



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES CONTRA
POLIO-VIRUS POR EL METODO DE
MICROTITULACION

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO
BIOLOGO

P R E S E N T A
MARIA ELSA ESCUDERO GARCIA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

CLAS: Tesis

AÑO: 1975

FECHA: _____

PROC: Mt. 97

S: _____



UNAM

JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE SEGUN EL TEMA:

PRESIDENTE: PROFR. OSCAR AMOR DODERO
VOCAL: PROFR. MAGDALENA ACOSTA SEGURA
SECRETARIO: PROFR. SALVADOR MARTIN SOSA
1er. SUPLENTE: PROFRA. ERNESTINA BALLESTEROS RUEDA
2o. SUPLENTE: PROFRA. SOCORRO CAD ROMERO MARTINEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

LABORATORIO DE VIROLOGIA DEL HOSPITAL DEL NIÑO
I.M.A.N.

SUSTENTANTE: MARIA ELSA ESCUDERO GARCIA.

ASESOR DEL TEMA: DR. SALVADOR MARTIN SOSA.

A mi esposo:

Dr. Horacio Ruiseñor Delgado
sinónimo de comprensión y ternura.

A mis padres:

Sr. Santiago Escudero Alonso
Sra. Evelia G. de Escudero
Por la confianza y cariño que siempre me han
demostrado.

A mi hermana:

Carmen Escudero García
Con inmenso cariño.

I N D I C E

	Pág.
INTRODUCCION	1
1 GENERALIDADES	3
2 MATERIAL Y METODOS	25
3 RESULTADOS Y DISCUSION	49
CONCLUSIONES	59
BIBLIOGRAFIA	61

INTRODUCCION

Los agentes causales de la poliomielitis pertenecen al grupo de los Picornavirus, nombre propuesto por los expertos en enterovirus y aceptado por el Comité de Nomenclatura Internacional. Los Picornavirus -- constituyen probablemente el grupo más numeroso y más importante de los virus patógenos humanos. Son también los más pequeños y contienen ácido ribonucleico (ARN), de ahí el nombre de "pico" (pequeño) ARN virus. El grupo se ha dividido en dos subgrupos, el de los enterovirus (encontrados principalmente en el conducto entérico) y el de los rinovirus (encontrados originalmente en la nariz).

Los enterovirus, a su vez, comprenden los virus de poliomielitis, los Coxsackie y los ECHO.

Esta clasificación se basa en el hecho de tener propiedades bioquímicas y biofísicas comunes, así como bastantes similitudes por lo que toca a su patogenicidad. Desde este punto de vista, los poliovirus son indudablemente los más importantes, tanto por la relativa frecuencia de las formas paráliticas como por la severidad de éstas y las escasas posibilidades de recuperación de las secuelas, debido a que las lesiones neuronales ocasionadas por estos virus son prácticamente -- irreversibles.

El hecho de que esta enfermedad sea prevenible mediante el uso de vacunas de gran efectividad y seguridad, ha creado la necesidad de realizar una vigilan

cia y control epidemiológico continuos a fin de racionalizar el uso de los productos inmunogénicos frente a -- condiciones cambiantes de la inmunidad al nivel comunitario.

El mejor procedimiento para evaluar la condición inmunitaria de un individuo o de un grupo de individuos es la encuesta serológica, ya que permite precisar por métodos de laboratorio la presencia y aún el nivel de anticuerpos específicos a un determinado agente patógeno. La notificación de casos paralíticos de poliomiélitis suele ser parcial y no siempre es posible -- confirmar por el laboratorio la etiología de la parálisis, y los individuos sanos pueden estar inmunes a consecuencia de infecciones sub-clínicas (asintomáticas), y de hecho esto es lo que ocurre en la mayoría de los -- casos.

Este estudio es una contribución al conocimiento de la condición inmunitaria de varios grupos humanos de una región del sureste de nuestro país.

CAPITULO I GENERALIDADES

HISTORIA

La poliomielitis es una enfermedad febril aguda que usualmente se reconoce por el repentino e inesperado ataque a una o más extremidades, las cuales presentan una gran debilidad primero y luego parálisis de diversa severidad y extensión.

Ocurría en forma epidémica en especial durante los meses de verano, pero sus características epidemiológicas se han modificado considerablemente a consecuencia del uso masivo de vacunas.

Un aspecto interesante de los inicios de la poliomielitis fue su tardía caracterización. En el siglo XIX, no obstante numerosas evidencias de que se presentaba desde la antigüedad, la confusión con otras enfermedades paralíticas y el nebuloso entendimiento que se tenía de las enfermedades neurológicas y musculares en general, hizo que la poliomielitis no fuera catalogada claramente como una entidad clínica hasta que se presentó un número elevado de casos (1).

Un trascendental momento en la historia de la poliomielitis fue la transmisión experimental de la enfermedad a monos realizada por Landsteiner y Popper. El desconocimiento de la vía de entrega y la forma de diseminación en el organismo se prolongó por muchos años. Se aclaró a través del concepto de neurotropismo, el cual implica la diseminación del virus a través de fi-

bras nerviosas en el SNC, y el haber demostrado la participación del sistema linfático en la diseminación del virus en el organismo (2).

Hacia 1938 se observó que los poliovirus se encuentran regularmente en la materia fecal de los enfermos; algunos avances mayores que se lograron en esa época fueron la adaptación de la cepa Lansing a ratas y ratones llevada a cabo por Armstrong (3), y otros eventos que abrieron el camino para cuantificar la actividad de estos virus y los anticuerpos neutralizantes específicos.

Finalmente, en 1949 Enders y colaboradores -- anunciaron su trascendental descubrimiento de que la replicación del agente causal de la poliomiелitis podía llevarse a cabo en cultivos de tejidos sin células nerviosas.

PROPIEDADES DEL VIRUS

ESTRUCTURA VIRAL

La fina estructura de los picornavirus continúa siendo objeto de controversia.

A partir de estudios realizados en material purificado se asignó a las partículas un diámetro de 28nm (4); sin embargo, actualmente se acepta como diámetro promedio 20nm. Los estudios de difracción con rayos X indican la presencia de una cubierta proteica de simetría icosaédrica con 60 subunidades de 60 a 65 nm (5).

El análisis realizado con poliovirus purificado ha revelado una composición del 20-25% de ARN, el cual está en forma de un solo filamento con peso molecular de 2.6 millones de daltones. El ARN puede ser liberado por tratamiento con soluciones concentradas de urea, el cual deja intacta la cubierta proteica (6). Se ha establecido también la composición de ARN para los tres serotipos y la composición en aminoácidos de la cubierta proteica.

Los enterovirus son resistentes al ácido del jugo gástrico y a la bilis del contenido intestinal.

Una propiedad que indica la ausencia de lípidos o lipoproteínas en los viriones de poliovirus es la resistencia al éter, cloroformo y detergentes.

Los poliovirus son estables a pH=3 pero son -

inactivados rápidamente por el calor, formaldehído y -- radiación ultravioleta.

COMPOSICION ANTIGENICA

Se han encontrado tres antígenos distintos - para cada serotipo de poliovirus (7); el antígeno D, -- que sedimenta a 160s, se relaciona con partículas virales completas. El antígeno C, que sedimenta a 80s, se relaciona con partículas carentes de ARN, y el S se obtiene por degradación usando guanidina o urea. El antígeno C puede ser producido a partir del D por calentamiento a 56°C, por radiación ultravioleta o por tratamiento químico (8 y 9).

Las cepas prototipo originales fueron denominadas Brunhilde, Lansing y Leon, que en la actualidad -- se designan como tipos 1, 2 y 3 respectivamente.

La demostración de cierto grado de protección cruzada indica la existencia de grupos antigénicos comunes al tipo 1 y 2 (10). Estudios posteriores han indicado que anticuerpos neutralizantes (en pequeña cantidad) contra el tipo 2 pueden ser producidos por la infección con el tipo 1 (11 y 12).

REPLICACION EN CULTIVO DE TEJIDOS

El descubrimiento de que los poliovirus pueden ser replicados in-vitro, en tejido no nervioso de -- primates (hombre o mono), abrió una nueva fase en la investigación sobre poliomiелitis. Pronto se encontró -- que tanto cultivos primarios como líneas celulares de --

una amplia gama de órganos de primates y de tumores humanos eran susceptibles a estos virus.

El desarrollo del método de placa para el crecimiento viral, así como las pruebas sobre cultivos de tejidos en monocapas epiteliales derivadas de la tripsinización de células de riñón de mono, representaron importantes avances en el cultivo de poliovirus.

Los poliovirus son altamente citocidas. Los efectos citopáticos progresan rápidamente, en tal forma que las células afectadas se retraen y desarrollan un aumento en la refringencia; el citoplasma se hace granuoso, hay picnosis y finalmente lisis.

HUESPEDES SUSCEPTIBLES

Los poliovirus son específicos del hombre y de las especies cercanas afines. Esto se atribuye a la presencia, en el cápside viral, de grupos químicos complementarios a los sitios correspondientes de enlace (receptores) en la membrana de las células susceptibles.

MULTIPLICACION VIRAL

Vamos a tomar como "modelo" de multiplicación viral de los poliovirus al tipo 1.

Este virus sin envoltura, icosaédrico, contiene una molécula de ARN de filamento único con un peso molecular de 2.6 millones de daltones. Se multiplica

en estrecha relación con las membranas.

La molécula de ARN progenitora viral se adhiere rápidamente a los ribosomas, donde sirve como ARNm - policistrónico, muy grande, para la traducción directa en proteína, la cual después se rompe en dos o más moléculas más pequeñas. Luego, éstas se parten para producir las cuatro proteínas estructurales del virión, junto con ciertas proteínas que no son del cápside, encontradas en las células infectadas.

Una de estas proteínas nuevas es la ARN polimerasa dependiente de ARN sintetasa requerida para catalizar la réplica de ARN viral. Obviamente es difícil que una proteína así esté presente en células no infectadas, acostumbradas a la transcripción de ARN por el ADN-templete solamente.

La síntesis de ARN viral comienza alrededor de media hora después de la infección y prosigue espontáneamente por unas tres horas, cuando ya hay aproximadamente 250,000 moléculas nuevas de ARN viral en la célula infectada.

Los detalles precisos de la replica del ARN viral continúan sujetos a investigaciones intensivas. En primer lugar, el filamento progenitor (positivo) sirve como plantilla o templete para la transcripción de un filamento complementario (negativo). Este filamento negativo sirve como plantilla para la producción de nuevos filamentos positivos.

El recubrimiento del ARN viral por las proteínas del cápside se hace rápidamente utilizando la gran concentración de polipéptidos estructurales. El primer paso en la construcción del virión parece que involucra el ensamble de pequeñas subunidades proteicas en una estructura conocida como "procápside". Subsecuentemente, la molécula de ácido nucleico viral entra y uno de los polipéptidos del procápside se adhiere entre dos moléculas más pequeñas, que conducen a la formación del vi-
rión completo.

FACTORES QUE DETERMINAN LA INFECCION CON POLIOVIRUS

La poliomiелitis es primeramente una infección intestinal y la parálisis puede ser considerada una complicación. Para que se presente la enfermedad es muy importante tanto las condiciones del huésped como factores virales. En el caso del huésped es muy importante la presencia o ausencia de anticuerpos neutralizantes en la sangre. Estos anticuerpos se pueden adquirir ya sea en forma pasiva (heredados de la madre o por inyección de globulina gama) o activa, debido a una infección natural o a la aplicación de las vacunas. Los anticuerpos transplacentarios son eliminados paulatinamente a partir del nacimiento, así que después de varios meses (6-12) el niño queda desprotegido contra la infección natural. La inmunidad que se adquiere en forma natural (sub-clínica o paralítica) o por medio de vacunación oral con virus atenuados protege al individuo por el resto de su vida; la vacuna inactivada produce una respuesta inmunológica temporal por lo cual debe ser administrada periódicamente para mantener la protección contra la infección por estos virus.

Lo que se sabe acerca de la patogénesis de la poliomiелitis procede de estudios realizados en monos. Los estadios tempranos de la infección con poliovirus fueron demostrados primero en chimpancés alimentados con virus virulentos (18).

El virus poliomiелítico habitualmente se introduce en el organismo por la boca; después de la ingestión, se multiplica primero en la faringe y luego en el intestino delgado, encontrándose involucrado en este

proceso el tejido linfoide (amígdalas y placas de Pe- - yer). Su extensión a los nódulos linfoides de drenaje conduce a la viremia, lo cual propicia que el virus se disemine ampliamente en todo el cuerpo. El virus es lle- vado vía la corriente sanguínea a la médula espinal y - de aquí puede diseminarse hacia bulbo raquídeo y otras estructuras cerebrales. En el tejido nervioso, el vi- - rus infecta y destruye las neuronas motoras, lo cual -- explica el que las secuelas sean irreversibles.

Los ejercicios físicos pueden precipitar o -- agravar la parálisis, principalmente cuando se hace en forma continua en la fase preparalítica (13 y 14).

La extirpación de las amígdalas es otro fac- - tor que predispone a la forma bulbar de la enfermedad - (15).

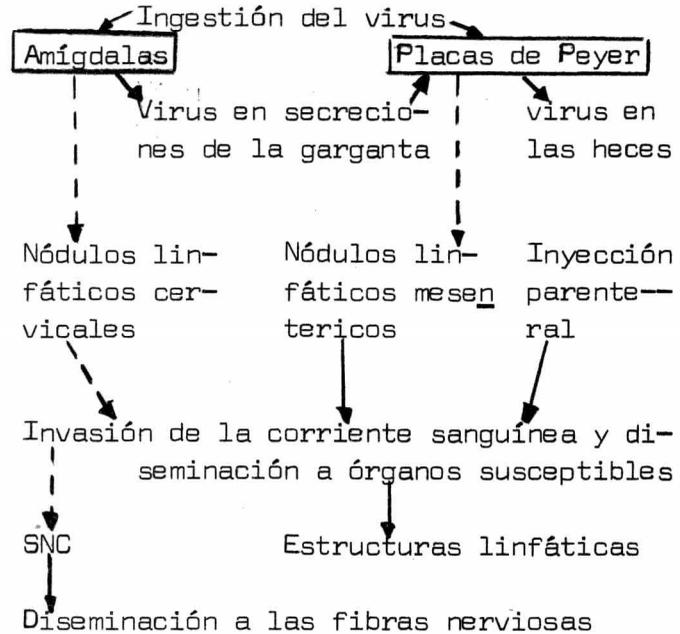
En la mujer embarazada se observa una mayor - incidencia a contraer la enfermedad que en la mujer no embarazada de la misma edad (16).

Por lo tanto la infección no sólo depende de la infectividad del virus sino también de las defensas tanto específicas como no específicas del huésped.

La manifestación más frecuente de infección - por poliovirus en el hombre es la excreción del virus - en las heces, que se inicia por lo general una o dos se - manas antes de que se presenten síntomas (17), y puede prolongarse 3 ó 4 semanas más.

SITIOS DE MULTIPLICACION VIRAL

- 1.- Vía alimentaria para la diseminación del virus
- 2.- Vía linfática
- 3.- Vía sanguínea
- 4.- Vía neuronal



Esquema que ilustra los sitios primarios de implantación y de multiplicación viral en chimpancés, y caminos de diseminación viral en el organismo. Los sitios primarios están encerrados en cuadros.

Según el grado de diseminación en el SNC y la extensión de las lesiones, la poliomielitis puede pre-sentar muy diversos grados de severidad, inclusive la -muerte. En la gran mayoría de los casos, la infección -por virus poliomiélico no se extiende más allá del --tracto gastro-intestinal, es decir, se presenta cuando mucho un cuadro diarréico habitualmente de corta dura--ción y de escasa severidad; se habla entonces de "poliomielitis sub-clínica o asintomática".

En algunos casos pueden presentarse síntomas sugestivos de la enfermedad, pero éstos desaparecen sin dejar secuelas y en tales casos se ha utilizado la ex--presión "poliomielitis abortiva".

En condiciones "naturales", es decir, antes --del uso masivo de vacunas, solo una pequeña proporción de individuos (1 de cada 2000 aproximadamente) desarro--llaba un cuadro paralítico característico.

La parálisis involucra a los músculos inerva--dos por la región afectada de la médula; cuando el vi--rus alcanza el bulbo raquídeo, se presenta la forma --"bulbar", muy severa y que involucra los centros respi--ratorios y vasomotores.

El patrón de la enfermedad es diferente en ni--ños y en adultos. En niños la enfermedad suele presen--tarse en forma más o menos repentina, en cambio en adultos es gradual y más severa generalmente.

EPIDEMIOLOGIA

Siendo entéricos en su habitat, los poliovirus se propagan principalmente por la vía fecal-bucal. El modelo común de transmitir la infección es por medio de las heces contaminadas o de gotas de saliva procedentes de la nasofaringe, éste último en mínima proporción.

Las moscas sin duda pueden diseminar materia fecal contaminada, aunque es obvio que no son esenciales para mantener la cadena de transmisión. Los virus han sido aislados de varias especies: Mosca doméstica, *Phaenicia seriata* y *Phaenicia regina*.

En los trópicos, la enfermedad es endémica durante todo el año. En países templados, en contraste, tiende a ser más frecuente durante el verano, pero los patrones epidemiológicos se han modificado considerablemente en todas aquellas regiones o comunidades donde se han utilizado vacunas antipoliomielíticas en escala importante.

La diseminación de los poliovirus es propiciada por las malas condiciones sanitarias, por la falta de hábitos higiénicos y por la proporción baja de individuos inmunes en una comunidad. La cadena de transmisión de estos virus puede romperse si se logra inmunizar al 80% de la población susceptible y se mejoran las condiciones y hábitos de higiene.

La poliomiелitis ha sido reducida significativamente en muchas partes del mundo, debido al uso masi-

vo de vacunas específicas. En algunas áreas tropicales, la enfermedad todavía es endémica, si bien ha logrado reducirse en forma considerable el número de casos paralíticos a pesar de no haberse utilizado vacuna en cantidad suficiente para modificar la diseminación de los virus.

Los países que han erradicado total o virtualmente la poliomielitis son: Cuba, Checoslovaquia, la Unión Soviética, los Estados Unidos de Norteamérica, China, Japón, los países escandinavos y la mayor parte de los demás países europeos.

En nuestro país, este problema ha evolucionado con relativa lentitud. Desde 1956 se inició la vacunación en gran escala con vacuna tipo Salk, y a partir de 1961 con vacuna oral de Sabin. Las estadísticas nacionales muestran los siguientes datos:

MORBILIDAD POR POLIOMIELITIS
ESTADOS UNIDOS MEXICANOS
1937-1970

AÑO	CASOS ¹	TASA ²
1937	25	.15
1938	23	.12
1939	23	.12
1940	24	.12
1941	25	.12
1942	23	.11
1943	22	.10
1944	47	.22

1945	28	1.13
1946	247	1.14
1947	212	.96
1948	653	2.90
1949	683	3.00
1950	804	3.10
1951	1834	7.30
1952	771	2.80
1953	1783	6.25
1954	609	1.80
1955	1824	6.01
1956	594	1.90
1957	1562	4.99
1958	904	2.80
1959	1877	5.90
1960	1126	3.12
1961	740	1.99
1962	483	1.25
1963	538	1.33
1964	424	1.03
1965	637	1.50
1966	1024	2.32
1967	648	1.42
1968	324	1.80
1969	324	1.4
1970	1662	3.39

- 1) Casos notificados a la Dirección de Epidemiología y Campañas Sanitarias.
- 2) Tasa por 100,000 habitantes.

Datos tomados de la Revista Salud Pública de México: Volumen XII-Número 1 Enero-Febrero 70.

DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

El diagnóstico se basa en el aislamiento del virus y la demostración de un aumento en el título de los anticuerpos específicos durante el curso de la enfermedad.

El virus se presenta en la garganta durante la fase aguda y en la materia fecal por varias semanas y ocasionalmente por meses. Las muestras de materia fecal que llegan al laboratorio para tal fin son positivas en un 80% de los casos, si han sido obtenidas en los primeros diez días a partir de que se inician los síntomas.

La prueba de neutralización y la de fijación de complemento son las que comunmente se utilizan para el diagnóstico serológico de la poliomielitis por el laboratorio.

Los anticuerpos neutralizantes aparecen pronto en el curso de la enfermedad. Títulos de 1:512 y aún mayores se presentan en el 60-70% de los pacientes en los primeros tres meses después del comienzo de la enfermedad y persisten durante toda la vida.

Debido a que los anticuerpos fijadores de complemento tienen un corto período de duración, el hecho de encontrar un título significativo en una prueba es un indicio de infección reciente.

PREVENCIÓN Y CONTROL EN LA REPÚBLICA MEXICANA

El control de la poliomielitis conseguido en varias partes del mundo en la última década, ha sido uno de los más espectaculares triunfos de la medicina preventiva. Anteriormente la enfermedad ocurría en grandes epidemias; en la actualidad su incidencia en los países más desarrollados ha sido reducida a cero o a menos de un caso parálítico por millón de habitantes. La vacunación es la base para el control de la enfermedad.

Los principales obstáculos para la preparación de la vacuna fueron pronto vencidos. Primero vino el conocimiento de los tres tipos antigénicos de poliovirus; a esto siguió la discusión de los métodos para lograr la producción de grandes cantidades de virus en células no derivadas de SNC. Salk desarrolló la técnica de inactivación del virus preservando el antígeno protector (19 y 20), y Sabin, posteriormente, desarrolló cepas de poliovirus atenuados para preparar una vacuna "viva".

La poliomielitis ha estado presente en México al menos desde fines del siglo pasado, y es un hecho que revistió características epidémicas hacia la mitad de la presente centuria; el descenso de la curva de morbilidad se inició en 1956 cuando empezó a utilizarse la vacuna tipo Salk.

A partir de 1962 se dispuso de la vacuna oral de Sabin preparada en México, lo cual permitió una mejor cobertura de la población susceptible; el descenso fue mayor hasta el año de 1969 en el que se observó una

tendencia ascendente, llegando en 1970 a alcanzar una tasa de morbilidad de 4.0 por cada 100,000 habitantes. Debe hacerse notar que a pesar de la morbilidad más elevada en estos últimos cinco años, nunca han vuelto a presentarse las elevadas tasas observadas antes de la aplicación de las vacunas.

Aún cuando es posible que tales incrementos se deban a un aumento real de casos paralíticos, existen evidencias de que la notificación a las autoridades sanitarias ha mejorado en forma notable y ello se ha reflejado en las estadísticas.

Mecanismo de acción.— Por lo que se refiere a la respuesta del organismo a la vacuna inactivada, su efectividad resulta de la estimulación de la producción de anticuerpos humorales, los cuales son capaces de neutralizar el virus.

Entre los factores que influyen en la magnitud de la respuesta (niveles de anticuerpos) tenemos la potencia del estímulo antigénico y el lapso entre una y otra dosis. Se requieren 2 dosis iniciales, espaciadas 30 días, y reactivaciones anuales, para mantener niveles protectores de anticuerpos.

Debido a la interferencia de los anticuerpos maternos, la primera dosis se debe administrar una vez que éstos hayan desaparecido de la sangre del niño (6 meses a 1 año de edad).

Se ha demostrado que los anticuerpos contra —

el tipo dos son más estables, mientras que para el tipo uno y tres tienden a disminuir con mayor rapidez (21).

Existen evidencias de que con la administración de esta vacuna se elimina en parte la circulación de virus silvestres (22), y por lo tanto hay menor incidencia de casos paralíticos en personas no vacunadas.

En la vacuna atenuada el virus se implanta en la faringe y se replica con rapidez; lo mismo ocurre a nivel de intestino delgado principalmente, iniciándose así la excreción de virus en la materia fecal, en grandes cantidades. La multiplicación que tiene lugar en el intestino delgado es muy extensa en los individuos susceptibles pero, como en la infección natural, depende mucho del individuo. La excreción del virus continúa por tres a seis semanas, y los niveles de anticuerpos que aparecen en el suero son similares a los producidos por la infección natural.

La diseminación extensa de otros enterovirus en la población puede causar interferencia a la efectividad de la vacuna oral y también las cepas vacunales pueden interferir con enterovirus silvestres (23 y 24). La interferencia entre los diferentes tipos de poliovirus en la vacuna también puede ocurrir cuando se administra una vacuna trivalente.

Tanto una como otra vacuna tienen sus ventajas y desventajas, las cuales se resumen en el siguiente cuadro:

VentajasDesventajasVacunas vivas

- | | |
|--|---|
| <ol style="list-style-type: none"> 1) Administración por vía natural 2) Producción de altos niveles de anticuerpos generalmente. 3) Producción local de anticuerpos (inmunidad celular). 4) Posibilidad de la erradicación al romperse la cadena de transmisión. | <ol style="list-style-type: none"> 1) Posibilidad de reversión a la virulencia (no demostrada aún) 2) Interferencia intratípica y por otros enterovirus (se contrasta administrando un número de 3 dosis a intervalos no menores de 2 meses). |
|--|---|

Vacunas inactivadas

- | | |
|---|---|
| <ol style="list-style-type: none"> 1) Posibilidad de vacunas polivalentes 2) Estabilidad (relativa) | <ol style="list-style-type: none"> 1) Se necesitan dosis múltiples y refuerzos periódicos. 2) Administración por inyección. 3) No se desarrolla inmunidad local. 4) Producción baja de anticuerpos humorales. |
|---|---|

Una de las principales razones por las cuales se extendió tan rápidamente el uso de la vacuna oral de

Sabin es su fácil administración: puede ser en forma líquida, requiriéndose de dos a tres gotas, y también se puede administrar en forma de caramelos (25); en cambio, el hecho de que la vacuna inactivada se administre en forma inyectada hace que la gente no la acepte tan fácilmente.

La historia en detalles del desarrollo de la vacuna oral ha sido presentada en muchas revistas (26, 27 y 28). Después de ser utilizada por más de 15 años — hay bastantes evidencias de su efectividad para prevenir la poliomielitis en países en donde se ha aplicado en gran escala, así como de su inocuidad.

Para la protección óptima de la población se recomienda iniciar la inmunización con campañas de vacunación masiva. Estas campañas deben de comprender el mayor número de individuos susceptibles, y previamente debe determinarse qué grupos (por edades) de la población no se han inmunizado en forma natural. Son los niños pequeños principalmente los que muestran mayor susceptibilidad. Estas campañas deben llevarse a cabo, de preferencia, durante los meses de invierno o primavera para evitar en lo posible la interferencia con otros enterovirus, los cuales circulan principalmente en los meses de verano.

Después de la aplicación masiva de vacunas es necesario establecer mecanismos eficientes de vacunación continua que permitan mantener baja la proporción de individuos susceptibles. Las campañas periódicas — pueden ser efectivas sólo parcialmente debido a que "entre campañas" se restablece el ciclo de transmisión de

los agentes.

En el caso particular de la vacuna oral de -- Sabin se ha recomendado (26) su aplicación en el recién nacido, para proteger a aquellos niños de pocos meses -- de edad que no tienen inmunidad heredada de sus madres. Esta práctica tiene como inconveniente principal la posibilidad de neutralización de los virus vacunales por los anticuerpos específicos presentes en el calostro y en la leche materna, de tal manera que cada dosis de va -- cuna debe administrarse varias horas (6 cuando menos) -- antes de que el niño reciba alimentación natural. Esta es una limitación cuando menos relativa pues exige un -- control cuidadoso de su administración. Por otra par -- te, este control sólo puede realizarse satisfactoriame -- nte en condiciones hospitalarias o institucionales, por lo cual es de creerse que en nuestro medio la vacuna -- ción del recién nacido no ha sido muy efectiva hasta -- ahora ya que se estima que no más del 25% de los naci -- mientos ocurren en tales condiciones.

Debido a que la incidencia de poliomiелitis -- en México parece haber aumentado, es necesario que los departamentos de medicina preventiva y epidemiología de la República se dediquen a estudiar a que se debe el -- aparente fracaso de nuestras campañas de vacunación.

Entre las preguntas que han surgido como cau -- sas probables de los resultados pobres obtenidos pode -- mos mencionar los siguientes: ¿la cobertura es la apro -- piada?, ¿la vacuna se distribuye homogéneamente en toda la República?, ¿ha aumentado efectivamente la notifica -- ción de casos paralíticos?, ¿llega la vacuna a todas --

partes con su potencia adecuada?, ¿las estadísticas sobre número de dosis administradas son veraces?, ¿en -- cuántos casos se ha confirmado el diagnóstico por métodos de laboratorio, únicos bastantes seguros?.

Las encuestas serológicas como la que se practicó en este trabajo aportan información útil para la - vigilancia epidemiológica, así como para precisar los - grupos humanos de mayor susceptibilidad, que son los de más alto riesgo de sufrir la enfermedad.

CAPITULO 2

MATERIAL Y METODOS

En el presente estudio se utilizaron 378 sueros de personas residentes en las siguientes poblaciones del sureste de la República: Lacanjá, Arriaga, Motozintla, Villa de Acala, Ejido de José María Morelos, - Puerto Madero y Río Florido. Estos sueros fueron obtenidos por investigadores del Centro de Investigaciones Ecológicas del Sureste (San Cristobal las Casas, Chiapas) y proporcionados al laboratorio de Virología del Hospital del Niño de la Institución Mexicana de Asistencia a la Niñez por el Dr. Fernando Beltran, Director del CIES.

Ha transcurrido más de medio siglo desde que fué posible, por primera vez, cultivar células in-vitro. Sin embargo, hasta el advenimiento de los antibióticos los cultivos celulares pudieron ser utilizados en procedimientos de rutina. Hoy en día cualquier tipo de célula de mamífero que sea capaz de dividirse in-vivo, también puede ser propagada in-vitro. Tales células suministran un sustrato ideal para la replicación de los virus.

Durante el desarrollo del trabajo se utilizó la línea celular HEp-2, establecida por A.E. Moore., L. Sabachewsky, and H.W. Toolan en 1952 (29). Esta línea celular fue obtenida a partir de tumores producidos en ratas destetadas, irradiadas y tratadas con cortisona - después de inyectarlas con tejido canceroso de la laringe de una mujer de 56 años.

El aislamiento in-vitro fue llevado a cabo en sueros humanos y de caballo y soluciones salinas balanceadas, y la línea celular subsecuentemente creció -- bien en diferentes medios de cultivo. Es una línea celular que resiste cambios relativamente importantes en las condiciones de temperatura, nutricionales y ambientales sin pérdida de viabilidad. Puede obtenerse de American Type Culture Collection y de laboratorios de Biología Celular, de Virología, de producción de vacunas antivirales, etc. Es conveniente conservar células congeladas en N_2 líquido para recuperar la línea en caso necesario.

Las células pueden cultivarse ya sea como cultivo de órganos (fragmentos) y como cultivo de células aisladas en suspensión ó monocapa. Las posibilidades de cultivar células in-vitro han aumentado grandemente por el desarrollo de medios químicamente definidos que contienen casi todos los requerimientos nutritivos para el crecimiento de las células humanas. Existen tres tipos principales de células cultivadas: cultivos primarios, cepas de células diploides y líneas celulares continuas ó estables.

Para la realización de este trabajo fue necesario adaptar la línea HEp-2 cultivada habitualmente en M-199 (medio de Morgan, Morton y Parker) (30) adicionado de 8% de suero fetal de ternera (SFT), 1% de mezcla de antibióticos y 0.07% de bicarbonato de sodio, a crecer en medio de Leibovitz (31) conteniendo 8% de SFT -- más 1% de la misma mezcla de antibióticos.

La adaptación al medio de Leibovitz tuvo como

objeto evitar la necesidad de utilizar una incubadora - con CO_2 que se requiere en la técnica original a base - de cultivos celulares en medios con bicarbonato; la incubación en ambiente que contenga un 5% de CO_2 es indispensable para evitar la alcalinización de los medios amortiguados con un sistema fosfatos-bicarbonato. En nuestro caso la adaptación de las células HEp-2 se realizó sin dificultad en un solo sub-cultivo, pero antes de utilizarlas fueron subcultivadas cinco veces para reducir el riesgo de inestabilidad de los cultivos por -- una adaptación incompleta.

Cepas virales.- Se utilizaron las cepas vacunales de -
Sabin, principalmente por la seguridad que representa -
trabajar con ellas debido a su inocuidad aún para indi-
viduos susceptibles, además de que su especificidad co-
rrelaciona totalmente con la de las cepas naturales. -
Las cepas de Sabin se identifican como sigue:

Tipo	1	- - - - -	Lsc, 2ab
"	2	- - - - -	P 712, Ch, 2ab
"	3	- - - - -	Leon, 12a ₁ b

Preparación de las suspensiones virales

- 1.- Seleccionar al microscopio una botella cuyo tejido esté en buenas condiciones y cuya monocapa esté - - completa.
- 2.- Inocular 0.3 ml de la cepa viral que se desea re- - plicar en el cultivo celular seleccionado.
- 3.- Incubar a 37° C durante dos días, con el objeto - - que el efecto citopatogénico sea completo.
- 4.- Congelar la botella a -20° C durante 24 horas; en - - esa forma las células estallan y dejan en libertad las partículas virales recién formadas.
- 5.- Descongelar el medio (10 ml. aproximadamente) de la botella y centrifugar a 1500 rpm durante 20 min. - - en centrifuga refrigerada a 2 °C (el sobrenadante es la suspensión viral, el sedimento son restos celulares).
- 6.- Retirar el sobrenadante con una pipeta estéril y -- distribuirlo en varias alícuotas en tubos de 13x100, estériles también.
- 7.- La suspensión viral se guarda a -20 °C para ser uti- lizada posteriormente.

TECNICA UTILIZADA PARA LA TITULACION DE VIRUS

Material necesario

- 1.- Placas desechables de vinilo, con 96 cavidades, fondo plano (Limbro). Estas placas requieren un tratamiento previo a su utilización, que es el siguiente: Las placas son sumergidas en un recipiente con alcohol etílico Q.P. al 70%, durante 24 horas; al término de este lapso se enjuagan primero con agua de la llave (10 veces) y después con agua destilada (10 veces); después de dejarlas secar perfectamente son colocadas bajo la luz ultravioleta, a una distancia no mayor de 40 cm. del tubo emisor, por cuatro horas. En seguida se guardan en bolsas nuevas de plástico (colocadas también bajo la lámpara de UV) para utilizarlas posteriormente en el experimento.
- 2.- Pipetas de polietileno con punta calibrada (Cooke - Engineerig CO) de 0.025 ml., esterilizables en autoclave.
- 3.- Microdilutores (Limbro) de 0.025 ml. Se esterilizan a la flama.
- 4.- Medio de Leibovitz con 8% de SFT más 1% de antibióticos (se esteriliza por filtración).
- 5.- Suspensión de células HEp-2, conteniendo 400,000/ml.

Todo el material utilizado debe estar estéril y manejarse con técnica aséptica rigurosa. En este trabajo se utilizó un gabinete de flujo laminar.

Preparación de la suspensión de células

- 1.- Seleccionar al microscopio la botella que se desea - subcultivar (observar que el tejido esté en buenas - condiciones y la monocapa completa).
- 2.- Desechar el medio de mantenimiento de la botella.
- 3.- Agregar 2 ml. de mezcla tripsina-verseno de la si- guiente composición:

Tripsina (1:250) - - - - - 0.25 gr.

Verseno (EDTA disódico) - - - - 0.02 gr.

PBS (Dulbecco) (32) - - - - - cbp. 100 ml.

Esterilizar por filtración y congelar a - -
20 °C.

- 4.- Después de 1 a 2 minutos a temperatura de la estufa (37 °C), decantar esa tripsina y agregar 0.5 ml. de tripsina nueva.
- 5.- Dejar actuar la tripsina hasta que las células es- tén completamente desprendidas.
- 6.- Agregar 2.5 ml. de medio de Leibovitz para disgre- gar completamente las células, por medio de pipeteo enérgico.
- 7.- Una vez que se logra una suspensión unicelular, se pasa al conteo de células.

Método de conteo de células

- 1.- En un tubo de 13x100mm. medir 0.2 ml. de rojo neutro 1:500 más 0.8 ml. de la suspensión celular.
- 2.- Mezclar perfectamente y esperar 5-10 min.
- 3.- Llenar la cámara cuenta glóbulos.
- 4.- Esperar 1-2 min. y contar las células en los cinco cuadros grandes, incluyendo las células sobre las líneas de arriba y de la derecha. El núcleo de las células viables se tiñen con el rojo neutro.
- 5.- El cálculo se hace como sigue:

Número de células en los 5 cuadros x 2000= Número total de células /ml.

Volumen final a que se debe llevar la dilución inicial para tener la concentración celular deseada por ml. =

$$\frac{\text{Número de células dilución en los 5 cuadros} \times \text{inicial} \times 2000}{\text{Número de células deseadas/ml.}}$$

Titulación de la suspensión viral

- 1.- Colocar 2 gotas (0.050 ml.) del medio de crecimiento en cada una de las cavidades de la placa, usando una pipeta de 0.025 ml.
- 2.- Colocar una gota (0.025 ml.) de la suspensión viral en las cavidades de la fila H, usando una pipeta de 0.025 ml.
- 3.- Sumergir los microdilutores de 0.025 ml. en las cavidades de la fila H y mezclar por rotación de 10 a 15 veces.
- 4.- Pasar los microdilutores a la fila G y mezclar en la misma forma.
- 5.- Repetir lo mismo hasta la fila A.
- 6.- Después de mezclar en la fila A, vaciar los microdilutores en papel absorbente, enjuagar en agua destilada, sumergir en alcohol y pasar por la flama hasta el rojo.
- 7.- Adicionar 2 gotas (0.050 ml.) de la suspensión de células HEp-2 (400,000 cel/ml.) a cada una de las cavidades de la placa, usando una pipeta de 0.025ml.

Las placas se cubren con una hoja de plástico transparente flexible (tipo Ega-pac) y se colocan en charolas cuyos fondos tengan una compresa húmeda; se cubren a su vez con otra charola (de preferencia más pequeña), y se incuban a 35 °C durante 7 días.

Al terminar el período de incubación, cada cavidad es observada al microscopio para ver el efecto

citopatogénico típico de los virus de polio. Si las -
células en una cavidad muestran efecto típico, esa cavi-
dad se considera positiva. Es conveniente, y así se hi-
zo en este estudio, revisar la condición de las célu- -
las a los 3 y 5 días también.

Cálculos para determinar el título del virus

Concepto de dosis infetiva.- Kärber (34) y otros autores reportaron un método para determinar el 50% en el punto final.

El 50% en el punto final puede ser utilizado en varios tipos de reacciones; la que a nosotros nos interesa es la referente a virus y cultivo de tejidos, en la cual $DICT_{50}$ representa la dosis que se necesita administrar para que se produzcan cambios citopatogénicos en el 50% de los cultivos inoculados.

La fórmula que Kärber emplea en su método para calcular el título de una suspensión de virus es la siguiente:

Log título = $-\log$ de la dilución más baja-

$$\left[\frac{P_1}{T_1} + \frac{P_2}{T_2} + \text{etc} = 0.5 \right] \log \text{ de la dilución}$$

donde::

P_1 = Número total de cavidades positivas por cada dilución.

P_2 = Número total de cavidades positivas por cada dilución.

T_1 = Número total de cavidades utilizadas para cada dilución.

T_2 = Número total de cavidades utilizadas para cada dilución.

Ejemplo

Dilución de virus	Número total positivo
$10^{-4.5}$	3/3
$10^{-5.0}$	3/3
$10^{-5.5}$	3/3
$10^{-6.0}$	3/3
$10^{-6.5}$	1/3
$10^{-7.0}$	0/3
$10^{-7.5}$	1/3

log título =

$$-4.5 - \left[\frac{3}{3} + \frac{3}{3} + \frac{3}{3} + \frac{3}{3} + \frac{1}{3} + \frac{0}{3} + \frac{1}{3} - 0.5 \right] \quad 0.5$$

$$= -4.5 - \left[5 + \frac{1}{3} + \frac{1}{3} - 0.5 \right] \quad 0.5$$

$$\text{log título} = -4.5 - [5.6 - 0.5] \quad 0.5$$

$$= -4.5 - [5.1] \quad 0.5$$

$$= -4.5 - 2.55$$

$$= -7.05$$

PRUEBA DE NEUTRALIZACION

El mecanismo preciso de la neutralización viral por los anticuerpos específicos continúa sin entenderse completamente. El efecto más importante de los anticuerpos neutralizantes es prevenir la adsorción de los viriones a las células, por obstáculo estérico. Los anticuerpos, adheridos por ambos sitios de unión en la superficie del virion, pueden distorcionar la configuración de la envoltura viral lo suficiente como para alterar los procesos normales de adhesión, o para permitir la entrada de nucleasas o de algunas otras enzimas a la partícula.

El virus intracelular está protegido de los anticuerpos presentes en el plasma circulante o en los líquidos tisulares. Algunos virus, como el poliovirus, al ser liberados de la superficie de las células en las que se están multiplicando, quedan expuestos inmediatamente a la acción de los anticuerpos neutralizantes presentes en el ambiente.

Este fenómeno se utiliza para titular anticuerpos específicos en el laboratorio, para lo cual se ha convenido internacionalmente en utilizar una cantidad fija de virus, por lo general 100 DICT₅₀ para cada dilución de suero con el fin de que los resultados de niveles de anticuerpos sean comparables.

La prueba de neutralización se realiza como sigue:

Material necesario

Igual al mencionado para determinar el título del virus.

Destoxificación de las placas

Se realiza en la misma forma mencionada anteriormente.

Cálculos para determinar la dilución que se necesita hacer del virus para obtener las dosis infectivas deseadas.

Título del virus - log 200

200 = dosis infectivas que se necesitan (se reducen a -
100 DICT₅₀ al
mezclar con un
volumen igual
de suero)

Antilog de la mantisa que resulta de la resta anterior
= X

1:X es la dilución que se necesita hacer del virus para obtener las 200 DICT₅₀ por unidad de volumen.

Ejemplo:

$$\begin{array}{r} \text{Título del virus} = -6.9 \\ \text{Log de 200} \quad = \underline{-2.3} \\ \hline -4.6 \end{array}$$

Antilog de 0.6 = 4

Primera dilución 1:4= (1 vol. de virus + 3 vols. de diluyente).

Virus	Diluyente	Dilución final
1 vol. 10^0	3 vol.	$10^{-0.6}$
1 vol. $10^{-0.6}$	9 vol.	$10^{-1.6}$
1 vol. $10^{-1.6}$	9 vol.	$10^{-2.6}$
1 vol. $10^{-2.6}$	9 vol.	$10^{-3.6}$
1 vol. $10^{-3.6}$	9 vol.	$10^{-4.6}$

Una vez que se tiene lista la dilución del virus se hace la prueba propiamente dicha, la cual debe realizarse observando una técnica aséptica rigurosa.

TECNICA

1.- El suero es "inactivado por calentamiento a 56°C - durante 30 min. con el fin de inactivar inhibidores inespecíficos termolabiles.

2.- Dilución del suero;

- a) Colocar 3 gotas (0.075 ml.) del medio de crecimiento en todas las cavidades de la placa usando una pipeta con punta calibrada de 0.025 ml.
- b) Colocar 1 gota (0.025 ml.) del suero que se desea titular en dos cavidades de la fila A.

- c) Sumergir los microdilutores de 0.025 ml. estériles en las cavidades de la fila A y mezclar de 10-15 veces, quedando así - el suero diluído 1:4
 - d) Pasar los microdilutores a la fila B y mezclar en la misma - forma (dilución 1:16).
 - e) Repetir lo mismo en las filas C (dilución 1:64) y D (dilu- - ción 1:256).
 - f) Después de mezclar en la fila D, descargar los microdiluto- - res en papel absorbente, enjua- - gar en agua destilada, sume- - r- - gir en alcohol y esterilizar a la flama.
- 3.- A cada dilución (por duplicado del suero, agregar - una cantidad constante del virus, en este caso 200 $DICT_{50}$, de tal manera que la concentración final -- del virus sea de 100 $DICT_{50}$.
- 4.- Mezclar cuidadosamente el contenido de las cavida- - des y dejar las placas (protegidas de la contamina- - ción ambiental) durante 1 hora a temperatura ambien- - te para que se realice la neutralización del virus.
- 5.- Agregar 2 gotas (0.050 ml.) de la suspensión de cé- - lulas HEp-2 conteniendo 400,000 cel/ml.
- 6.- Cubrir las placas con papel transparente (tipo Ega- - pac), recortado al tamaño de las placas y esterili- - zado a la UV.

7.- Colocar las placas cubiertas en una charola que tenga una compresa húmeda, cubrir ésta con otra de menor tamaño e incubar a 35°C durante 7 días.

Con el fin de tener la seguridad de haber utilizado la cantidad correcta de virus, en cada prueba se efectuó la titulación de la dilución de trabajo en forma similar a la descrita anteriormente, pero realizando únicamente 3 diluciones:

1:2 (100 DICT₅₀), 1:20 (10 DICT₅₀), 1:200 (1 DICT₅₀).

La prueba era considerada satisfactoria si la cantidad de virus correspondía a 32-100 DICT₅₀.

Los pasos 2 a 6 se realizaron invariablemente en gabinete de flujo laminar y en esa forma no se presentaron problemas de contaminación ambiental.

La observación de las placas al microscopio invertido para detectar el efecto citopatogénico se hizo a los 3, 5 y 7 días de montada la prueba. En las cavidades donde el virus había sido neutralizado por anticuerpos específicos, las células habían formado capa confluyente hacia el 5º día, claramente observable con un aumento de 80 veces (microscopio Zeiss invertido, ocular 8x, objetivo 10/0.22). El papel plástico no dificultaba en absoluto la observación.

Para la interpretación cuantitativa (esquema 1) se consideraron negativas todas las cavidades-diluciones que mostraron ausencia total de efecto citopatogénico; el título de anticuerpos específicos correspondió a la recíproca de la mayor dilución capaz de neutra

lizar totalmente la actividad viral.

Observar las figuras 1 y 2 para la mejor comprensión de la técnica.

Esquema 1

INTERPRETACION DE RESULTADOS (EJEMPLO)TITULO DE ANTICUERPOS ESPECIFICOS

Dil. del suero	1:4	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:256	Testigo de células
1:4	++	+-	--	---	--	--	--	--	--	--
1:16	++	++	++	+-	--	--	--	--	--	--
1:64	++	++	++	++	++	+-	--	--	--	--
1:256	++	++	++	++	++	++	++	+-	--	--

+ Células destruidas

- Células normales (capa monocelular)

En la prueba de neutralización se debe utilizar un testigo de células, el cual se prepara colocando en dos cavidades la dilución más baja del suero y células únicamente; esto tiene como objeto detectar una posible toxicidad de los sueros.

Figura 1

ESQUEMA DE LA MANIPULACION PARA LA
TECNICA DE NEUTRALIZACION

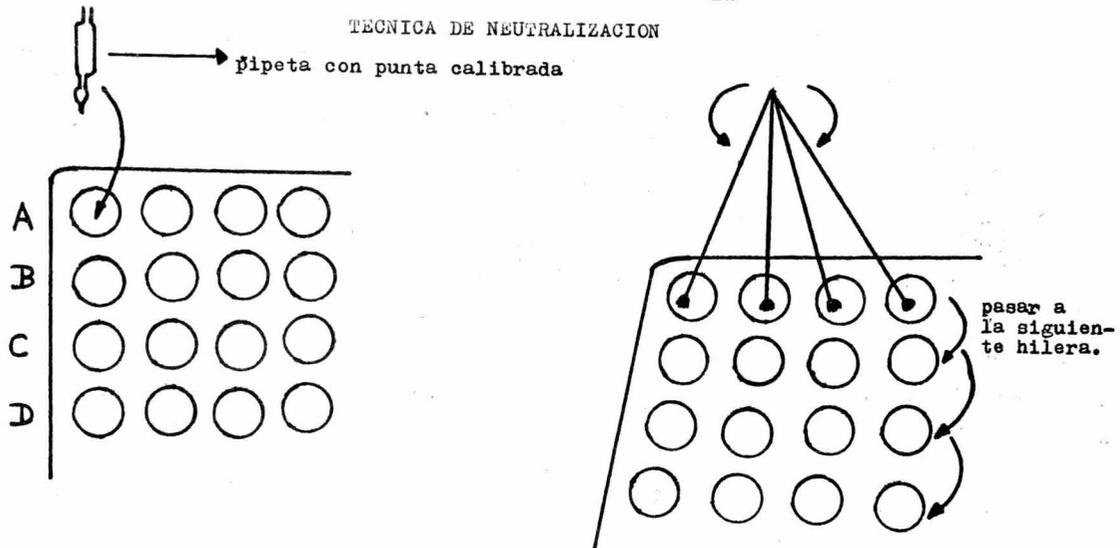
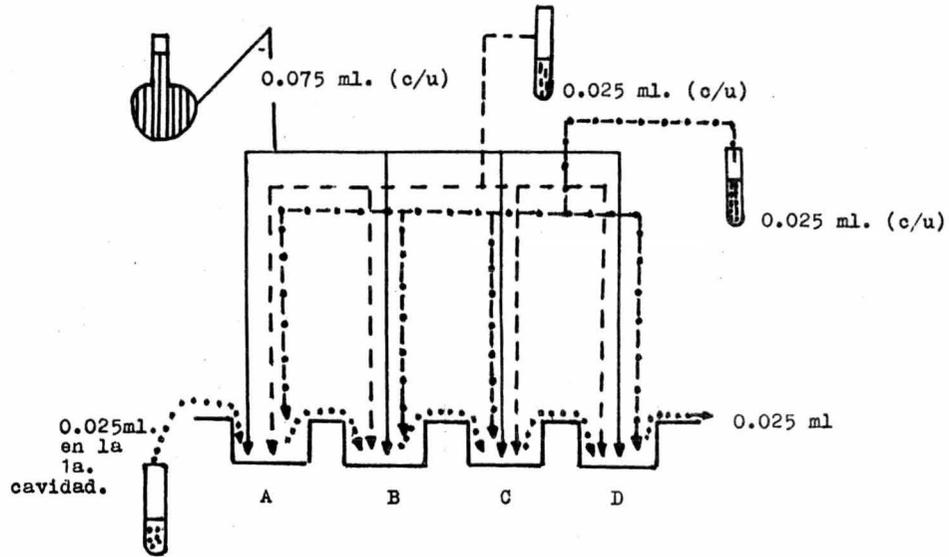


Figura 2

ESQUEMA REPRESENTATIVO DE LA TECNICA DE NEUTRALIZACION



- 1 _____ medio de Leibovitz.
2..... suero problema inactivado 30 min. a 56 °C
3 _____ Antígeno (virus de poliomieltitis)
4..... suspensión de células HEP-2

Índice de neutralización

Una variante de la prueba de neutralización - consiste en utilizar cantidades constantes de suero y - cantidades variables de virus; con esto se logra determinar el índice de neutralización, el cual es muy importante cuando se trabaja con vacunas.

Otras pruebas de neutralización.- Además de la prueba de microtitulación aquí descrita, existen otras variantes que también dan buenos resultados, y entre estas pruebas tenemos:

Prueba clásica del cultivo de tejidos en tubo de ensaye

En esta prueba se siguen los mismos pasos descritos para la microtécnica, sólo que en este caso se utiliza más material, tanto de vidriería (tubos, pipetas) como células y biológicos (sueros, virus). También requiere más espacio de incubación y la observación de los tubos es más lenta y fatigosa, ya que debe usarse un tubo con células en lugar de una cavidad de la microplaca.

Inhibición metabólica

Esta prueba se basa en el hecho de que el CO_2 producido por el metabolismo de las células ocasiona cambios de pH en el medio de cultivo celular. Puede realizarse en tubo, en placa semi-micro y en microplaca.

Uno de los inconvenientes de esta técnica es la presencia de colores intermedios del indicador (rojo de fenol), lo cual dificulta la interpretación.

Titulación de anticuerpos neutralizantes por microtécnica, usando cámara de CO_2 durante la incubación.

La técnica es similar (debe usarse un medio con bicarbonato de sodio) a la empleada en este trabajo

y el inconveniente en este caso es la necesidad de contar con incubadora de CO_2 la cual es muy costosa.

CAPITULO 3

RESULTADOS Y DISCUSION

En los cuadros 1 a 6 se resumen los resultados obtenidos, los cuales han sido analizados desde distintos puntos de vista.

En el cuadro 1 se encuentran los resultados globales. Vale la pena hacer notar que en el caso de Lacanjá, casi la mitad de la población proporcionó muestras para el estudio. En los casos de Puerto Madero, Ejido de José María Morelos y Río Florido, también fue posible incluir una proporción relativamente alta de población, el 2.74 en promedio, considerando que se trata de tres poblaciones muy cercanas entre sí, situadas en una área geográfica de características ecológicas similares. Las otras poblaciones se encuentran dispersas, en zonas muy diferentes del Estado de Chiapas según se aprecia en el mapa No. 1; a excepción de Lacanjá, se trata de poblaciones de regular tamaño, entre 13,000 y 28,000 habitantes.

Al analizar los resultados globales del cuadro 1 encontramos como datos más interesantes la baja seropositividad a los tipos 1 y 3 en la muestra de Motozintla y, en términos generales, la menor seropositividad en las poblaciones grandes, lo cual es muy probablemente un reflejo de vacunación incompleta en esas localidades.

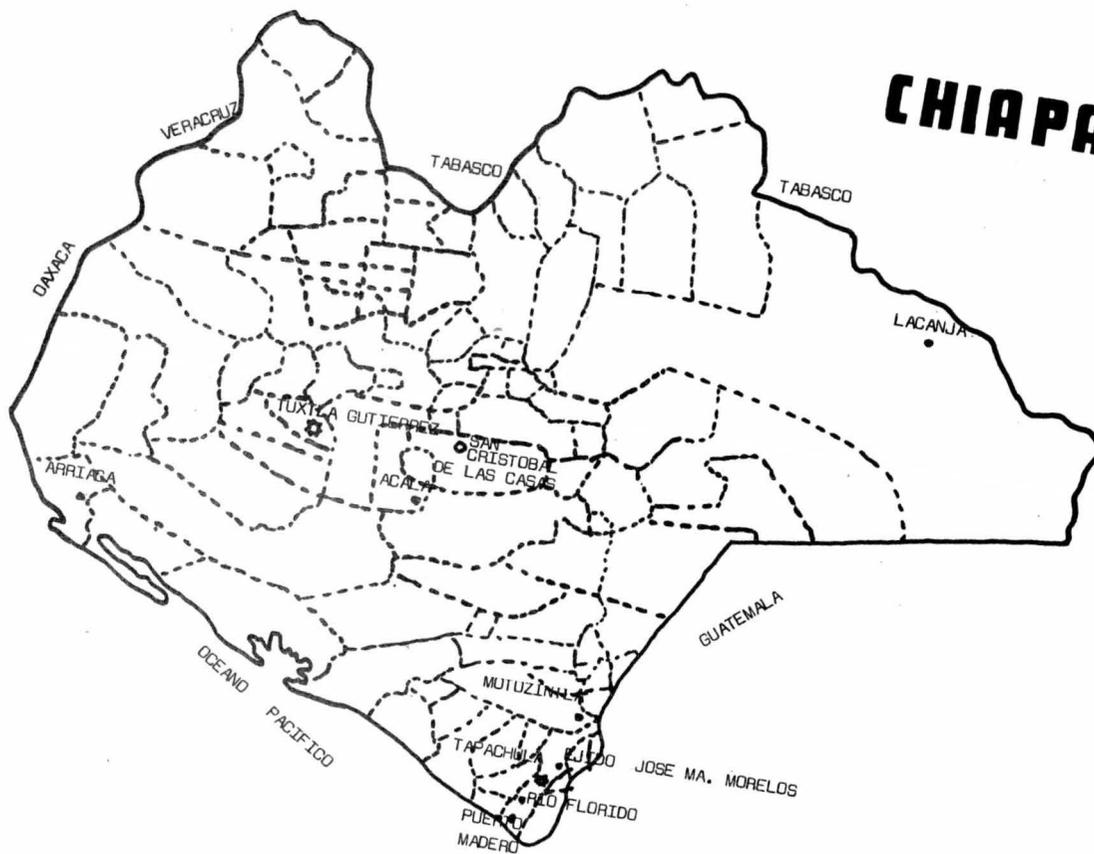
Como puede verse en los cuadros 2 y 3, al agrupar los sueros sobre la base de la edad de los individuos muestreados, observamos que en todos los grupos

CUADRO 1

INMUNIDAD A LOS 3 TIPOS DE POLIOVIRUS EN LAS POBLACIONES ESTUDIADAS

Localidad	Población aproximada	No. de muestras obtenidas	% de población estudiada	Total de positivos		
				P-1	P-2	P-3
LACANJA	120	55	45.8	92.7	100	100
VILLA DE ACALA	13,000	86	0.66	95.3	94.2	93.0
ARRIAGA	27,000	79	0.26	98.7	98.7	98.7
MOTOZINTLA	28,000	73	0.26	79.4	93.1	87.7
PTO. MADERO	2,100	29	1.38	89.7	100	96.6
E. J. MA. MORELOS	662	28	4.22	92.9	96.4	96.4
RIO FLORIDO	344	28	8.13	100	100	96.4

CHIAPAS



MAPA 1

CUADRO 2

INMUNIDAD A LOS 3 TIPOS DE POLIOVIRUS, POR GRUPOS DE EDAD

GRUPO DE EDAD	No. DE SUEROS PROBADOS	% DE POSITIVOS		
		P-1	P-2	P-3
Menos de 1 año	1	100	100	100
1-15 años	208	92.3	96.6	95.7
16-30 años	88	94.3	96.6	95.5
Más de 30 años	81	90.1	97.5	92.6
TOTALES	378	92.3	96.8	95.0

se encuentran individuos sin inmunidad a uno o más poliovirus; sin embargo el número de triple-negativos es bastante pequeño (4 casos), así como el de negativos a 2 virus (11 casos). Estos datos parecen apoyar el que la cobertura de inmunizante haya sido bastante efectiva con la posible excepción de Motozintla. El 8.2% de individuos negativos a un solo poliovirus hace pensar que probablemente falta intensificar la administración de la tercera dosis. También parece claro que la población adulta se encuentra bien protegida, si bien llama la atención que sean mayores de 15 años 3 de los individuos sin anticuerpos a ninguno de los 3 virus.

Independientemente de la explicación que pudiera darse a la persistencia de seronegatividad en todos los grupos de edad, de acuerdo a nuestros resultados puede afirmarse que en los grupos humanos estudiados existen de 5-10% de susceptibles a la infección por virus de poliomiélitis. Estos niveles inmunitarios pueden ser considerados muy satisfactorios ya que difícilmente permitirán que se restablezca el ciclo de transmisión de los poliovirus. Esta consideración puede no ser válida en el caso de Motozintla.

De los cuadros 4, 5 y 6 se desprende que los habitantes de Puerto Madero, Ejido de José María Morelos y Río Florido presentan niveles más elevados de inmunidad a la poliomiélitis, particularmente el grupo de 16-30 años de edad (cuadro 5), y un poco menos el grupo de 1-15 años (cuadro 4). Queda la impresión de que debe hacerse énfasis en la vacunación del grupo de 1-15 años tanto de Puerto Madero como en el Ejido de José María Morelos.

CUADRO 3

PERSISTENCIA DE SERONEGATIVIDAD

Grupo de edad	No. de sueros probados	Triple-negativos		Negativos a 2 Tipos		Negativos a un solo Tipo	
		<u>Número</u> Total	%	<u>Número</u> Total	%	<u>Número</u> Total	%
1-5	20	0/20	0	0/20	0	3/20	15
6-15	188	1/188	0.53	3/188	1.6	21/188	11.2
16-30	88	2/88	2.3	5/88	5.7	2/88	2.3
Mayor de 30	81	1/81	1.23	3/81	3.7	5/81	6.2
TOTAL	377	4/377	1.06	11/377	2.9	31/377	8.2

En las localidades dispersas se observa irregularidad en la presencia de anticuerpos contra los tres tipos de poliovirus; sin embargo, parece evidente que Motozintla es la población menos protegida contra estos virus, en especial contra el tipo 1, que es el potencialmente más peligroso por ser el que produce la gran mayoría de las epidemias.

Si bien el número de muestras en los grupos estudiados es relativamente bajo en relación a la población total, excepto en Lacanjá, los resultados negativos forzosamente indican protección incompleta, aún cuando también es cierto, como ya se indicó anteriormente que resulta poco probable la circulación continua o frecuente de estos virus ante una proporción tan baja de susceptibles. En el caso de Motozintla, la condición inmunitaria de sus habitantes hace temer alguna epidemia a menos que se acentúe la vacunación sobre todo en los pre-escolares.

Finalmente, es necesario recalcar que en este estudio los títulos neutralizantes de 1:4 fueron considerados positivos lo cual podría elevar la proporción de seropositivos no necesariamente protegidos, o de falsos positivos por presencia de inhibidores inespecíficos, por otra parte todavía no parece haberse precisado claramente el nivel mínimo de anticuerpos antipolio capaz de proteger de manera efectiva.

CUADRO 4

SEROPOSITIVIDAD EN EL GRUPO DE 1 a 15 AÑOS DE EDAD

Localidades cercanas	No. de sueros probados	% de positivos		
		P-1	P-2	P-3
RIO FLORIDO	16	100	100	93.4
EJIDO JOSE MA. MORELOS	13	92.3	92.3	100
PUERTO MADERO	17	88.2	100	94.1
TOTALES	46	93.5	97.8	95.6

Localidades dispersas	No. de sueros probados	% de positivos		
		P-1	P-2	P-3
LACANJA	29	89.7	100	100
VILLA DE ALCALA	52	94.7	96.1	94.2
ARRIAGA	53	100	98.1	98.1
MOTOZINTLA	28	75	89.2	89.2
TOTALES	162	92.0	96.2	95.7

CUADRO 5

SEROPOSITIVIDAD EN EL GRUPO DE 16 A 30 AÑOS DE EDAD

Localidades cercanas	No. de sueros probados	% de positivos		
		P-1	P-2	P-3
RIO FLORIDO	7	100	100	100
EJIDO JOSE MA. MORELOS	9	100	100	100
PUERTO MADERO	7	100	100	100
TOTALES	23	100	100	100

Localidades dispersas	No. de sueros probados	% de positivos		
		P-1	P-2	P-3
LACANJA	13	92.3	100	100
VILLA DE ACALA	17	94.1	88.2	94.1
ARRIAGA	9	88.8	100	100
MOTOZINTLA	26	92.3	91.1	88.5
TOTALES	65	92.3	95.4	93.8

CUADRO 6

SEROPOSITIVIDAD EN EL GRUPO DE MAYORES DE 30 AÑOS DE EDAD

Localidades cercanas	Nº de sueros probados	% de positivos		
		P-1	P-2	P-3
RIO FLO- RIDO	5	100	100	100
EJIDO JOSE MA. MORELOS	6	88.3	100	88.3
PUERTO MA- DERO	5	80	100	100
TOTALES	16	87.5	100	93.7

Localidades dispersas	Nº de sueros probados	% de positivos		
		P-1	P-2	P-3
LACANJA	13	100	100	100
VILLA DE ACALA	17	100	94.1	88.2
ARRIAGA	17	100	100	100
MOTOZINTLA	18	66.6	94.4	83.3
TOTALES	65	90.8	96.9	92.3

CONCLUSIONES

- 1.- La metodología utilizada para realizar el presente-trabajo demostró tener grandes ventajas, principalmente economía de tiempo, material, esfuerzo, cultivo de tejidos, antígeno y medios para los cultivos-celulares en comparación con la técnica clásica del cultivo de tejidos en tubo de ensaye.
- 2.- Los resultados obtenidos indican una amplia circulación de los tres tipos de poliovirus en las comunidades objeto de la encuesta, ya sea natural ó consecutiva a la administración de la vacuna oral.
- 3.- La condición inmunitaria de los grupos estudiados parece satisfactoria, excepto en Motozintla para los virus tipo 1 y tipo 3.
- 4.- Debido a que se carece de información respecto a si habían sido o no vacunados los individuos participantes, cuando menos para los menores de 16 años, no se puede concluir que los títulos de anticuerpos obtenidos se deban a la efectividad de la vacuna, ya que se sabe que infecciones "silenciosas" (subclínicas) dan como resultado la inmunización de la mayor parte de la población infantil antes de llegar a los cinco años, aún sin el uso de vacunas.
- 5.- Debido a lo mencionado en el punto anterior, creo necesario que las subsecuentes encuestas que se realicen será de gran interés incluir, además de edad, el dato de si han sido o no vacunados y cuantas dosis recibieron, con lo cual será factible determinar la efectividad de la vacuna utilizada, además -

de la condición inmunitaria de cada individuo y de cada grupo humano.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Underwood, M.: A treatise on the diseases of children, ed J. Mathews. London. 1789.
- 2.- Flexner, S., Lewis, P.A.: Experimental epidemic poliomyelitis in monkeys. Ascending nasal infection; characteristic alterations of the cerebrospinal fluid and its early infectivity; infection from human mesenteric lymph node. J.A.M.A. 54:1140, 1910.
- 3.- Armstrong, C.: The experimental transmission of poliomyelitis to the Eastern cotton rat, Sigmodon hispidus hispidus. Pub. Health Rep. 54: 1719-1721, 1939.
- 4.- Schaffer, F.L., and Schwerdt, C.E.: Purification and properties of poliovirus. Adv. Virus Res. 6:159-204, 1959.
- 5.- Finch, T.J. and Klug, A.: Structure of poliomyelitis virus Nature. 183: 1709-1714, 1959.
- 6.- Cooper, P.D.: Studies on the structure and function of poliovirus: effect of concentrated urea solutions. Virology. 16: 485-495, 1962.
- 7.- Le Bouvier, G.L.: The modification of poliovirus antigens by heat and ultraviolet light. Lancet. 2: 1013-1016, 1955.
- 8.- Le Bouvier, G.L.: Poliovirus D and C antigens: Their differentiation and measurement by precipitation in agar. Brit. J. Exo. Path. 40:452-463, 1959.
- 9.- Roizman, B., Mayer, M.M., and Roane, P.R.: Immunological studies of poliovirus. Alteration of immunologic specificity of purified poliomyelitis virus by heat and ultraviolet light J. Immunology. 82: 19-25, 1959.

- 10.- Bodian, D.: Differentiation of types of poliomyelitis viruses. I. Reinfection experiments in monkeys (second attacks). *Am. J. Hyg.* 49:200-224, 1949.
- 11.- Sabin, A.B. Transitory appearance of type 2 neutralizing antibody in patients infected with type I - poliomyelitis virus *J. Exp. Med.* 96:99-106, 1952.
- 12.- Schmidt, N.J., and Lennette, E.H.: A microflocculation test for poliomyelitis. *Am. J. Hyg.* 70:51, -- 1959.
- 13.- Howe, H.A., and Bodian, D.: Poliomyelitis in the chimpanzee; a clinical-pathological study. *Bull. - Johns Hopkins Hosp.* 69:149-181, 1941.
- 14.- Russell, W.R.: Paralytic poliomyelitis. The early symptoms and effect of physical activity on the -- course of the disease. *Brit. Med. J.* 1: 465-471, - 1949.
- 15.- Horstmann, D.M.: Acute poliomyelitis: relation of physical activity at the time of onset to the course of disease. *J.A.M.A.* 142: 236-241, 1950.
- 16.- Anderson, G.W., and Rondeau, J.L.: Absence of tonsils as a factor in the development of bulbar poliomyelitis. *J.A.M.A.* 155: 1123-1130, 1954.
- 17.- Siegel, M., and Greenberg, M.: Incidence of poliomyelitis in pregnancy. Its relation to maternal -- age, parity and gestational period. *New Eng. J. -- Med.* 253:841-847, 1955.
- 18.- Schabel, F.M. Jr., Smith, H.T., Fishbein, W.I., -- and Casey, A.E.: Stool virus recovery in subclinical poliomyelitis during incubation, febrile, and convalescent periods. *J. Infect. Dis.* 86:214-218, - 1950.

- 19.- Salk, J.E., Krech, U., Youngner, J.S., Bennett, — B.L., Lewis, L.J., and Bazeley, P.L.: Formaldehyde treatment and safety testing of experimental polio myelitis vaccines. *Am. J. Pub. Health* 44:563-570, 1954.
- 20.- Gard, S.: Inactivation of poliovirus by formaldehy de. Theoretical and practical aspects. *Bull. WHO.* — 17:979-989, 1957.
- 21.- Lepow, M.L., Carver, D.A., and Robbins F.C.: Sero- logic response of nonimmune subjects to comercial Salk vaccine.
Response and antibody persistence with four doses. *Am. J. Dis. Child.* 103-811, 1962.
- 22.- Gard, S.: Exit poliomyelitis-What next, *Yale J. — Biol. — Med.* 34:277-288, 1961-62.
- 23.- Hale, J.H., Doraisingham, M., Kanagatnam, K., — Leong, K.W., and Monteiro E.S. ; Large-scale use — of Sabin type 2 attenuated poliovirus vaccine in — Singapore during a type 1 poliomyelitis epidemic. *Brit. M. J.* 1:1541-1549, 1959.
- 24.- Hale, J.H., Lee, L.M., and Gardner, P.S.: Ineterfe — rence patterns encountered when using attenuated — poliovirus vaccines *Brit. M. J.* 2:728-732, 1961.
- 25.- Chumakov, M.P., Vorishilova, M.K., Drozdov, S.G., Dragurov, S.G., Lahkevich, V.A., Mironova, L.L., — Ralph, N.M., Gargarina, A.V., Ashmarina, E.E., — Shirman, G.A., Fleer, G.P., Tols kaya, L.B., Sokó- lova, L.S., Elbert, L.B., and Sinkay, K.M.: Some re — sults of the work on mass immunization in the So — viet Union with live poliovirus vaccines prepared from Sabin Strains. *Bull. WHO.* 25:79-91, 1961.

- 26.- Sabin, A.B.: Present position of immunization -- against poliomyelitis with live virus vaccine. -- Brit. M. J. 1:663-680, 1959.
- 27.- Koprowsk, H.: Live poliomyelitis virus vaccines. -- Present atatus and problems for the future. J.A.M. A. 178: 1151-1155, 1961.
- 28.- Paul, J.R.: Status of vaccination against poliomye- litis with particular reference to oral vaccina- tion. New.J. Med. 264: 651-658, 1961.
- 29.- Tomado de: Registry of animal cell lines certified by the cell culture collection committee. First -- Edition. Pág. 23 1964.
- 30.- Morgan, J.F., Morton, H.J., and Parker, R.C.: Nu- trition of animal cells in tissue culture. I. Ini- tial studies on a Synthetic medium. Proc. Soc. -- Exp. Biol. Med. 73:1-8, 1950.
- 31.- Leibovitz, A.: The growth and maintenance of ti- ssue-cell cultures in free gas exchange with the atmosphere. Amer. J. Hyg. 78:173-180, 1963.
- 32.- Dulbecco, R., and Vogt, M.: Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viru- ses. J. Exp. Med. 99: 167-182, 1954.