

CLASIFICACION INMUNOLOGICA DE 25 CEPAS EUROPEAS DE VIRUS DE POLIOMIELITIS^{1, 2}

POR LOS DRES. J. D. VERLINDE,³ B. HOFMAN,⁴ Y E. NIHOUL⁵

Utilizando las observaciones del Comité de Clasificación de la Fundación contra la Parálisis Infantil,⁶ tratamos de clasificar 25 cepas de virus de poliomielitis que aislamos de enfermos que sufrían de poliomielitis paralítica en Holanda, Bélgica y Alemania.⁷

MÉTODOS

Se emplearon cuatro métodos de clasificación:

- (a) Prueba de resistencia de monos inmunizados con cepas prototipo⁸ contra la provocación intracerebral de 100 PD₅₀⁹ de cepas desconocidas;
- (b) Prueba de resistencia de monos inmunizados con cepas desconocidas contra la provocación intracerebral de 100 PD₅₀ de cepas prototipo;
- (c) Neutralización de cepas desconocidas con sueros preparados contra cepas prototipo;
- (d) Neutralización de cepas prototipo con sueros preparados contra cepas desconocidas.

Los monos utilizados para las pruebas de resistencia y la preparación de antisueros fueron inmunizados con dos inoculaciones intramusculares de 3 ml de una suspensión al 20 % de médula espinal virulenta mezclada, a la que se agregó un volumen igual del coadyuvante recomendado por Salk, Lewis, Youngner y Bennet.¹⁰ El coadyuvante consistió en el aceite

¹ Para este trabajo se recibieron subvenciones del Consejo Nacional de Investigaciones Sanitarias, I.N.O., La Haya, Países Bajos, y de la Fundación Dr. Simon Baruch, Nueva York, E. U. A.

² Publicado en inglés en el *Bulletin of the World Health Organization*, Vol. 9, No. 4, 1953, p. 559.

³ Profesor de Bacteriología, Facultad de Medicina, Universidad del Estado, Leyden, Países Bajos, y Jefe del Departamento de Bacteriología y Patología Experimental, Instituut voor Praeventieve Geneeskunde, Leyden, Países Bajos.

⁴ Bacteriólogo Auxiliar, Departamento de Bacteriología y Patología Experimental, Instituut voor Praeventieve Geneeskunde, Leyden, Países Bajos.

⁵ Jefe del Laboratorio de Microbiología, Universidad de Gante, Bélgica.

⁶ Comité de Clasificación de la Fundación Nacional contra la Parálisis Infantil, *Am. Jour. Hyg.* 54:191, 1951.

⁷ Las muestras de heces obtenidas en Bélgica fueron recogidas por el Dr. L. Laruelle, Instituto Neurológico Belga, Bruselas, Bélgica, y las obtenidas en Alemania, por el Dr. F. Koch, Kinderklinik, Giessen, Alemania.

⁸ Las cepas prototipo Brunilda y León se obtuvieron por cortesía del Dr. H. A. Howe, Baltimore, Md., E. U. A.

⁹ Dilución en la que la mitad de los animales inoculados mostraron indicios de poliomielitis.

¹⁰ Salk, J. E., Lewis, L. J., Youngner, J. S., y Bennett, B. L.: *Am. Jour. Hyg.*, 54:157, 1951.

mineral Bayol F¹¹ y el agente emulsificador Arlacel A,¹² estos constituyentes se utilizaron al principio en una proporción de 9 vol. del primero y 1 vol. del segundo. Más tarde se emplearon 3 vol. de Bayol F y 1 vol. de Arlacel A. El intervalo entre las inyecciones fué de dos semanas.

CUADRO NO. 1.—*Historia de las cepas ensayadas*

Nombre de la cepa	Paciente		País	Fuente	Fecha del aislamiento		Pases en los monos	Información epidemiológica
	Sexo	edad (años)						
AK	F	2	Holanda	Heces	Septiembre	1949	14 y 18	Caso esporádico
WH	M	1	"	"	Julio	1950	5	Caso esporádico
HSM	M	4	"	"	Julio	1951	5	Caso esporádico
KI	M	18	"	Sistema nervioso central	Agosto	"	1	Caso procedente de foco epidémico
Hf	F	7	"	Heces	"	"	3	Caso de origen epidémico
HZ	M	8	"	"	Octubre	"	2	Caso aislado de origen epidémico
CW	M	10	"	"	Noviembre	"	1	Caso de origen epidémico
Sey	F	2	"	Sistema nervioso central	"	"	1	Caso procedente de foco epidémico
Borr	M	7	"	Heces	Enero	1952	2	Caso de la fase inicial de la epidemia
Kor	M	14	"	"	"	"	2	Caso de la fase inicial de la epidemia
EW	F	12	"	"	Abril	"	1	Caso procedente de foco epidémico
DK	M	12	"	"	Mayo	"	3	Caso de la fase inicial de la epidemia
AP	M	7	"	"	Junio	"	2	Caso procedente de foco epidémico
Tass	—	—	Bélgica	"	Julio	"	3	—
DR	—	—	Alemania	"	"	"	3	Caso procedente de zona epidémica
Mol	M	(4 semanas)	Holanda	"	"	"	2	Caso procedente de foco epidémico
BW	—	—	Alemania	"	Agosto	"	1	—
HL	—	—	"	"	"	"	1	Casos procedentes de una zona epidémica
RA	—	—	"	"	"	"	1	—
Sm	—	—	Bélgica	"	"	"	2	—
Wa	—	—	"	"	"	"	2	—
Ni, I	—	—	"	"	"	"	2	—
Ni, II	—	—	"	"	Octubre	"	2	—
HK	—	—	Alemania	"	Noviembre	"	1	—
ES	—	—	Holanda	"	Diciembre	"	1	Caso esporádico

Se extrajeron muestras de sangre de los animales dos semanas después de la última inyección. Los sueros no diluidos neutralizaron por lo menos 1,000 PD₅₀ de la cepa homóloga. Algunas veces hubo que administrar a los monos inmunizados con cepas desconocidas tres inyecciones intramusculares con el fin de obtener el índice requerido de neutralización. Se prepararon mezclas de sueros, por lo menos de tres monos.

¹¹ Se puede obtener de la Esso Standard Oil Co., E. U. A.

¹² El coadyuvante fué amablemente suministrado por N. V. Philips-Roxane, de Weesp, Países Bajos.

CUADRO No. 2.—Prueba de resistencia de monos inmunizados con cepas desconocidas

Monos	Cepa inmunizadora desconocida	Provocación con 100 PD ₅₀			Controles 100 PD ₅₀			Tipo
		Brunilda	Lansing	León	Brunilda	Lansing	León	
Rhesus	AK	3/4	0/4	4/4	4/4	4/4	4/4	2
Cynomolgus	WH	4/4	0/4	4/4				2
Rhesus	KI	0/4	4/4	4/4				1
Cynomolgus	Hf	2/4	4/4	4/4				1
Rhesus	HZ	0/4	4/4	4/4				1
Cynomolgus	CW	0/4	4/4	4/4				1
Cynomolgus	Sey	0/4	4/4	4/4				1
Rhesus	Borr	0/4	4/4	4/4				1
Rhesus	Kor	0/4	4/4	4/4				1

CUADRO No. 3.—Prueba de resistencia de monos inmunizados con cepas prototipo

Monos	Provocación con 100 PD ₅₀ de cepa desconocida	Cepa inmunizadora prototipo			Controles	Tipo
		Brunilda	Lansing	León		
Rhesus	HZ	0/4	4/4	3/4	4/4	1
"	Borr	0/4	4/4	4/4	3/4	1
"	Kor	0/4	4/4	3/4	4/4	1
"	DK	0/4	2/4	4/4	4/4	1
"	AP	4/4	0/4	4/4	4/4	2
"	HK	3/3	3/3	1/3	3/3	3

CUADRO No. 4.—Neutralización con antiseros prototipo

Monos	Cepa desconocida	Antiseros prototipo			Suero control de mono normal	Tipo
		Brunilda	Lansing	León		
Rhesus	AK	4/4	0/4	4/4	2/2	2
Rhesus	Kor	2/4	4/4	4/4	2/2	1
Cynomolgus	EW	0/4	4/4	4/4	2/2	1
Cynomolgus	AP	4/4	3/4	3/3	2/2	2*
Rhesus	Tass	4/4	0/4	3/3	2/2	2
Rhesus	DR	0/4	4/4	2/3	2/2	1
Rhesus	Mol	1/4	3/3	3/3	2/2	1
Cynomolgus	HL	0/4	2/3	3/3	2/2	1
Rhesus	Sm	2/4	4/4	4/4	2/2	1
Cynomolgus	Wa	0/4	4/4	4/4	2/2	1
Rhesus	Ni. I	2/4	2/2	3/4	2/2	1
Cynomolgus	HK	4/4	3/3	2/4	2/2	3
Rhesus	Ni. II	0/4	2/2	4/4	2/2	1
Cynomolgus	ES	4/4	0/4	4/4	2/2	2

* Determinada como tipo 2 por otro método.

Se observó que la inmunización por vía intramuscular con la cepa León producía a menudo parálisis y muerte. En consecuencia, decidimos seguir un procedimiento de inmunización diferente con esta cepa concreta, administrando dos inyecciones de médula de mono a una dilución de 10^{-2} y otras dos a una dilución de 10^{-1} , ambas mezcladas con coadyuvante. El intervalo entre las inyecciones fué de una semana.

La resistencia de los monos inmunizados fué probada en un período de dos a cuatro semanas después de la última inyección de virus y coadyuvante.

CUADRO NO. 5.—Neutralización con antisueros contra cepas desconocidas

Monos	Suero de cepa desconocida	Cepas prototipo				Tipo
		Brunilda (monos)	Lansing		León (monos)	
			monos	ratones		
Rhesus	AK	3/4	2/4	2/8	4/4	2
"	WH	2/2	—	0/8	2/2	2
"	HSM	2/2	2/2	0/8	2/2	2
"	KI	2/2	—	6/8	2/2	?*
"	HZ	2/4	—	7/8	2/2	1
"	CW	0/4	—	8/8	2/2	1
"	Sey	0/2	—	6/8	2/2	1
"	Borr	0/4	—	6/8	2/2	1
"	Kor	1/4	—	5/8	2/2	1
"	DK	0/3	—	6/8	2/2	1
"	Tass	2/2	—	2/8	2/2	2
"	DR	1/3	2/2	5/8	2/2	1
"	Mol	0/2	—	8/8	2/2	1
"	BW	2/2	—	1/8	2/2	2
"	RA	1/3	2/2	5/8	2/2	1
"	Sm	0/2	—	6/8	2/2	1
"	Wa	1/4	2/2	6/8	2/2	1

* Determinada como tipo 1 por otro método.

Las pruebas de neutralización se llevaron a cabo mediante inoculación intracerebral de monos y ratones (según fuera la patogenicidad de la cepa en los roedores) con mezclas de suero no diluido y una concentración final de virus de 100 PD₅₀. Se dejaron las mezclas durante dos horas a la temperatura ambiente y durante 30 minutos a 4°C, antes de proceder a la inoculación. Se inoculó a los monos con 0.5 ml, y a los ratones con 0.02 ml, de la mezcla de virus y suero. Se incluyeron mezclas adecuadas de control que contenían la misma cantidad de virus y de suero de monos normales.

Los animales utilizados en estos experimentos eran monos *rhesus* y *cynomolgus* jóvenes, que pesaban aproximadamente 1.2 kg, y ratones blancos, de ojos negros de las variedades híbridas de las cepas *Rhodesfarm* y *Extreme Dilute*, cuyo peso era de 10 g, criados en la Estación

Central de Cría del Consejo Nacional de Investigaciones Sanitarias,
T. N. O.

CUADRO No. 6.—*Resultados de la clasificación inmunológica por cuatro métodos diferentes*

Cepa	País	Año del aislamiento	Diferenciación de tipos				Determinación final del tipo
			resistencia contra		neutralización con		
			cepas pro-totipo	cepas desconocidas	antisueros pro-totipo	antisueros de cepas desconocidas	
AK	Holanda	1949	—	2	2	2	2
WH	"	1950	—	2	—	2	2
HSM	"	1951	—	—	—	2	2
KI	"	"	—	1	?	?	1
Hf	"	"	—	1	?	—	1
HZ	"	"	1	1	—	1	1
CW	"	"	—	1	—	1	1
Sey	"	"	—	1	?	1	1
Borr	"	1952	1	1	—	1	1
Kor	"	"	1	1	1	1	1
EW	"	"	—	—	1	—	1
DK	"	"	1	—	—	1	1
AP	"	"	2	—	?	—	2
Tass	Bélgica	"	—	—	2	2	2
DR	Alemania	"	—	—	1	1	1
Mol	Holanda	"	—	—	1	1	1
BW	Alemania	"	—	—	?	2	2
HL	"	"	—	—	1	—	1
RA	"	"	—	—	?	1	1
Sm	Bélgica	"	—	—	1	1	1
Wa	"	"	—	—	1	1	1
Ni. I	"	"	—	—	1	—	1
Ni. II	"	"	—	—	1	—	1
HK	Alemania	"	—	3	3	—	3
ES	Holanda	"	—	—	2	—	2

CUADRO No. 7.—*Sumario de los resultados de la clasificación*

Año	País	Número de cepas		
		tipo 1	tipo 2	tipo 3
1949	Holanda	—	1	—
1950	"	—	1	—
1951	"	5	1	—
1952	"	5	2	—
1952	Bélgica	4	1	—
1952	Alemania	3	1	1
	Total	17 (68%)	7 (28%)	1 (4%)

RESULTADOS

En el Cuadro No. 1 figuran la procedencia de las cepas y el número de pases en monos. En los Cuadros Nos. 2, 3, 4 y 5 aparecen los resultados obtenidos con esos diversos métodos de clasificación empleados. Se examinaron 19 cepas mediante más de un método. Los resultados obtenidos con diferentes métodos coincidieron en la mayoría de los casos (véase Cuadro No. 6), aunque el método de neutralización produjo resultados imprecisos con seis cepas (24%). Sin embargo, se pudieron clasificar por otro método.

FIG. 1.—Distribución de la poliomielitis en Holanda: 1949.



● representa un caso notificado.

La cepa AP (Cuadro No. 4) no fué claramente neutralizada por uno de los antisueros prototipo, pero el método de la prueba de resistencia, la clasificó como tipo 2 (véase Cuadro No. 3). La cepa KI produjo en los monos inmunizados un antisuero que tenía tan poco poder neu-

tralizador que el método de neutralización con cepas prototipo dió resultados imprecisos (véase Cuadro No. 5). No obstante, fué clasificada por otro método como tipo 1 (véase Cuadro No. 2).

La mayoría de las cepas han sido clasificadas en sus primeros países en el mono. Con seis de ellas, a saber, las cepas AP, KI, Hf, Sey, BW y RA, se obtuvieron resultados imprecisos por el método de neutralización con antiseros prototipo al parecer debido a su poca virulencia (menos

FIG. 2.—Distribución de la poliomielitis en Holanda: 1950.



● representa un caso notificado.

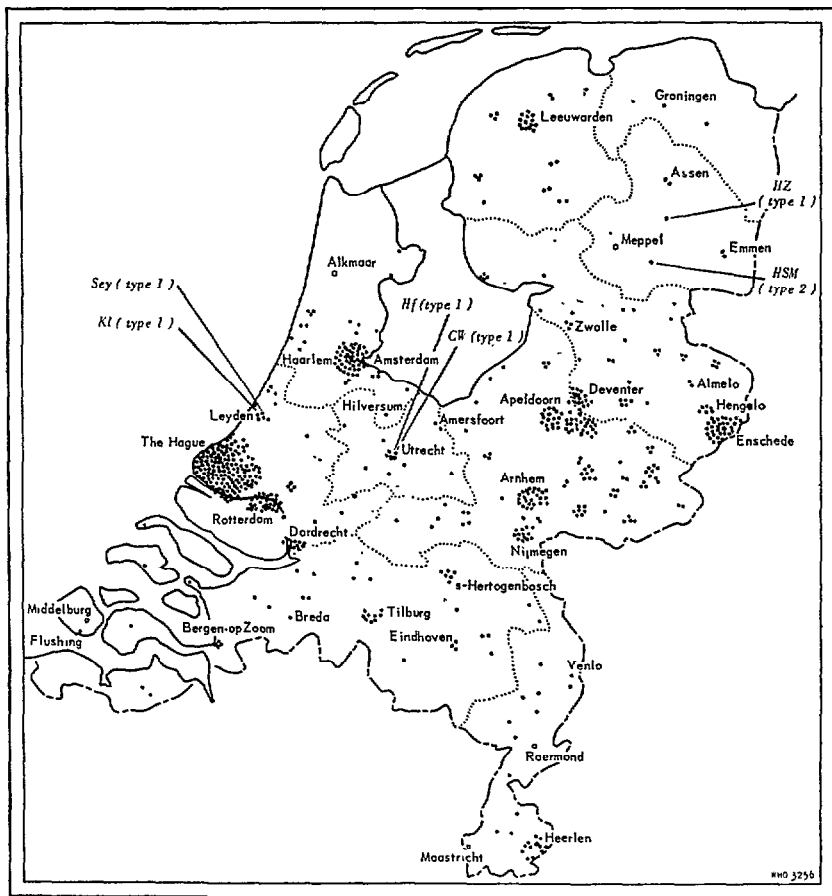
de 10^{-3}). Ahora bien, estas cepas se pudieron clasificar, bien fuera mediante la prueba de resistencia, o por la neutralización con antiseros preparados en monos inmunizados contra las cepas desconocidas (Cuadro No. 5).

En los Cuadros Nos. 6 y 7 se presenta un resumen de la clasificación por los cuatro métodos diferentes empleados y un resumen general.

En cuanto a la distribución de tipos en relación con la epidemiología, cabe señalar que en 1949 y 1950, sólo ocurrieron en Holanda casos aisla-

dos de poliomielitis parálitica. En esos dos años se obtuvieron dos cepas del tipo 2 (véanse las Figs. 1 y 2). En los dos años siguientes, especialmente en 1952, se registró una elevada incidencia de poliomielitis parálitica; se aislaron 13 cepas, 10 de las cuales (77 %) fueron clasificadas como del tipo 1, y tres (23 %) como del tipo 2 (véanse las Figs. 3 y 4).

FIG. 3.—Distribución de la poliomielitis en Holanda: 1951.

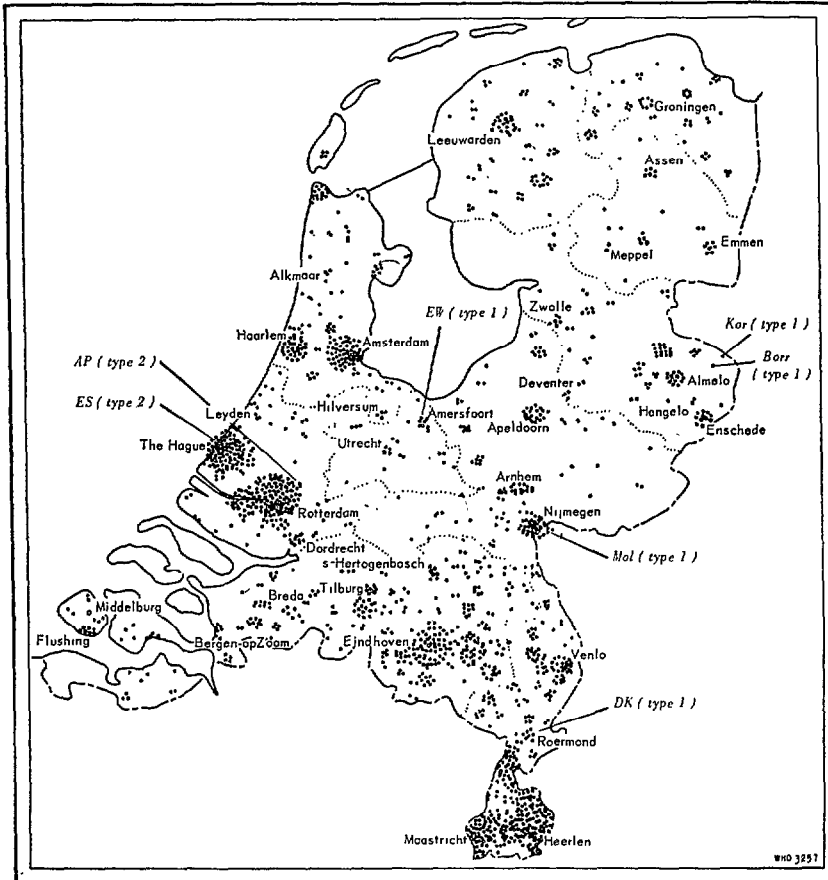


● representa un caso notificado.

La cepa del tipo 2 aislada en 1951 se obtuvo de un caso único de poliomielitis parálitica, y la cepa AP de 1952 de un caso similar justamente fuera de una zona epidémica, mientras que la cepa ES de 1952, aunque procedía de una zona epidémica, fué aislada en diciembre, es decir, cuando hacía tres meses que no se había registrado ningún otro caso en la citada zona. Puesto que las muestras para el aislamiento del virus se recogieron a discreción en diversas zonas del país, parece que las cepas del tipo 2 aparecen regularmente año tras año, pero producen casos

esporádicos, en tanto que las del tipo 1 tienden a causar epidemias de poliomiélitis parálitica. Por consiguiente, parece que el poder neurotrópico de estas últimas es más elevado que el de las cepas del tipo 2.

FIG. 4.—Distribución de la poliomiélitis en Holanda: 1952.



● representa un caso notificado.

IMMUNOLOGICAL CLASSIFICATION OF 25 EUROPEAN STRAINS OF POLIOMYELITIS VIRUS (Summary)

Twenty-five strains of poliomyelitis virus isolated from paralytic cases in the Netherlands, Belgium, and Germany were classified either by testing resistance of immunized monkeys, or by neutralization. Seventeen strains (68%) were classified as type 1; 7 (28%) as type 2, and 1 (4%) as type 3. Strains of type 2 are presumably present from year to year, only occasionally, however, causing paralytic poliomyelitis. Type 1 strains, on the contrary, are apparently the agents tending to cause epidemics of the paralytic disease.