

03062
Zej.
13

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA

"Papel que juega el rotavirus SA-11 sobre la multiplicación *in vitro* de la cepa atenuada oral de poliovirus 1".

T E S I S

Para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

AREA: MICROBIOLOGIA

Presenta:

CESAR ZEFERINO ZAMORA ZAYALA

ASESOR: DR. ONOFRE MUEOZ HERNANDEZ.

COASESOR: M. en C. JUAN PABLO GUISCAFRE GALLARDO.

Este trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Virología de la Unidad de Investigación en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Instituto Mexicano del Seguro Social.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1987



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE.

Contenido	página
Introducción	1
Planteamiento del Problema	8
Hipótesis	8
Material	9
Métodos	11
Resultados	16
Discusión	36
Bibliografía	40

INTRODUCCION

La poliomiелitis ha sido una de las enfermedades virales más temidas por la humanidad, sobre todo por las secuelas de parálisis y deformidades que produce. A fines del decenio de los cuarenta la Fundación Nacional Americana para la parálisis infantil, recaudó fondos para sostener una amplia investigación en un intento de desarrollar una vacuna anti-polio. La vacuna inactivada con formol, de Salk, fue la primera en obtener licencia en 1954 y fue adoptada en Estados Unidos de Norteamérica, Europa y Australia, mientras tanto la vacuna viva atenuada oral de Sabin fue acogida en la U.R.S.S. y Europa Oriental en donde demostró tener tanto éxito que el mundo entero, excepto algunos países escandinavos, utiliza en la actualidad la vacuna de Sabin (1).

Desde que se iniciaron las campañas de vacunación anti-poliomiелítica se observó un importante descenso en los casos de poliomiелitis, en especial en los países desarrollados, sin embargo en países del tercer mundo la ocurrencia de esta enfermedad no ha disminuido en forma similar. En México se reportaron 710 casos en 1975-77, cifra que disminuyó a 180 casos en 1983-85, en contraparte Estados Unidos y Canadá presentaron conjuntamente una disminución de 20 a 8 casos de poliomiелitis en el mismo período (2, 3, 4).

A pesar de la disminución de los casos de poliomiелitis en todo el mundo, no se ha erradicado totalmente esta

enfermedad atribuyéndose a diversos factores como son: 1) Inactivación de la vacuna por defectos en la cadena frigorífica, 2) Campañas de vacunación inadecuadas y 3) Interferencia viral (5, 6).

El fenómeno de interferencia viral se conoce desde hace tiempo y puede definirse como un estado inducido por un virus interferente y se caracteriza por resistencia de células o tejidos a una infección por un segundo virus (7). Esta interferencia se ha observado en diferentes virus (8, 9), tal es el caso del virus vacunal de la polio, ya que éste puede sufrir de auto interferencia en la mezcla trivalente en donde con igual número de dosis infectantes, se hizo evidente que el serotipo más afectado era el polio-3, seguido del poliovirus-1 y el menos afectado era el serotipo 2; en la actualidad se han logrado optimizar las cantidades de cada virus para reducir el efecto de autointerferencia (10, 11, 12). Por otro lado, existen reportes de que otros enterovirus como adenovirus tipo 1, coxsackie B5 y ECHO 20 pueden interferir con la respuesta de la vacunación anti-poliomielítica (11). En un estudio realizado en Chile también se observó el fenómeno inverso, es decir se ha utilizado masivamente la vacuna antipolio--mielítica para la prevención de diarreas de etiología viral, lográndose una reducción de hasta un 15% de las tasas de mortalidad (11).

También existen evidencias de que otros agentes como calicivirus, astrovirus, minirovirus y el agente norwalk son capaces de multiplicarse en la mucosa intestinal humana

y producir gastroenteritis (14, 15, 16, 17).

Se ha estimado que anualmente ocurren de 744 a 1000 millones de casos de diarreas en Asia, Africa e Iberoamérica; de éstos, 4.6 millones de muertes suceden en niños menores de 5 años y en este grupo etáreo los principales agentes causales de gastroenteritis aguda son los rotavirus (17).

Generalidades de los Rotavirus.

Los rotavirus humanos pertenecen a la familia Reoviridae, y se clasifican por pruebas de neutralización en 4 serotipos. La partícula completa mide aproximadamente 70 nm de diámetro, tiene una cápside de doble capa que encierra un genoma de 11 segmentos de ARN de doble cadena y con un peso molecular de aproximadamente 2.2 millones de daltones. La etapa de morfogénesis de rotavirus humanos y animales es muy semejante en cultivos celulares. Su réplica, se inicia con la entrada de los viriones a las células por endocitosis, posteriormente dentro de los lisosomas los viriones pierden su cubierta, liberándose partículas subvirales de 50 nm; 8 hr post-infección se observan inclusiones de material granular denso (viroplasma) que representan proteínas nuevas y ARN víal precursor acumulado en el citoplasma, después se empaqueta el ARN y se ensamblan las proteínas virales de la cápside, estas partículas dejan el viroplasma por gemación en donde adquieren su envoltura, para después perderla al moverse hacia el interior de las cisternas de retículo endoplásmico, ya que la envoltura no es necesaria para la infectividad (18).

El rotavirus de los humanos es difícil de cultivar *in vitro*, sin embargo el rotavirus de simio SA-11, ha sido multiplicado en varios cultivos primarios y líneas celulares (19, 20, 21) y manifiesta un efecto citopático (E.C.P.) que se caracteriza por: acumulación de material granular en el citoplasma, redondeamiento y aumento del volumen celular, agrupamiento de células infectadas y mayor adherencia a la superficie de contacto (19,20,21). Cabe mencionar que el SA-11 presenta reacción cruzada con el serotipo 3 de rotavirus humano (18).

Los daños celulares que provocan los rotavirus en biopsia de mucosa yeyunal de niños con gastroenteritis, incluyen atrofia y acortamiento de las vellosidades, infiltración de la lámina propia con células mononucleares, distensión de las cisternas del retículo endoplásmico, aumento mitocondrial y espaciamiento irregular de las microvellosidades. Además se ha demostrado que en la diarrea inducida experimentalmente en cerdos, se daña el sistema de transporte de sodio acoplado a glucosa, disminuye la actividad de la sacarasa pero la actividad de la timidín quinasa aumenta; sin embargo, la adenilato ciclasa y el AMP cíclico no son estimulados. Por otro lado, existen datos que en algunos pacientes se afecta la absorción de D-xilosa y en general disminuyen los niveles de disacáridasas como la maltasa sacarasa y lactasa (18).

Generalidades de los Poliovirus.

Los poliovirus tienen un ciclo de replicación más rápido que los rotavirus, ya que las células en cultivo

presentan cambios morfológicos a las 3 y 4 h post-infección, entre los que destacan pérdida de la cromatina en el núcleo, desplazamiento nuclear y arrugamiento de su membrana, aparición de masas citoplásmicas eosinófilas, aumento en la vacuolización, redondeamiento y aumento de volumen, mayor refringencia y lisis celular (22).

Los poliovirus pertenecen a la familia Picornaviridae, son partículas de 30 nm, compuestas de un genoma de ácido ribonucleico (ARN) de cadena sencilla y está cubierto por una cápside con simetría icosaédrica. La réplica del virus se inicia con la adherencia a los receptores lipoprotéicos de la célula huésped. Dentro de la célula, la cápside se escinde liberándose el ARN monofilamentoso que sirve como molécula de ARN mensajero para la síntesis de la ARN-replicasa, en este punto se desarrolla el intermediario replicador de ARN que sirve para la síntesis de nuevas moléculas de ácido nucleico viral. Simultáneamente a este proceso se lleva a cabo la síntesis de las proteínas de la cápside que será la envoltura del ácido nucleico viral, todos estos eventos ocurren en la matriz citoplásmica.

La patogénesis del virus polio, se inicia con la ingestión de los virus y su multiplicación primaria en las mucosas orofaríngea e intestinal; sin embargo, no se sabe si el virus se multiplica en las células epiteliales o linfoides del tubo digestivo, pero hay evidencia de que las amígdalas y las placas de Peyer del ileon son invadidas rápidamente. De estos focos primarios los virus pasan a los ganglios linfáticos, posteriormente a la sangre para final-

mente dirigirse a otros tejidos sensibles como la grasa parda; en la mayoría de las infecciones naturales incluso en individuos no inmunizados solo se produce una viremia transitoria ya que sólo el 2 % de las infecciones ocasionan el síndrome clínico paralítico, al invadir los virus el sistema nervioso central (23).

El proceso de la enfermedad paralizante se inicia con una enfermedad leve asociada a la viremia caracterizada por problemas respiratorios o gastrointestinales, posteriormente de 1 a 3 días o a veces sin ningún intervalo se presenta la enfermedad principal caracterizada por cefalea, fiebre, rigidez muscular y parálisis asociada a destrucción celular en el sistema nervioso central, como sucede en las astas anteriores de la médula espinal (poliomielitis espinal), tronco cerebral (poliomielitis bulbar) y la corteza motora (poliomielitis encefálica). La poliomielitis bulbar es a menudo mortal al provocar insuficiencia respiratoria o cardíaca, mientras que las otras formas pueden dejar secuelas con cuadros muy variables de parálisis residual.

El curso de la infección puede ser alterado por varios factores del huésped como son la fatiga, los traumas, inyecciones de medicamentos y vacunas, amigdalectomía, embarazo y la edad del paciente. Estos factores influyen en la frecuencia y la gravedad de la parálisis (22, 23).

Cabe señalar que los enterovirus (poliovirus) y los rotavirus se replican más eficientemente en células epiteliales de primates como las de riñón de mono, de amnios humano, en la línea celular HeLa obtenida de un carcinoma

cervical humano (24) y células tumorales Hep 2c (26).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Estudiar *in vitro*, si la infección de una línea celular por rotavirus, puede interferir la infección y multiplicación ulterior de poliovirus. La demostración de este fenómeno de interferencia viral podría explicar algunos casos de falla vacunal (5, 12, 25), tomando en cuenta que los rotavirus son los principales agentes causales de diarrea en niños menores de 5 años.

HIPOTESIS

El rotavirus de simio SA-11 al infectar células cultivadas *in vitro* será capaz de inhibir la multiplicación del poliovirus tipo-1 vacunal.

MATERIAL Y METODOS

Material:

Cultivos celulares: Se utilizaron cultivos celulares de la línea MA-104 (células epiteliales de riñón de mono) ya que estas células son susceptibles a la réplica tanto de rotavirus como de poliovirus (26).

Reactivos utilizados.

- 1) Medio mínimo esencial (MEM) (26).
- 2) Suero fetal bovino.
- 3) Amortiguador de fosfatos-solución salina libre de calcio y magnesio (PBS-), pH 7.2.
- 4) Amortiguador de fosfatos-solución salina con calcio y magnesio (PBS+), pH 7.2
- 5) Solución de tripsina-verseno: tripsina 0.05%, verseno 0.05%.
- 6) Solución de 5000 U.I. penicilina/ml y 5000 µg de sulfato de dihidroestreptomocina/ml.
- 7) Amortiguador de bicarbonato de sodio al 4.4% adicionado con CO₂ , pH 7.3-7.5.
- 8) Amortiguador de ácido N-2 hidroxietil piperazín N 2 etanosulfónico, sal sódica (HEPES) 1 M, pH 7.3.
- 9) Amortiguador de cacodilato de sodio 0.1 M pH 7.2.
- 10) Solución de Karnovsky.
- 11) tetróxido de osmio al 1% en amortiguador de cacodilatos.

12) Oxido de propileno.

13) EPON.

14) Acetato de uranilo.

15) Citrato de plomo.

Botellas de cultivo

Botellas de poliestireno de 25 cm² de superficie para cultivo de tejidos.

Placas de poliestireno de 96 pozos con fondo plano para cultivo de tejidos.

Virus:

Rotavirus de simio SA-11 (proporcionada por el Dr. Romilo Espejo I.I.B. UNAM).

Poliovirus serotipo-1 cepa vacunal de Sabin (proporcionada por el Dr. Julio de Mucha, del Instituto de Virología).

Virus Herpes simple tipo 1.

Antisueros: Suero anti-SA-11 producido en conejo:

Se inocularon 10 µg de virus SA-11 purificados y emulsificados con adyuvante completo de Freund en un volumen final de 1 ml y se inoculó al conejo por vía subcutánea e intramuscular. 9 días después se hizo un refuerzo con 10 µg de virus emulsificado con adyuvante incompleto en un volumen final de 1 ml; a los 18 y 23 días se dió otro refuerzo de la misma manera. Se sangró al conejo por la vena marginal y se comprobó el título del suero

Suero antipolio 1 producido en conejo:

Se inoculó a conejos con líquido de células Vero infectadas sin diluir como antígeno, utilizando 10 ml de mezcla virus-adyuvante a partes iguales por vía intramuscular en 4 sitios diferentes; además 1 ml de líquido de células por vía intravenosa, a los 7, 14, 21 y 30 días se inmunizó con 1 ml de líquido de células infectadas por vía intravenosa; en el día 21 también se administró por vía intramuscular 10 ml de la mezcla virus-adyuvante. En el día 37 se reforzó con 0.5 ml de antígeno por vía intravenosa; se obtuvieron muestras de sangre del conejo y se comprobó el título del antisuero (26).

Métodos.

Cultivos celulares:

Como medio de crecimiento de las células se utilizó medio diploide MEM enriquecido con 10% de suero fetal bovino adicionado con bicarbonato de sodio gasificado a 4.4%; HEPES y 100 U.I. de penicilina y 100 µg de estreptomina. El mismo medio pero sin suero fetal bovino fue el medio de mantenimiento y de infección de las células.

Titulación de los virus:

Tanto el virus polio-1 como el rotavirus SA-11 fueron titulados por el ensayo de Dosis Infecciosas del 50%

Suero antipollo 1 producido en conejo:

Se inoculó a conejos con líquido de células Vero infectadas sin diluir como antígeno, utilizando 10 ml de mezcla virus-adyuvante a partes iguales por vía intramuscular en 4 sitios diferentes; además 1 ml de líquido de células por vía intravenosa, a los 7, 14, 21 y 30 días se inmunizó con 1 ml de líquido de células infectadas por vía intravenosa; en el día 21 también se administró por vía intramuscular 10 ml de la mezcla virus-adyuvante. En el día 37 se reforzó con 0.5 ml de antígeno por vía intravenosa; se obtuvieron muestras de sangre del conejo y se comprobó el título del antisuero (26).

Métodos.

Cultivos celulares:

Como medio de crecimiento de las células se utilizó medio diploide MEM enriquecido con 10% de suero fetal bovino adicionado con bicarbonato de sodio gasificado a 4.4%; HEPES y 100 U.I. de penicilina y 100 µg de estreptomina. El mismo medio pero sin suero fetal bovino fue el medio de mantenimiento y de infección de las células.

Titulación de los virus:

Tanto el virus pollo-1 como el rotavirus SA-11 fueron titulados por el ensayo de Dosis Infecciosas del 50%

en Cultivos de Tejidos (DICT₅₀), y los títulos fueron interpretados de acuerdo al método de Reed y Muench (26).

Titulación de los antisueros específicos:

Los antisueros se titularon por pruebas de neutralización (26) en microplacas de 96 pozos de fondo plano.

Se realizaron los siguientes experimentos:

1. Efecto del tiempo entre la infección con rotavirus SA-11 y la infección ulterior con poliovirus tipo 1.

Botellas de cultivo con 100% de confluencia celular obtenida después de 48 h (células MA-104), se lavaron 3 veces con PBS, pH 7.3, posteriormente se inocularon con 10 dosis que infectan al 50% de las células en cultivo (10 DICT₅₀/0.1 ml) de rotavirus las cuales se incubaron a 37° C durante 1 h para permitir la adsorción del virus y se lavaron con PBS. Posteriormente a las 1, 2, 4, 8, 24 y 36 h los mismos cultivos fueron retados con 100 DICT₅₀/0.1 ml de poliovirus tipo 1 incubándose en las mismas condiciones. Todos los cultivos se cosecharon a las 72 h post-inoculación del virus SA-11 (células + MEM congelando y descongelando) y los virus obtenidos en cada botella se titularon por el ensayo de DICT₅₀ utilizando de testigos botellas infectadas con 10² DICT₅₀ de poliovirus y otras inoculadas con 10² DICT₅₀ de rotavirus. Los agentes virales presentes en las cosechas obtenidas fueron identificados con los antisueros respectivos, utilizando un

ensayo de reducción de la infectividad es decir se retaron diluciones seriadas de los virus obtenidos contra una dosis constante de antisuero específico, en nuestro caso, utilizamos 20 unidades neutralizantes (U.N.)(26) de suero anti-SA-11 y 2 U.N. de suero anti-polio 1.

Es importante señalar que se requirieron 2 unidades neutralizantes de anti-polio tipo 1 ya que si este antisuero se usaba en mayores cantidades era capaz de neutralizar tanto a las 50 DICT₅₀ de poliovirus-1 como a 50 DICT₅₀ de rotavirus, por lo cual la cantidad antes mencionada neutralizaba eficazmente a los virus polio-1 pero no al SA-11.

Los controles utilizados en los ensayos de reducción de la infectividad son los siguientes: 2 U.N. de anti-polio 1 + 50 DICT₅₀ de poliovirus 1; 2 U.N. de anti-polio 1 + 50 DICT₅₀ de rotavirus SA-11; 20 U.N. de anti SA-11 + 50 DICT₅₀ de rotavirus SA-11 y 20 U.N. de anti SA-11 + 50 DICT₅₀ de poliovirus 1.

Todos los experimentos se realizaron por triplicado observando el tipo de ECP producido para cada tiempo de infección.

II. Efecto de la cantidad de los rotavirus SA-11 utilizada. sobre la infección con una dosis constante de poliovirus 1.

Las botellas de cultivo con 100% de confluencia celular obtenida después de 48 h, se lavaron 3 veces con PBS, pH 7.3, posteriormente se inocularon con 1, 10¹, 10², 10³,

10^4 y 10^5 DICT₅₀/0.1 ml de rotavirus, éstas se incubaron a 37° C 1 h para permitir la adsorción del virus; después de 2 h las mismas botellas se retaron con 10^2 DICT₅₀ de virus polio-1. A las 72 h post-infección con el SA-11, los virus que se produjeron se titularon por el ensayo de DICT₅₀ en cada una de las cosechas obtenidas. Se utilizaron los mismos controles que en el experimento I.

Tanto el poliovirus 1 como el rotavirus SA-11 fueron identificados con sus antisueros específicos mediante la prueba de reducción de la infectividad utilizando 20 U.N. de suero anti-SA-11 y 2 U.N. de suero anti-polio 1, teniendo como testigos los mencionados en el inciso I.

III. Efecto del tiempo y la cantidad del virus herpes simple tipo 1 sobre la infección ulterior con poliovirus 1.

Se realizaron experimentos control infectando células MA-104 a las 2, 6 y 24 h y con 1 , 10^3 y 10^4 DICT₅₀ de virus herpes simple tipo 1, previas a la inoculación de una dosis constante (10^2 DICT₅₀) de poliovirus tipo 1.

Microscopía electrónica:

Se prepararon cultivos de tejidos para observar mediante microscopía electrónica el ensayo del efecto del tiempo entre la infección con rotavirus SA-11 y la infección ulterior con poliovirus tipo 1 para cada uno de los tiempos estudiados de la siguiente manera:

1) Se fijaron las células, 2 ciclos de 30 minutos cada uno.

2) Se lavaron 1 vez en amortiguador de cacodilato de sodio 0.1 M pH 7.2.

3) Se hizo una post-fijación en tetróxido de osmio al 1% en amortiguador de cacodilatos.

4) Se deshidrató en alcohol a 70, 80 y 90% durante 15 min en cada concentración, y 3 veces en alcohol absoluto por 20 min cada vez.

5) Luego se realizaron 2 lavados con óxido de propileno durante 30 min cada lavado.

6) Se dejó una noche en una mezcla de propileno + EPON v/v.

7) Posteriormente, se dejó en EPON toda la noche.

8) La muestra se incluyó en EPON y se polimerizó a 60 C.

9) Posteriormente se cortaron las muestras y se tiñeron con acetato de uranilo al 5% + citrato de plomo al 1.25%.

10) Se realizaron las observaciones al microscopio de transmisión Marca JEOL mod. 100 B.

RESULTADOS.

I. Efecto del tiempo entre la infección con rotavirus SA-11 y la infección ulterior con poliovirus tipo 1.

El tipo de efecto citopático observado a las 1 y 2 h fue predominante de poliovirus, mientras que a las 4, 8 y 24 h se observó un ECP mezclado, es decir se observó daño celular producido por ambos virus. Por otro lado, el daño celular encontrado a las 36 h fue principalmente por rotavirus (tabla 1).

La titulación de las cosechas obtenidas mostraron que a las 1, 2, 4 y 8 h los títulos alcanzados son semejantes al control de polio (10^6); sin embargo a las 24 y 36 h los títulos máximos obtenidos son similares al testigo de rotavirus (10^4) (tabla 2).

Los ensayos de reducción de la infectividad por el empleo de sueros anti-polio 1 y anti-rotavirus nos mostró que a las 1, 2, 4 y 8 h el virus con mayor replicación fue polio tipo 1, mientras que a las 24 y 36 h el virus con mejor eficiencia de multiplicación fue el SA-11 (tabla 3).

II. Efecto de la cantidad de los rotavirus SA-11 utilizada sobre la infección con una dosis constante de poliovirus 1.

Con respecto al tipo de ECP observado, cuando se uti-

lizaron 10^5 DICT₅₀ de rotavirus contra 10^2 DICT₅₀ de poliovirus, el daño celular fue más característico de SA-11; con 10^4 y 10^3 DICT₅₀ de rotavirus, las células mostraron un efecto citopatogénico mezclado. Por último, con 1, 10 y 10^2 DICT de SA-11 las lesiones celulares fueron más parecidas a las producidas por poliovirus-1 (tabla 4).

La titulación de las cosechas de las infecciones mixtas señaladas anteriormente mostró que con 10^5 y 10^4 DICT₅₀ de SA-11 producen títulos iguales a los obtenidos con los controles infectados únicamente con rotavirus. Por otro lado se observó una disminución en el título con 10^3 y 10^2 DICT₅₀ de rotavirus, sin embargo con las cosechas con 10^1 y 1 DICT₅₀ de rotavirus, los títulos alcanzados fueron iguales al control del virus polio (tabla 5).

Con los sueros anti-rotavirus SA-11 y anti-polio 1, los ensayos de reducción de la infectividad sobre las cosechas mencionadas mostraron que con 10^5 y 10^4 DICT₅₀ de virus SA-11 los rotavirus se replicaron con una mayor eficiencia, por otro lado las cosechas con 10^3 y 10^2 DICT₅₀ de rotavirus, se observó multiplicación de ambos virus. Finalmente, cuando se tuvieron 10 y 1 DICT₅₀ de rotavirus, al parecer la descendencia viral predominante fue poliovirus (tabla 6).

III. Efecto del tiempo y la cantidad del virus herpes simple tipo 1 sobre la infección ulterior con poliovirus 1.

El tipo de E.C.P. observado a las 2, 6 y 24 h con

virus herpes previos a la infección con el poliovirus tipo 1, fue característico del primero; el mismo tipo de daño celular se observó con 10^3 y 10^4 DICT₅₀, sin embargo, se observó E.C.P. por el virus polio con una dosis infectante de virus herpes (tabla 7 y 8).

Microscopía electrónica.

El estudio por microscopía electrónica del efecto del tiempo entre la infección con rotavirus SA-11 y la infección ulterior con poliovirus tipo 1, mostró la presencia de partículas virales de rotavirus a las 8 y 24 h y las preparaciones control inoculadas con el SA-11, (fotos 1-5) sin embargo esto no se observó en las preparaciones de 1 y 2 h (fotos 6 y 7).

En cuanto al virus polio en las preparaciones control (fotos 8 y 9) se pudo apreciar la acumulación de agregados (viroplasmias) y el desarrollo de cuerpos rodeados por una membrana en los cuales pensamos se encuentran las partículas virales, estos resultados concuerdan con lo reportado por Dales y cols. (27). A las 1, 2, 4 y 8 h se observaron agregados semejantes a los viroplasmias y los cuerpos con membrana (fotos 1, 2, 3, 6 y 7).

En la fotografía 10 se muestran células sin infectar.

TABLA 1
TIPO DE EFECTO CITOPATICO OBSERVADO, DE ACUERDO AL
TIEMPO ENTRE LA INFECCION CON ROTAVIRUS SA-11 Y LA
INFECCION ULTERIOR CON POLIOVIRUS TIPO 1.*

	TIPO DE EFECTO CITOPATICO		
Tiempo de infeccion entre rotavirus y poliovirus-1 (horas)	Polio-1	Mezclado	SA-11
1	+	-	-
2	+	-	-
4	-	+	-
8	-	+	-
24	-	+	-
36	-	-	+

*Celulas MA-104 infectadas con 100 DICT₅₀/0.1 ml de poliovirus 1 y 100 DICT₅₀/0.1 ml de rotavirus SA-11. Tres ensayos por triplicado.

TABLA 2
 TITULACION POR DICT₅₀ DE LAS COSECHAS OBTENIDAS DE ACUERDO
 AL TIEMPO ENTRE LA INFECCION CON ROTAVIRUS SA-11 Y LA
 INFECCION ULTERIOR CON POLIOVIRUS-1*

Tiempo de infeccion entre rotavirus y poliovirus (horas)	Titulo de las cosechas (DICT ₅₀ /0.1 ml)
1	10 ⁵
2	10 ⁵
4	10 ⁵
8	10 ⁵
24	10 ⁴
36	10 ⁴

Controles: polio-1 10⁵ DICT₅₀/0.1 ml
 SA-11 10⁴ DICT₅₀/0.1 ml

*Promedio de 3 ensayos por triplicado

TABLA 3
ENSAYOS DE REDUCCION DE LA INFECTIVIDAD EMPLEANDO
SUEROS ANTIPOLIO 1 O ANTI SA-11 SOBRE LAS COSECHAS OBTENI-
DAS DE ACUERDO AL TIEMPO ENTRE LA INFECCION CON ROTAVI-
RUS Y LA INFECCION ULTERIOR CON POLIOVIRUS 1*

Tiempo de infeccion entre rotavirus y poliovirus (horas)	SUEROS:	
	Antipolio 1 (DICT ₅₀ /0.1 ml)	Anti SA-11 (DICT ₅₀ /0.1 ml)
1	2 X 10	2 X 10 ⁴
2	2 X 10	2 X 10 ⁵
4	2 X 10	2 X 10 ⁶
8	2 X 10 ²	2 X 10 ⁵
24	2 X 10 ³	2 X 10
36	2 X 10 ⁴	2 X 10

Controles:

2 U.N. Antipolio-1 + 50 DICT₅₀ SA-11 = 2⁺
 2 U.N. Antipolio-1 + 50 DICT₅₀ Polio-1 = Negativo
 20 U.N. Anti-SA-11 + 50 DICT₅₀ Polio-1 = 4⁺
 20 U.N. Anti-SA-11 + 50 DICT₅₀ SA-11 = Negativo
 Virus Polio-1 = 10⁶DICT₅₀/0.1 ml
 Virus SA-11 = 10⁴DICT₅₀/0.1 ml

*Promedio de 3 ensayos por triplicado

TABLA 4
 EFECTO CITOPATICO OBSERVADO SEGUN LA CANTIDAD DE VIRUS
 SA-11 UTILIZADA VS. 100 DICT₅₀ DE VIRUS POLIO-1*

Cantidad de SA-11 (DICT ₅₀ /0.1 ml)	Tipo de Efecto Citopatico		
	Polio-1	Mezclado	SA-11
10 ⁵	-	-	+
10 ⁴	-	+	-
10 ³	-	+	-
10 ²	+	-	-
10	+	-	-
1	+	-	-

*Celulas MA-104. Tres ensayos por triplicado.

TABLA 5
TITULACION DE LAS DIFERENTES COSECHAS SEGUN LA
CANTIDAD DE VIRUS SA-11 VS 100 DICT₅₀ DE VIRUS
FOLIO-1 *

Cantidad de SA-11 (DICT ₅₀ /0.1 ml)	Título (DICT ₅₀ /0.1 ml)
10 ⁵	10 ⁴
10 ⁴	10 ⁴
10 ³	10 ⁵
10 ²	10 ⁵
10	10 ⁶
1	10 ⁶
<hr/>	
Controles:	
Polio-1	10 ⁶
SA-11	10 ⁴

*Promedio de 3 ensayos por triplicado.

TABLA 6
 ENSAYOS DE REDUCCION DE LA INFECTIVIDAD POR EL EMPLEO
 DE SUEROS ANTIPOLIO 1 Y ANTI SA-11 SOBRE LAS COSECHAS
 DE INFECCIONES MIXTAS CON DIFERENTES DICT₅₀ DE ROTAVI-
 RUS Y 100 DICT₅₀ DE POLIO 1*

Cantidad de SA-11 (DICT ₅₀ /0.1 ml)	SUEROS	
	Antipolio 1 (DICT ₅₀ /0.1 ml)	Anti SA-11 (DICT ₅₀ /0.1 ml)
10 ⁵	2 X 10 ⁴	negativo
10 ⁴	2 X 10 ⁴	2 X 10 ³
10 ³	2 X 10 ⁴	2 X 10 ⁵
10 ²	2 X 10 ³	2 X 10 ⁵
10	2 X 10 ³	2 X 10 ⁶
1	2 X 10 ³	2 X 10 ⁶

Controles:

2 U.N. Antipolio 1 + 50 DICT₅₀ Polio-1 = Negativo
 2 U.N. Antipolio 1 + 50 DICT₅₀ SA-11 = 2⁺
 20 U.N. Anti SA-11 + 50 DICT₅₀ SA-11 = Negativo
 20 U.N. Anti SA-11 + 50 DICT₅₀ Polio-1 = 4⁺
 Polio-1 = 10⁶DICT₅₀/0.1 ml
 SA-11 = 10⁴DICT₅₀/0.1 ml

*Promedio de 3 ensayos por triplicado.

TABLA 7
INFLUENCIA DEL TIEMPO DE INOCULACION PREVIA CON VIRUS
HERPES SIMPLE 1 SOBRE LA INFECCION ULTERIOR CON LA
CEPA VACUNAL DE VIRUS POLIO TIPO 1. EFECTO CITOPATICO
OBSERVADO*

Tiempo de infeccion entre virus herpes y poliovirus (horas)	Tipo de Efecto Citopatico	
	Herpes-1	Polio-1
2	+	-
6	+	-
24	+	-

*Celulas MA-104 infectadas con 100 DICT₅₀/0.1 ml de virus herpes 1 y con 100 DICT₅₀/0.1 ml de poliovirus 1. Tres ensayos.

TABLA 8.
EFECTO CITOPATICO OBSERVADO SEGUN LA CANTIDAD DE VIRUS
HERPES-1 UTILIZADO VS. 100 DICT₅₀ DE VIRUS POLIO-1*

Cantidad de Herpes-1 (DICT ₅₀ /0.1 ml)	Tipo de Efecto Citopatico	
	Herpes-1	Polio-1
10 ⁴	+	-
10 ³	+	-
1	-	+

*Celulas MA-104. Tres ensayos.

V
P

R

FIGURE 1 Vp- Viroplasma polio

Exposure: 4 hr. R- Rotavirus

30 000X



FOTO 2

R= Rotavirus

30 000X



FOTO 3
Ensayo 24 hr.

R- Rotavirus
M N- Membrana Nuclear

30 000X

FIG 4
Ensayo: Control SA-11
M C- Membrana Celular
M N- Membrana Nuclear
N- Nucleo
R- Rotavirus
20 000X

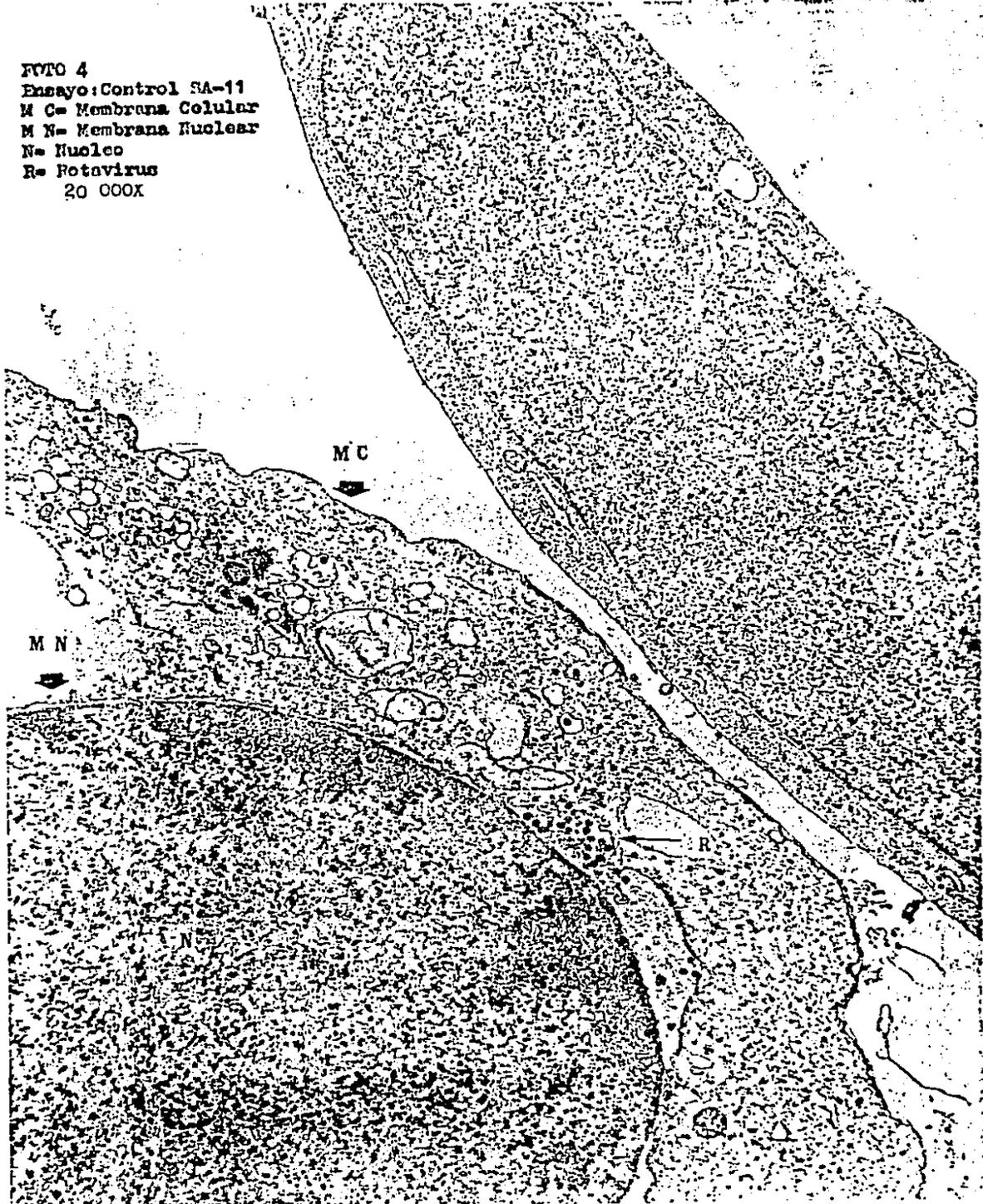




FOTO 5

Ensayo: Control SA-11

M N = Membrana Nuclear

R = Rotavirus

30 000X

FOTO 6

Ensayo: 1 hr.

V P= Viroplasma polis

M N= Membrana Nuclear

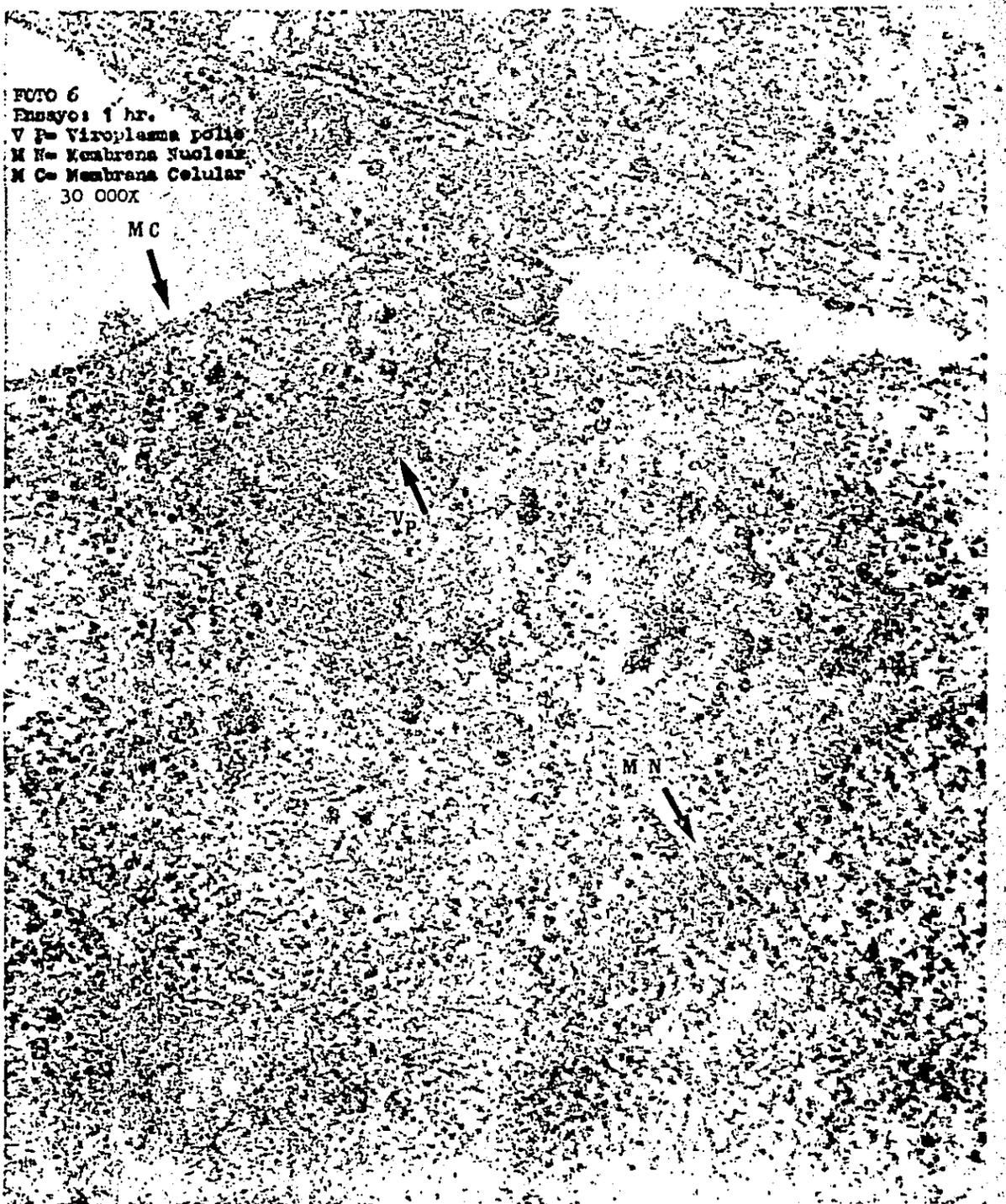
M C= Membrana Celular

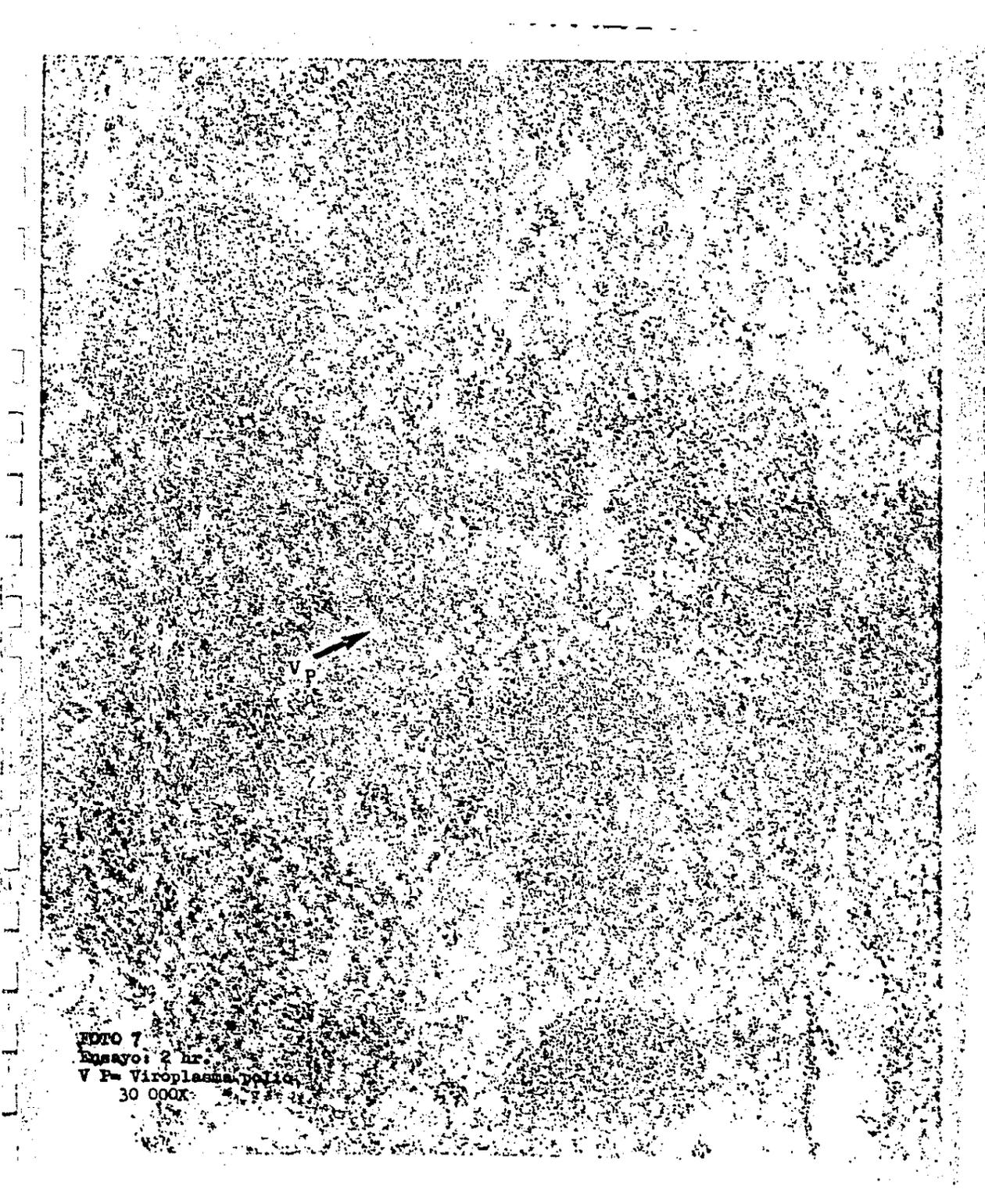
30 000X

MC



M N





V P

FOTO 7

Ensayo: 2 hr.

V P= Viroplasma polio.

30 000X

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

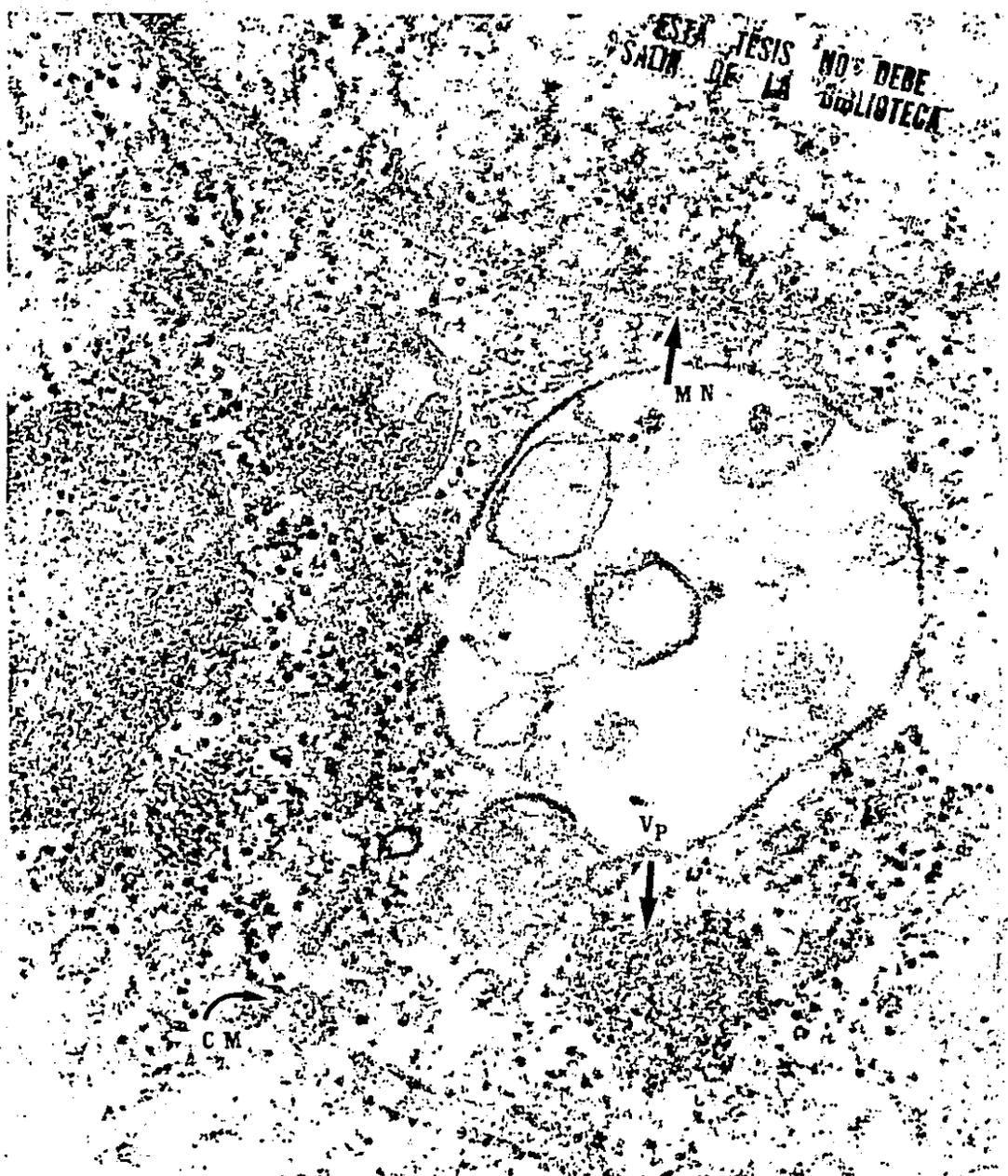


FOTO 8
Ensayo: Control Folio-1

M N= Membrana Nuclear
C M= Cuerpos rodeados por Membrana
V P= Viroplasma folio

30 000X

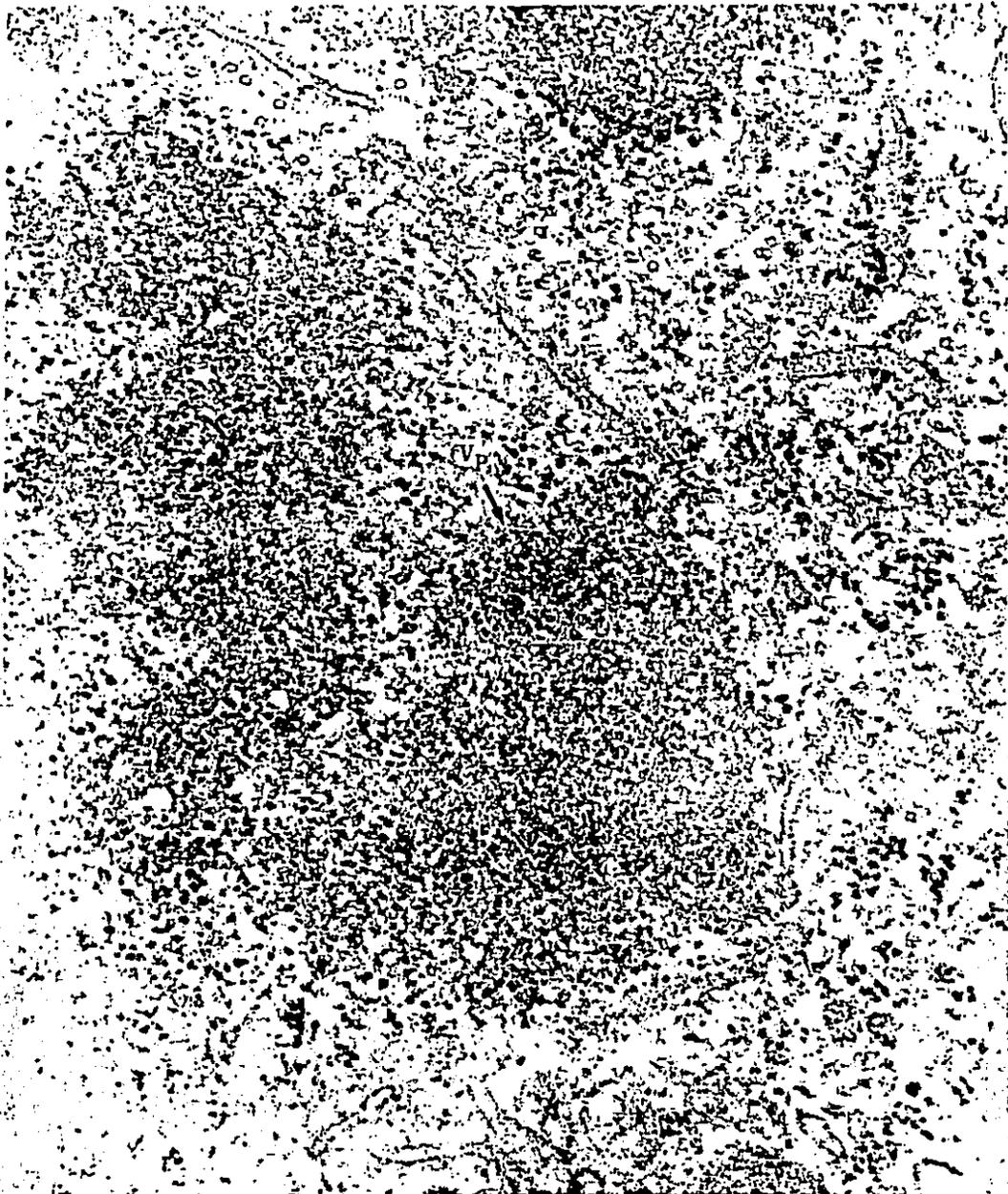


FOTO 9
Ensayo: Control Polio-1

V P- Viroplasma polio
30 000X

T- Mitochondria

FOTO 10
Ensayo: Control Celular
(sin infectar)

M C= Membrana Celular

M T= Mitochondria

R E= Reticulo Endoplasmico

30 000X



DISCUSION.

Debido a que se ha implicado a la interferencia viral como una de las posibles causas de la falla de la vacuna con virus vivos atenuados de poliomieltis y a que los rotavirus son uno de los agentes infecciosos a nivel intestinal más frecuentes en los niños menores de 5 años, decidimos estudiar la posible interferencia del rotavirus SA-11 sobre el poliovirus vacunal tipo 1, analizando la influencia del tiempo y la concentración viral entre la infección con el rotavirus y la infección ulterior con poliovirus.

En nuestro estudio por el tipo de E.C.P. observado, los títulos de los ensayos de reducción de la infectividad y la observación de células infectadas mediante microscopía electrónica, se demostró que en tiempos cortos entre la infección con ambos virus (menor a 8 h) el virus que se replicó fue el polio contrastando con la replicación del rotavirus en los tiempos largos de la infección (24 y 36 h). Sin embargo se obtuvo replicación de ambos virus en tiempos intermedios (8 h).

La explicación de estos resultados pudiera ser:

a) Que los ciclos de replicación del poliovirus son más cortos que los del rotavirus, Dales y cols. (27) al estudiar por microscopía electrónica células HeLa infectadas con poliovirus 1, encontraron que entre 5 y 6 h es posible observar cristales de viriones maduros. Por otro lado, Kolb y Altenburg (19, 21) observaron que al infectar células de

rión de mono MA-104 con rotavirus SA-11 éste mostraba un período de eclipse de 4 h y era posible observar las partículas virales hasta 8 h postinoculación y la excreción viral máxima ocurría entre las 18 y 24 h.

b) Que el poliovirus tiene la capacidad de inhibir la síntesis de proteínas de la célula huésped así como la de otros virus, tal es el caso del virus de la estomatitis vesicular (VSV), cuando son inoculados previamente al poliovirus (30). Esta inhibición se debe a que no se permite la formación del complejo ribosomal y por lo tanto no se lleva a cabo la traducción de los ARNs mensajeros tanto de la célula huésped como la de otros virus diferentes al del propio poliovirus.

Todo lo anterior sugiere que el rotavirus SA-11 no es capaz de interferir con la replicación del poliovirus 1, y solamente en períodos largos de infección cuando la replicación del rotavirus se ha completado, el poliovirus es incapaz de multiplicarse.

En cuanto a la cantidad del rotavirus SA-11 utilizada, sobre una dosis constante de poliovirus, todos nuestros ensayos mostraron que los rotavirus fueron los únicos virus replicados al infectar las células con dosis 10 veces mayores a las del poliovirus (10^5 DICT₅₀ contra 10^2 DICT₅₀); cuando la cantidad de los rotavirus fue 10^2 veces mayor, se observó la replicación de ambos agentes, y a partir de una dosis 10 veces mayor o incluso en desventaja, el rotavirus no se pudo replicar. Estos resultados pueden explicarse de acuerdo a las razones anteriormente expuestas.

Los títulos de las cosechas en los ensayos de reducción de la infectividad con 10^6 y 10^2 DICT₅₀ (tabla 6), mostraron solo una disminución de 10^6 a 10^3 al utilizar suero antipolio 1, lo que no corresponde a lo esperado ($10^2 - 10$); debido a que la cantidad de suero no fue la óptima, por que el suero antipolio también contenía anticuerpos antirotavirus (39), solo la concentración de 2 U.N. del antipolio neutralizaba el efecto producido por el polio 1 y no el efecto del rotavirus SA-11.

Los experimentos control al infectar células MA-104 con virus herpes simple tipo 1, previo a la infección con poliovirus 1, mostraron un E.C.P. característico del primer virus, en todos los tiempos y con 2 de las cantidades de virus herpes empleada, esto indica que el virus herpes se puede replicar cuando es inoculado antes del poliovirus. Solamente con dosis infectantes muy bajas del virus herpes, el polio 1 fue capaz de multiplicarse. Estos resultados demuestran que el comportamiento observado con el binomio rotavirus/poliovirus es característico de ambos ya que es diferente al comportamiento entre el binomio virus herpes/poliovirus.

El virus herpes probablemente pudo replicarse e interferir al poliovirus por que el primero también tiene la capacidad de inhibir la síntesis proteica de la célula huésped y dirigir la maquinaria metabólica celular a la síntesis de sus propios componentes en el proceso de replicación.

En conclusión en este modelo *in vitro* no hubo

interferencia del rotavirus sobre el poliovirus. Por otro lado la disminución o ausencia de multiplicación de poliovirus con inóculos previos muy altos de rotavirus o después de intervalos prolongados de los 2 virus, se debe a las condiciones experimentales extremas y no a una interferencia.

Estos resultados *in vitro* no descartan la conveniencia de llevar a cabo estudios de interferencia de rotavirus sobre poliovirus en modelos *in vivo*, debido a las diferencias que inevitablemente existen en estos dos sistemas.

BIBLIOGRAFIA.

1. Fenner, F. y D. O. White.: *Virología Médica*. 2a. ed. La Prensa Médica Mexicana. México. 1981.
2. PAHO Bulletin. Vol. 19, No. 4, pp.389-91. 1985.
3. Anónimo: Información epidemiológica. *Poliomielitis. Boletín mensual de epidemiología*. 2; (2),p.19.1987.
4. Anónimo: Información epidemiológica. *Poliomielitis. Boletín mensual de epidemiología*. 2; (6),p.68. 1987.
5. Ruiz-Gomez, J.; et al.: Respuesta de la revacunación contra polio-1 en niños seronegativos despues de haber recibido 3 o mas dosis de vacuna. *Gaceta Médica de México*.
6. Kumate, J.: *Poliomielitis anterior aguda*. En: *Manual de Infectología*. Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México. 6a. ed. México. pp. 170-85. 1978.
7. Fenner, F.; et al.: *The Biology of Animal Viruses*. Academic Press London. 1974.
8. Anestad, G.: Interference between outbreaks of respiratory syncytial virus and influenza virus infection. *Lancet*. february 27, pp. 502. 1982.
9. Adams, R.H. y D.T. Brown.: BHK cells expressing sindbis virus-induced homologous interference allow the translation of non structural genes of super infecting virus. *Journal of Virology*. Vol. 54, No 2, pp. 351-57. 1985.
10. Sabin, A.; et al.: Live, orally given poliovirus vaccine. *JAMA*. 173 (14). pp. 1521-26. 1960.
11. Hale, J.H.; L.H. Lee y S.P. Gardner.: Interference patterns encountered when using attenuated poliovirus vaccines. *British Med. Journal*. 2. pp 728-32. 1961.
12. Kumate, J.: *Poliomielitis*. En: *Inmunidad Inmunización Vacunas*. Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México. 1a. ed. México. pp. 75-93. 1977.
13. Wu, E.H.; et al.: Estudio sobre la etiología viral de la diarrea aguda del lactante e influencia de la vacunación Sabin sobre la flora de enterovirus. *Rev. Chil. Pediat.* 42. pp. 225-38. 1971.
14. Ashley, C.R.; E.O. Caul y K. Paver.: *Astrovirus-associated gastroenteritis in children*. *J. Clin. Pathol.* 31. pp. 939-43. 1978.
15. Spratt, H.C.; et al.: *Nosocomial infantile gastroenteritis associated with minirovirus and calicivirus*. *J. Pediatr.* 93 (6). pp. 922-25. 1978.
16. Madeley, C.R.: *Comparison of the features of astroviruses and caliciviruses seen in samples of feces by electronic microscopy*. *J. Infect. Dis.* 139 (5). pp. 519-23. 1979.
17. Cukor, G. y N.R. Blacklow.: *Human viral gastroenteritis*. *Microbiological Reviews*. 48 (2). pp. 157-79. 1984.
18. Fields, B.N.; et al. (Editors): *Virology*. Raven Press New York. pp. 863-906. 1985.
19. Altenburg, B.C.; et al.: *Ultrastructural study of*

rotavirus replication in cultured cells. *J. Gen. Virol.* 46. pp. 75-85. 1980.

20. Esparza, J.; et al.: Multiplication of human rotavirus in cultured cells. 47. pp. 461-72. 1980.

21. Kolb, M.E.; et al.: Simian rotavirus SA-11 replication in cell cultures. *J. of Virology.* 31 (3). pp. 810-15. 1979.

22. Bablian, R.: Structural and functional alterations in cultured cells infected with cytotoxic viruses. *Progr. Med. Virol.* 19. pp. 40-83. 1975.

23. Davies, B. D.; et al.: *Tratado de Microbiología.* Ed. Salvat, 2a. edición. Barcelona, España; 1978.

24. Melnick, J.L.; H.A. Wenner y C.A. Phillips; Enteroviruses. En: Diagnostic procedures for viral, Rickettsial and Chlamydial infections. Ed. Lennette E.H. y N.J. Schmidt. 5a.ed. American Public Health Association. New York. pp. 471-534. 1979.

25. Gutierrez, G.; et al.: Neurovirosis. En: *Jornada Pediátrica 1965.* Hospital de Pediatría, CMN.IMSS.1968. pp. 307.

26. Ed. Lennette E.H. y N.J. Schmidt: General principles underlying laboratory diagnosis of viral infections. 5a. ed. Ed. American Public Health Association. New York.

27. Dales, S.; et al.: Electron microscopic study of the formation of poliovirus. *Virology* 26. pp. 379-89. 1965.

28. Ruiz-Gómez, J.; et al.: Estado actual de la poliomieltis en México. *Gaceta Med. (Méx.)* 102. pp. 629-40. 1971.

29. Ruiz-Gómez, J.; et al.: Rotavirus II. Virus relacionados con la gastroenteritis aguda en el niño. *Arch. Invest. Med. (Méx.)* 12 (1). pp. 133-40. 1981.

30. Brown, D.; et al.: Translation of capped and uncapped VSV mRNAs in the presence of initiation factors from poliovirus-infected cells. *Virology* 123. pp.60-8. 1982.

31. Wyatt, R.G.; et al.: In vitro cultivation in human fetal intestinal organ culture of a reovirus-like agent associated with nonbacterial gastroenteritis in infants and children. *J. Infect. Dis.* 130 (5) pp. 523-28. 1974.

32. Ogra, P.L. y H.S. Faden.: Poliovirus vaccines: Live or death. *J. Pediatr.* 108 (6). pp.1031-33. 1986.

33. Jacobs, J.: Immune response of neonates to oral poliomyelitis vaccine. *Br. Med. J.* 289 (6449). pp. 881. 1984.

34. Mertens, T.H.; J.E. Eggers.: Vaccine associated poliomyelitis. *Lancet* 2 (8416). pp.1390-1. 1984.

35. Morens, D.M.: Poliovaccine strategy. *Lancet* 1 (8423). pp. 285-6. 1985.

36. Evans, D.M.: Increased neurovirulence associated with a single nucleotide change in a noncoding region of the Sabin type 3 poliovaccine genome. *Nature* 314 (6011). pp. 548-50. 1985.

37. Middleton, P.J.: Pathogenesis of rotaviral infection. *J.A.V.M.A.* 173, No. 5 (2). pp. 544-45. 1978.

38. Vesikari T.: Rotavirus infections and their preven-

tion by vaccination. Antiviral Res. Suppl. 1;pp. 293-300.
39. Bryden, A. S.; Thouless, M. E. y Flewett, T. H.:
Rotavirus in rabbits. Vet. Rec. 99, pp. 323. 1976.