

29
201



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"CUAUTITLAN"

V. N. A. M.

FALLA DE ORIGEN

UTILIZACION DEL METODO DE CONCENTRACION
ACIDA PARA AISLAR EL VIRUS CAUSANTE DE
PARALISIS FLACIDA EN NIÑOS DE LOS CUALES
NO SE AISLO POR EL METODO CLASICO DE
CULTIVO DIRECTO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A:
MARTIN MELO MUNGUIA

DIRECTOR DE TESIS: Q.B.P. JUDITH MARTINEZ ZAMITIZ

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1991



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 GENERAL

Glosario	1
I.- RESUMEN	2
II.- INTRODUCCION	3
III.- GENERALIDADES	9
1.- Poliovirus	9
1.1.- Historia	9
1.2.- Clasificación	13
1.3.- Características	14
1.4.- Respuesta Inmune	17
1.5.- Signos Clínicos	19
1.6.- Patogénesis y Patología	22
1.7.- Histopatología	26
1.8.- Epidemiología	28
1.9.- Diagnóstico de Laboratorio	30
1.10.- Tratamiento	35
1.11.- Prevención y Control	33
2.- Enfermedades Paralíticas no Poliovíricas	46
3.- El Síndrome de Guillain-Barré	52
4.- Diagnóstico Diferencial Entre SGB y Poliomielitis	58
IV.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	60
V.- OBJETIVOS	61
VI.- MATERIALES Y METODOS	62
VII.- RESULTADOS	75
VIII.- DISCUSION	83
IX.- CONCLUSIONES	88
X.- APENDICE	90
XI.- BIBLIOGRAFIA	92

GLOSARIO

- CD : Cultivo Directo.
- CDC : Cultivo Directo Concentrado.
- CPRM : Cultivo Primario de Riñón de Mono.
- DICT₅₀ : Dosis Infeccivas en Cultivo de Tejido 50%.
- ECHO : Enterocitopatogen Human Organ.
- ELISA : Enzime Linked Immunosorbent Assay.
- I.N.D.R.E : Instituto Nacional de Referencias Epidemiológicas.
- I.N.V : Instituto Nacional de Virología.
- O.M.S : Organización Mundial de la Salud.
- O.P.S : Organización Panamericana de la Salud.
- SGE : Síndrome de Guillain-Barré.
- SNC : Sistema Nervioso Central.
- SSB : Solución Salina Balanceada.
- TAC : Tratamiento Acido Concentrado.
- MEM : Medio Mínimo de Mantenimiento.

RESUMEN

I.- RESUMEN.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Virología del I.N.D.R.E con la finalidad de probar un método alternativo que nos permitiera aislar el agente viral de casos de parálisis flácida reportados como negativos por el método clásico de cultivo directo (CD).

Se seleccionaron 35 muestras de heces fecales que habían sido trabajadas con anterioridad por el método de CD y que resultaban negativas para el aislamiento de poliovirus ó algún otro enterovirus. También se seleccionaron 3 controles positivos.

Las 46 muestras se trabajaron por el método de concentración con dos variantes: TAc y CDe.

El total de aislamientos hechos por TAc fué de 23.68% de los cuales el 15.78% correspondió a niños con Dx. clínico de SGB y el 7.9% a niños con diagnóstico de poliomiélitis. Por CDe el total de aislamientos fué de 13.1% de los cuales 7.39% fué de niños con diagnóstico clínico de SGB y el 5.25% de niños con Dx. de poliomiélitis.

Por las dos variantes del método de concentración se aisló el virus de los 3 controles positivos.

Para la identificación del virus aislado se empleó la técnica de microneutralización en placa, utilizando mezclas de antisueros contra los tres serotipos de poliovirus.

Se identificaron en total 9 muestras de las cuales tres fueron poliovirus tipo 3 y las otras 6 se consideraron como virus entéricos "no polio".

Se considera que el método de concentración ácida es el más eficiente para el aislamiento de poliovirus/enterovirus principalmente de casos con Dx. clínico de SGB, de los que se aisló básicamente enterovirus "no polio".

INTRODUCCION

II.- INTRODUCCION

Los enterovirus pueden causar muchos síndromes clínicos. - La parálisis es una consecuencia común de la infección causada por poliovirus. Sin embargo, la parálisis, después de una infección como la citada sólo se presenta en 1 a 2% de los casos(53). Los enterovirus de los demás grupos raras veces causan parálisis. Dos de los tipos de enterovirus de aceptación más reciente, los 70 y 71, al carecer la causan con mayor frecuencia. En la India, Japón, Taiwán, Tailandia y Senegal se ha observado parálisis con ulterioridad a conjuntivitis hemorrágica aguda ocasionada por el enterovirus 70. En Bulgaria y Hungría ocurrieron dos brotes de la enfermedad causada por el enterovirus 71 que afecta al sistema nervioso central, acompañados de parálisis en algunos casos-- (44,53). Otros enterovirus que se han encontrado causando parálisis son los Coxsakie A_{2,4,7,9}; Coxsakie B_{1,2,3,4,5} y los ECHO -- 1,2,4,6,9,11,13,16,30 (13,35,53).

Otros síndromes causados por los enterovirus comprenden: - meningitis séptica, pericarditis, miocarditis, pleurodinia, hepatitis, enfermedad neonatal, enfermedades respiratorias, erupciones de la piel y algunos enterovirus se han relacionado con el Síndrome de Guillain-Barré; tal es el caso del ECHO 6. Este síndrome incluso se ha llegado a confundir clínicamente con la poliomielitis ya que sus manifestaciones son muy parecidas, sin embargo, hasta la fecha, a dicho síndrome se le considera de etiología desconocida ya que se ha relacionado con varios agentes - tanto virales como bacterianos (27,40,51,53).

El hombre es el único huesped natural conocido de los poliovirus, se han encontrado anticuerpos en algunos monos y chimpancés estudiados en cautiverio, pero existen pruebas de que sólo adquieren la infección después de su captura (21).

Los poliovirus pertenecen a la familia de los picornavirus, junto con los ECHO, Coxsackie y Rhinovirus y comparten características físicas, químicas, biológicas y epidemiológicas. Son pequeños (210-300 Å), contienen RNA de una sola cadena y carecen de lípidos. Su morfología es icosaédrica, son resistentes a solventes lipídicos y son relativamente estables a temperatura ambiente y a pH ácido (13).

Los poliovirus comprenden tres serotipos inmunológicamente distintos, que pueden identificarse por reacciones de neutralización, fijación de complementos o reacciones de precipitación por difusión en gel. Existen dos tipos de partículas virales de poliovirus: la partícula D (densa) infecciosa y la partícula C (carente de porción central) no infecciosa. La partícula D contiene 4 cadenas polipeptídicas estructurales: VP₁, VP₂, VP₃ y VP₄ y la partícula C carece de VP₂ y de VP₄ y tiene en su lugar a un precursor que es VP₀ (13).

Después de su ingestión por vía oral, el poliovirus invade las amígdalas, placas de Peyer, ganglios linfáticos y mesentéricos y causa viremia (13,21).

Las lesiones a nivel de las células de las astas anteriores de la médula espinal son la causa principal de la parálisis por poliovirus, también puede haber lesiones a nivel de tronco cerebral y corteza motora (43).

Es posible emplear varios especímenes para tratar de aislar los poliovirus y enterovirus. La recolección de los especímenes apropiados y las buenas condiciones de almacenamiento y envío son fundamentales para el éxito de los estudios de laboratorio. Los especímenes para el aislamiento del virus deben ser recolectados lo más pronto posible durante el curso de la enfermedad ya que en ésta etapa el virus alcanza su punto máximo (44). Los especímenes empleados con mayor frecuencia para el aislamiento de poliovirus y enterovirus son: Heces fecales, frotis de garganta, líquido cefalorraquídeo y tejidos obtenidos de autopsias (bulbo raquídeo, médula espinal cervical y lumbar). Además debe obtenerse suero de casos agudos y convalecientes para estudios serológicos (44).

Se considera que las heces son el mejor material para el aislamiento de los enterovirus, ya que éstos se excretan hasta por 4 semanas después del comienzo de la infección(44).

Por muchos años han existido métodos para el diagnóstico de las infecciones enterovíricas en el laboratorio, entre los que cabe citar el aislamiento del virus en cultivos celulares -- (RD: Raddho-mio-sarcoma humano, Hep-2c: Carcinoma de laringe, -- Vero: Riñón de mono verde y HeLa: Carcinoma de cervix) o en ratones recién nacidos y la identificación mediante pruebas de neutralización en un sistema huésped apropiado. Se han efectuado -- pruebas serológicas, primordialmente por el método de neutralización con muestras de sueros en pares para ofrecer información útil para el diagnóstico (19,20). Esta medida es práctica cuando se conoce el tipo de virus infeccioso por medio de estudios de

aislamiento vírico ó cuando se sospecha de un limitado número de tipo de virus (41).

Un método comúnmente empleado para el aislamiento de polio virus consiste en el cultivo de una suspensión clarificada de heces fecales en las líneas celulares RD y Hep-2c. Se ha visto que por este método la frecuencia de aislamientos es relativamente buena, sin embargo, se ha encontrado que existen ciertas muestras, provenientes de casos clínicos con parálisis, a partir de los cuales no se logra aislar el virus causante de la enfermedad por lo que, para dichos casos, es necesaria la utilización de métodos más eficaces para el aislamiento de los agentes virales cuando éstos se encuentran en cantidades muy pequeñas ó "enmascarados" por algunas sustancias que impidan su multiplicación en los cultivos celulares (62).

Desde hace algunos años se ha utilizado, con poca frecuencia, el método de concentración para el aislamiento de poliovirus y algunos otros enterovirus (46,62). Este método consiste primordialmente en someter, las suspensiones de heces fecales clarificadas, a un proceso de centrifugación diferencial a altas revoluciones (14,000-35,000) lo que permite, en primer lugar, la obtención de una mayor cantidad de virus por volumen de muestra, con un alto grado de pureza, ya que este método permite la eliminación de posibles sustancias orgánicas y citotóxicas de las muestras e inocular (46,62).

Una variante del método de concentración consiste en someter las muestras a un tratamiento ácido (pH 2.4-3) previamente clarificadas y concentradas (concentración ácida) lo que permite,

además de las ventajas de concentración, obtener al virus totalmente libre de restos celulares, proteínas, sustancias citotóxicas, etc. que pudieran interferir en su reproducción en los cultivos celulares (46,62). Este método de concentración ácida se ha utilizado con éxito, sobre todo para el aislamiento de enterovirus no polio (62); pero también se han logrado buenos resultados para el aislamiento de poliovirus.

Recientemente se han aplicado algunos de los métodos virológicos/serológicos más modernos al estudio de los enterovirus. Se ha tratado de hacer el análisis de la IgM del suero humano en el serodiagnóstico de las infecciones causadas por el virus Coxsackie B por medio de la prueba de ELISA. Esta metodología también se ha usado para la tipificación de poliovirus y para la titulación de anticuerpos contra los poliovirus. Se han preparado anticuerpos monoclonales contra los tres tipos de poliovirus. Algunos de estos anticuerpos se están estudiando en la actualidad para determinar su capacidad de diferenciar a los poliovirus salvajes de los empleados en la vacuna ((10,30,44).

También se ha recurrido a la determinación de la secuencia de nucleótidos en un fragmento del RNA de los poliovirus para determinar el origen de las cepas de éstos (32).

Se ha visto que las "sondas" de DNA marcadas con material radioactivo reaccionan con varios enterovirus incluso los poliovirus tipo 1. Dichas "sondas" pueden permitir la identificación de éstos en cultivos celulares por medio de técnicas de hibridación del ácido nucleico (32).

Algunos de estos métodos, pese a no ser los normales ni --

los de uso común, quizá tengan una aplicación más amplia en el futuro después de su perfeccionamiento y evaluación.

GENERALIDADES

III.- GENERALIDADES

1.- POLIOVIRUS.

1.1.- HISTORIA

Probablemente la poliomielitis (polio:gris y mielos:médula) haya sido el problema existente desde la antigüedad ya que se han encontrado en algunas pirámides de Egipto restos humanos momificados que muestran extremidades anormales (brazos delgados ó --- piernas asimétricas) que indican posibles afecciones por poliovirus. Sin embargo, la poliomielitis no fué reconocida como una --- entidad clínica distintiva hasta que en 1784, Michael Enderwood, un médico inglés, publicó un tratado sobre enfermedades de los --- niños (60).

A principios del siglo XIX el tratamiento consistía en --- fuertes curvas, ampollas, sangrías y aún electricidad aplicada --- al miembro afectado. Varios médicos asociaron los dientes con la enfermedad pero esto no fué muy aceptado (60).

En 1840, Jacob Heine, ortopedista alemán y el mejor expo- --- nente de la medicina física, publica el primer estudio sistemáti- --- co de "Parálisis Espinal". Heine anotó las siguientes caracterís- --- ticas sobre la enfermedad: los pacientes tenían una edad de 6 a --- 36 meses, gozaban de buena salud antes de la enfermedad, mostra- --- ban dolor y algunos experimentaban fiebres, irritabilidad y mani- --- festaciones convulsivas; lo que precedía, en muchos casos, a la --- parálisis de ambas extremidades. De estos signos y síntomas, ---

Heine concluyó que la afección era en un "punto del sistema nervioso central llamado médula espinal" (60).

En 1870 Jean-Martin Charcot y su colega A. Joffroy notaron cambios microscópicos en el asta anterior de la materia gris de la médula espinal en las víctimas de la poliomielitis. Charcot reconoce que éstas células motoras particularmente son extremadamente vulnerables al "veneno" generado durante el curso de la enfermedad aguda, confirmando lo dicho por Heine. Los descubrimientos de Charcot y otros investigadores establecen la neuropatología de la poliomielitis que permite diferenciar a esta enfermedad de otras del sistema nervioso central (60).

Karl Oskar Medin, en 1887, investigando una epidemia de 44 casos de poliomielitis en Suecia la describe como una enfermedad sistémica con fiebre y malestar generalizado la cual podría estar acompañada por la implicación del sistema nervioso central. En 1905, Wickman, discípulo de Medin, después de estudiar una devastadora epidemia escandinava concluye que el período de incubación en la enfermedad menor es de tres a cuatro días y el período de incubación en la enfermedad mayor con fiebre y parálisis es de 8-10 días, observó también que la enfermedad es altamente contagiosa y que frecuentemente era expandida por individuos infectados subclínicamente (60).

En diciembre de 1908 en Viena Karl Landsteiner, famoso inmunólogo (descubridor de la mayor cantidad de grupos sanguíneos) y sus colaboradores reportaron que la poliomielitis era causada por un agente filtrable. Ellos demostraron que una suspensión de médula espinal de un caso agudo de poliomielitis producía ---

enfermedad similar en dos monos. Un mono murió después de una -- breve enfermedad y el otro desarrolló la parálisis, pero ambos -- animales mostraron cambios característicos en las células de las -- astas anteriores de la médula espinal. Este descubrimiento ini- -- cial condujo a Landsteiner y C. Levaditi a mostrar que el virus -- podía ser recuperado de amígdalas, secreciones nasales, glándo- -- las salivales y nódulos linfoides mesentéricos de casos humanos -- fatales de infecciones naturales de poliomielitis claramente es- -- tablecidas (60).

Poco tiempo después, Simón Flexner y colaboradores en el -- Instituto Rockefeller, basaron sucesivamente poliovirus de mono a -- mono. De 1909 a 1912 se hicieron varios descubrimientos sobre -- poliovirus en Estados Unidos y Europa. Flexner y Paul Lewis de- -- mostraron que el suero de monos convalescientes de poliomielitis -- contenían anticuerpos ó "substancias germicidas". A Netter y Le- -- vaditi encontraron anticuerpos neutralizantes en la sangre de -- humanos recuperados de poliomielitis (30,60).

En 1949 John P. Enders, Thomas H. Weller y Frederick C. -- Robins publicaron que los poliovirus podían crecer en cultivos -- de tejidos embrionarios humanos no nerviosos y producían un -- efecto citopático característico (20,30,52,60).

Hasta 1956 se tuvo el concepto de que la infección ocurría -- vía nasal y que el virus migraba a lo largo de los nervios olfa- -- torios hasta el cerebro. En este año Dorothy M. Horstman mostró -- que el poliovirus entraba al torrente sanguíneo durante el perio- -- do de incubación en monos Macaca cynomolgus infectados por vía -- oral (52,60).

oral (52,60).

El descubrimiento del origen intestinal de la infección -- por poliovirus, la existencia de tres serotipos y la capacidad -- de inactivación del virus que induce anticuerpos neutralizantes -- con protección en monos al retarlos con poliovirus, así como la -- contribución hecha por Enders en 1949, sientan las bases para la -- producción de la vacuna antipoliomielítica (30,52,60).

En 1953 Jones Salk, de la Universidad de Pittsburgh desarro -- lló la primera vacuna antipoliomielítica, inactivando el virus -- con formalina. Dicha vacuna estaba constituida por los tres sero -- tipos de poliovirus, multiplicados en cultivo primario de riñón -- de mono (OPRM). (30,60)

Thomas Francis y otros epidemiólogos organizaron varios es -- tudios con pacientes tratados con la vacuna de Salk, obteniendo -- resultados que mostraron claramente la efectividad de la vacuna -- y, en 1955 se le otorgó la licencia por la USP Health Service. -- Desafortunadamente, poco tiempo después de que se le otorgó la -- licencia aparecieron casos de poliomieltis en niños que habían -- sido vacunados (30).

En 1951, Koprowski y colaboradores logran modificar el po -- liovirus tipo 2 por adaptación en ratones y prueban los virus -- "modificados" en 20 humanos voluntarios los cuales no mostraron -- efectos colaterales adversos después de ingerir dicha vacuna ate -- nuada (viva) de poliovirus tipo 2 (30).

En 1952 Enders, Weller y Robbins observan que los poliovi -- rus disminuyen su virulencia después de pases repetidos en célu -- las extraneurales (20,30,32).

Entre 1955 y 1957, A. S. Sabin logra preparar cepos atenuados de los tres tipos de poliovirus crecidos en cultivos celulares (20,52).

La vacuna viva de poliovirus atenuados fué introducida a partir de 1961 y remplazó gradualmente a la vacuna de Salk en -- Estados Unidos y en la mayoría del mundo. Durante los primeros -- años casi siempre se emplearon vacunas monovalentes que incorporaban cada serotipo por separado pero en la actualidad se utiliza ampliamente la vacuna trivalente (30).

1.2.- CLASIFICACION.

El virus de la poliomielitis pertenece a la familia de los picornaviridae, junto con los rinovirus, cuyos miembros afectan comunmente a humanos. Se han encontrado virus similares a los -- picornavirus en varias especies de animales inferiores, por ejemplo los causantes de la globope de del ganado, la enfermedad de -- Teschen de los cerdos y la encefalomielococciocitosis de los ratones -- (6,13,31,44).

El término picornaviridae significa pequeños (pico) virus- (viridae) de ácido ribonucleico (RNA, que es la sigla inglesa de este ácido). Este nombre fué adoptado por The International Committee of Virus Nomenclature. Los poliovirus están incluidos en el grupo de los enterovirus (17,31).

En un principio los enterovirus se dividieron en 4 grupos: los poliovirus (serotipos 1,2,3), los Coxsackie A (24 serotipos), los Coxsackie B (6 serotipos) y los Echovirus (34 serotipos) a --

causa de ciertas dificultades de este esquema de clasificación, los nuevos tipos descubiertos, después de los ECHO 34, se han de signado como enterovirus 68,69,70,71 y 72 (13,31,44,53).

Los poliovirus, Echovirus y virus Coxsakie poseen características físicas, químicas, biológicas y epidemiológicas similares y comparten la propiedad de afectar el tubo digestivo del hombre. En la actualidad el término enterovirus, designado originalmente para estos grupos de virus ya no es muy apropiado ya que se ha encontrado que ciertos virus Coxsakie y ECHO causan también infecciones respiratorias agudas (ver tabla No.1) (13, 43,53).

1.3.- CARACTERISTICAS.

-Propiedades Físicas.

Estudios de ultracentrifugación, microscopía electrónica y difracción de rayos X muestran que el virión es icosaédrico desnudo y su tamaño es de 20-30 nm. Los poliovirus, por ser virus desnudos, son resistentes a solventes lipídicos como el éter, son estables a pH ácido de 3 a 5 durante una a tres horas (aunque se ha visto que son capaces de resistir pHs menores a 3) --- (6,13,33). Los poliovirus son estabilizados a temperaturas altas utilizando cationes divalentes como el $MgCl_2$. Esto ha servido para estabilizar las vacunas vivas atenuadas antipoliomielíticas contra la pérdida de infectividad en los trópicos (21).

Los poliovirus son inactivados con radiaciones ultravioleta, formalina y por desecación y pueden ser preservados durante

TABLA No. 1
ENFERMEDADES CAUSADAS POR LOS ENTEROVIRUS

SINDROME	VIRUS	
	COMUNES	POCO COMUNES
- Parálisis	Poliovirus 1,2,3	Coxsakie A (2,4,7,9) Coxsakie B (1,2,3,4,5) ECHO (1,2,4,6,9,11,13,30)
- Meningitis aséptica.	ECHO (4,5,9,11,14,16,30), Coxsakie A (7,9,23), Coxsakie B (1-6)	Coxsakie A (16-18,4-11)
- Encefalitis	Enterovirus 71 Coxsakie B ₅ .	ECHO (9,14,19), Coxsakie A (2,4,6,8,9,18).
- Encefalomyelitis carditis.	Coxsakie B (1-5).	
- Conjuntivitis hemorrágica aguda y radiculoneuritis.	Enterovirus 70.	Enterovirus 71.
- Infecciones del aparato respiratorio alto.	Coxsakie A ₂₁ , ECHO (11,20)	Coxsakie A (10,24), B (2-5), ECHO (4,8,9,22,25).
- Neumonitis y bronquiolitis.	Enterovirus 68.	
- Mialgia epidémica (enf. de Bornholm)	Coxsakie B (1-5).	

Tomado de: Davis, B.D., Dulbecco et al: Tratado de Microbiología, 2a ed. Salvat, 1983. (13).

largo tiempo por congelación a -70°C . (31,33).

-Características Bioquímicas.

El genoma de los poliovirus está compuesto por RNA de una sola cadena positiva con peso molecular de $2-2.8 \times 10^6$ daltons - y constituye alrededor del 30% de la masa de la partícula viral y el resto son proteínas (10,13,31).

La cápside está constituida de 60 unidades idénticas, formadas cada una de 4 proteínas estructurales o de cubierta, estas proteínas de cubierta son: VP_1 , VP_2 , VP_3 y VP_4 (14,17,31,33).

Se ha establecido que VP_1 es la proteína de superficie expuesta principalmente, VP_2 y VP_3 también están localizadas externamente pero son menos expuestas que VP_1 , y VP_4 parece ser completamente interna y relacionada al RNA viral (6,17).

El poliovirus infectante es comúnmente referido como partícula D (densa) la cual está totalmente estructurada y contiene RNA central mientras que el antígeno C (carente) no tiene núcleo central formado por RNA y se le considera como una partícula no infecciosa. Las partículas vacías C, al parecer son precursoras de los viriones que no han sido totalmente acoplados. La partícula D (es decir, el virión infeccioso) contiene las 4 cadenas polipeptídicas (VP_1 , VP_2 , VP_3 y VP_4) y la partícula C carece de VP_2 y de VP_4 , conteniendo en su lugar un polipéptido de gran tamaño (VP_0) que no es otra cosa que el precursor de VP_2 y de VP_4 (13,30).

La composición de bases es de 46% guanina-citosina, el coeficiente de sedimentación del virión es de 157-160 y el peso molecular del virión es de $6.4-6.5 \times 10^6$ daltons (6,13,33).

1.4.- RESPUESTA INMUNE.

Una primera infección por poliovirus induce la producción de altos niveles de anticuerpos neutralizantes. Se ha calculado que una simple dosis correspondiente a 0.5% de virus, induce una clara respuesta del sistema inmune produciéndose, primeramente anticuerpos del tipo IgM y posteriormente anticuerpos del tipo IgG (30).

Se ha visto que las partículas C (no infecciosas) no reaccionan, in vitro, con los anticuerpos contra la partícula D (virión infeccioso), pero la inyección de partículas C a conejos da lugar a la producción de anticuerpos contra D y C, por otra parte, la inmunización con uno y otro tipo de partículas origina la producción de anticuerpos neutralizantes (13,30).

Se ha visto que la partícula D es altamente inductora de anticuerpos neutralizantes, mientras que la C es inductora de éstos pero en menor grado (30).

La primera evidencia de que los anticuerpos neutralizantes son inducidos por polipeptidos obtenidos a partir de la disociación de poliovirus fué hecha después de que se logró el aislamiento de los polipeptidos estructurales VP₁ y VP₂, los cuales inducen títulos significativos de anticuerpos neutralizantes. También se ha reportado que VP₁ puede inducir títulos significa-

tivos de anticuerpos neutralizantes (14).

Los tres serotipos de poliovirus comparten antígenos comunes fijadores de complemento pero son distintos en las pruebas de neutralización y muestran ausencia casi absoluta de protección cruzada. La reactividad cruzada puede ponerse de manifiesto sólo en caso de que el suero proceda de individuos que han sido infectados con más de un tipo de poliovirus, después de la infección inicial la respuesta de anticuerpos es estrictamente específica de tipo, pero al producirse la infección con un segundo tipo de poliovirus se producen anticuerpos frente a ambos virus o contra los tres tipos conocidos (13).

Por técnicas de neutralización puede observarse una reactividad cruzada poco importante entre los tipos 2 y 3 pero no entre los tipos 1 y 3. El parentesco inmunológico entre los tipos 1 y 2 se confirma epidemiológicamente; la posesión de anticuerpos contra el tipo 2 confiere una notable protección contra los efectos paralizantes de una infección subsecuente por poliovirus tipo 1 (13).

Tanto la vacuna oral como la de virus inactivado pueden inducir rápidamente la producción de anticuerpos neutralizantes, los que se pueden detectar después de tres días de la vacunación. Se ha observado que después de 5 años de una vacunación primaria los anticuerpos de tipo 1 se pueden detectar de 92-98%, los de tipo 2 en 98% y los de tipo 3 de 81-87% (25).

Durante las 2 ó 3 primeras semanas después de la infección aparecen anticuerpos fijadores de complemento (anti-D y anti-C), que alcanzan títulos máximos a los 2 meses aproximadamente y ---

persisten durante casi dos años (ver diagrama No.1) (13,25).

Las infecciones leves y no paralizantes dan lugar a niveles de anticuerpos tan altos como los que aparecen después de una grave enfermedad paralizante. Las reinfecciones que causan parálisis son raras y producidas invariablemente por virus de tipo no distinto al causante de la primera enfermedad (13,25).

1.5.- SIGNOS CLINICOS.

La poliomielitis se ha correlacionado, tradicionalmente, con parálisis asimétrica y flácida de las extremidades, sin embargo, ésta se desarrolla sólo en el 1 a 2% de los casos, donde puede o no haber parálisis bulbar (25).

Se ha visto que otros enterovirus (enterovirus 70,71 y Coxsackie) pueden presentar características semejantes a los poliovirus (25).

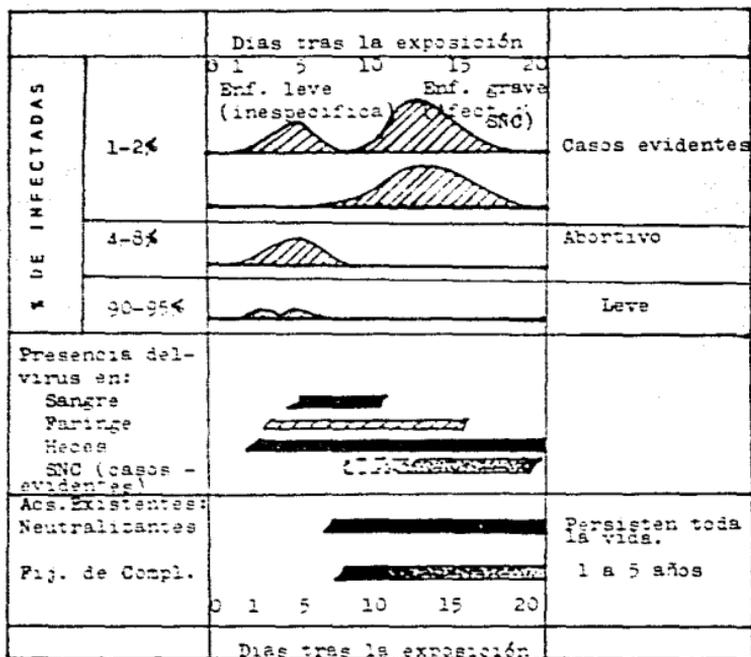
Las manifestaciones clínicas se presentan después de un período de incubación de 1 a 2 semanas y, según el grado de afección, y las manifestaciones clínicas la poliomielitis se ha dividido en los siguientes tipos:

1.- Poliomielitis abortiva ó inaparente.

Es la forma más común que se presenta (90-98%). Se manifiesta por dolor de cabeza, malestar general, fiebre, vómito, letargo, constipación, dolor de garganta y dolores musculares. La recuperación es rápida y completa en unos cuantos días y sin dejar secuelas (13,43,55).

DIAGRAMA No 1 .

Diagrama esquemático de la aparición y evolución de las manifestaciones clínicas de la poliomielitis, localización del virus, desarrollo y persistencia de los anticuerpos.



Tomado de: Nelson, W.E., Vaughan, V.C. and McKay: Tratado de pediatría, Vol. 1, Salvat, México (1977). (43)

Este tipo de poliomielitis sólo se puede diagnosticar por el aislamiento del virus a partir del paciente ó por la identificación y titulación de anticuerpos (3,33).

2.- Poliomielitis no paralítica.

Generalmente el paciente manifiesta los síntomas referidos para la poliomielitis abortiva y, además desarrolla meningitis - aséptica con rigidez y dolor del cuello y espalda; se ha calculado que aproximadamente del 4-8% de los casos inaparentes evolucionan a la forma no paralítica y en muy pocas ocasiones este tipo de poliomielitis puede evolucionar a la forma paralítica (3, 13,33).

3.- Poliomielitis paralítica.

Las lesiones causadas por el virus en las neuronas motoras causan la característica principal de este tipo de poliomielitis que es la parálisis flácida asimétrica.

Muy pequeños porcentajes (1 a 2%) de pacientes con poliomielitis no paralítica evolucionan hasta la forma paralítica y - en ocasiones la parálisis se presenta sin fase antecedente (13, 43,58).

En este tipo de poliomielitis puede haber también incoordinación consecutiva a la invasión del tallo encefálico, así como espasmos dolorosos de los músculos no paralíticos. La parálisis puede ocurrir en músculos que están enervados de la médula, pero ésta es mucho menos frecuente y se le llama parálisis bulbar (43).

La parálisis bulbar puede tener un grado de severidad, --

debilidad o parálisis de solamente ciertos músculos, por ejemplo, músculos faciales e implicación de los centros vasomotores o respiratorios. La parálisis bulbar es a menudo mortal por la insuficiencia respiratoria o cardíaca (13,43).

La afección de los músculos generalmente es máxima durante los primeros días después de la iniciación de la fase paralítica y la máxima recuperación es observada dentro de los 6 meses, pero ocasionalmente puede tomar de 1 a 2 años (33).

El ataque de la enfermedad es a menudo abrupto en niños y en adultos es gradual pero la enfermedad es más severa con una proporción de mortalidad que aumenta con la edad (3).

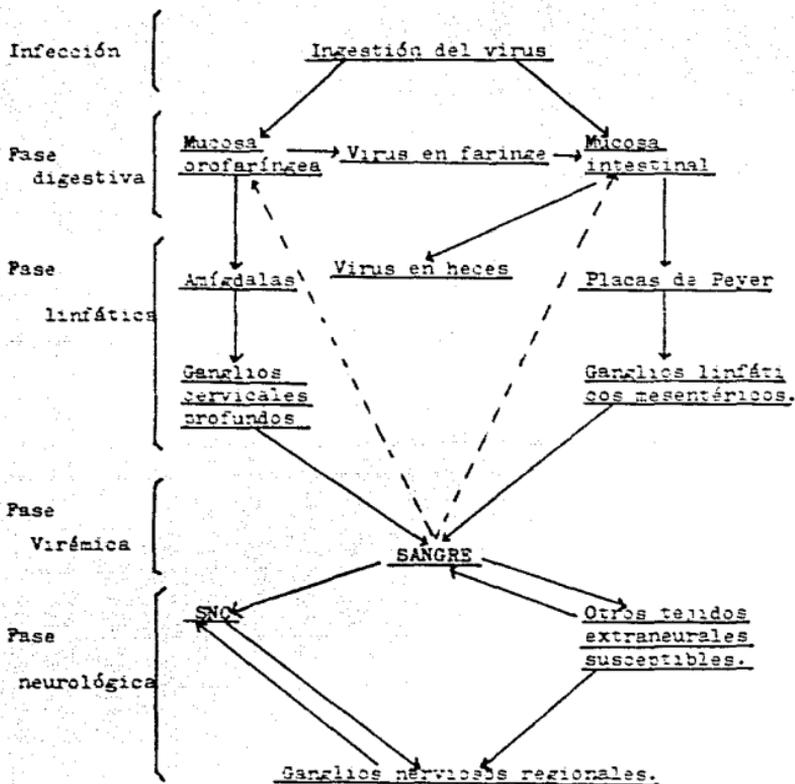
1.6.- PATOGENESIS Y PATOLOGIA.

Las atapas fundamentales de la multiplicación y propagación de los poliovirus fueron aclaradas por numerosos estudios sobre la evolución de la poliomielitis en chimpancés y en el hombre. El progreso de la infección, que culmina afectando al cerebro y a la médula espinal, cuyas lesiones condicionan la gravedad de la infección se resumen en el diagrama No.2 (13).

El virus entra al huésped a través de la cavidad oral y su multiplicación primaria es en la mucosa bucofaríngea e intestinal. El virus está presente con regularidad en la faringe y en las heces antes de que la enfermedad se establezca clínicamente (32,33).

No se sabe si el virus se multiplica en las células epiteliales o linfoides del tubo digestivo. Las amígdalas y las pla-

DIAGRAMA No.2
 PATOGENESIS DE LOS POLIOVIRUS



cas de Peyer del ileón son invadidas muy pronto, una vez iniciado el proceso infeccioso, se produce una intensa multiplicación de los virus en dichos lugares, hasta el punto, de que puede acumularse de 10^7 a 10^8 DICT₅₀ de virus por gramo de tejido (13).

El hecho de que los poliovirus se repliquen en órganos del sistema linforreticular tal como son placas de Peyer y amígdalas hace pensar que los linfocitos juegan un papel importante en la patogénesis de las infecciones naturales por poliovirus. En experimentos hechos con células linfoides humanas se ha visto que existe una infección persistente debida a la replicación del virus en dichas células (8).

Desde los focos primarios de propagación, los virus pasan a los ganglios linfáticos cervicales profundos y mesentéricos - estos ganglios pueden constituir zonas de replicación del virus poco importantes para el progreso de la infección. De los ganglios los virus pasan a la sangre, lo que probablemente provoca una viremia transitoria, que disemina al virus por otros tejidos sensibles como la grasa parda (grasa axilar, paravertebral y supraesternal) y la vísceras. En estas localizaciones extraneurales - se efectúa replicación del virus que es entonces continuamente devuelto al torrente circulatorio con lo que se establece y se mantiene una viremia persistente, esta viremia puede ser favorecida por la probabilidad de que las células del sistema retículo endotelial experimenten también multiplicación viral (5,8,13,-33).

Las vías por las cuales el virus alcanza el SNC no han sido elucidadas, sin embargo, se cree comunmente que los virus —

pueden alcanzar el sistema nervioso central por vía hematológica-- (a través de la barrera hematoencefálica) y por viajar a lo largo de los axones de los nervios periféricos. Dado que la viremia es esencial en la patogénesis de la poliomielitis puede suponerse que la invasión del SNC a través de la pared de los capilares constituye la vía más importante de penetración. Los datos en favor de la invasión del SNC por el virus mediante transmisión a lo largo de las fibras nerviosas son los siguientes: --

- 1.- Se hallan poliovirus en los ganglios de los nervios periféricos durante el proceso de infección.
- 2.- Los virus pueden extenderse siguiendo las fibras nerviosas mediante mecanismos aún desconocidos tanto en los nervios periféricos como en el SNC. (3, 13, 13).

Se ha observado que la amigdalectomía (la cual presumiblemente expone los nervios terminales) inadvertidamente realizada durante el período de incubación del virus, ha precipitado la parálisis. Los traumatismos, incluyendo las inyecciones hipodérmicas y las vacunas, tienden a localizar la parálisis en los músculos traumatizados. No se conocen con exactitud los mecanismos de acción de estos factores del huésped que influyen en la localización sobre la patogénesis de la poliomielitis. Es probable, según se deduce de algunos datos, que los diversos traumas físicos aumenten la infección en ganglios nerviosos periféricos o faciliten la transmisión del virus a lo largo de los nervios periféricos del área afectada, ciertos datos sugieren también que los factores localizadores aumentan la permeabilidad de los vasos sanguíneos en regiones del sistema nervioso central próxi-

mas a la zona traumatizada (3,13,33).

Se ha visto que otros factores del huésped que influyen en el curso de la infección son la edad y el embarazo. La mayor gravedad de la parálisis en adultos, y aún más, en embarazadas, puede tener relaciones con factores endócrinos, ya que se ha visto, en animales de experimentación que los esteroides aumentan la gravedad de la infección (13).

1.7.- HISTOPATOLOGIA.

Las lesiones que originan la parálisis se producen casi siempre en las células de las astas anteriores de la médula espinal y en casos severos las astas posteriores también están involucradas, lesiones similares pueden producirse en el tronco cerebral y corteza motora. Por la formación reticular el núcleo vestibular y el núcleo cerebeloso profundo son las áreas más severamente afectadas del cerebro (ver fig. No.1) (3).

Una de las características constantes del ataque viral sobre células nerviosas es la infiltración difusa perivascular focal de linfocitos y algunos polimorfonucleares así como también células plasmáticas y microglía (43).

Las células de las astas anteriores muestran primero cromatolisis (disolución de la sustancia de Nissl) e hinchazón ó tumefacción; los núcleos son entonces desplazados y muestran pérdida de tinción empezando a ser pionóticos siendo destruidos eventualmente. Finalmente, la célula infectada se redondea, fragmenta y muere y es eliminada por neurofagia y reemplazada por una cicatriz astrogliosa (3,22,55).

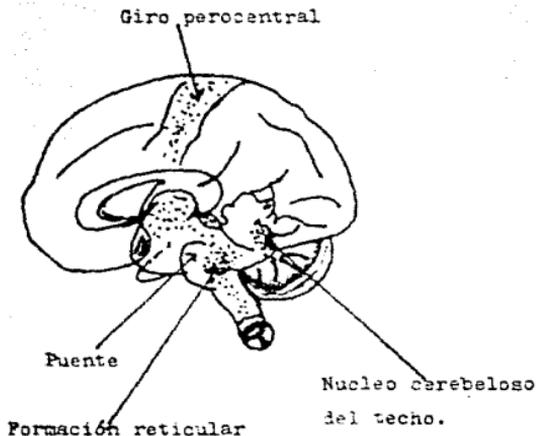


FIGURA No.1

Esquema de la proyección lateral del cerebro humano y de la superficie sagital media del tronco cerebral.

La distribución ordinaria de las lesiones por poliovirus se representan con puntos negros.

Las lesiones espinales se producen generalmente en células de la protuberancia anterior, las de la corteza cerebral se limitan, en gran parte, al giro perocentral; las del cerebelo se encuentran generalmente en los núcleos del techo, las lesiones del pedúnculo cerebral son muy dispersas.

Mientras las células afectadas por el virus sufren lesiones irreversibles, las neuronas próximas pueden contribuir también a la parálisis mediante inhibición debida al edema y a la liberación de productos secundarios por la necrosis (3).

La parálisis no es la única consecuencia por la invasión de poliovirus sino también se puede presentar expansión de ganglios linfáticos y esplénicos, miocarditis, ulceración de placas de Peyer, hiperplasia y prominencia de folículos (43).

1.8.- EPIDEMIOLOGIA.

Siendo autóctonos en su habitat, los poliovirus se transmiten principalmente por las vías fecal-bucal en medios insalubres pero también se cree que puede haber diseminación por aerosoles. La contaminación fecal directa de las manos y de ahí a los alimentos o a utensilios de cocina es, probablemente, la responsable de la mayoría de los contagios caso a caso (13,21).

Durante las epidemias muchas especies de moscas pueden servir como portadores mecánicos de los virus y así contaminar alimentos y aguas consumidos por individuos susceptibles (21,47).

Los poliovirus están diseminados mundialmente, especialmente en países en vías de desarrollo, incluyendo a México. Históricamente el serotipo 1 ha sido el más común pero el tipo 3 se ha hecho más prominente desde la introducción de la vacuna de Sabin (1,23,25).

Cerca del 90% de las infecciones en Norteamérica y Europa Occidental son causadas por el poliovirus tipo 1 y esporádicamente por el tipo 3. El serotipo 2 es el menos diseminado pero se ha visto que, en áreas como el medio oriente ha causado infecciones severas (13,25).

En los trópicos la enfermedad es endémica durante todo el año, en países templados, antes de la introducción de la vacuna, ocurría en forma clásica como epidemia de verano. El hecho de que ocurran casos esporádicos en invierno indica la posibilidad de que el virus pueda también propagarse por las vías respiratorias (13,21).

Los grandes cambios han influido en la epidemiología de la poliomielitis en los últimos años: 1.- La introducción (paradójicamente) de estándares modernos de higiene en los países más avanzados del mundo que produjo un cambio en la edad de mayor frecuencia de la enfermedad. La consecuente reducción de la propagación del virus por la vía fecal-bucal limita la circulación de los poliovirus y la frecuencia de la infección en la comunidad como un todo. Como resultado, la mayoría de las personas no tienen inmunidad adquirida para cuando llegan a la adolescencia y aún a la edad adulta. Se ha visto que la infección primaria en los adultos tiene, por razones todavía desconocidas, más probabilidades de terminar en una enfermedad parálitica grave que cuando se trata de una infección primaria en niños, por lo que en los países avanzados se tienen más probabilidades de epidemias en adultos jóvenes, dejando secuelas graves. La mayor susceptibilidad de los adultos jóvenes a la parálisis ha sido más notable-

en las epidemias en los "suelos vírgenes" que ocurren en comunidades aisladas sin contacto previo con el virus (13,21).

2.- El segundo cambio es la introducción masiva de la vacuna oral viva atenuada que causó una declinación de la enfermedad sobretodo en los últimos 20 años (21,23).

En Norteamérica, Europa y Australia, la incidencia de poliomieltis paralítica se ha reducido casi en un 100% a partir de 1955 raras veces se encuentran poliovirus silvestres en desechos humanos (aunque las cepas vacunales son actualmente ubicuas). Los pocos casos que quedan tienden a ocurrir en los grupos marginados no vacunados. En los países tropicales de Africa, Asia, Centro y Sudamérica la inmunización no ha alcanzado el éxito deseado y en algunos países la frecuencia de la poliomieltis parece ir en aumento. Sin embargo, es en gran parte, atribuible a los problemas prácticos asociados con la administración de la vacuna oral en los países tropicales (21,23), y a los fenómenos de interferencia producidos por otros enterovirus.

1.9.- DIAGNOSTICO DE LABORATORIO.

a) Recolección y Almacenamiento de las Muestras.

Es posible emplear varios tipos de especímenes para tratar de aislar a los poliovirus o enterovirus. Además, debe obtenerse suero de los casos agudos y convalecientes para estudios serológicos. La recolección de los especímenes apropiados y las buenas condiciones de almacenamiento y envío son fundamentales para el-

éxito de los estudios realizados en el laboratorio. Los especímenes para aislamiento de virus deben recogerse lo más pronto posible durante el curso de la enfermedad, ya que la excreción del virus infeccioso durante esa época alcanza su punto máximo. El suero de casos agudos también se habrá de recoger con la mayor rapidez y en fecha posterior se habrá de tomar una muestra en estado convaleciente. Los especímenes tomados en autopsias se habrán de recoger inmediatamente después de la muerte. De otro modo, cualquier virus que exista puede perder su viabilidad por los cambios tisulares post-mortem (44).

Tanto los especímenes para el aislamiento del virus como los sueros deben guardarse congelados (a -20°C) en el laboratorio hasta el momento de su procesamiento.

b) Especímenes Para el Aislamiento del Virus.

- Heces .- Se recogen de 4 a 8 gramos en recipientes limpios con tapa de rosca. Se recomienda tomar dos muestras con uno a dos días de diferencia.

- Protis rectales .- Se introduce al recto un isópo de algodón estéril humedecido y se frota la mucosa hasta que la materia fecal queda adherida al mismo y se coloca en un frasco estéril que contenga medio de transporte del virus.

- Protis de garganta .- Se frota bien la parte posterior de la faringe con uno o dos isópos de algodón estériles y se colocan en un frasco que contenga 2 ml de medio de transporte del virus.

- Líquido cefalorraquídeo .- Se recogen de 3 a 5 ml de ---

éste líquido en forma aséptica en un frasco estéril.

- Especímenes tomados al practicar una autopsia.- Principalmente se toman especímenes del SNC. Los del bulbo raquídeo, el pons y la médula espinal cervical y lumbar deberán recogerse con instrumentos estériles y deberán colocarse en recipientes individuales estériles con tapa de rosca. Por último se obtiene una muestra de la materia fecal del colon descendente y se coloca en un recipiente de plástico estéril con tapa de rosca.

c) Especímenes Para Serología.

- Sueros pares .- Se recolectan de 5 a 10 ml de sangre venosa en forma aséptica y se colocan en tubo estéril sin anticoagulante. La muestra de fase convaleciente se toma de 3 a 4 semanas después de la fase aguda.

Las muestras de sangre deberán dejarse coagular a la temperatura ambiente por una a dos horas. Se deberá tener cuidado en la separación del suero, ya que los eritrocitos residuales se hemolizarían durante el almacenamiento ulterior y podrían obstaculizar las pruebas serológicas. Es necesario emplear una técnica aséptica y recipientes de vidrio estériles para tomar la sangre y separar el suero ya que la contaminación bacteriana o micótica del suero puede destruir los anticuerpos y obstaculizar las pruebas de neutralización y fijación de complemento (44).

Los poliovirus/enterovirus son excretados en las heces hasta por 4 semanas o más después del comienzo de la infección. Por tanto, las heces fecales son el mejor material para el aislamiento de los virus. Los frotis rectales con la mayor cantidad -

posible de heces adheridas pueden emplearse en lugar de la muestra fecal, sin embargo, la tasa de aislamientos de esos frotis es muy inferior a la que se logra con las heces (44).

Con frecuencia no es posible aislar poliovirus de líquido cefalorraquídeo. Sin embargo, si existe alguna muestra de éste debe cultivarse, ya que para determinar la etiología de la enfermedad es muy importante demostrar que ese material contiene virus. Es posible aislar con mayor frecuencia otros enterovirus del líquido cefalorraquídeo. Ello amplía la conveniencia de cultivarlo, el descubrimiento de otros enterovirus en la muestra de ese líquido tomada a un supuesto caso de poliomielitis sugeriría que el agente etiológico de la enfermedad es otro virus distinto a polio (podría ocurrir una doble infección) (21,44).

d) Aislamiento del Virus.

El sistema de elección empleado para el diagnóstico de la poliomielitis es el cultivo celular. El aislamiento del virus -- se puede hacer en células renales primarias de varias especies -- de monos o en líneas celulares de origen humano o simio. Las --- líneas celulares que se emplean con mayor frecuencia son las siguientes:

- RD
- Hep-2c
- Vero
- Hela

También se pueden aislar otros enterovirus en estos tipos-celulares o en ratones recién nacidos (en éstos se aíslan parti-

cularmente los virus Coxsackie A). (44)

Las muestras clarificadas y tratadas con antibióticos se inoculan en los tubos de cultivo celular y son revisados a diario durante una semana para detectar la aparición del efecto citopático característico. Los poliovirus, como la mayor parte de los enterovirus que infectan células de riñón de mono producen manifiesta retracción celular, redondeamiento, aumento en la refractividad, citoplasma granular, piconosis nuclear y a veces hinchazón de las células seguida de rápida lisis. Generalmente el efecto citopático se desarrolla entre 1-4 días después de la inoculación del material infectado (la aparición del efecto citopático es más rápida cuando se trata de un segundo o tercer pase) los cultivos, aparentemente negativos, pueden ser sometidos a pases subsiguientes para establecer un diagnóstico definitivo (44).

La identificación del virus se realiza por medio de pruebas de neutralización, sirviéndose de un suero estandarizado para cada uno de los tres tipos de poliovirus. Para establecer el diagnóstico serológico se comparan los títulos de anticuerpos de los sueros obtenidos durante la fase aguda de la enfermedad y de 2 a 3 semanas después de su inicio mediante pruebas de neutralización y fijación de complemento (44).

En el Laboratorio de Virología del I.N.D.R.E la técnica empleada para el aislamiento de los poliovirus enterovirus es la mencionada anteriormente y las líneas celulares son RD y Hep-2c.

A continuación se enumeran algunos otros estudios hechos a casos de parálisis flácida encaminados al diagnóstico del

del agente etiológico causante:

- Identificación de los virus aislados mediante la Ratería de sueros de Menlick.

- Pruebas con anticuerpos bloqueadores.

- Aislamiento e identificación de los poliovirus en forma simultánea.

- Uso de anticuerpos monoclonales para la diferenciación intratípica de las cepas de poliovirus.

- Pruebas de hemaglutinación e inhibición de la hemaglutinación con enterovirus.

La utricuidad de las cepas de Sabin, atenuadas, posterior a la adopción generalizada de la inmunización bucal acarrea un problema muy difícil para el diagnóstico de laboratorio hoy en día. Puesto que los marcadores genéticos para la virulencia no son -- del todo confiables, se debe recurrir a las pruebas de patogeni- cidad en animales para distinguir las cepas silvestres de las -- cepas vacunales. En la práctica esto se hace únicamente cuando -- aparece un caso paralítico de poliomielitis en un individuo re- cientemente inmunizado, lo que plantea la remota posibilidad de que la enfermedad haya sido inducida por la vacuna (21,23,61).

1.10 .- TRATAMIENTO.

No existe un tratamiento específico para la poliomielitis. Los antibióticos no tienen acción sobre el virus de la poliomie- litis y se cree que también son ineficaces las inyecciones de in- munglobulina humana si se administra después del comienzo de la

enfermedad (43,58).

Para la forma abortiva de poliomielitis son suficientes -- los sedantes y los analgésicos y una dieta apetitosa y reposo en cama hasta que la temperatura vuelva a la normalidad. Es conveniente evitar todo exceso de actividad física durante dos semanas consecutivas y dos meses después se deberá practicar un detallado examen neuromuscular para descubrir pequeños grados de parálisis que pudieran existir (43,58).

Los pacientes con formas no paralítica y paralítica leve pueden tratarse en su domicilio. El tratamiento es análogo el de la forma abortiva. Se aliviarán las molestias que producen la -- tensión muscular, la rigidez de la nuca, el tronco y las extremidades. Los analgésicos son más eficaces si se combinan con la -- aplicación directa de calor húmedo en forma de compresas calientes que se mantienen colocadas de 15 a 30 minutos y se aplican a intervalos de 2-4 horas. El empleo del calor seco (en forma de rayos infrarrojos) constituye un método más sencillo pero menos eficaz para el alivio del dolor. Algunas veces los baños calientes son útiles. El dolor muscular y el espasmo pueden persistir durante varias semanas, hasta en la forma no paralítica exigiendo el empleo de compresas calientes y fisioterapia suave. Dos meses después del restablecimiento se practicará un examen detallado para descubrir posibles secuelas que podrían originar problemas posturales en los años venideros (43,58).

En la mayoría de los pacientes con la forma paralítica es necesaria la hospitalización. Conviene que el enfermo se encuentre en una atmósfera quieta y tranquila. Se mantendrá la posi---

ción más conveniente para evitar excesivas deformidades esqueléticas. Mediante los dispositivos adecuados (calzados especiales, sacos de arena, ligeras férulas si es necesario) se obtendrá una posición natural, con los pies en ángulo recto, las rodillas ligeramente flexionadas y las caderas y el raquis en extensión. -- Solamente podrá tolerarse sedantes y opiáceos, si no está amenazada la respiración. El estreñimiento es frecuente y debe evitarse la obstrucción del intestino grueso por masas fecales endurecidas (43,58).

Quando existe parálisis vesical, un estimulante del parasimpático, como el "urecholine" puede provocar el vaciamiento en 15 a 30 minutos. Algunos pacientes no responden a esta medicación y en otros provoca náuseas, vómitos y palpitaciones. El tratamiento de la parálisis bulbar consiste esencialmente en mantener expeditas las vías aéreas y evitar el riesgo de inhalación de saliva, alimento y materias vomitadas. El drenaje por acción de la gravedad de las secreciones acumuladas se favorece teniendo la cabeza baja (lo que se consigue elevando los pies de la cama unos 20-25°) y adoptando la posición de decúbito prono con la cara vuelta a un lado (43).

El mantenimiento del equilibrio hídrico y electrolítico se efectúa mejor por infusión parenteral ya que la administración oral por sonda e ingestión en los primeros días provoca vómitos (43).

En ciertos casos es necesario practicar la traqueotomía en los pacientes con poliomielitis bulbar, por existir parálisis de las cuerdas bucales con constricción de la hipofaringe. También -

puede ser necesario colocar al paciente en respiradores mecánicos.

1.11 .- PREVENCIÓN Y CONTROL.

Hasta que en 1954 se dispuso de una vacuna con virus inactivado, las únicas posibilidades de controlar la infección era la inmunización pasiva y los medios inespecíficos de sanidad pública. Para interrumpir la transmisión del virus se aislaba a los enfermos, se cerraban los lugares donde podían reunirse grupos de personas sensibles (por ej. iglesias, cines, piscinas, etc.) y se rociaba el aire con insecticidas para reducir la población de moscas y otros insectos sospechosos de transportar al virus, pero ninguna de éstas medidas resultó eficaz para prevenir o detener la marcha de una epidemia (13).

Actualmente se cuenta con dos tipos de vacunas: a) La de virus inactivo, que se administra por inyección y b) La de virus atenuado, que se emplea por vía oral (35,52)

El primer acontecimiento que abrió el camino para el desarrollo de una vacuna segura fué, en 1949, la demostración por John F. Enders y colaboradores de que los poliovirus crecían en cultivos humanos embrionarios produciendo un efecto citopático característico (18,20,30,52).

a) Vacuna de Virus Inactivo.

En 1953 John Salk demostró que los tres tipos de poliovirus podían inactivarse por acción, durante una semana, del formal 1:4,000 a pH 7 y a 37°C, persistiendo la suficiente capaci-

dad antigénica (20,30,52). Salk demostró la efectividad de ésta vacuna sobre 100 voluntarios humanos (60).

Esta vacuna se prepara a partir de poliovirus que se multiplica en tejido renal de mono (20,30,42). Se dispone de ella desde 1955, año en que se le otorgó la licencia por el Servicio Público de salud (60).

Cuando se utiliza virus purificado, su inactivación es --- buena pero cuando se emplean preparaciones no purificadas, el virus puede agregarse y dar una deficiente inactivación. La incompreensión de estos hechos planteó, al principio, algunos problemas serios en la producción de la vacuna, de lo que es un --- ejemplo un incidente en que quedó virus infeccioso residual en --- varios de los lotes de vacuna comercial y provocó más de 100 casos de poliomiелitis parálitica. Estos errores se han corregido y actualmente la vacuna se considera inocua y eficaz.(13)

En los últimos años se han estudiado nuevas técnicas para mejorar la calidad de las vacunas de virus inactivo, una posibilidad consiste en obtener una concentración de virus muy elevada purificarla y preparar a continuación una vacuna subunitaria que no contiene ácido nucleico del virus sino ciertos polipéptidos --- seleccionados que poseen actividad antigénica. Se ha visto que --- la inactivación por formol en presencia de 1 M de $MgCl_2$ produce mucho menos desnaturalización y da lugar a un preparado más adecuado como vacuna que el virus inactivado sin $MgCl_2$. Además con 1 M de $MgCl_2$ puede practicarse la inactivación por formol a --- 50°C con lo que no existe pérdida de inmunogenicidad, consiguiendo también la inactivación de otros virus que pueden hallarse---

presentes en los cultivos de células de monos en los que se propagan los poliovirus. Estos virus tales como el SV40 son más resistentes a la inactivación por formol que los poliovirus pero el $MgCl_2$ no los protege de la inactivación por calor (13).

La vacuna se aplica mediante una inyección subcutánea y se requieren de 4 inoculaciones para lograr la inmunización primaria, las tres primeras se administran en intervalos de 4 a 6 semanas y la cuarta se aplica doce meses después (25,42).

La vacunación primaria produce respuesta de anticuerpos -- contra los tres serotipos de poliovirus en más del 70-90% de -- los vacunados. Las dosis de refuerzo se aplican en períodos de 5 años hasta que la persona tenga 18 años (25).

La inmunización no impide la infección del tubo digestivo a menos de que los niveles de anticuerpos del suero sean muy altos (lo cual no sucede, excepto en un corto período de tiempo que sigue a la dosis de refuerzo).

Ventajas de la Vacuna de Virus Inactivo:

- La inactivación permite que se use en individuos con deficiencias inmunológicas o bajo tratamientos inmunosupresores.

- La inactivación evita la posibilidad de mutaciones y la aparición de virulencia.

- Se evita la presencia de agentes adventicios.

- Si se administra en las dosis suficientes da una inmunidad satisfactoria.

- Se puede incorporar en los programas de inmunización -- pediátrica junto con otras vacunas (42).

Desventajas de la Vacuna de Virus Inactivo:

- Problemas lógicos de administración, relativos a la inyección estéril a un gran número de personas, en especial a niños.
- Mayor costo, tanto por la inyección como por las diferentes dosis de la vacuna.
- No produce inmunidad local (intestinal) en los vacunados.
- Si la inactivación del virus fracasara podría dar lugar a parálisis debida a la vacuna.
- Problemas en la preparación debido a la creciente escasez de monos (42).

b) Vacuna con Virus Atemuado.

En 1951 Coprowski y colaboradores logran "modificar" al poliovirus tipo 2, por adaptación en ratones alboneros y prueban que el virus modificado no causó efectos colaterales en 20 humanos voluntarios y se crea así la vacuna atenuada de poliovirus tipo 2 (30).

En 1952 Enders, Wellers y Robbins observan que la virulencia de los poliovirus disminuye después de pases repetidos en células extraneurales (cultivo embrionario de piel, riñón e intestino de humanos) (20,30,32).

Entre 1955-1957 A.B. Sabin logra preparar cepas atenuadas de los tres tipos de poliovirus crecidos en cultivos celulares - de riñón de mono (20,52).

La vacuna de poliovirus atenuado fué introducida a partir de 1961 y ha reemplazado gradualmente a la vacuna de Salk en -- Estados Unidos y la mayoría del mundo (3). Durante los prime-- ros años casi siempre se emplearon vacunas monovalentes que in-- corporaban cada serotipo por separado pero en la actualidad se-- utiliza ampliamente la vacuna trivalente (30).

La vacunación primaria produce anticuerpos contra los tres serotipos, en más del 95% de los receptores y estos anticuerpos permanecen durante varios años igual que con la vacuna inactiva-- da. Se recomiendan dosis de reactivación para mantener concentra-- ciones adecuadas de anticuerpos (3).

La vacuna de Sabin se aplica por vía oral en forma de go-- tas saborizadas, fácilmente administrables en gran escala por -- personal no necesariamente calificado. Estando activo el virus - se multiplica en el conducto gastrointestinal, de ahí que el con-- siguiente estímulo inmunogénico sea equivalente al que sigue la infección subclínica natural. La vacuna de Sabin induce no sola-- mente la producción de IgG sérica sino también de IgA local en - las células del intestino. Con esta vacuna el niño queda prote-- gido no solamente contra la diseminación de los virus por la -- corriente sanguínea sino también contra la multiplicación de ta-- les virus en el intestino (21).

Con las vacunas trivalentes el programa de vacunación esti-- pula que la primera dosis debe ser administrada a los dos meses de edad y la segunda y tercera dosis se aplica en intervalos de dos meses y a los 18 meses de edad se da una cuarta dosis (42).

Algunos autores refieren que la vacunación debe iniciarse -- alrededor de los 6 meses de edad, después de que la alimentación del pecho materno haya terminado, puesto que los anticuerpos IgA antipolio son tan presentes en la leche materna (21). Se debe administrar una dosis de refuerzo alrededor de los 6 años de edad y se considera que no es necesario aplicar nuevos refuerzos (42).

Ha surgido cierta preocupación acerca de la posibilidad de que la vacuna tipo 3 (Cepa León) pueda no estar suficientemente atenuada. No hay duda de que genéticamente es menos estable que las otras dos y ocasionalmente sufre una mutación en retroceso -- en su paso al hombre y vuelve a ser neurovirulenta para el mono. El análisis estadístico de los casos de poliomielitis asociados con la vacuna (definidos como aquellos casos de parálisis que se desarrollan en menos de un mes después de haberse aplicado la vacuna) indica cifras mayores que la mera coincidencia de aislamientos de poliovirus tipo tres y sugiere que éste componente de la vacuna puede realmente causar parálisis en algo menos de uno en un millón de receptores. También se han llegado a encontrar -- casos de poliomielitis paralítica en niños vacunados con la vacuna de Sabin de los cuales se ha aislado el poliovirus tipo 2 -- mutado, aparentemente, durante su replicación en el tracto intestinal (23,61).

La vacuna trivalente atenuada se produce en el Instituto -- Nacional de Virología (INV). Los poliovirus utilizados para la -- elaboración de la vacuna se propagan en cultivos primarios de -- riñón de mono *Brythrocebus patas* y las cepas utilizadas son:

- Poliovirus tipo 1 cepa LSc 2ab
- Poliovirus tipo 2 cepa p712 Ch2ab
- Poliovirus tipo 3 cepa León 12ab

Ventajas de la Vacuna de Virus Ateniado:

- Fácil administración.
- No se requiere personal especializado para su administración.
- La producción de anticuerpos es rápida.
- Proporciona inmunidad sérica y secretoria (intestinal).
- La inmunidad perdura toda la vida.
- En su forma estabilizada conserva su potencia en condiciones difíciles de campo con poca refrigeración y sin congelación.
- Bajos costos de producción y distribución ya que no se requieren dosis de refuerzo posteriores.
- En casos de epidemias, no sólo induce la producción rápida de anticuerpos, sino también infecta con prontitud el tubo digestivo con lo que se evita la propagación del virus causante de la epidemia (31,42).

Desventajas de la Vacuna de Virus Ateniado.

- Puede haber mutaciones, que en algunos casos raros han dado origen a neurovirulencia causante de parálisis en los individuos vacunados o en personas que han tenido contacto con ellos.

- Puede haber interferencia por otros enterovirus que limitan la colonización intestinal.

- Está contraindicada en personas con enfermedades inmunosupresoras y sus contactos familiares, así como también en personas con tratamientos inmunosupresores.

- En muchas partes del mundo la vacuna antipoliomilítica - continúa siendo cultivada en células de riñón de mono a pesar de las claras señales de alerta proporcionadas por los incidentes - con virus B de Marburg y con el SV40 y el descubrimiento de --- otros virus crípticos de los simios (42).

2.- Enfermedades Paralíticas No Poliovíricas.

Antiguamente se consideraba que todo caso de parálisis era producido por poliovirus, sin embargo, con los años y el desarrollo de nuevas técnicas de aislamiento e identificación así como el empleo de estudios neurocitológicos se han ido descubriendo otros enterovirus que también pueden producir parálisis semejante a la que causan los poliovirus (53).

Se ha encontrado que gran cantidad de enterovirus (ECHO, Coxsakie, enterovirus 70 y 71) producen parálisis la cual comúnmente se confunde con poliomielitis paralítica debido a que, muchas veces las manifestaciones clínicas y los cambios neuropatológicos son muy similares (ver tabla No. 2). (53)

El enterovirus 71 es biológicamente similar al virus Coxsakie A. Este enterovirus fué aislado entre los años 60s y 70s de casos esporádicos de meningitis aséptica y encefalitis. En 1975, en Bulgaria, donde la poliomielitis aparentemente había sido — erradicada, se reportaron varios casos de meningitis aséptica y meningoencefalitis así como enfermedad paralítica indistinguible clínicamente de poliomielitis la cual era causada por enterovirus 71. De los 700 casos reportados durante la epidemia de Bulgaria 147 (21%) presentaron parálisis espinal y 44 (30%) de estas personas murieron. El virus fué aislado de médula espinal (53).

En 1978 se reportó una epidemia por enterovirus 71 en Hungría, en la mayoría de los casos se presentó disminución neuromotora y parálisis (53).

TABLA No.2

Enterovirus Etiológicamente Asociados Con Enf. Paralítica

GRUPO	TIPOS
Poliovirus	1, 2, 3
Coxsackie	A ₁ , A ₇ , A ₉ , B ₂ , B ₃ , B ₄ , B ₅
ECHO	1, 2, 4, 6, 7, 9, 11, 16, 18, 30
No Agrupados	70 y 71*

*Casos fatales donde se aisló el virus de médula espinal.

Fuente: Sabin A.B.: Paralytic Poliomyelitis: Old dogma and new perspectives, Rev. Infect. Dis., 3(3):543-564, (1981). (53)

En Bulgaria y Hungría la parálisis por enterovirus 71 ocurre principalmente en niños y adultos jóvenes (53).

El enterovirus 70 (virus de la conjuntivitis hemorrágica - aguda) aparece recientemente, y en 1975 se encuentra distribuido en Asia, Africa, Europa y Oceanía, pero no se encuentra en el hemisferio norte. Hacia 1980 es aislado en California proveniente del Sudeste de Asia, produciendo conjuntivitis hemorrágica -- (43).

Disminución motora y enfermedad paralítica asociada con el enterovirus 70 ha sido erróneamente descrita como polirradiculoneuritis. Aunque no existen reportes de casos fatales por enterovirus 70 se han hecho estudios con monos inoculados con este virus y han exhibido lesiones típicas de poliomielitis en médula espinal (53,58).

Las enfermedades paralíticas que más frecuentemente se -- diagnostican, erróneamente, como poliomielitis paralítica se enlistan en la tabla No. 3.

El Síndrome de Guillain-Barré es el que más frecuentemente se confunde clínicamente con la poliomielitis paralítica por lo que en los últimos años se han reglamentado los signos y síntomas clínicos para el diagnóstico diferencial de este síndrome y la poliomielitis (53,58).

La neuritis periférica consecutiva a inyección tóxica (plomo, avitaminosis, etc.) o herpes zoster paralítico craneal así como las neuropatías postdiftéricas pueden ser excluidas por historial, examinación sensorial y condiciones relacionadas (45,58).

TABLA No.3

Enfermedades paralíticas que son, erróneamente, diagnosticadas como poliomiелitis.

- 1.- Síndrome de Guillain-Barré (Polirradiculoneuritis).
- 2.- Neuropatías nucleares o citoplásmicas no inflamatorias
- 3.- Mielitis postinfecciosa.
- 4.- Mielitis transversa.
- 5.- Polineuritis postdiftérica.
- 6.- Neuritis periférica postinyeccionaI tóxica.
- 7.- Encefalomiелitis de etiología variada.
- 8.- Meningitis tuberculosa.
- 9.- Neuropatía diabética.
- 10.- Rabia y tétanos (confundidas con polio bulbar)
- 11.- Paresis con líquido cerebrospinal normal y rápida y completa recuperación.

Esta información está basada en estudios postmortem en -- México (1962-1968) y sobre un análisis de 37 casos adecuadamente documentados y reportados como poliomiелitis en Brasil después - de la vacunación masiva de 18 millones de niños dentro de los 5- años de edad en junio y agosto de 1950 (53,58).

La encefalitis, rabia y tétanos pueden ser confundidas con poliomiелitis bulbar (43).

La pseudoparálisis causada por diversas condiciones también puede, en determinados momentos, ser confundida con poliomiелitis. Así tenemos que un trauma no reconocido a partir de contusiones, torceduras, fracturas y separaciones epificiarias con dolor y deficiencia en el movimiento de extremidades puede ser referido al hospital con diagnóstico de poliomiелitis sin embargo un examen subsecuente puede mostrar osteomiелitis, fiebre reumática aguda, triquinósis o sífilis congénita que puede ser la causa verdadera de la parálisis (43,58).

La sinovitis no específica tóxica origina una cojera unilateral, las localizaciones más frecuentes son en la cadera y la rodilla y puede haber fiebre baja durante algunos días (43).

Debido a la gran cantidad de enfermedades que pueden manifestar parálisis y ser confundidas con poliomiелitis se han determinado una serie de signos y síntomas, así como pruebas o estudios de laboratorio que nos pueden dar un diagnóstico diferencial entre estas enfermedades y la poliomiелitis. El aislamiento del agente causal, así como los estudios neurocitológicos nos darán la etiología real de una enfermedad paralítica. En la tabla No.4 se resumen una serie de signos clínicos no compatibles con un diagnóstico definitivo de poliomiелitis (53).

TABLA No.4

Signos Clínicos Indicativos de Enfermedad Paralítica no Polio

- 1.- Leucocitos en LCR $\leq 10/\text{mm}^3$ dentro de los 7 días después del comienzo de la parálisis.
- 2.- Bajas concentraciones de glucosa (menor a 40 mg/100 ml)
- 3.- Marcada disminución o pérdida de la sensación.
- 4.- Disturbios persistentes al orinar.
- 5.- Somnolencia, desorientación o coma.
- 6.- Reflejos normales o exagerados.
- 7.- Ausencia de fiebre al inicio de la parálisis.
- 8.- Ausencia de rigidez mucro-espinal al inicio de la parálisis.
- 9.- Recuperación completa desde una extensa parálisis en - dos a cuatro semanas.
- 10.- Completa recuperación de una paresis o parálisis dentro de 7 a 10 días.
- 11.- Progresión de parálisis de otras partes del cuerpo - después de una semana, seguida a la primera aparición de parálisis.

Fuente: Sabin A.B. : Paralytic Poliomyelitis: Old dogms and new perspectives, Rev. Infect. Dis., 3(3):543-564 (1981).(53)

3.- EL Síndrome de Guillain-Barré (SGB).

3.1.- Historia.

El Síndrome de Guillain-Barré fué descrito inicialmente -- por Landry en 1857 (37,49) como una parálisis ascendente de predominio motor con deficiencia respiratoria y muerte. En 1892, -- William Oster notó cierta asociación, en uno de sus pacientes, -- con enfermedad febril y el posterior desarrollo de displejia fa-- facial y debilidad arrefléxica de miembros (40).

En 1916 Guillain-Barré y Strohl refieren un cuadro benigno y añaden la observación de alteraciones características en lí-- quido cefalorraquídeo (LCR) de disociación albúmino-citológica - (29).

El SGB es una polirradiculoneuropatía aguda desmielinizan-- te(40,57).

Es una condición clínica severa caracterizada por disminu-- ción motora y parálisis neural. Tiene suficientes características que justifican su clasificación dentro de las principales infec-- ciones polineuríticas (49).

3.2.- Etiología.

El Síndrome de Guillain-Barré se considera como un padeci-- miento de etiología desconocida ya que, hasta la fecha, no se ha encontrado un agente causal específico (40,41,57).

Es una enfermedad compleja relacionada frecuentemente a infecciones inespecíficas y en la mayoría de los casos de tipo viral y bacteriano que se presenta después de un período de días o semanas (41).

Se ha encontrado que, aproximadamente el 60% de los casos, de SGB están asociados con síndromes virales, sobretodo los que afectan el tracto respiratorio y en menor proporción los del -- tracto gastrointestinal (40).

El SGB se ha asociado a diversos agentes infecciosos entre los que tenemos los siguientes:

Citomegalovirus, Virus de Epstein-Barr, Micoplasma pneumoniae, virus de la influenza A y B , virus Coxsackie A2,5,5,9 virus ECHO 6,11 y 22, hepatitis B y hepatitis no A y no B (4,40,-- 43,51,53).

Otras enfermedades que han sido asociadas con el SGB son - la fiebre tifoidea, fiebre escarlatina, mononucleosis infecciosa e incluso se han reportado casos de SGB precedidos de enteritis por Campilobacter jejuni (27,51).

Se han observado complicaciones incluso después de la aplicación de la antitoxina tetánica y varias vacunas, incluyendo vi ruela y poliomielitis (57).

Se considera que la etiopatogenia del SGB está mediada por mecanismos inmunológicos, además se ha reconocido la presencia - de anticuerpos contra antígenos del nervio y factores séricos -- desmielinizantes (1,3,54).

3.3.- Signos Clínicos.

El cuadro clínico es variable y puede consistir en parálisis bilateral ascendente aguda, alteraciones sensoriales y motoras o una combinación de signos y síntomas referidos a los nervios craneales y periféricos. Hay dolor muscular y los reflejos de los tendones se abaten o decrecen en gran medida, los reflejos cutáneos se mantienen generalmente. La confusión sensorial es variable pero en niños esto no es prominente. Pueden ocurrir calambres dolorosos y parestesias. Normalmente el desarrollo de la parálisis tiende a ser simétrica y ascendente, se ven involucrados los músculos abdominales y torácicos. No necesariamente deben estar afectadas las 4 extremidades. No es común que estén involucrados los nervios craneales, excepto por los nervios faciales, en cuyo caso puede ser bilateral. Como regla se produce atrofia muscular y generalmente la recuperación es completa, --- sobretodo en niños. Los casos fatales son poco comunes pero pueden ocurrir como resultado de la parálisis respiratoria (41,49,-57).

En un estudio hecho por Haynaker y Kernohan donde estudiaron 50 casos fatales de SGB no encontraron cambios primarios de finitivos en la médula espinal, tallo cerebral o cerebro. Sin -- embargo el sistema nervioso periférico siempre estuvo afectado - (44).

El líquido cerebroespinal en la fase aguda muestra proteínas elevadas y un bajo contenido de células, la llamada disociación albuminocitológica (2,41,49,57).

3.4.- Patología.

A nivel de patología el hallazgo cardinal de la lesión del nervio periférico es desmielinización segmentaria, asociada frecuentemente con infiltración perivascolar de células inflamatorias (48,57).

Se encuentran considerablemente involucradas las raíces de los nervios craneales y las raíces ventrales a lo largo del eje espinal. Se han reportado lesiones viscerales consistentes en necrosis focal con infiltración de células redondas en el hígado, riñón y glándulas suprarrenales (57).

Otros cambios que se manifiestan a nivel del sistema nervioso periférico son edema y proliferación de células de Schwann (49).

3.5.- Criterios de Diagnóstico.

Los criterios de diagnóstico para el SGB del Comité Ad. Hoc, incluyen:

a.- Puede estar presente una infección inespecífica previa a la parálisis, incluyendo infecciones como difteria o herpes zoster.

b.- Datos múltiples o difusos de parálisis de neurona motora inferior con inicio rápido o gradual de afección simétrica ascendente y arrefléxica.

c.- Puede haber afección de la sensibilidad pero habitualmente es menor que la motora .

d.- Líquido cefalorraquídeo con menos de 10 células y 60-mg/dl o más de proteínas.

3.5.- Incidencia y Susceptibilidad.

La incidencia anual del SGB varía de 0.06 a 1.89 casos por 100,000 que es semejante en todo el mundo y no ha variado mucho en las últimas décadas (56).

La incidencia de la enfermedad en niños aparentemente se ha ido incrementando paulatinamente. Se sugiere una alta susceptibilidad entre los 4-10 años pero la enfermedad puede ocurrir desde un año de edad hasta en los ancianos (15).

Aunque la evolución natural de la enfermedad en la mayoría de los pacientes es favorable y se recuperan satisfactoriamente hay una tasa de mortalidad de 3-5%, un 10 a 20 % requiere de ventilación asistida y un 10 a 15% permanece con secuelas (15).

3.7.- Tratamiento.

Las medidas generales de apoyo constituyen el elemento principal para estos pacientes. Es necesario mantener una adecuada función cardiorrespiratoria y vigilar y prevenir las posibles complicaciones. La insuficiencia respiratoria es la más frecuente y grave, llegando en ocasiones a requerir respiración asistida (15).

Debido a las evidencias que implican una patogenesis inmune para el SGB se ha alentado el uso de esteroides y otros agentes inmunosupresores como la ciclofosfamida y ciclosporina, estos

dos últimos se han usado esporádicamente con las desventajas de efectos secundarios frecuentes (43,57).

El uso de esteroides no ha mostrado gran utilidad y se ha notado que pueden prolongar el tiempo de recuperación (43).

Actualmente las dos modalidades terapéuticas específicas, que han mostrado un beneficio real en pacientes con SGB son la plasmaféresis y la administración de gammaglobulina intravenosa lo cual se ideó en base a las evidencias de una probable etiología autoinmune (7,16,36).

Desde el primer informe de éxito en el uso de plasmaféresis en pacientes con SGB en 1975, se han publicado múltiples artículos tanto de series pequeñas sin controles como estudios prospectivos multicéntricos controlados, como el grupo colaborativo francés que incluye 220 pacientes y el grupo americano que incluye 245 y ambos hablan a favor del uso de plasmaféresis en pacientes graves y dentro de las dos primeras semanas de evolución. Los beneficios que se logran con este tratamiento son los siguientes: disminución en la mortalidad, en el tiempo de hospitalización, de recuperación y de necesidad de ventilación (7,24,28,39,50).

Casi todas las publicaciones sobre el uso de plasmaféresis en el SGB mencionan mejoría de los pacientes, en relación con los controles y sólo algunos refieren recaídas o curso fluctuante que responden a un segundo tratamiento (7,24,28).

Más recientemente se introdujo el uso de gammaglobulina IV y se han observado efectos favorables en el curso de la enfermedad. Las dosis recomendadas van de 0.4g/kg/día durante 5 días a 1 g/kg/día durante dos días (16,36).

4.- Diagnóstico Diferencial Entre SGB y Poliomiелitis.

En el SGB por lo general la fiebre, la cefalalgia y los -- signos meníngeos son menores que en la poliomiелitis. En el LCR puede existir una pleocitosis en la primera semana pero en todo caso es pasajera y luego el número de células se hace normal. Al principio el contenido protéico es normal o poco elevado pero -- progresivamente va aumentando alcanzando cifras muy altas del -- orden de dos gramos o más por 100 ml que persiste durante varios meses y que junto con la normalización precoz de las células -- constituye un dato de gran valor diagnóstico (2).

En la poliomiелitis la pleocitosis es constante y más persistente, siendo escaso (no superior a 300 mg/dl) el aumento del contenido protéico en LCR (2).

Es característica, en el SGB, la distribución simétrica de la parálisis. Las alteraciones sensitivas o los signos piramidales o ambos a la vez son frecuentes en el SGB pero no en la poliomiелitis (4).

Al inicio de la parálisis por poliovirus se presenta la -- llamada rigidez nudo-espinal y fiebre.

En la tabla No.5 se muestran las principales diferencias -- entre el SGB y la poliomiелitis.

TABLA No. 5

Diferencias Entre el SGB y la Poliomiелitis

	SGB	Poliomiелitis
1.- Etiología	Desconocida	Poliovirus 1, 2, 3.
2.- Patología	Desmielinización segmentaria de nervios periféricos.	Afección de las células de las astas anteriores de la médula espinal.
3.- Parálisis	Flácida simétrica	Flácida asimétrica
4.- Disociación albuminocitológica	+	-
5.- Afección de la sensibilidad.	±	-
6.- Rigidez nuco-espinal.	-	+

Fuente: Diversos (29,40,41,53).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

IV.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Para el aislamiento de poliovirus/enterovirus se ha utilizado, como método de rutina en el Laboratorio de Virología del I.N.D.R.E., el cultivo de una suspensión clarificada de heces -- fecales en las líneas celulares RD y Hep-2c, pero se ha visto -- que dicha metodología no logra aislar al virus en la totalidad -- de las muestras trabajadas, por lo que entre los últimos meses -- de 1988 y principios de 1989 se seleccionaron muestras que por -- el método de rutina (CD) habían sido negativas (pero que procedían de casos clínicos con parálisis) para ser trabajadas nuevamente pero ahora por el método de concentración con sus dos variantes: TAc y CDc.

Este método alternativo nos ofrece mayor sensibilidad que el método de rutina ya que nos permite aislar al virus aunque -- éste se encuentre en cantidades muy pequeñas o "mascarado" por diferentes sustancias y esto nos permite eliminar los posibles falsos negativos dados por CD.

OBJETIVOS

V.- O B J E T I V O S

- 1.- Aislar, por el método de concentración ácida, el virus causante de parálisis flácida en niños de los cuales - no se pudo aislar por el método de cultivo directo y - cuyo diagnóstico clínico es poliomielitis y SGB.
- 2.- Identificar el virus aislado.
- 3.- Evaluar la eficiencia del método de concentración y su utilidad para eliminar falsos negativos dados por el - método de cultivo directo.

MATERIALES Y METODOS

VI.- MATERIALES Y METODOS.

1.- MATERIAL BIOLÓGICO.

a) 38 muestras de heces fecales provenientes de niños con parálisis flácida, las cuales fueron trabajadas con anterioridad para el aislamiento de poliovirus/enterovirus, dando resultados negativos. Estas muestras fueron conservadas a -70°C en el Laboratorio de Virología del I.N.D.R.E hasta el momento de su procesamiento.

b) 3 muestras de heces fecales de las cuales se había aislado poliovirus previamente por CD y se consideraron como controles positivos.

c) Tubos con monocapa de células de la línea RD.

d) Tubos con monocapa de células de la línea Hep-2c.

e) Suspensión celular RD y Hep-2c (100-200,000 células por mililitro).

f) Antisueros antipolio (contra serotipos 1,2,3).

2.- MATERIAL DE LABORATORIO.

Para la realización de este trabajo todo el material de vidrio y las sustancias a utilizar fueron sometidas a condiciones de completa esterilidad.

a) Tubos para centrifuga, cónicos, de polipropileno de 15-ml con tapón de rosca 'Costar 3215'.

b) Tubos para centrifuga, de policarbonato de 12 ml con tapón de presión 'Nalgene 3110-0120'.

c) Tubos para ultracentrifuga con tapón de aluminio a presión.

d) Tubos de vidrio con tapón de rosca de 10 a 15 ml.

e) Biales de plástico con tapón de rosca de 2 ml 'Costar'.

f) Pipetas de 1,2,5 y 10 ml.

g) Micropipetas de 0.05, 0.02 y 0.01 ml 'Ependorf 4710'.

h) Puntillas para micropipetas con rango de volumen de 1 a 250 microlitros, 'America 700730'.

i) Microplacas para microneutralización (titulación) de 96 pozos de fondo cónico, 'Costar 3596'.

j) Matraces aferados de 100,500 y 1000 ml.

k) Matraces Erlenmeyer de 100 y 500 ml.

l) Gradillas inclinadas para tubos de cultivo.

m) Bulbos de seguridad de tres pasos.

n) Abatelenguas

ñ) Frascos ámbar de diferentes tamaños.

3.- APARATOS.

a) Campana de flujo laminar vertical 'Canadian Cabinets' - Mod. EM-42a-49.

b) Centrifuga refrigerada 'Damon-IBC, CO DPR 6000'

c) Ultracentrifuga refrigerada 'Damon IBC DPR 10,000'.

d) Ultracentrifuga refrigerada 'Beckman 3212'.

e) Incubadora de CO₂ (35°C) 'Forma Scientific' Mod. 3158.

f) Incubadora a 35°C 'Thelco' Mod. 6M.

g) Refrigeradores a -20°C y a -70°C 'RHEM, RSVCO, Ultra -

Low' Mod. ULT-1155 BLT.

- h) Refrigerador a 4°C 'Recca'.
- i) Balanza analítica.
- j) Equipo de filtración 'Milipore' de 250 ml con filtro de 0.2 μ m.
- k) Bomba de vacío 'Gelman' Mod. 13152.
- l) Agitador mecánico para tubos 'Lab-line Instruments' Mod. 1290.
- m) Autoclave.

4.- SOLUCIONES Y REACTIVOS.

- a) Solución salina balanceada (SSB) de Hanks.
- b) Mezcla de antibióticos: Penicilina(1000 u), Estreptomina 1000 μ gm, Neomicina (5000 μ gm) y 10 μ gm de fungicida.
- c) Medio mínimo de mantenimiento de Eagles (MM), 'DIBCO'.
- d) Medio de crecimiento de Eagles 'DIBCO'.
- e) Buffer de glicina/HCl, pH 2.4 .
- f) Sacarosa al 30%.
- g) NaOH 0.5 M.
- h) HCl 0.5 N.

Nota: Ver composición y preparación en el apéndice.

5.- METODOLOGIA.

Se trabajó con un total de 46 muestras de heces fecales de las cuales 8 (controles) fueron muestras cuyos resultados anteriores habían sido positivos para el aislamiento de poliovirus o algún otro enterovirus, 15 provenían de niños con parálisis flácida y diagnóstico clínico de SGE y las 23 restantes de pacientes con diagnóstico clínico de poliomielitis; de estos 35 casos no se había podido aislar el virus causante de la parálisis utilizando el método de rutina de CD para poliovirus/enterovirus seguido normalmente en el Laboratorio de Virología del I.N.D.R.E.

Tanto las muestras con resultados anteriores negativos como los controles positivos se trabajaron bajo las mismas condiciones de concentración; los pasos seguidos fueron los siguientes:

I.- Suspensión y Clarificado.

a) Se preparó una suspensión al 20% (P/V) en SSE de Hanks-fría, adicionando 2 gramos de heces fecales a 10 ml de SSE en tubos cónico de propileno de 15 ml.

b) Se agitó el tubo hasta obtener una suspensión homogénea.

c) Se centrifugó a 3,000 rpm durante 20 minutos en centrifuga refrigerada (5-10°C).

d) El sobrenadante se transfirió a tubos de policarbonato de 10 ml y se centrifugó durante 30' a 10,000 rpm en centrifuga refrigerada (5-10°C).

- e) Se adicionaron 0.2 ml de mezcla de antibióticos.
- f) Las suspensiones clarificadas se almacenaron en tubos de vidrio con tapón de rosca a -20°C hasta el momento de continuar con su tratamiento.

II.- Concentración por Ultracentrifugación.

- a) Las suspensiones clarificadas se descongelaron y se transfirieron a tubos especiales para ultracentrifuga.
- b) Se centrifugaron a 34,000 rpm (150,000 g) durante dos horas en ultracentrifuga refrigerada a 5°C.
- d) Se resuspendieron los botones en 4 ml de MSM.
- e) Se separaron 2 ml de suspensión clarificada y concentrada y se guardaron a -20°C para su posterior inoculación en los cultivos celulares (cultivo directo concentrado, CDc).
- f) Los dos ml restantes de suspensión concentrada se sometieron a un tratamiento ácido.

III.- Tratamiento Acido.

- a) A 2 mililitros de los concentrados por ultracentrifugación se les adicionó 1.2 ml de buffer de glicina/HCl, pH 2.4 - y, en los casos necesarios, se ajustó el pH con HCl 0.5 N.
- b) Se incubaron por 3 horas a temperatura ambiente.
- c) Se les adicionó 8.8 ml de sacarosa al 30% y se reajustó el pH a 2.4.
- d) Se centrifugó a 34,000 rpm durante 2 horas en ultracentrifuga refrigerada a 5°C.

e) Los botones obtenidos se resuspendieron en 2 ml de MEM y se ajustó el pH a 7 con NaOH 0.5 M.

f) Estos concentrados (tratamiento ácido concentrado, TAc) se guardaron en tubos de vidrio con tapón de rosca a -20°C para su posterior inoculación en los cultivos celulares. Ver diagrama No.3.

IV.- Aislamiento del Virus.

a) Para el aislamiento del virus se emplearon dos líneas celulares de origen humano, RD y Hep-2c y para cada muestra se utilizaron dos tubos de cada línea celular.

b) Los tubos a inocular se observaron previamente en microscopio invertido para asegurarse de que las células estuvieran en buen estado y se les cambió el medio de crecimiento por medio de mantenimiento.

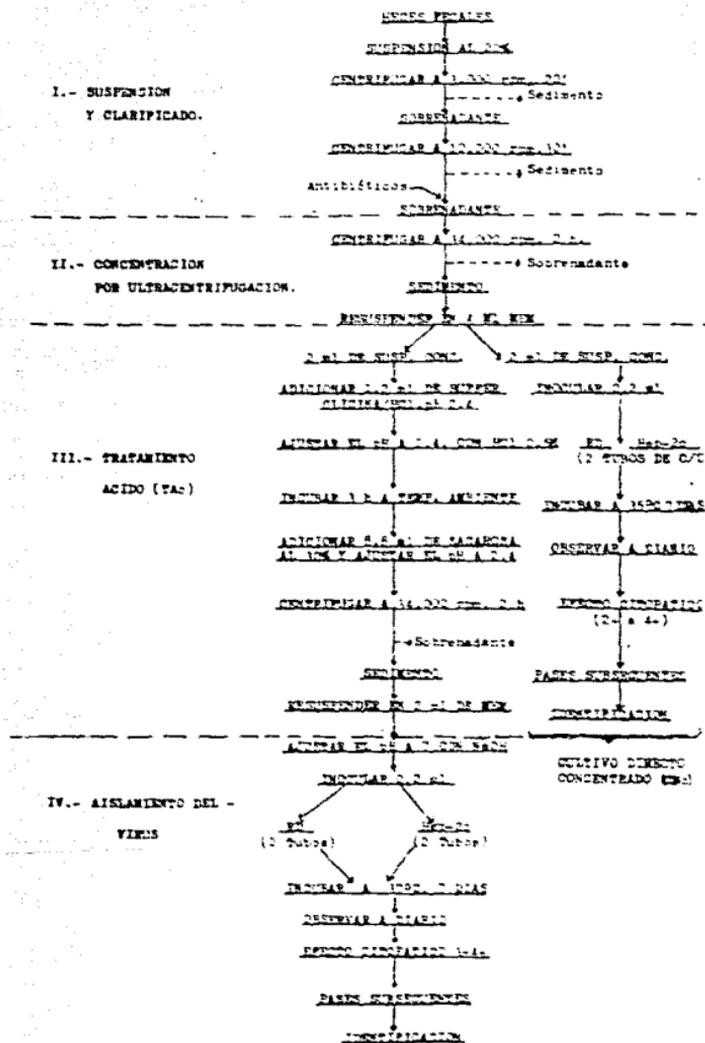
c) Cada tubo se inoculó con 0.2 ml de muestra.

d) Los tubos, ya inoculados, se incubaron a 35°C (los Hep-2c en atmósfera de CO_2 para evitar una alcalinización excesiva) y se observaron a diario durante 7 días.

e) Al mismo tiempo se incubaron y observaron, como testigos, varios tubos sin inocular de cada línea celular. Esas células deberían mantener una apariencia normal durante todo el período de incubación para que el aislamiento se considerara válido.

f) Las parejas de tubos que mostraban un efecto citopático

DIAGRAMA No. 3
MÉTODOLÓGICA GENERAL



de 3+ a 4+ en el transcurso de los días de observación, se juntaron en un sólo tubo y se congelaron a -20°C para realizar pases posteriores.

g) Los tubos que sufrían degeneración durante el período de incubación y los que se mantenían negativos durante todo el período (7 días) se congelaban y descongelaban para realizar pases subsecuentes.

h) Los pases posteriores se realizaron inoculando tubos -- frescos de la misma línea celular con 0.25 ml de la substancia -- del pase original o bién del pase anterior inmediato.

i) Los pases posteriores se incubaron y observaron de igual forma que las muestras originales y si no había un efecto citopático claro en un segundo o tercer pase la muestra se consideró como negativa.

j) Sólo se realizaron pases extras (40,50 ó 60) en aquellas muestras positivas pero con títulos de virus muy bajos.

V.- Identificación del Virus.

(Técnica de microneutralización en placa)

a) Se distribuyeron 0.05 ml de las mezclas de antisueros -- de tipificación en las cavidades de una microplaca empleando 4 -- cavidades para cada muestra, las mezclas de antisueros fueron -- las siguientes:

-Poliovirus 1 y 2

-Poliovirus 1 y 3

-Poliovirus 2 y 3

-Poliovirus 1,2 y 3

Cada antisuero se encontraba en la mezcla en una concentración final de 20 unidades de anticuerpos neutralizantes por cada 0.05 ml.

Los antisueros se inactivaron a 56°C por 30' antes de preparar las mezclas.

b) Se realizaron diluciones seriadas (desde 10^{-1} a 10^{-4}) - de los virus aislados.

c) Se agregaron 0.05 ml del aislado del virus diluido a -- 10^{-1} a dos de las cavidades de cada mezcla de antisueros anti-polio y 0.05 ml del aislado diluido a 10^{-2} a las otras dos cavidades de las mezclas (ver fig. No.2).

Se empleó como diluyente medio de crecimiento de eagles.

d) Se preparó una retrotitulación de la dilución del virus empleada para la identificación (punto c), es decir, se realizaron diluciones seriadas en tubo (punto b) y se agregaron 0.05 - ml de cada dilución a cada una de las 4 cavidades dedicadas a cada muestra en una microplaca, a dichas cavidades se les agregó - previamente 0.05 ml de MEM como diluyente (ver fig. No.3).

A cada muestra se le dedicó 4 cavidades en la microplaca - para cada una de sus cuatro diluciones.

e) Las placas de identificación y retrotitulación se incubaron a 35°C, durante 2 horas en incubadora de CO₂.

f) Después del período de incubación a cada una de las cavidades se les agregó 0.1 ml de suspensión celular (RD ó Hep-2c

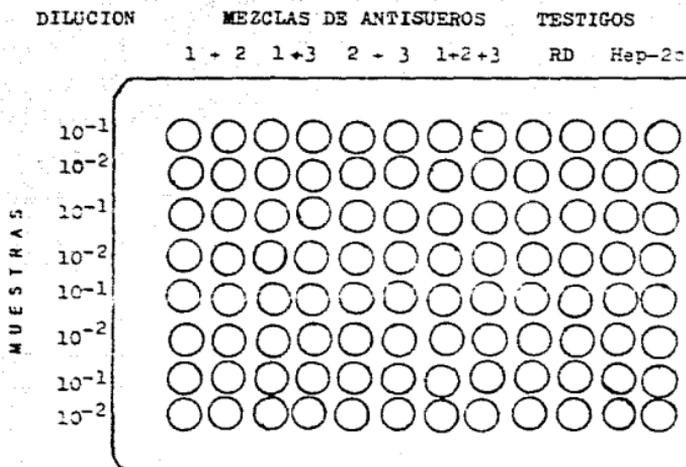


FIGURA No.2
 REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LA TECNICA DE IDENTIFICACION POR MICRONEUTRALIZACION EN PLACA.

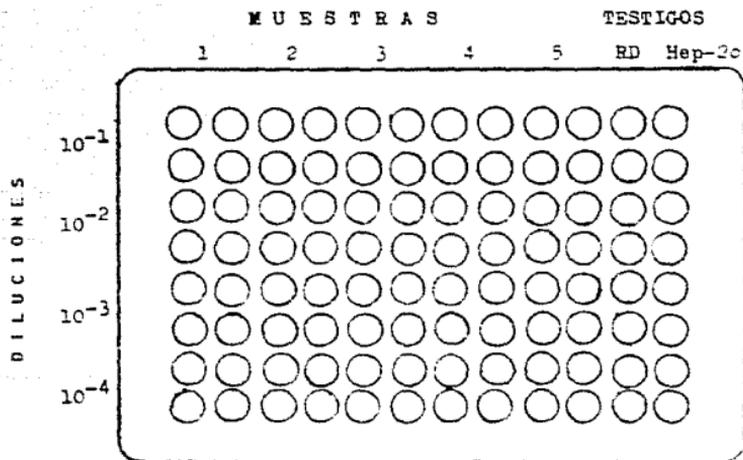


FIGURA No. 3
 DISTRIBUCION DE LAS MUESTRAS Y SUS DILUCIONES PARA LA-
 RETROTITULACION EN PLACA.

dependiendo de la línea celular en que se haya aislado el virus de cada muestra). Dicha suspensión contenía de 100,000 a 200,000 células por mililitro en medio de crecimiento de Eagles.

g) También se prepararon de 6 a 8 cavidades en cada placa para que sirvieran como testigos celulares, para ésto se agregaron 0.1 ml de suspensión celular a 0.1 ml de medio de crecimiento en cada cavidad.

h) Las placas se incubaron a 35°C en incubadora de CO₂ durante 7 días.

i) Las placas se examinaron diariamente en microscopio invertido para determinar si se producía efecto citopático. La retrotitulación del virus y los testigos celulares también se observaron a diario.

VI.- Interpretación (Ver tabla No.6).

a) La ausencia de un efecto citopático indica que la mezcla de antisueros ha neutralizado al virus. El antisuero común a las mezclas que causan neutralización indica el tipo de virus aislado.

b) La presencia de efecto citopático en todas las mezclas indica que el virus aislado es un enterovirus "no polio".

c) Los controles celulares deberán permanecer sin ningún efecto durante todo el período de observación para que la prueba se pueda dar como válida.

TABLA No. 6

INTERPRETACION DE LA PRUEBA DE MICRONEUTRALIZACION EN PLACA PARA LA IDENTIFICACION DEL VIRUS AISLADO.

	MEZCLAS DE ANTISUEROS				VIRUS AISLADO
	1+2	1+3	2 + 3	1+2+3	
E F E C T O C I T O P A T I C O	+	-	-	-	POLIO 3
	-	+	-	-	POLIO 2
	-	-	+	-	POLIO 1
	+	+	-	-	POLIO 2 Y 3
	+	-	+	-	POLIO 1 Y 3
	-	+	+	-	POLIO 1 Y 2
	+	+	+	-	POLIO 1,2 Y 3
	+	+	+	+	NO POLIO
	-	-	-	-	*NO POLIO

*Sólo cuando la retrotitulación garantice la presencia del virus en títulos adecuados.

RESULTADOS

VII.- RESULTADOS.

En la tabla No.7 se muestran los diagnósticos clínicos de cada una de las muestras trabajadas así como los resultados obtenidos por el método clásico de cultivo directo (CD) y los resultados obtenidos por el método de concentración con sus dos variantes: cultivo directo concentrado (CDc) y tratamiento ácido concentrado (TAc).

El número de aislamientos hechos por el método de concentración ácida (TAc) fué de 9 casos, que representan un 23.63% -- del total de casos trabajados, sin tomar en cuenta los 8 controles positivos, 6 de estos 9 casos corresponden a pacientes con diagnóstico clínico de SGB y 3 a pacientes con diagnóstico de poliomielitis (tabla No.8).

Por el cultivo directo concentrado (CDc) se obtuvieron un total de 5 aislamientos (13.1%) de los cuales 3 fueron pacientes con diagnóstico clínico de SGB y 2 con diagnóstico de poliomielitis (tabla No.8).

En la tabla No. 9 se resumen los pases y la línea celular en que se aislaron aquellos casos que fueron positivos por el método de concentración en sus dos variantes (TAc y CDc).

Del total de aislamientos hechos por CDc, 3 se lograron aislar en primer pase (aunque con títulos muy bajos) y el resto en tercer y cuarto pase. De las muestras aisladas por TAc 4 se aislaron en primer pase y las demás (5) sólo hasta un segundo, tercero ó cuarto pase.

TABLA No. 7

DIAGNOSTICO CLINICO DE LOS CASOS ESTUDIADOS Y RESULTADOS OBTENIDOS POR EL METODO CLASICO (CD) Y POR EL METODO DE CONCENTRACION.

Dx. CLINICO	No. MUESTRAS	A I S L A M I E N T O S					
		METODO CLASICO		METODO DE CONCENTRACION			
		NEGATIVOS	POSITIVOS (controles)	CDc		TAc	
				NEGATIVOS	POSITIVOS	NEGATIVOS	POSITIVOS
SGB	15	13	2	10	5	7	5
POLIO	31	25	6	23	8	22	9
TOTAL	46	38	8	33	13*	29	17*

* INCLUYE LOS 8 CONTROLES POSITIVOS

TABLA No.8

FRECUENCIA DE AISLAMIENTOS HECHOS POR
EL METODO DE CONCENTRACION.

		SGB	POLIOMIELITIS	TOTAL
CASOS NEGATIVOS POR EL METODO CLASICO (CD).		13	25	38*
METODO DE CONCENTRACION	AISLAMIENTOS HECHOS POR Cdc	3(7.89%)	2(5.26%)	5(13.1%)
	AISLAMIENTOS HECHOS POR TAc	6(15.78%)	3(7.9)	9(23.68%)

*TOTAL DE MUESTRAS SIN TONAR EN CUENTA LOS 8
CONTROLES POSITIVOS.

En la tabla No. 9 se marcan tanto los pases en que se logró aislar el virus por primera vez (efecto citopático 2+ a 4+) como los pases sucesivos que se tuvieron que hacer para aumentar los títulos del virus. En la mayoría de los casos se hicieron de 3 a 6 pases extras para obtener títulos buenos que nos permitieran montar la identificación de dichos agentes.

La tabla 10 corresponde a los resultados obtenidos en la identificación de los agentes virales aislados por el método de concentración ácida.

De los 9 aislamientos hechos por el método de concentración ácida, 6 resultaron ser enterovirus "no polio" y los tres restantes poliovirus tipo 3.

La retrotitulación de cada una de las muestras nos confirma que en todas ellas se empleó una cantidad de DICT₅₀ que está entre 32 y 320, que se considera una cantidad de virus adecuada para la identificación según lo menciona la Guía de Procedimientos para el Aislamiento, la Identificación y la Serología de los Poliovirus/enterovirus, publicada por la OPS y la OMS (44).

Finalmente, en las tablas 11 y 12 se resumen los pases, - las líneas celulares y los diagnósticos clínicos de los agentes virales aislados por cada una de las dos variantes del método de concentración.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

TABLA No. 9

CASOS POSITIVOS POR EL METODO DE CONCENTRACION CONSIDERANDO
EL PASE Y LA LINEA CELULAR EN QUE SE AISLARON.

MUESTRA	LINEA CELULAR	CULTIVO DIRECTO CONC. (Cdc)						TRATAMIENTO ACIDO CONC. (Tac)						
		PASE						PASE						
		1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	
27255	RD	++	++	++				++	++	++				
	Hep	++	++	++				++	++	++				
27481	RD								++	++	++	++	++	
	Hep													
27758	RD							++	++	++				
	Hep							++	++	++				
28309	RD								++	++	++	++	++	
	Hep													
29740	RD													
	Hep	++	++	++				++	++	++				
30223	RD	++	++					++	++	++				
	Hep	++	++					++	++	++				
080-H1	RD									++	++	++		
	Hep													
080-H2	RD		++	++	++				++	++	++	++		
	Hep													
094-H1	RD													
	Hep					++	++	++				++	++	++

TABLA No.10

IDENTIFICACION DE LOS AGENTES VIRALES AISLADOS POR EL METODO DE CONCENTRACION ACIDA.

CASO	ANTISUEROS								RETROTITULACION				AGENTE AISLADO
	1 + 2		1 + 3		2 + 3		1+ 2 +3		10	10	10	10	
	10	10	10	10	10	10	10	10					
27255	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	0	0	NO POLIO	
27451	4+	4+	0	0	0	0	0	0	4+	4+	4+	4+	POLIO 3
27768	0	0	0	0	0	0	0	0	4+	4+	4+	2+	NO POLIO
28309	0	0	0	0	0	0	0	0	4+	4+	4+	4+	NO POLIO
29740	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	NO POLIO
30223	0	0	0	0	0	0	0	0	4+	4+	4+	4+	NO POLIO
080-1	4+	4+	0	0	0	0	0	0	4+	4+	4+	4+	POLIO 3
080-2	4+	4+	0	0	0	0	0	0	4+	4+	4+	4+	POLIO 3
094-1	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	NO POLIO

TABLA No. 11

AGENTES VIRALES AISLADOS POR CULTIVO DIRECTO CONCENTRADO TOMAN
DO EN CUENTA EL PASE, LA LINEA CELULAR Y EL DIAGNOSTICO CLINICO

MUESTRA	AGENTE VIRAL	LINEA CELULAR	*PASE EN QUE SE AISLO.	DIAGNOSTICO CLINICO
27255	No polio	RD-Hep	1°	SGB
29740	No polio	Hep	1°	SGB
30223	No polio	RD-Hep	1°	SGB
080-H ₂	Polio 3	RD	3°	Polio
094-H ₁	No polio	Hep	4°	Polio

*Pase en que se observó por primera vez un efecto citopático de 2+ a 4+ .

TABLA No. 12

AGENTES VIRALES AISLADOS POR TRATAMIENTO ACIDO CONCENTRADO --
TOMANDO EN CUENTA EL PASE, LA LINEA CELULAR Y EL DIAGNOSTICO -
CLINICO.

MUESTRA	AGENTE VIRAL	LINEA CELULAR	PASE EN QUE SE AISLO	DIAGNOSTICO CLINICO
+27295	No polio	RD Hep	1º	SGB
27481	Polio 3	RD	2º	SGB
27768	No polio	RD-Hep	1º	SGB
28309	No polio	RD	2º	SGB
+29740	No polio	Hep	1º	SGB
+30223	No polio	RD-Hep	1º	SGB
080-H ₁	Polio 3	RD	3º	Polio
+080-H ₂	Polio 3	RD	2º	Polio
+094-H ₁	No polio	Hep	4º	Polio

(*) Muestras que se aislaron por las dos variantes del método de concentración.

DISCUSSION

VIII.- DISCUSION.

En la tabla No.7 se observa que por las dos variantes del método de concentración (TAc y CDc) se aisló el virus de los 8 - casos considerados como controles positivos lo que nos indica - que el método es confiable y además sensible ya que aisla agentes virales en un buen porcentaje de muestras (tabla No.8) que - por el método de CD se habían reportado como negativas.

Las ventajas que ofrece el método de concentración sobre - el método clásico son, principalmente, la concentración de la -- muestra lo que nos permite aislar al virus aunque éste se encuentre en cantidades muy pequeñas y la eliminación, por el tratamiento ácido, de todas aquellas sustancias (materia orgánica, proteínas, restos celulares, sustancias citotóxicas, etc.) que -- pueden interferir para que el virus infecte a las células y por lo tanto sea aislado (38,50,62). Si se consideran todas estas -- ventajas vemos que el método de concentración en la variante ácida (TAc) ofrece mayores posibilidades para el aislamiento ya que elimina gran cantidad de factores que por el método clásico no - se toman en cuenta.

En los casos que siguieron siendo negativos tanto por el método de concentración como por el método clásico, se podría pensar que estos resultados se deben más que nada a algún error en las condiciones de envío y almacenamiento de las muestras. Ya -- que se sabe que tanto el momento de toma del producto como las - condiciones de envío y almacenamiento son primordiales para lograr aislar el virus (44).

Lo que se sugeriría para evitar falsos negativos debidos a factores diferentes al método de aislamiento y saber si el error es realmente en el método empleado es controlar estrictamente -- todos los factores que tienen que ver con la recolección, almacenamiento y envío de las muestras. Esto implicaría, en primer término, vigilar que las muestras de materia fecal se tomen -- dentro de las 4 semanas después de iniciar el proceso infeccioso ya que se sabe que más adelante el virus deja de eliminarse -- por heces y por lo tanto es muy poco probable su aislamiento si la muestra fué tomada después de las 4 semanas. Debido a que la mayor cantidad de muestras proceden del interior de la república es muy importante controlar la red fría desde el lugar de origen hasta el laboratorio de referencia y, por último, las condiciones de almacenamiento, congelación y descongelación de las muestras también deberán ser controladas ya que se ha visto que la -- concentración del virus viable en heces disminuye si la muestra es sometida a congelaciones y descongelaciones continuas.

En las tablas 7 y 8 se puede ver que se obtiene un mayor -- número de aislamientos utilizando la variante TAc ya que por CDC se logran en total sólo 5 (13.1%) aislamientos mientras que por TAc 9 (23.68%). En general vemos que a pesar de que la mayor -- cantidad de muestras trabajadas procedieron de pacientes con -- diagnóstico clínico de poliomielitis y sólo 13 fueron de pacientes con SGB la frecuencia de aislamientos es siempre mayor en -- los casos con diagnóstico clínico de SGB lo que nos indica que -- el método de concentración es más sensible para aislar el virus

a partir de niños con diagnóstico clínico de SGB de los cuales - se aisló principalmente enterovirus "no polio". En la tabla No.- 12 se puede ver como en todos los casos (salvo 2 excepciones)-- con diagnóstico clínico de SGB el virus aislado es un enterovirus "no polio".

El método de concentración ácida se ha empleado, según la literatura, para aislar básicamente enterovirus del tipo ECHO y Coxsakie B de pacientes con síndrome de fatiga postviral dando - resultados satisfactorios en el aislamiento de dichos virus (62) por lo que podríamos pensar que dentro de estos enterovirus --- "no polio" aislados de pacientes con diagnóstico clínico de SGB, al ser identificados totalmente (mediante la batería de sueros - de Menlick, inoculación en ratones lactantes, anticuerpos monoclonales, etc.) probablemente encontraríamos virus ECHO (1,2,4, 6,7,9,11,15,18,30), Coxsakie A (4,7,9), B (2,3,4,5) o bien enterovirus 70 y 71 que son los enterovirus "no polio" que más frecuentemente se han encontrado causando parálisis (53).

En este trabajo la identificación realizada mediante la mi cronneutralización en placa (tabla No.10) sólo nos permitió identificar a los virus aislados como poliovirus o como enterovirus "no polio" ya que para una identificación total de estos virus - no se contaba con algún método que estuviera a nuestro alcance - en el tiempo en que se trabajaron dichas muestras.

En la tabla No.9 vemos que en cuanto al número de pases - en que se lograron los aislamientos no hay gran diferencia por - las dos variantes del método de concentración ya que si descar-

amos los casos en que por CDC no se aisló virus y comparamos -- sólo aquellos casos positivos por las dos variantes notamos que los aislamientos se hicieron en las mismas líneas celulares y -- casi en los mismos pases (tablas 11 y 12).

En los casos en que por TAc si se aisló virus y por CDC no el número de pases necesarios para el aislamiento fué mayor (tablas 9 y 12) que en los casos en que se aisló el virus por las dos variantes, lo que nos indica que en estos casos en particular los virus, además de encontrarse en cantidades muy pequeñas, -- muy probablemente estaban rodeados por otras substancias que sólo mediante el tratamiento ácido son eliminadas haciendo más sensible y por lo tanto más eficiente la variante TAc.

Al comparar el número de pase en que se aisló el virus en cada caso y el tipo de virus aislado (tablas 11 y 12) tenemos -- que aquellos virus identificados como "no polio" se aislaron más rápidamente (primer a segundo pase) mientras que los poliovirus -- tipo 3 se aislaron sólo hasta un segundo o tercer pase y con títulos bajos siendo necesarios más pases subsecuentes para aumentarlos (tabla No.9) aunque todo esto, como se mencionó anteriormente también dependió de la variante de concentración empleada.

Los virus "no polio" aparentemente no mostraron preferencia marcada por alguno de los dos tipos de líneas celulares utilizadas mientras que los poliovirus muestran una marcada preferencia por la línea RD (tablas 11 y 12).

La OPS recomienda, para el aislamiento de poliovirus/enterovirus el uso, principalmente, de las líneas celulares RD y Hep-2 ya que son las que han mostrado mayor sensibilidad a este tipo -

de virus (44), mostrando efectos citopáticos característicos --- mediante los cuales se hace evidente la infección.

Al analizar la tabla No.12 vemos que existen dos casos -- (27481 y 094-H₁) en los que el diagnóstico clínico no concuerda con el agente viral aislado ya que, en el primer caso (27481) el diagnóstico clínico es de SGB y el virus aislado es polio tipo 3 y en el segundo caso (094-H₁) ocurre lo contrario ya que el diagnóstico es poliomielitis y el agente aislado es un virus "no polio", esto nos lleva a suponer que en estos dos casos, en particular, los signos y síntomas clínicos no fueron evaluados correctamente por los médicos esto se debe a que, como lo menciona la literatura, estas dos enfermedades paralíticas son muy similares y pueden causar confusión sobretodo en el diagnóstico clínico -- temprano (53,58) por lo que se debe contar con un método de diagnóstico confiable que nos permita saber la causa real de la parálisis.

CONCLUSIONES

IX.- CONCLUSIONES.

- 1.- El método de concentración en sus dos variantes: --- ácida (TAc) y directa (CDc) es más eficiente que el --- método clásico de CD, para aislar el virus causante de la parálisis flácida.
- 2.- Comparando las dos variantes del método de concentra--- ción (TAc y CDc), el tratamiento ácido concentrado --- (TAc) resulta ser más eficiente que la variante sin --- tratamiento (CDc).
- 3.- El método de concentración en sus dos variantes aísla eficientemente a los poliovirus pero muestra una mayor sensibilidad por los enterovirus "no polio" provenientes de pacientes con diagnóstico clínico de SGB.
- 4.- La línea celular RD es la más susceptible a la infec--- ción por poliovirus. Los virus "no polio" no muestran preferencia marcada por alguno de los dos tipos de cé--- lulas empleadas para su aislamiento.
- 5.- Es difícil la diferenciación clínica entre poliomielit--- tis y SGB por lo que sólo el aislamiento del agente --- etiológico nos dirá la causa real de la parálisis.

6.- Sería conveniente el uso del método de concentración -
ácida como una alternativa confiable para eliminar los
posibles falsos negativos dados por el método clásico
de cultivo directo.

APPENDICE

X.- APENDICE.

a) Solución Salina Balanceada de Hanks (SSB).

Se empleó SSB comercial por lo que únicamente su preparación consistió en hacer la dilución señalada por la casa comercial "Difco".

b) Mezcla de antibióticos.

Penicilina 1Mgu
Streptomizina 1 g
Solución salina..... 100 ml

Al agregar un mililitro de esta solución a 100 ml de medio de cultivo resultará una concentración final de 100 unidades de penicilina y 100 microgramos de streptomizina por mililitro (11).

c) Medio de mantenimiento de Eagles.

Únicamente se realizaron las diluciones ya que se utilizaron medios comerciales 'Difco' ya preparados.

d) Buffer de Glicina/HCl a pH 2.4 .

Soluciones madre:

A.- Glicina 0.1 M en NaCl 0.1 N

Glicina 7.5 g

NaCl 5.85 g

Aforar a 1000 ml con agua destilada.

B.- Acido Clorhídrico 0.1 N.

Tomar del HCl concentrado Merck con densidad 1.18, 12 N, la cantidad necesaria para la solución 0.1 N de HCl.

Composición de la Mezcla:

X ml de A + (100 - X) ml de B

Para un pH de 2.4 :

X= 64.5 ml de A (tomado de tablas científicas 'Gaigy').

Una vez hecha la mezcla se filtra en milipore 0.2 um y se guarda en frascos ámbar estériles a 4°C. (26)

e) Sacarosa al 30%.

Sacarosa 30 g

Aforar a 1000 ml con agua destilada.

Filtrar en milipore 0.2 um guardar en frascos ámbar estériles a 4°C.

f) Hidróxido de Sodio 0.5 M.

20 gramos de NaOH disueltos en 1000 ml de agua destilada.

g) Acido Clorhídrico 0.5 N.

Tomar del HCl concentrado Merck con densidad de 1.18, 12 N, la cantidad necesaria para una solución 0.5 N de HCl.

BIBLIOGRAFIA

XI.- BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Arnason, B.G.W. : Acute inflammatory demyelinating poly neuropathies en: Dyck, P.J. Thomas, P.K., Lambert, G.H. Bunge R. eds. peripheral neuropathy; p. 2050-2100, 2a ed., Philadelphia, W.B. Saunders Co. (1984).
- 2.- Balcells, A.: La clínica y el laboratorio, p.55-58, 12a edición, Ed. Calirse, México D.F. (1984).
- 3.- Sehkhani, A.M. and Wenner, H.H.: Human viral, bedsonial and rickettsial diseases, p241-248, 2a edición, Ed. Charles C. -- Thomas Publisher Springfield, U.S.A (1972).
- 4.- Berger, J.R., Ayyar, R. and Sneremata, H.A.: Guillain-Barré Syndrome complicating acute hepatitis B, Arch. Neurol., -- 38:366-368 (1981).
- 5.- Blackman, K.E. and Eubel, H.C.: Poliovirus induced cellular injury, J. Virology, 4:203-208 (1969).
- 6.- Soeye A.: Picornaviral structure and protein sintesis, Archives Internationales the Physiologie et Biochimie, 84:1027-1128 (1976).
- 7.- Brettle, R.P., Gross, M., Legg, N.U., Lockwood P.: -- Treatment of acute polyneuropathy by plasma change, Lancet, 11: - 1100 (1978).

- 8.- Carp, R.I.: Persistence of infection of human lymphoid cells with poliovirus and development of temperature-sensitive mutants, Intervirology, 15:49-56 (1981).
- 9.- Cook, S.D. and Bowling, P.C.: The role of autoantibody and immune complexes in the pathogenesis of Guillain-Barré Syndrome, Ann. Neurol., 70-79 (suppl) (1981).
- 10.- Crainic, R., Coullin, P.: Natural variation of poliovirus neutralization epitopes, Infection and Immunity, 41(3): -- 1217-1225 (1983).
- 11.- Cummins, H.: Virología. Cultivo de tejidos, El manual moderno, p.11, México (1975).
- 12.- Dalos, N.P., Barel, C. and Hanley, D.F.: Cardiovascular autonomic dysfunction in Guillain-Barré Syndrome, Arch Neurol. 45:115-117 (1988).
- 13.- Davis, B.D., Dulbecco, R.: Tratado de microbiología, - p. 1304-1329, 2a edición, Ed. Salvat Editores, España (1983).
- 14.- Dermic, R., Hevkeshoven, J. and Hübner, E.: Induction neutralizing antibodies by all three structural poliovirus polypeptides, Intervirology, 130:243-246 (1983).

15.- Dowling, P.C., Blumberg, B.M. and Cook, S.T.: Handbook of clinical neurology, Vol. 7, p. 51, Neuropathies, Elsevier Science Publishers B.V. (1987).

16.- Elishahar, M.D. and Gordon, M.: Benefit of intravenously administered immune serum globulin in patients with Guillain-Barré syndrome, The J. of Ped., 116:1120-1125 (1990).

17.- Emzini, E.A., James, B. and Wimmer, E.: Identification of a new neutralization antigenic site on poliovirus coat protein VP₂, J.Virol., 52(2):719-721 (1984).

18.- Emzini, E.A., James B. and W.: Poliovirus neutralization epitopes: analysis and localization with neutralizing monoclonal antibodies, J.Virology, 43:997-1005 (1982).

19.- Emzini, E.A., Ostapchuck, P. and Wimmer, E.: Bivalent attachment of antibody onto poliovirus leads to conformational alteration and neutralization, J. Virol., 45(2): 547-550 (1983).

20.- Enders, J.P., Robbins, P. and Weller, T.H.: Classics in infectious diseases. The cultivation of the poliomyelitis viruses in tissue culture, Rev. Infect. Dis., 2(3):493-504 (1980).

21.- Penner and White, D.O.: Virología Médica, p.314-331, 2a edición, La Prensa Médica Mexicana, México (1987).

22.- Fernandez, T.C. and Baltimore, D.: Morphogenesis of poliovirus II. Demonstration of a new intermediate the provirion, J.Virology, 12:1122-1130 (1973).

23.- Fiore, L., Pierangel, A. and W.M.: Antigenic and biochemical characterization of poliovirus type 2 isolated from two cases of paralytic disease, Intervirology, 27:196-204 (1989).

24.- French, cooperative group on plasma exchange in the Guillain-Barré Syndrome: role of replacement fluids, Ann Neurol, 22:753-761 (1987).

25.- Pulginit, V.A. : Immunizaciones en la practica médica p. 144-155, El Manual Moderno, México(1984).

26.- Geigy, S.A. : Documenta Geigy, Tablas científicas, 6a ed., J.R. Geigy S.A., Suiza (1965).

27.- Goldblat, D.: Guillain-Barré syndrome following Campylobacter jejuni enteritis, Arch. Neurol., 45:604 (1988).

28.- Gruener, G., Bosh, and M. : Prediction of early beneficial response to plasma change in Guillain-Barré Syndrome, Arch. Neurol., 44:295-298 (1987).

29.- Guillain, G.B. and Ströhl, A.: Sur un syndrome de radiculoneurite a vec hiperalbuminose de liquide cefalorachiden -- sans reaction cellulaire, Bull. Mem. Sc. Med. Hop., 40:1462 (1916).

30.- Horaud, P., Crainic, R. and Eloued, B.: Polio vaccine from empiricism and efficacy to scientific knowledge, Ann. Inst. Pasteur Virol., 136:527-545 (1985).

31.- Hsiung, G.D.: Methods commonly used for virus isolation and identification. Diagnostic Virology, New Haven on London, U.S.A (1973).

32.- Hysia, T., Stalhandke, P. and Raija, V.: Detection of enteroviruses by spot hybridization, J. Clin. Microbiol., -- 19(3):463-483 (1984).

33.- Jawetz, E.D., Menlick, J.D. and Adelberg, E.A.: Microbiología Médica, p. 433-440, 8a edición, El Manual Moderno, México (1979).

34.- Kew, O.M. and Nottay, B.K., Hato, M.H.: Molecular epidemiology polioviruses, Rev. Infect. Dis., 6(suppl 2): 499-504 (1984).

35.- Kew, O.M., Nottay, B.K. and Hato, M.H.: Multiple genetic changes can occur in the oral poliovaccines upon replication in humans, J.Gen. Virol., 56:337-347 (1981).

36.- Keyweg, R.D., M.De., A'Vandar Wecha, RD. : Using of the globulin gamma IV of the treatment of Guillain-Barré Syndrome, Neurology, 38:1639-1641 (1988).

37.- Landry, J.B.B.: Note sur la paralysie ascendante aige: GAZ. EBO, Med. Chir. 6: 72-74 (1859).

38.- Lennette, E.H. and Shindt, N.J. : Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections, 5a edición, American Public Health Association, U.S.A. (1972).

39.- Macchian, G.M., Griffin, J.W. and Cornblath, D.R.: The Guillain-Barré syndrome: Analysis of prognostic factors and the effects of plasmapheresis, Ann. Neurol., 23:347-353 (1988).

40.- Macleod, W.N. and Mccab: Esporadic non-A, non-B hepatitis and Epstein-Barr hepatitis associated with the Guillain-Barré syndrome, Arch. Neurol., 44:438-442 (1987).

41.- Mc. Farland, H.R., Heller, G.L. and Arbor, A.: --- Guillain-Barré disease complex, Arch. Neurol., 14:196-201 (1966).

42.- Melnick, J.L.: Ventajas e inconvenientes de las vacunas antipoliomielíticas elaboradas con virus vivo ó con virus -- muerto, Bol. Of Sanit. Panam., 88:507-528 (1980).

43.- Nelson, W.E., Vaughan, V.C. and McKay, R.J.: Tratado de pediatría, Vol. 1, p.975-989, 6a edición, Salvat Editores. -- México (1977).

44.- Organización Panamericana para la Salud y OMS: Guía - de Procedimientos Seguros para el Aislamiento, la identificación y la serología de poliovirus/enterovirus, Marzo 1988.

45.- Pakalnis, A., Drake, E., Richard, M.D. and Weiss, K.M.: Evoked potentials in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy, Arch. Neurol., 45:1014-1016 (1988).

46.- Peizer, L.R., Mandel and Weisman, D.: Improved method for rapid laboratory diagnosis of poliomyelitis, Health Research Institute, 15(2):772-776 (1971).

47.- Phaff, H.J.: Industrial microorganisms, Scien. Amer., 245:52-65 (1981).

48.- Prineas, J.W.: Pathology of the Guillain-Barré Syndrome, Ann. Neurol., 9(suppl):6-19 (1981).

49.- Rhodes, A.J. and Rooyen, V.: Textbook of Virology, --- p. 459-462, 5a ed., W and W Co., U.S.A (1968).

50.- Ropper, A.H., Albers, J.W. and Adison, R.: Limited --- relapse in Guillain-Barré syndrome after plasma exchange, Arch. Neurol., 45:314-315 (1988).

51.- Ropper, A.H.: Campylobacter diarrhea and Guillain-Barré syndrome, Arch. Neurol., 45:604 (1988).

52.- Sabin, A.B.: Oral poliovirus vaccine: History of its - development and use and current challenge to eliminate poliomyelitis from the world, J. Infect. Dis., 151(3):420-432 (1985).

53.- Sabin, A.P.: Paralytic poliomyelitis: Old dogmas and new perspectives, Rev. Infect. Dis., 3(3):543-564 (1981).

54.- Saida, T. Saida, K. and Brow, M.J.: In vivo demyelinating activity of sera from patients with Guillain-Barré syndrome Ann. Neurol., 11:69-75 (1985).

55.- Schaffer, A., Kuhne, J. and Koch, G.: Poliovirus induced alterations in Hela Cell membrane functions, J. Virology, -- 44:444-449 (1982).

56.- Schonberger, L.N., Hiwitez, E.S., Kotana, R.C.: Guillain Barré syndrome: its epidemiology and associations with influenza vaccine, Ann. Neurol. 9(suppl):31-38 (1981).

57.- Vaughan, V.C., McKay, R.J. and Waldo, E.N.: Textbook of pediatrics, p. 997-1005, 10a ed., W.B. Saunders Co., U.S.A -- (1964).

58.- Waldo, E.: Textbook of pediatrics, p. 456-460, 8a -- edición, Saunders Co., U.S.A (1969).

59.- Wisniewski, H. Terry, R.D. and Withaker, J.N.: Landry-Guillain-Barré syndrome. A primary demyelinating disease, Arch. Neurol., 21:269-276 (1969).

60.- Wjishnow, R.H. and Steinfeld, J.C.: The conquest of --
the mayor infectious diseases in the United States, Ann. Rev. --
Microbiol., 30:427-450 (1976).

61.- Yoneyama, T., Hagiwara, A., Hara, M. and Kendal : Al-
teration in oligonucleotide finger print patterns of the viral -
genome in poliovirus type 2 isolated from paralytic patients, --
Infect. Immun., 37:46-53 (1982).

62.- Yousef, G.E., Morn, G.F., and Smith, D.G.: Chronic --
enterovirus infection in patients with postviral fatigue syndro-
me, The Lancet, 23:146-150 (1988).