueros, esto se debió a que se eleboraron solamente dos lotes a lo largo del trabajo de experimenta ción y que el primer lote de sueros se utilizó para la determinación -- del serotipo 1 en la vacuna trivalente de referencia (V.T.R.) y en -- los tres primeros lotes de la vacuna trivalente (V. T.) y los cuatro lotes restantes de V. T. se evaluó el mismo serotipo con el segundo lo- te de sueros preparado. Por las razones anteriores este cuadro fue to- mado como control intertípico de cruzamiento para la determinación de - dicho serotipo, siendo la justificación de los factores numéricos o de . corrección agregados para éste serotipo en los resultados obtenidos. Independientemente a los resultados de éste cuadro se probó el suero - antipolio tipo 2 en presencia del serotipo 1 siendo el grado de cruza- miento de $0.5 \log_{10}$ lo cual implica que el suero antipolio tipo 2 in- terfiere mayormente que el tipo 3.

En los cuadros posteriores al cuadro Nº 4 el serotipo 1 determina- do se encuentra indicado con dos valores, un valor colocado entre paren tesis que fue el valor obtenido sin agregar ningún factor numérico y él otro señalado con un asterisco siendo el valor obtenido mas el factor - de corrección o numérico.

En los cuadros 5 y 6 se tienen los resultados de la determinación

de cada serotipo y el total de las 18 pruebas que se hicieron a la ---- V. T. R. y a los lotes de V. T. que solamente se les realizó una titulación diferencial para cada lote.

En el cuadro Nº 7 se tiene el análisis estadístico de la V. T. R. con dos niveles de significancia de 0.05 el primero y de 0.01 el segundo. El intervalo con 0.01 de significancia es mas amplio. Este estudio estadístico se hizo para tener los límites en los cuales los lotes de V. T. estarían dentro de lo establecido en base a la formulación indicada en el cuadro Nº 1.

En el cuadro Nº 8 se observan los títulos de cada serotipo de la V. T. R. comparandolos con los valores esperados conforme a la proporción de cada uno de ellos. Las diferencias entre observados y esperados son pequeñas si tomamos en consideración la relación intertípica entre los serotipos.

Debido a esta relación se sugiere ampliar el rango de los límites establecidos estadísticamente que fueron calculados en forma independiente para cada serotipo. Estos límites podrían ser tomados como los considerados por la O. M. S. para vacunas monovalentes que es de ----- $\pm 0.5 \log_{10}$ y aplicarlo también a las vacunas trivalentes.

En el cuadro Nº 9 se encuentran los límites establecidos para la formulación de la V. T. en base a los resultados obtenidos de la V.T.R.

Tomando en cuenta estos límites con un nivel de significancia de 0.01 de los 7 lotes examinados de V. T. observamos que los lotes 677 y 678 se encuentran dentro o en los límites tanto cada uno de los serotipos como la determinación de los tres. Los lotes 687, 692 y 695 se encuentran fuera de estos límites y de los lotes 693 y 694 el serotipo que se encuentra dentro de los límites es el serotipo 2.

Para límites de $\pm 0.5 \log_{10}$ los lotes encontrados dentro de estos en la determinación de cada serotipo y la determinación de los tres --- fueron el 677, 678 y 695, los lotes 693 y 694 se encuentran dentro de los límites a excepción del serotipo 1 de cada uno de ellos. En el lote 692 se encuentran dentro de los límites la determinación del serotipo 2 y la de los tres serotipos quedando fuera el serotipo 1 y 3. Por último en el lote 687 se encuentra fuera de los límites el serotipo 3 y dentro los serotipos 1, 2 y los tres (Cuadro Nº 10).

Estos resultados sugieren que el serotipo 2 y el serotipo 1 poseen sitios antígenicos similares en mayor proporción que con el serotipo 3.

Como comentario en 1958, una vacuna de virus vivo tipo 2 monovalente fue usada durante un foco de poliomiелitis de tipo 1. Una reducción de incidencia de parálisis fue observada entre individuos inmunizados 8 días antes del brote de parálisis, debiéndose a la interferencia viral (48a) o protección heterologa por el anticuerpo tipo 2 contra el antígeno tipo 1 (48a, 57).

Posteriormente se realizó una titulación diferencial teniendo como control la V. T. R. y para la determinación de serotipos una V. T. proveniente de Argentina, se utilizaron células Hep-2C pase 172 y suero fetal de ternera Gibco 30N 4246.

TITULOS ($\log_{10} \text{DICT}_{50}/\text{ml}$)

V. T. R.	OBSERVADOS	ESPERADOS	DIFERENCIA
TIPO 1	6.05	6.136	- 0.08
TIPO 2	5.15	5.439	- 0.28
TIPO 3	5.85	5.91	- 0.06
	6.35		
TOTAL	(6.4)	6.4	0
	6.45		
S6B9B4ASKF DE		FORMULACION	
ARGENTINA	OBSERVADOS	ESPERADOS	DIFERENCIA
TIPO 1	6.55	7.0	- 0.45
TIPO 2	5.85	6.0	- 0.15
TIPO 3	6.35	6.5	- 0.15
	7.25		
TOTAL	7.05 (7.15)	7.14	+ 0.01

Como se observa en estos resultados las diferencias entre los valores observados y esperados son muy pequeñas no excediendo de $\pm 0.5 \log$

aun cuando el tipo 1 es el que mas difiere no se vio la necesidad de agregar un factor númerico.

Las variantes en esta titulación fueron:

- a). Las mezclas virus-suero se hicieron en las microplacas (utilizando volúmenes de 0.05 ml de c/u de suero y virus para hacer la mezcla).
- b). Las células se adicionaron a las microplacas al final del período de incubación de la neutralización.
- c). Los volúmenes se añadieron con micropipeta SOCCREX.

Estas variaciones evitan el uso de tubos y pipetas serológicas, las cuáles pueden influir sobre los resultados de la prueba, si no estan ---bien lavados e incluso en la exactitud.

Aunque debido a que solamente se tiene este resultado con la variación de metodología de utilizar solamente las microplacas y las varian--tes mencionados su influencia sobre el resultado debe tomarse con cierta reserva.

Sin embargo es importante observar que las diluciones de los sueros antipoliomielíticos fueron seleccionadas adecuadamente y apropiadas para determinar cada uno de los serotipos en una mezcla que contiene los tres serotipos como son las vacunas trivalentes.

CONCLUSIONES
XXXXXXXXXXXX

" En lo más crudo del invierno aprendí al fin que había en
mi un invencible verano "

Albert Camus

[illegible]

1. EL MANEJO DE LOS METODOS SE LLEVO A CABO SATISFACTORIAMENTE.
2. LA TITULACION DIFERENCIAL ES UTIL Y APROPIADA PARA LA DETERMINACION DE LOS TRES SEROTIPOS EN UNA VACUNA TRIVALENTE Y POR TANTO PARA LOS FINES INMEDIATOS DE CONTROL DE POTENCIA DE LA VACUNA.
3. DEBIDO AL CRUZAMIENTO INTERTIPICO DE LOS TRES SEROTIPOS DE LA VACUNA DE POLIOVIRUS, SE PROPONE CONSIDERAR UNA RANGO DE VARIACION SIMILAR AL DADO POR LA O. M. S. PARA VACUNAS MONOVALENTES QUE ES DE $\pm 0.5 \log_{10}$. ADEMAS DE UN CONTROL DE CRUZAMIENTO INTERTIPICO PARA LA DETERMINACION DEL SEROTIPO 1, EL CUAL PRESENTO PROBLEMAS EN SU DETERMINACION.
4. LA TITULACION DIFERENCIAL ES DE FACIL MANEJO Y ESTA DENTRO DE --- LAS POSIBILIDADES DE I. N. V. LLEVARLA A CABO Y TENERLA.

XXXXXXXXXX

Honorato de Balzac

[illegible]

MÉTODOS DE CÁLCULO EMPLEADOS

A). MÉTODO DE SPEARMAN-KARBER. UTILIZADO EN LOS ESTUDIOS DE INFECCIÓN PARA DETERMINAR LA POTENCIA DE SUSPENSIONES VIRALES EN DOSIS INFECTIVAS PARA CULTIVO DE TEJIDOS 50% ($DICT_{50}$).

$$\log_{10} DICT_{50} = D - \Delta (S - 0.5) \quad \text{DONDE:}$$

D = log DE LA DILUCIÓN QUE CONTIENE LA MÁS ALTA CONCENTRACIÓN DE VIRUS.

Δ = LA DIFERENCIA LOGARÍTMICA ENTRE LAS DILUCIONES

S = LA SUMA DE LOS POSITIVOS EN TODAS LAS DILUCIONES

0.5 = CONSTANTE USADA EN TODOS LOS CASOS PORQUE DA EL VALOR DEL 50%

B). MEDIA GEOMÉTRICA. EL LOGARITMO DE LA MEDIA GEOMÉTRICA ES LA MEDIA ARITMÉTICA DE LOS LOGARITMOS DE TODOS LOS VALORES.

$$\log MG = \frac{\log X_1 + \log X_2 + \log X_3 + \log X_4 + \dots}{N}$$

C). t DE STUDENT (51 y 60).

$$U = X \pm t \frac{S}{\sqrt{n}}$$

DONDE:

X = MEDIA GEOMETRICA (MG).

t = VALOR DE t (TABLAS)

S = DESVIACION STANDARD

n = TAMAÑO DE LA MUESTRA

1. Albrech P., Enterline Joan C., Boone J. E. and Klutch M. J. 1983.
Poliovirus and Polio Antibody Assay in Hep-2C and Vero Cell Cultures
J. Biol. Standard. 11:91-97.
2. Behbehani A. M. and Wenner H. A. 1972. Cap. 43. Poliovirus Infection
p. 241-248. Human Viral, Bedsonial and Rickettsial Diseases. Ed. --
Charles C. Thomas Publisher Springfield Illinois. U. S. A.
3. Blackman K. E. and Bubel H. C. 1969.
Poliovirus Induced Cellular Injury.
J. Virology 4:203-208.
4. Boeyé A. 1976. Picornaviral Structure and Protein Synthesis.
Arch. Internat. Physiol. Biochim. 84:1027-1128.
5. Breach M. R. 1976. Pag. 54. Cap. 5. Agentes Químicos.
Ed. El Manual Moderno S. A. México.
6. Caliguiri L. A., Mc Sharry J. J. and Lawrence G. W. 1980.
Effect of Arildone on Modification of Poliovirus in Vitro.
Virology 105:86-93.
7. Carrasco L. and Smith A. E. 1976.
Sodium ions and the Shut-off Host-cell Protein Synthesis by Picorna-
viruses. Nature 264:807-809.

8. Cooper P. D., Sumers D. and Maizel J. V. 1970. Evidence for Ambiguity in the Postranslational Cleavage of Poliovirus Proteins. *Virology* 41:408-418.
9. Della-Porta A. J. and Westaway E. F. 1977. A Multi-Hit Model for the Neutralization of Animal Viruses. *J. Gen. Virol.* 38:1-19.
10. Dernick Rudolf, Heukeshown J. and Hilbrig M. 1983. Induction of - Neutralizing Antibodies by All Tree Structural Poliovirus Polypeptides. *Virology* 130:243-246.
11. Dimmock N. J. 1984. Mechanisms of Neutralization of Animal Viruses *J. Gen. Virol.* 65:1015-1022.
12. Emini E. A., Dorner A. J., Dorner L. F., Jameson B. A. and Wimmer E. 1983. Identification of a Poliovirus Neutralization Epitope through Use of Neutralizing Antiserum Raised against a purified Viral Structural Protein. *Virology* 124:144-151.
13. Emini E. A., Jameson B. A., Lewis A. J., Larsen G. R. and Wimmer E. 1982. Poliovirus Neutralization Epitopes: Analysis and Localization with Neutralizing Monoclonal Antibodies. *J. Virology* 43:997-1005.

14. Emini E. A., Jameson B. A. and Wimmer E. 1984. Identification of a New Neutralization Antigenic Site on Poliovirus Coat Protein VP 2 J. Virology 52:719-721.
15. Emini E. A., Kao Shay-Yi., Lewis A. J., Crinic R. and Wimmer E. -- 1983. Functional Basis of Poliovirus Neutralization Determined --- with Monospecific Neutralizant Antibodies. J. Virology 46:466-474.
16. Emini E. A., Ostapchuck P. and Wimmer E. 1983. Bivalent Attachment of Antibody onto Poliovirus Leads to Conformational Alteration and Neutralization. J. Virology 48:547-550.
17. Enders J. F., Robbins F. C. and Weller T. H. 1980. Classics in Infectious Diseases. The Cultivation of the Poliomyelitis Viruses in - Tissue Culture. Rev. Infect. Dis. 2:493-503.
18. Ferguson M., Minor P. D., Spitz M., Magrath D. I. and Schild G. C. 1982. Monoclonal Antibodies Specific for The Sabin Vaccine Strain of Poliovirus 3. The Lancet 11:122-124.
19. Fernandez-Tomas C. B. and Baltimore D. 1973. Morphogenesis of Poliovirus. II. Demonstration of a New Intermediate, the Provirus. -- J. Virology 12:1122-1130.

20. Fulginiti Vincent A. 1984. Cap. 12. Poliomieltis. P. 144-155. In-
munizaciones en la Práctica Médica. Ed. El Manual Moderno, S. A.
México.
21. Hsiung G. D. 1973. Cap. II. Methods Commonly used for Virus Isola-
tion and Identification. 3. Virus Isolation and Identification.
Diagnostic Virology. Pags. 11-17; 54-68. Ed. New Haven and London,
Yale University Press.
22. Icenogle J., Gilbert S. F., Grievess J., Anderegg J. and Ruekert R.
1981. A Neutralizing Monoclonal Antibody against Poliovirus and
its Reaction with Related Antigenes. Virology 115:211-215.
23. Icenogle J., Shiwen H., Ducke G., Gilbert S., Ruecker R. and Ande-
regg J. 1983. Neutralization of Poliovirus by a Monoclonal Antibody:
Kinetics and Stoichiometry. Virology 127:412-425.
24. Jawetz E. D., Melnick J. D. and Adelberg E. A. 1979. Cap. 31. Fam-
lia Picornavirus. Pag. 433-440. Microbiología Médica. Ed. El Ma-
nual Moderno S. A. México D. F. 89 Ed.
25. Kew D. M., Nottay B. K., Hatch M. H., Nakano J. H. and Obijeski J.
F. 1981. Multiple Genetic Changes can Occur in the Oral Poliova-
ccines upon Replication in Humans. J. Gen. Virol. 56:337-347.

26. Koroleva G. A., Lashkevich V. A. and Voroshilova M. K. 1974. Study of Poliovirus Multiplication in Different Animal Species Using Photosensitized Virus Strains. Archiv. für die gesamte Virusforschung 46:11-28.
27. Leibowitz R. and Penman S. 1971. Regulation of Protein Synthesis in HeLa Cell. III. Inhibition during Poliovirus Infection. J. Virology 8:661-668.
28. Lenk R. and Penman S. 1979. The Cytoskeletal Framework and Poliovirus Metabolism. Cell 16:289-301.
29. Curia S. E. and Darrell J. E. 1977. Cap. 2. Titulación de Virus.- Pag. 21. General Virology . Ed. Omega S. A. Barcelona.
30. Mandel Benjamin. 1967. The Interaction of Neutralized Poliovirus with HeLa Cells. I. Adsorption. Virology 31:238-247.
- 30a. Mandel Benjamin. 1976. Neutralization of Poliovirus: A Hypothesis to Explain the Mechanism and the One-Hit Character of the Neutralization Reaction. Virology 69:500-510.
31. Melnick J. L. 1980. Ventajas e Inconvenientes de las Vacunas Antipoliomielíticas Elaboradas con Virus Vivos o con Virus Muertos. Bol. of Sanit. Panam. 88:507-528.

32. Milstein J. B., Walker J. R. and Eron L. J. 1977. Correlation of - Virus Polypeptide Structure with Attenuation of Poliovirus Type I. J. Virology 23:811-815.
33. Minor Philip D. 1980. Comparative Biochemical Studies of Type 3 - Poliovirus. J. Virology 34:73-84.
34. Minor P. D., Kew P. and Schild G. C. 1982. Poliomyelitis Epidemiology, Molecular Biology and Immunology. Nature:299:108-110.
35. Minor P. D., Schild G. C., Wood J. M. and Dandekar C. N. 1980. The Preparation of Specific Immune Sera against Type 3. Poliovirus --- D-Antigen y C-Antigen and the Demonstration of Two C-Antigenic Components in Vaccine Strain Populations. J. Gen. Virol. 51:147-156.
36. Moynihan M. and Petersen I. 1982. The durability of inactivated - Poliovirus Vaccine: Studies on the Stability of Potency in vivo and in the Stability of Potency in vitro. J. Biol. Standard. 10:261-268.
37. Nair C. N. 1981. Monovalent Cation Metabolism and Cytopathic ---- Effects of Poliovirus Infected HeLa Cells. J. Virology 37:268-273.
38. Nottay Baldew K., Kewolen M., Hatch Milford H., Heyward T. J. and - Obijeski J. F. 1981. Molecular Variation of Type 1 Vaccine-Related and Wild Polioviruses during Replication in Humans. Virology 108:405-423.

39. Osterhaus A. D. M. E., Van Wezel A. L., Van Seenis B., Drost G. A., Hacendonk T. G. 1981. Monoclonal Antibodies to Polioviruses. Intervirology 16:218-224.
40. Phaff Herman J. 1981. Industrial Microorganisms. Scien. Amer. 245:52-65.
41. Putnak R. J. and Phillips B. A. 1982. Poliovirus Empty Capsid Morphogenesis: Evidence for Conformational Differences Between Self -- and Extract-Assembled Empty Capsids. J. Virology 41:792-800.
42. Richman D., Cleveland P., Redfield D., Osman M. and Wahl G. M. Rapid Viral Diagnosis. The J. Infect. Dis. 149:298-310.
43. Romanova L. I., Tolskaya E. A. and Agol V. I. 1981. Antigenic and Structural Relatedness among Non-capside and Capsid Polypeptides of Polioviruses Belonging to Different Serotypes. J. Gen. Virol. 52:279-289.
44. Rubin S. G., Chumakov M. P., Savinskaya S. S., Pervikov Yu. V., Gracheva L. A. and Voroshilova M. K. 1974. Improvement of Methods for Intratypic Differentiation of Poliovirus. II. Use of Strain-Specific Antisera Cross-Adsorbed with Antigens of Heterologous Strains - in Agar Gel Diffusion Precipitation Test for Differentiation between Wild and Vaccine Strains of Poliovirus Types 1, 2 and 3. Archiv. für die gesamte Virusforschung. 46:66-70.

45. Rueckert R. R., and Wimmer E. 1984. Systematic Nomenclature of -- Picornavirus Proteins. J. Virology 50:957-959.
46. Sabin A. B. 1985. Oral Poliovirus Vaccine: History of its Development and Use in Current Challenge to Eliminate Poliomyelitis from - the World. The J. Inf. Dis. 151:420-436.
47. Sabin A. B. and Boulger L. R. 1973. History of Sabin Attenuated - poliovirus Oral Live Vaccine Strains. J. Biol. Standard. 1:115-118.
48. Salk Darrell. 1980. Eradication of Poliomyelitis in the United -- States. I. Live Virus Vaccine. Associated and Wild Poliovirus Diseases. Rev. Infect. Dis. 2:228-242.
- 48a. Salk Darrell. 1980. Eradication of Poliomyelitis in the United -- States. III. Poliovaccines - Practice Consideration. Rev. Infect. Dis. 2:258-268.
49. Schaeffer A., Kuhne J., Zibirre R. and Koch G. 1982. Poliovirus - Induced Alterations in HeLa Cell Membrane Functions. J. Virology 44:444-449.
50. Scharli E. C. and Koch G. 1984. Protein Kinase Activity in Puri-- fied Poliovirus Particles and Empty Viral Capsid Preparations. J. Gen. Virol. 65:129-139.

51. Scheffler C. W. 1981. Cap. 6. Docimasia de Hipótesis. Pags. 69-102. Bioestadística. Ed. Fondo Educativo Interamericano. México.
52. Schild G. C., Wood J. M., Minor P. D., Dandewate C. M. and Magrath D. I. 1980. Immunoassay of Poliovirus Antigen by Single-Radial-Difusion: Development and Characteristics of a Sensitive Autoradiographic Zone Size Enhancement (ZE) Technique. J. Gen. Virol. 65:129-139.
53. Thorpe R., Minor P. D., Mackey A., Schild G. C. and Spitz M. 1982. Immunochemical Studies of Polioviruses: Identification of Immunoreactive Virus Capsid Polypeptides. J. Gen. Virol. 63:487-492.
54. Van Wezel A. L. and Hazendonk A. G. 1979. Intratypic Serodifferentiation of Poliomyelitis Virus Strains by Strain-Specific Antisera. Intervirology 11:2-8.
55. Vrijssen R. and Boeyé A. 1976. Improved Protein Separation by Polyacrylamide Gel Electrophoresis in the presence of pH gradient. Arch. Internat. Physiol. Biochim. 84:1120-1121.
- 55a. Vrijssen R. and Boeyé A. 1976. Electrophoretic Resolution of Poliovirus Capsid Polypeptides in the Presence of a pH gradient. Arch. Internat. Physiol. Biochim. 84:205-206.

- 55b. Vrijnen R. and Boeyé A. 1978. Capsid Polypeptides of Virulent and Attenuated Strains of the three Poliovirus Serotypes. Arch. Internat. Physic. Biochim. 86:468-469.
56. Vrijnen R., Brioen P. and Boeyé A. 1980. Identification of Poliovirus Precursor Proteins by Immunoprecipitation. Virology 107:567-569.
57. Vrijnen R., Rombaut B., and Boeyé A. 1984. Intertypic Cross-Reactions of Nonneutralizing Monoclonal Poliovirus Antibodies. J. Virology 49:1002-1004.
58. Wasley G. D. and May J. E. 1970. Cap. 11. Sub-zero Cell Preservation. Animal Cell Culture Methods. Pages. 136-144. Ed. Blackwell Scientific Publications. Great Britain.
59. Wasley Gerald D. 1972. Caps. 1 Mammalian Cell Culture Media. ---- Cap. 6. Subzero cell storage. Pages. 1-19; 139-145. Animal Tissue Culture. Ed. London Butterworths. England.
60. Wayne W. D. 1984. Cap. 6 Pruebas de Hipótesis. Pages. 159-190. ---- Bioestadística. 5ª Reimpresión. Ed. Limusa S. A. de C. México.

61. W.H.O. Collaborative Study. 1981. Markers of Poliovirus Strains. Isolated from cases temporally associated with the use of Live Poliovirus Vaccine; Report. J. Biol. Standard. 9:163-184.
62. Wiegers K. J. and Dernick R. 1981. Poliovirus-Specific Polypeptides in Infected HeLa Cells Analysed by Isoelectric Focusing and 2D- Analysis. J. Gen. Virol. 52:61-69.
63. Wjishnow R. M. and Steinfed J. L. 1976. The Conquest of the Major Infectious Diseases in the United States. Ann. Rev. Microbiol. 30:427-450. Ed. Annal. Reviews Inc.