

FACULTAD DE MICROBIOLOGIA

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

EVALUACION DE LA INMUNIDAD AL POLIOVIRUS EN UNA  
POBLACION UNIVERSITARIA

ESTUDIANTE

DAVID

GUEVARA MORALES

TUTOR

Dra. Teresita Somogyi P

1997

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Teresita Somogyi por su valioso apoyo y orientación brindados que han hecho posible el desarrollo de esta investigación. A Francisco y Edwin por su colaboración en el laboratorio de virología.

## RESUMEN

Se llevó a cabo un estudio de anticuerpos neutralizantes mediante la técnica de microneutralización, para determinar el estado inmunológico contra los tres serotipos del virus polio; se analizó una muestra de sueros de adultos jóvenes en su mayoría universitarios y un pequeño grupo de niños de 2 a 5 años de edad. Los resultados muestran títulos de anticuerpos neutralizantes variables para cada individuo; 55% de los sueros presentan protección contra polio 1, 63% contra polio 2 y 75% contra polio 3 mientras que el 14% de los sueros no tienen protección contra ningún serotipo del virus.

Esta investigación sugiere una posible disminución en la inmunidad contra la polio en la población con respecto a los resultados encontrados en estudios anteriores, un estado inmunitario subóptimo en niños y adultos jóvenes y la acumulación de individuos susceptibles a la infección con el virus. Se establece la necesidad de realizar estudios de los niveles de seroconversión alcanzados en Costa Rica de acuerdo con el esquema de vacunación contra polio y de los factores relacionados con el objeto de establecer las medidas necesarias para contribuir con las metas propuestas por la OMS.

**INDICE.**

	Pág.
I.- INTRODUCCION .....	2
II.- OBJETIVOS .....	6
III.- MATERIALES Y METODOS .....	7
IV.- RESULTADOS .....	12
V.- DISCUSION .....	19
VI.- BIBLIOGRAFIA .....	23

## **I.- INTRODUCCIÓN.**

Los enterovirus son responsables de gran variedad de enfermedades. El virus polio, es considerado el prototipo de los enterovirus, y es el más importante de este género. Este virus comprende 3 serotipos distribuidos por todo el mundo los cuales han producido epidemias a lo largo de la historia; son causantes de enfermedad paralítica conocida ya como una entidad clínica desde fines del siglo XVIII ( 1,8 ). Por su importancia clínica han sido muy estudiados y de los primeros virus del hombre que se logran caracterizar.

Las partículas virales miden de 24 a 30 nm de diámetro, su cápside consiste de 60 subunidades de 4 proteínas VP1-VP4 en arreglo icosaédrico que envuelve el genoma de ARN banda simple sentido positivo. Estos virus pueden resistir el pH estomacal lo que les permite llegar y multiplicarse en el intestino del hombre.

La forma primaria de diseminación del poliovirus es la transmisión fecal-oral; la infección y multiplicación se da en orofaringe e intestino delgado de donde pueden pasar a sangre, usualmente el período de incubación es de 7 a 14 días. Esta transmisión se ve favorecida dentro de los núcleos familiares o en ambientes en donde se mantenga un contacto estrecho de individuo.

Cuando una persona susceptible a la infección queda expuesta al virus, pueden presentarse cualesquiera de las siguientes respuestas:

- 1) Una infección subclínica.
- 2) Enfermedad leve (poliomielitis abortiva).
- 3) *Meningitis aséptica.*
- 4) Poliomielitis paralítica.

Más del 90% de las infecciones son asintomáticas, la enfermedad leve es la forma más común de enfermedad en 4-8 % de las infecciones y se presentan síntomas inespecíficos como fiebre, malestar, estreñimiento y dolor de garganta. En 1-2 % de las infecciones ocurre meningitis aséptica que aparte de los síntomas anteriores incluye rigidez y dolor de espalda y nuca, ocasionalmente flacidez muscular o parálisis pasajera pero normalmente hay recuperación completa ( 8 ).

La poliomielitis parálitica ocurre en menos del 1 % de las infecciones (principalmente en niños) . Esta puede seguir luego de enfermedad menor o darse sin ningún antecedente previo, en estos pacientes el virus logra invadir el sistema nervioso, se multiplica entre las fibras nerviosas causando daño o destrucción de las neuronas motoras lo que lleva a parálisis flácida aguda como síntoma clásico de poliomielitis y/o parálisis de otros músculos. La recuperación máxima de los músculos paralizados ocurre en 6 meses pero los pacientes quedan generalmente con parálisis residual toda su vida ( 8 ). En los países en desarrollo el virus polio produce enfermedad parálitica en 4 de cada 1.000 niños en edad escolar . En América Latina el último caso confirmado de polio causado por el poliovirus silvestre ocurrió en Perú en 1.991 (13, 11).

El diagnóstico de laboratorio para poliomielitis consiste en aislar el poliovirus utilizando cultivos celulares en los que el virus crece rápidamente destruyendo la monocapa en pocos días. El virus puede ser aislado a partir de las heces del paciente y algunas veces de orofaringe, pero es muy difícil de aislar de líquido cefalorraquídeo. El virus aislado debe luego identificarse como poliovirus y determinar su serotipo mediante tipificación, a la vez que se debe establecer si se trata de una cepa vacunal o silvestre, ya sea mediante la técnica de PCR o bien por crecimiento a 39 °C. También se puede realizar un análisis de sueros pareados para si se logra obtener una muestra al inicio del cuadro para determinar un aumento en el título de anticuerpos neutralizantes entre el suero de fase aguda y el suero de fase convaleciente. Existe además la posibilidad actualmente de detectar la presencia de IgM mediante la técnica de ELISA para establecer si se trata de una infección reciente (12, 18).

La inmunidad para el tipo de poliovirus que provocó la infección es permanente y la presencia de niveles detectables de anticuerpos neutralizantes en suero está fuertemente correlacionada con protección contra la enfermedad parálitica ( 17 ).

La prevención y control de esta enfermedad depende de la inmunización con la vacuna oral de polio (OPV) y/o con la vacuna inactivada contra polio (IPV), ambas vacunas contienen los 3 serotipos de poliovirus. Para conservar la inmunidad es necesario inmunizaciones periódicas de refuerzo.

Estas vacunas inducen anticuerpos que protegen el sistema nervioso central del virus. La vacuna oral (OPV) es la más utilizada a nivel mundial y está recomendada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) ( 8 ). El virus presente en la vacuna infecta, se multiplica e inmuniza de manera paralela a una infección natural e induce anticuerpos secretorios IgA en nasofaringe e intestino que dan resistencia a la infección con el virus silvestre.

En mayo de 1.988 la Asamblea de los estados miembros de la OMS propuso como meta para el año 2.000, la erradicación global de la poliomielitis. En 1.989 aprobaron un Plan de Acción para la erradicación global cuyos objetivos básicos son:

- lograr cero casos de poliomielitis causada por el virus salvaje.
- ausencia de poliovirus salvaje en todas las muestras ambientales obtenidas alrededor del mundo (17).

Hoy día la incidencia de polio paralítica ha disminuido substancialmente, cerca de 3/4 partes de todos los países del mundo reportaron en 1.993 cero casos de polio y se considera que la transmisión de poliovirus salvaje ha sido interrumpida en América. También hay zonas libres de polio en el norte, sur y este de África, península Arábiga, Europa Central y del Oeste y Pacífico Oeste ( 8 ).

A pesar de los progresos substanciales hacia la erradicación global de la polio, la polio paralítica se mantiene en alta endemia en la India y en países del África sub-sahariana y Asia, e incluso en diversos países con alta cobertura de vacunación que no habían reportado casos de la enfermedad durante varios años, se han reportado brotes por reintroducción del virus proveniente de áreas endémicas. En brotes ocurridos en Omán, Jordania, Malasia y Holanda se demostró que fueron resultado de la importación de poliovirus salvaje de países endémicos (India) ( 8 ). Así cualquier país libre de polio como Costa Rica, está en riesgo de importar el poliovirus salvaje hasta que éste sea erradicado totalmente del mundo, por lo que se debe procurar altos niveles de cobertura de vacunación.

Parte de las estrategias propuestas por la OMS para la erradicación de la polio, involucran la investigación de todos los casos de parálisis flácida aguda en cada país, la identificación de poliovirus salvaje circulante y el mantener altos niveles de cobertura con la vacuna. También incluye

la evaluación de la potencia de la vacuna oral de la polio (OPV) y el determinar la respuesta inmune de la población.

Dentro de este contexto la presente investigación pretende contribuir en los estudios necesarios para evaluar el estado inmunitario de los costarricenses pues es importante asegurarse que nuestra población posee niveles protectores de anticuerpos que contribuyan a alcanzar los objetivos propuestos por la OMS.

Este trabajo reúne el análisis de los resultados obtenidos de una encuesta serológica contra los 3 serotipos de poliovirus en una población de adultos jóvenes, estudiantes en su mayoría universitarios de diferentes procedencias y condiciones socioeconómicas, así como un pequeño número de muestras de niños de 2 a 5 años tomadas en el Hospital Nacional de Niños.

La investigación se realizó en la Sección de Virología Médica, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.

## **II.- OBJETIVOS**

### **II.1.- OBJETIVOS GENERALES.**

- 1.- Establecer los niveles de cobertura por vacunación de virus polio en una población de adultos jóvenes estudiantes.
- 2.- Determinar el estado inmune contra el virus de la polio en la población de adultos jóvenes.
- 3.- Establecer de manera indirecta si Costa Rica es un país con una cobertura e inmunidad adecuada contra el virus de la polio.
- 4.- Evaluar de manera indirecta la eficiencia del Programa de Vacunación en Costa Rica contra el virus polio.

### **II.2.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

- 1.- Establecer mediante encuesta el alcance del Programa de Vacunación contra poliovirus en la población en estudio.
- 2.- Determinar la seroprevalencia de anticuerpos contra poliovirus 1, 2 y 3 en la población a estudiar.
- 3.- Determinar el nivel de anticuerpos neutralizantes contra poliovirus 1, 2 y 3 en la población mencionada.

### **III.- MATERIALES Y MÉTODOS.**

#### **III.1.- MATERIALES.**

1.- **Población:** 50 adultos jóvenes en su mayoría estudiantes de la Facultad de Microbiología y 6 niños de 2 a 5 años que asistían al Laboratorio de Consulta Externa del Hospital Nacional de Niños.

2.- **Muestras:** se tomaron 5 ml ó 1 ml de sangre total en el caso de los adultos y los niños, respectivamente. La sangre se transportó al Laboratorio de Virología donde se procedió a separar el suero mediante centrifugación. Los sueros fueron recolectados asépticamente en cámara de flujo laminar para garantizar su esterilidad, y se guardaron a -20 C hasta su utilización.

3.- **Virus:** se emplearon las cepas atenuadas ( vacunales ) de polio 1, polio 2 y polio 3 de la ATCC.

4.- **Líneas celulares:** se emplearon células Hep-2 del Laboratorio de Virología y las células Hep-2 Cincinatti obtenida de la Sección de Enterovirus, Center for Disease Control (Atlanta, USA). Las células se crecieron en Medio Mínimo Esencial de Eagle suplementado con 10 % de suero fetal bovino, glutamina 20 mM, HEPES 8 mM, gentamicina 50 µg/ml y estreptomina 100 µg/ml, como medio de crecimiento. Para el medio de mantenimiento la concentración de suero se disminuye al 2 %. Este último medio se emplea también para realizar las diluciones de virus y suero.

5.- Se utilizaron placas estériles de 96 pozos ( Falcon ).

6.- Solución de cristal violeta ( 0.05% ) en alcohol etílico (25%), y tween 20 (0.5%) para la tinción de las células.

#### **III.b.- METODOLOGÍA.**

##### **a) Preparación del antígeno.**

La preparación del antígeno se realizó de acuerdo con los procedimientos de referencia (7,10 ). Esta preparación se realizó a intervalos de 1 semana para cada virus para evitar problemas de contaminación cruzada.

1.- Para cada poliovirus, se utilizó una botella de 75 cm<sup>2</sup> con monocapa bien formada de células Hep-2 y se drenó el medio de cultivo.

- 2.- A partir de una semilla de cada virus se inocula 0.1 ml por botella.
- 3.- Se deja adsorber una hora a 37 C.
- 4.- Con pipeta estéril, se agrega a cada botella 15 ml de medio de mantenimiento (MEM 2 %).
- 5.- Se incuban las botellas a 37 C hasta obtener un efecto citopático (ECP) de 4 + ( por lo general de 1 a 2 días).
- 6.- Una vez obtenido el ECP mencionado se procedió a realizar 3 ciclos de congelación-descongelación para liberar completamente el virus.
- 7.- Se pasa el contenido de cada botella a tubos estériles con tapa de rosca y se procedió a centrifugar 5 minutos a 5.000 r.p.m. a 4 C en una centrífuga con rotor angular.
- 8.- El sobrenadante así clarificado se guarda en alícuotas de 1 ml en forma estéril y se guardan a -70 C.

#### **b.- Titulación del antígeno.**

Se procedió de acuerdo con el procedimiento descrito en Herrero y Hun ( 7 ). La titulación se realizó tanto en tubo como en placa de microtitulación y en días diferentes para cada virus.

- 1.- Hacer 12 diluciones logarítmicas (1/10) a partir de la suspensión de cada serotipo de polio, colocando 0.1 ml de virus en un tubo con 0.9 ml de MEM 2 %. Se agita con Vortex y se pasa 0.1 ml al siguiente tubo, Este procedimiento se realiza hasta obtener  $10^{-12}$ .
- 2.- Para cada poliovirus, se toma una serie de tubos conteniendo monocapas bien formadas de células Hep-2 y se drena el medio de cultivo.
- 3.- Se inocula 0.05 ml de cada una de las diluciones ( $10^{-2}$  a  $10^{-12}$ ) por duplicado.
- 4.- Se deja adsorber 1 hora a 37 C.
- 5.- Se agrega 1.5 ml de MEM 2% y se incuba a 37 C por 5 días. Se realizan observaciones diarias para evidenciar la aparición de ECP.
- 6.- Se inoculan dos tubos únicamente con medio de cultivo como control de células.
- 7.- Pasados los 5 días, la evaluación del ECP mediante tinción con cristal violeta.

8.- La determinación de la dosis 50 % en cultivo celular (TCD 50 %) para cada poliovirus se realiza utilizando la fórmula de Karber, a saber:

$$\text{TCD50 \%} = L-d (\hat{S}-0.5) = \text{TCD}/0.05 \text{ ml.}$$

L= logaritmo de la dilución más baja.

d = diferencia entre logaritmo de las diluciones.

$\hat{S}$  = suma de las proporciones de las pruebas positivas.

La titulación en placas de microtitulación se realiza esencialmente de la misma forma, la diferencia es que la inoculación se realiza en microplaca y cada pozo contiene  $1 - 2 \times 10^4$  células / 0.1 ml.

### **c.- Prueba de microneutralización para detección de anticuerpos contra polio.**

Se realizó el procedimiento establecido por la OMS ( 6 ).

- 1.- Inactivar los sueros 30 minutos a 56 C.
- 2.- Realizar una dilución 1/ 8 de cada sueros mezclando 0.1 ml de suero con 0.7 ml de MEM 2 % en tubos estériles.
- 3.- Preparar una suspensión de cada poliovirus conteniendo 100 TCD 50% / 0,025 ml. Para esto a partir del virus titulado ( $1 \times 10^8$  /0.05 ml) hacer diluciones logarítmicas hasta  $10^5$  y de esta última hacer una dilución 1/5.
- 4.- Rotular las placas de microtitulación para cada serotipo de polio (1, 2 y 3 ).
- 5.- Añadir a cada placa 0.025 ml de diluyente a todos los pozos excepto a la fila A de la microplaca.
- 6.- Añadir 0.05 ml de cada suero diluido 1/ 8 en los pozos de la fila A de cada microplaca por duplicado. Esto permite analizar hasta 6 sueros por microplaca.
- 7.- Realizar diluciones dobles de los sueros a probar usando una micropipeta multicanal para pasar 0.025 ml de cada suero diluido de la fila A a los pozos de la fila B. Mezclar bien y continuar así en las siguientes filas hasta completar toda la microplaca (diluciones de 1/ 8 a 1/ 1.024). Descartar los últimos 0.025 ml.
- 8.- Añadir a cada microplaca 0.025 ml del poliovirus correspondiente en cada pozo, conteniendo 100TCD50.

- 9.- Incubar las microplacas a 37 C por 1 hora en incubadora de CO<sub>2</sub>.
- 10.- Durante este tiempo preparar la titulación reversa de cada poliovirus. A partir de la suspensión de poliovirus conteniendo 100 TCD<sub>50</sub>/0.025 ml realizar 3 diluciones 1/10 para obtener suspensiones de poliovirus conteniendo 10 TCD<sub>50</sub>/0.025 ml, 1 TCD<sub>50</sub>/0.025 ml y 0.1 TCD<sub>50</sub>/0.025 ml, respectivamente. Rotular una microplaca para la retrotitulación.
- 11.- Para la retrotitulación de los 3 serotipos de poliovirus, se utilizan todos los pozos de las filas A y B para 100 TCD<sub>50</sub>, todos los pozos de las filas C y D para 10 TCD<sub>50</sub>, todos los pozos de las filas E y F para 1 TCD<sub>50</sub>, y, todos los pozos de las filas G y H para 0.1 TCD<sub>50</sub>. En cada caso se utiliza se utiliza un total de 12 pozos para cada concentración de virus y esto para cada poliovirus. El resto de los pozos (24) de la microplaca se emplean como control de células.
- 12.- Tripsinizar una botellas conteniendo una monocapa confluyente de células Hep-2 C. Tomar una alícuota y contar el número de células en cámara de Neubauer. Preparar un suspensión de células en medio MEM 10 % conteniendo aproximadamente  $1-2 \times 10^4$  células / 0.1 ml.
- 13.- Agregar 0.1 ml de la suspensión anterior de células a cada uno de los pozos de todas las microplacas, a saber microplaca de titulación de sueros, retrotitulación de cada poliovirus y control de células.
- 14.- Incubar las placas por 5 días a 37 C en incubadora de CO<sub>2</sub>.
- 15.- Diariamente, observar la formación de la monocapa y la aparición de ECP.
- 16.- Teñir las microplacas con cristal violeta (ver más adelante).
- 17.- Leer los resultados en microscopio invertido.

**Interpretación:**

- Células teñidas y monocapa formada: presencia de anticuerpos.
- Células redondas, azules y / o ausencia de monocapa: efecto citopático para poliovirus.

- 18.- Verificar la formación de monocapa en los pozos de células control.
- 19.- Verificar la retrotitulación para cada poliovirus para confirmar que la suspensión contenía efectivamente 100 TCD<sub>50</sub>/0.025 ml.

20.- Establecer el título de cada suero como la máxima dilución capaz de neutralizar el efecto citopático de 100 TCD 50 de poliovirus.

**d.- Procedimiento de tinción con cristal violeta.**

Se realizó de acuerdo con el protocolo del CDC ( 17 ).

1.- Preparar una solución de cristal violeta de la siguiente forma:

- cristal violeta: 0.5 g.

- etanol 85 %: 250 ml.

- Tween 20: 5 ml.

- Agua : 750 ml.

2.- Aspirar con cuidado de no romper las monocapas, el medio de cada pozo de las microplacas utilizando una micropipeta multicanal.

3.- Adicionar la solución de cristal violeta a cada pozo.

4.- Incubar las microplacas por 40 minutos a temperatura ambiente.

5.- Lavar 3 veces con agua.

6.- Leer en microscopio invertido la presencia o ausencia de efecto citopático como se describió anteriormente.

#### IV.- RESULTADOS.

En este trabajo se analizó un total de 56 sueros: 50 muestras pertenecen a adultos jóvenes en su mayoría universitarios de diferente procedencia, los 6 sueros restantes pertenecen a niños de 2 a 5 años de edad que asistían a la consulta externa del Hospital Nacional de Niños por causas diversas.

Se elaboró un cuestionario para conocer el estado inmune de la población a analizar. De la información recolectada se obtiene que el 100 % de los adultos jóvenes afirman haber recibido las 3 dosis de vacuna y sus respectivos refuerzo. No se pudo obtener información de los sueros provenientes del Hospital Nacional de Niños.

La OMS ha establecido un título mayor o igual a 1/8 para poliovirus por la técnica de microneutralización como protector de enfermedad paralítica, por lo que en el trabajo nos basamos en ese valor para la determinación del título de anticuerpos neutralizantes. En el cuadro 1, se presenta para cada suero el título obtenido con respecto a cada serotipo de poliovirus.

**CUADRO 1**

**TITULO DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES PARA POLIOVIRUS.**

Suero #	Pollo 1	Pollo 2	Pollo 3	Suero #	Pollo 1	Pollo 2	Pollo 3	Suero #	Pollo 1	Pollo 2	Pollo 3
1	<1/8	1/8	1/8	21	1/32	1/16	1/8	41	<1/8	<1/8	<1/8
2	1/32	1/16	1/16	22	1/16	1/8	1/8	42	<1/8	<1/8	<1/8
3	1/8	1/8	1/8	23	1/16	1/16	1/8	43	1/32	1/32	1/8
4	<1/8	<1/8	1/128	24	<1/8	<1/8	<1/8	44	1/16	1/32	1/16
5	1/8	<1/8	<1/8	25	<1/8	<1/8	<1/8	45	<1/8	<1/8	<1/8
6	1/32	1/64	1/32	26	<1/8	<1/8	1/16	46	<1/8	<1/8	<1/8
7	<1/8	<1/8	1/16	27	1/8	1/8	1/16	47	<1/8	<1/8	1/16
8	<1/8	1/8	1/8	28	1/8	1/8	1/16	48	1/16	1/16	1/8
9	1/8	1/8	1/8	29	<1/8	<1/8	1/16	49	<1/8	<1/8	1/8
10	<1/8	1/8	<1/8	30	1/16	1/32	1/8	50	1/128	1/128	1/8
11	<1/8	<1/8	<1/8	31	1/32	1/32	<1/8	HNN1	<1/8	1/8	<1/8
12	1/16	1/16	1/8	32	<1/8	<1/8	1/64	HNN2	1/32	1/64	1/64
13	1/16	1/8	1/8	33	<1/8	<1/8	1/32	HNN3	1/16	1/64	<1/8
14	1/8	1/8	1/8	34	1/16	1/32	1/16	HNN4	1/32	1/32	1/512
15	1/32	1/8	1/8	35	<1/8	<1/8	<1/8	HNN5	1/16	1/16	1/32
16	1/64	1/16	1/8	36	1/16	1/16	1/8	HNN6	<1/8	<1/8	1/64
17	1/16	1/8	1/8	37	<1/8	<1/8	1/32				
18	<1/8	1/8	1/8	38	<1/8	<1/8	1/8				
19	1/32	1/16	1/8	39	1/8	1/32	<1/8				
20	<1/8	<1/8	1/16	40	1/64	1/64	1/64				

Título de anticuerpos neutralizantes para pollo 1, 2 y 3, respectivamente, de 50 sueros de adultos jóvenes y 6 niños de 2 a 5 años del Hospital Nacional de Niños (HNN).

Del cuadro anterior se desprende que el título de anticuerpos neutralizantes es variable para cada individuo y se observa que van desde  $1/8$  hasta  $1/512$ . Así de los 56 sueros analizados, sólo 27 sueros (48%) presentan títulos mayores o iguales a  $1/8$  contra los 3 serotipos de virus polio; 21 sueros (38%) muestran protección contra uno o dos de los serotipos del virus (protección parcial) mientras que 8 sueros (14%), tienen títulos inferiores contra los 3 serotipos virales (Figura 1)

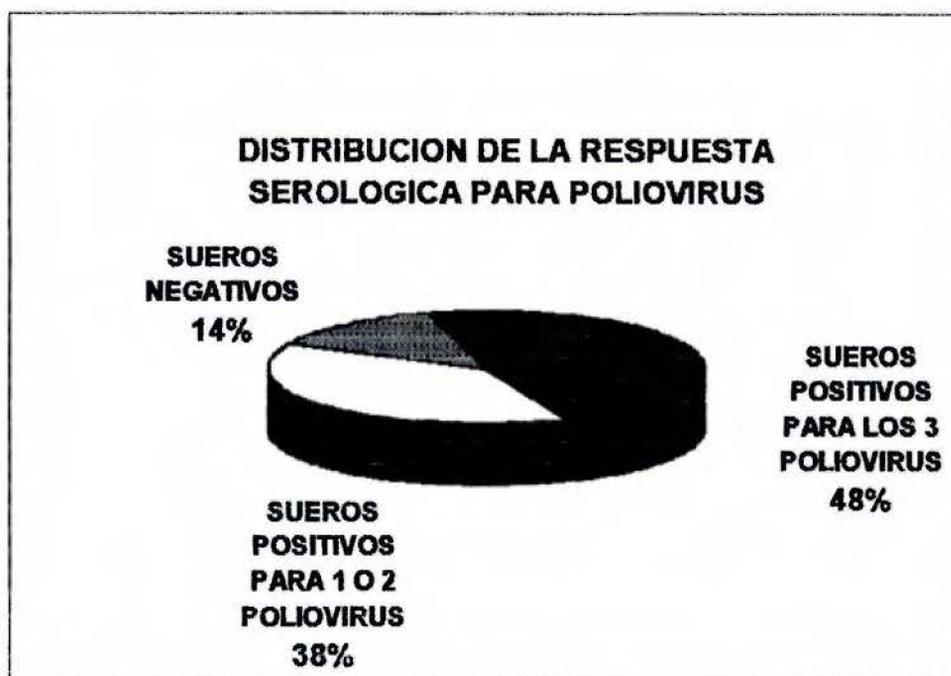


Figura 1. Se presenta la distribución de la respuesta de los diferentes sueros de acuerdo con el tipo de respuesta obtenido ■ sueros con títulos de anticuerpos neutralizantes  $\geq 1/8$  los 3 poliovirus, ■ sueros con títulos  $\geq 1/8$  únicamente para 1 o 2 poliovirus (Inmunidad parcial) y, □ sueros con títulos  $< 1/8$  para los 3 poliovirus.

Cuando se analiza la respuesta de los diferentes sueros con títulos protectores, se observa que la seroprevalencia para cada serotipo en particular es diferente. En la figura 2, se muestra la seroprevalencia para cada tipo de poliovirus. El 55% de los sueros presentan títulos protectores contra polio 1, 63% tiene protección contra polio 2 y el 75% contra el serotipo 3.

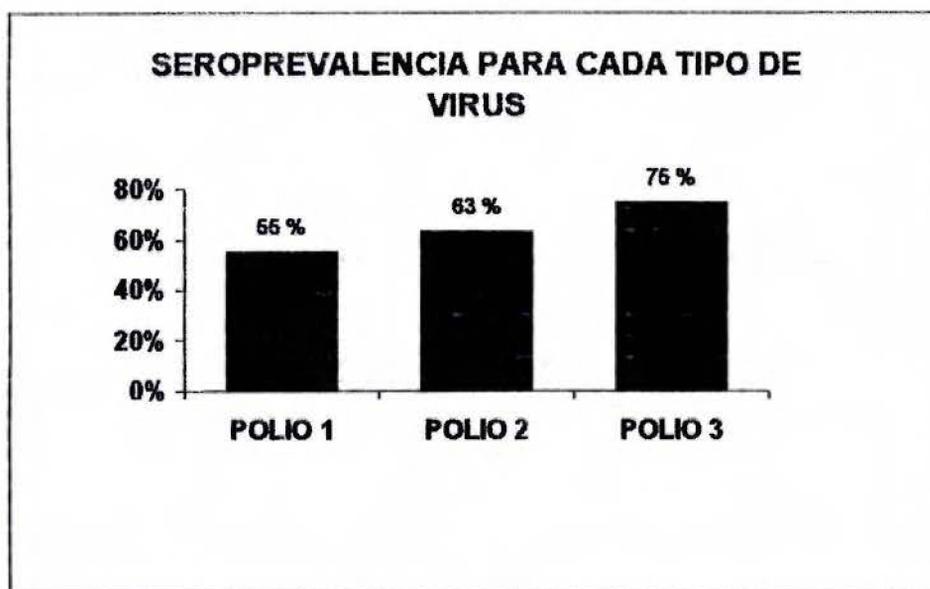


Figura 2. frecuencia (%) de sueros con títulos de anticuerpos neutralizantes  $\geq 1/8$  para cada uno de los serotipos de poliovirus.

De lo anterior se deduce que el porcentaje de seronegativos para cada serotipo (entendiéndose como seronegativos aquellos con títulos no protectores menores a  $1/8$ ) es de 45% para polio 1, 37% para polio 2 y 25% para polio 3 (Figura 3).

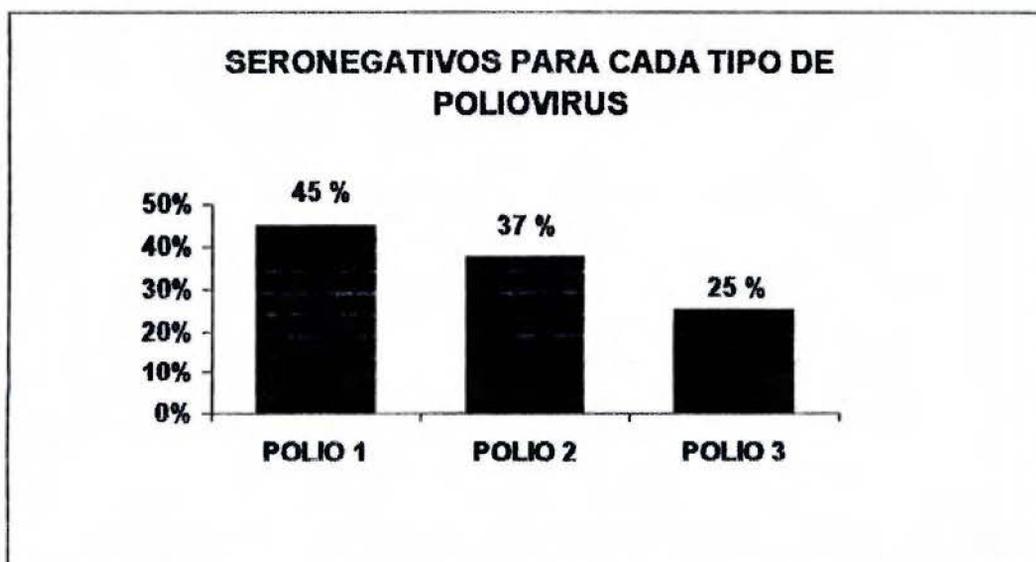


Figura 3. Número de sueros (%) cuyo título de anticuerpos neutralizantes para cada uno de los serotipos de polio es negativo ( $< 1/8$ ).

En la figura 4, se observa la frecuencia de sueros en función de los títulos obtenidos desde  $<1/8$  hasta  $1/512$  para cada serotipo del virus. En los 3 serotipos, la frecuencia de sueros por cada título disminuye conforme este sea mayor; los títulos protectores de mayor frecuencia para el virus son  $1/8$  y  $1/16$ , así, para polio 1 el 21% de los sueros tienen título de  $1/16$ , para polio 2 y 3 el 25% y 39% de los sueros tienen título de  $1/8$ .

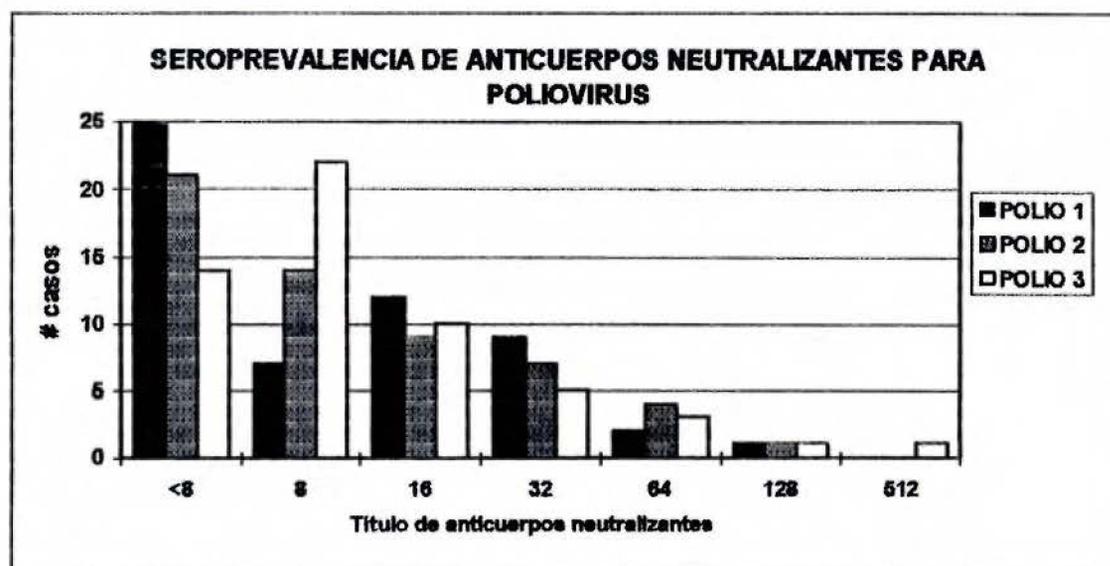


Figura 4. Distribución de la frecuencia de reacción de sueros para cada uno de los serotipos de polio de acuerdo con el título de anticuerpos neutralizantes.

El título más alto obtenido para Polio 1 y 2 es  $1/128$  por un mismo suero que se discutirá más adelante; para polio 3 el mayor título obtenido también por un solo suero es de  $1/512$  el cual corresponde a uno de los sueros de los niños que se analizarán posteriormente.

En cuanto a la inmunidad parcial definida como protección contra uno o dos de los serotipos del virus polio, la figura 5 muestra que el 5% de los sueros son inmunes a los serotipos 1 y 2 del virus mientras que otros 5% tienen protección contra los serotipos 2 y 3. También se puede deducir de esta figura que 21% de los sueros no tienen protección contra polio 1 y 2 pero sí contra polio 3; 7% de los sueros no tienen títulos protectores contra polio 1 y 3 pero sí para polio 2 y el 2% de los sueros no muestran protección contra polio 2 y 3 pero sí para polio 1.

**CUADRO 2.**  
**SEROPREVALENCIA PARA POLIOVIRUS POR PROVINCIAS.**

PROVINCIA \ VIRUS	San	José	Here	dia	Cart	ago	Alaju	ela	Punt	arenas	Gua	nacaste
	<1/8	≥ 1/8	<1/8	≥ 1/8	<1/8	≥ 1/8	<1/8	≥ 1/8	<1/8	≥ 1/8	<1/8	≥ 1/8
<b>POLIO 1</b>	52	48	50	50	50	50	17	83	50	50	50	50
<b>POLIO 2</b>	48	52	50	50	50	50	17	83	25	75	50	50
<b>POLIO 3</b>	20	80	17	83	50	50	17	83	0	100	50	50

Porcentaje de sueros que presentaron títulos de anticuerpos neutralizantes < 1/8 o ≥ 1/8 para cada serotipo de poliovirus según distribución por provincias.

En el cuadro 2, se observa la distribución por provincias de los sueros pertenecientes a la población de adultos jóvenes con título inferior a 1/8 y aquellos con título mayor o igual a 1/8 con respecto a cada serotipo de poliovirus. Hay 25 sueros pertenecientes a jóvenes que han sido vacunados en San José, 6 sueros de jóvenes vacunados en Heredia, 6 de Alajuela, 4 de Puntarenas, 2 de Cartago y 2 de Guanacaste; no se obtuvo sueros de jóvenes vacunados en la provincia de Limón.

En general, se observa que en San José, Heredia, Cartago y Guanacaste la mitad de los sueros obtenidos tienen títulos protectores contra polio 1 y 2 mientras que para polio 3, la protección aumenta al 80 y hasta el 100% de los sueros excepto en Cartago. En Puntarenas la protección encontrada es del 50 % contra polio 1, 75 % contra polio 2 y 100 % contra polio 3. De la provincia de Alajuela, 5 sueros tienen títulos protectores contra los 3 serotipos del virus, lo que representa 83 % de protección.

**CUADRO 3.**  
**SEROPREVALENCIA PARA POLIOVIRUS SEGUN GRUPO ETARIO.**

VIRUS \ EDAD	15 - 20 años		21- 25 años		26- 30 años		> 30 años	
	<1/8	≥ 1/8	<1/8	≥ 1/8	<1/8	≥ 1/8	<1/8	≥ 1/8
<b>POLIO 1</b>	2	1	14	20	7	4	0	1
<b>POLIO 2</b>	2	1	14	20	4	7	0	1
<b>POLIO 3</b>	2	1	7	27	3	8	0	1

Número de sueros que presentan títulos de anticuerpos neutralizantes < 1/8 o ≥ 1/8 para cada serotipo de poliovirus de acuerdo con el grupo etario.

En el cuadro 3 se observan los sueros de adultos jóvenes por grupos de edad. De los 3 sueros que pertenecen a jóvenes entre 15 y 20 años, sólo 1 tiene títulos protectores contra los tres serotipos. Hay 34 sueros de jóvenes entre 21 y 25 años, siendo alrededor del 59 % inmunes contra polio 1 y 2, y 80 % contra polio 3. Se analizaron 11 sueros de jóvenes entre 26 y 30 años de los cuales 4 (36%) tienen títulos protectores contra polio 1, 7 (64%) contra polio 2 y 8 (73%) contra polio 3. También se analizó un suero de una persona mayor de 30 años que presentó títulos protectores contra los 3 serotipos virales.

Dentro de los sueros de adultos jóvenes, 32 pertenecen al sexo masculino y 18 al femenino. Para poliovirus tipo 1 el 50 % de los jóvenes del sexo masculino presentan inmunidad mientras que para el sexo femenino es del 61 %. El 59 % y 61 % de los jóvenes de sexo masculino y femenino respectivamente, tienen inmunidad contra polio 2. Con respecto al serotipo 3, la inmunidad para ambos sexos es mayor del 69 % en el sexo masculino y 89 % del femenino.

Si se observa el cuadro 1 los títulos obtenidos para cada serotipo de poliovirus de los 6 sueros pertenecientes a niños de 2 a 5 años que asistían a la Consulta Externa del Hospital de Niños, se encuentra que sólo 3 sueros tienen un título mayor o igual a  $1/8$  contra los 3 serotipos del virus, y que dos sueros presentan protección contra un sólo serotipo de polio. También se puede observar que el título más alto en este grupo es de  $1/512$  contra el serotipo 3 y sólo lo presenta uno de los sueros; para poliovirus tipo 1 el título más alto es de  $1/32$  y para el serotipo 2 es  $1/64$ , en ambos casos alcanzados por dos de los sueros.

## V.- DISCUSIÓN.

Este trabajo es un estudio piloto que pretende dar a conocer la situación actual en Costa Rica en cuanto al estado inmunitario de la polio, para poder contribuir con los objetivos de la OMS para la erradicación de la poliomielitis no sólo en las Américas sino del mundo. Es importante señalar que la última publicación de que disponemos a este respecto fue la publicada por Serrato y Fuentes en 1975 (3).

Los datos obtenidos en la encuesta realizada en el grupo de adultos jóvenes cuyos sueros se analizaron, sugieren que al parecer el alcance del programa de vacunación contra la polio en la población ha sido adecuado pues estos jóvenes son de diferentes procedencias y todos reportan haber sido vacunados adecuadamente contra la polio.

La tasa de inmunidad obtenida en los sueros analizados, de un 48% contra los tres serotipos del virus polio difiere de la encontrada en un estudio previo realizado en nuestro país por Serrato y Fuentes en 1975 la cual fue del 62% en un grupo de adultos jóvenes. Es importante sin embargo, señalar que este trabajo se basó en una muestra de 546 sueros (3).

También los niveles de inmunidad contra los serotipos 1 y 2 de poliovirus no correlacionan con los encontrados en esta investigación pues estos autores reportan poco más del 80% de protección contra estos serotipos mientras que en nuestro estudio encontramos un 55% y 63% de inmunidad contra polio 1 y polio 2 respectivamente. Estos datos muestran una aparente disminución en la tasa de inmunidad en la población en especial contra los serotipos 1 y 2. Para poliovirus serotipo 3, hay correlación entre ambos estudios ya que en el estudio anterior obtienen un 70,5% de inmunidad y en nuestro estudio un 75%. (3).

El hecho de obtener en el presente estudio porcentajes considerables de seronegativos para cada serotipo del virus así como títulos bajos de protección en la mayoría de los seropositivos, correlaciona con estudios que indican que en los países en desarrollo y tropicales la respuesta de anticuerpos neutralizantes contra el virus polio es más baja que la observada en los países industrializados (8,9).

Estudios realizados con la vacuna oral de la polio indican que el serotipo 2 vacunal puede interferir con la respuesta de anticuerpos contra los serotipos 1 y 3 generando bajos títulos sin embargo esto no parece presentarse en la población, pues en nuestro caso se mantiene mayor inmunidad contra el serotipo 3 del virus y hay mayor porcentaje de sueros con título no protector contra los serotipos 1 y 2.(21%). En este momento, no poseemos mayor información en cuanto al tipo de vacuna que se emplea en nuestro país (potencia, dosificación de cada serotipo) para explicar este resultado. En otros estudio se ha reportado la posibilidad de interferencia entre los distintos serotipos ( 14 ).

A pesar de que el número de sueros por provincia es pequeño y es necesario realizar estudios con un mayor número de sueros que reflejen de forma significativa el estado inmunitario de la población, al parecer contra polio 3 hay mayor tasa de inmunidad en la mayoría de las provincias del país, sin embargo para polio 1 y 2 se obtienen diferentes tasas de inmunidad lo que puede indicar variaciones regionales en la inmunidad como se sugiere en estudios realizados en otros países ( 14 ).

Los datos obtenidos en la distribución por edad y sexo de la inmunidad contra el virus en los adultos jóvenes no presentan diferencias importantes, en general solo para polio 3 se obtienen niveles por arriba de 70% de protección. Como se mencionó anteriormente, hay una disminución en la tasa de protección en los adultos jóvenes comparado con el estudio anterior realizado en nuestro país; esta disminución en parte puede explicarse porque en nuestro país se considera interrumpida la circulación del virus silvestre por lo que se ha reducido la infección natural, también por mejoras en las condiciones sanitarias que evitan la diseminación del virus y además hoy día no se realizan las campañas masivas de vacunación de las que si fueron partícipes los adultos jóvenes del estudio anterior ( 13 ).

En vista de los bajos títulos que se obtenían en esta población de adultos jóvenes, y con el afán de obtener sueros control con títulos altos contra el virus polio, se analizaron el grupo de 6 sueros de niños de 2 a 5 años que asistían a la consulta externa del Hospital de Niños. En Costa Rica el esquema de vacunación contra la polio consiste de 4 dosis de la vacuna oral de la polio (OPV), la primera se da a los 2 meses de edad, luego al cuarto y sexto mes de edad y por último una dosis a los 18 meses de edad. Esto supone que estos niños deberían tener títulos altos contra el virus;

además se considera que el estado inmunitario se consolida conforme aumenta la edad y en estudios realizados en otros países las tasas de inmunidad en niños de estas edades son altas (superiores al 90 %)( 2).

Los resultados obtenidos en esta investigación no reflejan lo esperado pues no todos los sueros de los niños tienen protección contra los tres serotipos (solo el 33%), y los títulos protectores obtenidos no son muy altos. A pesar de ser un número pequeño de sueros analizados, estos resultados correlacionan con estudios que indican tasas de seroconversión subóptimas en los países en desarrollo; lo cual es preocupante y merece un estudio más exhaustivo para este grupo etario (16). También estos datos se asemejan a los obtenidos por Fuentes y Serrato en que reportan un estado insatisfactorio de inmunidad contra el virus polio en la población de infantes analizada ( 3)

El suero número 50 pertenece a una joven quien recibió una dosis de refuerzo, hace una año con la OPV. Se puede observar que mantiene títulos altos (1/128) contra poliovirus serotipo 1 y 2 mientras que para el serotipo 3 tiene protección pero con el título mínimo de 1/8. También el suero número 30 pertenece a un joven que reporta haber recibido una dosis de refuerzo hace un par de años quien mantiene títulos protectores contra los tres serotipos. El hecho de que ambos sueros presenten inmunidad total al virus correlaciona con estudios que indican que la administración de una dosis de refuerzo en adultos jóvenes puede generar aumento en los títulos de anticuerpos neutralizantes y por lo tanto protección contra poliomielitis parálitica ( 5).

Puesto que los estudios de seroprevalencia por anticuerpos neutralizantes contra poliovirus son válidos para estimar la inmunidad y susceptibilidad de una población contra la exposición al virus silvestre, esta investigación sugiere un estado inmunitario subóptimo en niños y adultos jóvenes de nuestro país; así se encuentra que hay una proporción importante de jóvenes e infantes que se mantienen susceptibles a pesar de la aparente buena cobertura del programa de vacunación contra polio en Costa Rica

A parte de las razones anteriormente mencionadas para explicar la disminución de la inmunidad en la población estudiada con respecto a estudios anteriores realizados en nuestro país, otros factores que se han relacionado con bajos niveles de inmunidad por tasas de seroconversión subóptimas son

la interferencia entre los serotipos de la vacuna OPV, la interferencia por infección con otros enterovirus como Coxsackie, la interferencia por diarrea la cual puede afectar directamente la multiplicación del virus en intestino (16). También se han relacionado en algunos países factores ambientales como estación lluviosa con bajas tasas de seroconversión (16). Finalmente, se debe considerar la posibilidad de baja potencia de las vacunas utilizadas por lo que se hace necesario realizar estudios para evaluar la calidad de las vacunas y la cadena de frío en todo el territorio del país.

Con base en los resultados obtenidos no se puede descartar el riesgo de reintroducción del virus silvestre a nuestro país. Dos factores observados en este estudio son la posible acumulación de niños y de adultos jóvenes susceptibles a poliomielitis y la eficacia subóptima del esquema de vacunación con OPV que pueden favorecer un brote de poliomielitis en Costa Rica por la importación del virus de lugares endémicos. Algunos estudios sugieren llevar a cabo campañas masivas de vacunación en países tropicales y subtropicales libres de polio para reducir el riesgo de reintroducción del virus silvestre, pues se ha demostrado que estas campañas son un refuerzo inmunitario importante en poblaciones con inmunidad subóptimas (12). Otros estudios recomiendan la administración suplemental de la vacuna inactivada contra la polio (IPV) sin necesidad de variar el esquema de vacunación existente, pues también se ha observado que genera protección contra poliomielitis en comunidades con tasa de seroconversión subóptimas(9). Independientemente de la vacuna que se utilice, es un hecho que es necesario dar refuerzos periódicos para mantener una tasa adecuada de inmunidad.

Por último, este estudio refleja la necesidad de realizar un estudio de mayor envergadura para conocer con exactitud el estado inmunitario contra poliovirus en Costa Rica, estudios de enterovirus circulantes en nuestro país así como, estudios de la potencia de la vacuna con el objeto de establecer las medidas necesarias para contribuir con las metas propuestas por la OMS y poder alcanzar la meta de la erradicación global de la poliomielitis.

**V.- BIBLIOGRAFÍA.**

- 1) **Brooks, G. et al. Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. Picornavirus. 1992. pp. 505-511.**
- 2) **Cher, R.; Hausinger, S.; Dajani, A.; Hanfling, M.; Baughman, A.; Pallansch, M.; Patriarca, P. Seroprevalence of antibody against poliovirus in inner-city preschool children. J. Am. Med. Assoc. 1996; 276: 1639-1645.**
- 3) **Fuentes, L.; Serrato, G. : Inmunidad a la poliomielitis en Costa Rica. Acta Médica Cost. 1975; 18(1): 45-52.**
- 4) **Ghendon, Y.; Robertson, S. : Interrupting the transmission of wild polioviruses with vaccines: immunological considerations. Bull-World-Health-Organ. 1994; 72(6): 973-983.**
- 5) **Green, M.; Handsher, R.; Slepon, R.; Ashkenazi, S.; Mendelson, E.; Cohen, D. : Four year follow-up of the immune status of young adults given a single booster dose of trivalent oral poliovaccine. Vaccine. 1994; 12(7): 582-584.**
- 6) **Guidelines for WHO/EPI Collaborative Studies on Poliomyelitis. Standard procedure for determining immunity to poliovirus using the microneutralization test. 1995. Center for Disease Control.**
- 7) **Herrero, L. & Hun, L. Manual de Virología Clínica. 1995. Universidad de Costa Rica; Facultad de Microbiología.**
- 8) **Melnick, J. Current status of poliovirus infections. Clin. Microbiol. Rev. 1996; 9(3): 293-300.**
- 9) **Moriniere, B.; Loon van, F.; Rhodes, P.; Klein-Zabban, M.; Frank-Senat, B.; Herrington, J.; Pallansch, M.; Patriarca, P. Immunogenicity of a supplemental dose of oral versus inactivated poliovirus vaccine. Lancet. 1993; 341: 1545-1550.**
- 10) **Pan American Health Organization. Procedural guide for polioviruses and enteroviruses isolation, identification and serology. 1988.**

- 11) **P.A.H.O.** Progress toward global poliomyelitis eradication, 1985-1994. *MMWR-Morb-Mortal-Wkly-Rep.* 1995; 44(14): 273-5, 281.
- 12) **Reichler, M.R.; Kharabsheh, S.; Rhodes, P.; Otoum, H.; Bloch, S.; Pallansch, M.; Patriarca, P.; Cochi, S.** :Increased immunogenicity of oral poliovirus vaccine administered in mass vaccination campaigns compared with the routine vaccination programme in Jordan. (sometido a publicación).
- 13) **Schmidt, N.J. & Emmons, R.W.** Diagnostic procedures for viral , rickettsial and chlamydial infections. *Enterovirus and reovirus.* 1989; pp. 513-559.
- 14) **Sutter, R.; Patriarca, P.; Suleiman, A.J.; Al-Ghassani, A.; El-Bulay, M.** : Paralytic Poliomyelitis in Oman: Association between regional differences in attack rate and variations in antibody responses to oral poliovirus vaccine. *Inter. J. Epidemiol.* 1993; 22: 936-944.
- 15) **Withers, B.; Kelley, P.; Pang, L.; Kusterman, J.; Mac Arthy, P.; Russell, B and Pallansch, M.** Vaccine-preventable disease susceptibility in a young adult micronesian population. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 1994; 25: 569-574.
- 16) **World Health Organization Collaborative Study Group on Oral Poliovirus Vaccine.** Factors affecting the immunogenicity of oral poliovirus vaccine: A prospective evaluation in Brazil and the Gambia. *J. Infect. Dis.* 1995; 171: 1097-96.
- 17) **World Health Organization.** Manual for the virological investigation of polio. Advance draft. Global programme for vaccines and immunization. Geneva. 1996.
- 18) **Zuckerman, A. J.; Banatavala, J. E.; Pattison, J.R.** Principles and practice of clinical virology. The enteroviruses. 1990. pp. 389-409.