

ESTUDO SOROLÓGICO PARA POLIOVÍRUS NA GUANABARA, BRASIL¹

Maria Genoveva von Hubinger,² Itamara Meilman,³ Célia Maria M. de Vasconcelos,⁴ e Luiz Armando de M. Frias⁵

Os autores apresentam os resultados da titulação de anticorpos para os poliovírus 1, 2 e 3 em grupo de crianças vacinadas no Estado da Guanabara, e demonstram que em 5,8% não houve formação de título de anticorpos para poliovírus 1. Para o poliovírus 2 a percentagem foi de 1,5 e para o poliovírus 3, de 7,9. Os títulos de anticorpos neutralizantes para os poliovírus 2 e 3 permaneceram estáveis por mais de um ano. Para o poliovírus 3 houve uma queda de títulos após seis meses de vacinação.

Introdução

A aplicação da vacina oral tipo Sabin contra a poliomielite em regiões de clima temperado conseguiu erradicar a doença. Nas regiões de clima tropical, um programa bem orientado de vacinação consegue controlar a doença, sem produzir porém a sua erradicação. O insucesso deve-se a diversos fatores, além da dificuldade de manutenção de esquema rígido de vacinação da população infantil suscetível.

Trabalhos recentes publicados pela OMS mostram que, em 1970, foi notificado nas Américas um número maior de casos de poliomielite que nos anos anteriores. Essa incidência foi maior em crianças menores de quatro anos.

No Canadá, Cuba, Estados Unidos, Jamaica, Porto Rico, República Dominicana e Trinidad-Tobago a doença foi eficazmente dominada. Nos Estados Unidos houve um moderado aumento que poderá ser atribuído

ao número cada vez maior de crianças que não está completamente imunizado pela vacinação (6). Na América Latina pode-se afirmar que a evolução da doença está ligada ao esforço empregado nos programas de vacinação.

Levando em consideração os fatos mencionados, e dispondo de poucos estudos em Brasil, os autores efetuaram a presente pesquisa com a finalidade de avaliar o grau de imunidade em um grupo de crianças vacinadas no Estado da Guanabara.

Material e métodos

População estudada

Foram estudadas 147 crianças no período de abril a maio de 1970, selecionadas ao acaso entre aquelas vacinadas nos postos de saúde das diversas regiões administrativas da Guanabara.

Vacina empregada

Foi utilizada pela Secretaria de Saúde da Guanabara a vacina oral trivalente, tipo Sabin, de várias procedências (Iugoslávia, Canadá, Bélgica, Inglaterra). Em 105 crianças foram aplicadas três doses de vacina. As 42 restantes receberam ainda uma ou duas doses de reforço.

¹ Trabalho do Laboratório de Virologia Louis Pasteur, Instituto Estadual de Saúde Pública, Estado da Guanabara, Brasil.

² Chefe, Seção de Virologia, Laboratório de Virologia Louis Pasteur.

³ Chefe do Centro de Isolamento de Poliomielite, Hospital Estadual Jesus, Guanabara.

⁴ Virologista, Laboratório de Virologia Louis Pasteur.

⁵ Professor Assistente de Epidemiologia e Estatística, Instituto Presidente Castello Branco, Fundação Instituto Oswaldo Cruz.

Coleta de material

Foi coletado sangue por punção venosa e enviado ao laboratório acompanhado de ficha informativa com nome, residência, número de doses de vacina e datas de aplicação e de coleta do material. O soro foi separado e guardado em congelador a -20°C e diluído a 1:5 em solução salina tamponada de Hanks com lactoalbumina, antibióticos e fungizona.

Determinação de anticorpos

Foi feita a titulação dos anticorpos circulantes de 1:5 a 1:640 por teste de neutralização usando microtécnica (3). Foi usada a linhagem de célula LLCMK₂ (rim de macaco, *Macaca mullata*). Os vírus padrões para os poliovírus 1, 2 e 3 foram respectivamente as amostras de Mahoney, Lansing e Leon, usadas na concentração de 100 TCD₅₀. A mistura soro-vírus foi incubada a 37°C por uma hora e uma noite a 4°C . A leitura final foi feita no quarto dia observando-se as células em microscópio invertido.

Análise estatística

Foi utilizado o teste bilateral de Kolmogorov-Smirnov, a um nível de significância de $\alpha = 0,05$.

Resultados

No quadro 1 são apresentados os resultados da titulação de anticorpos para os três tipos de poliovírus em relação à idade e ao número de doses de vacina aplicadas. Utilizando-se a aproximação do Qui-quadrado para o teste bilateral de Kolmogorov-Smirnov, observou-se que não houve influência nos títulos encontrados em relação ao número de doses, para nenhum dos três tipos de poliovírus. Aplicando-se o mesmo teste aos diversos grupos etários estudados, não foi encontrada diferença significativa nos títulos para os três tipos de poliovírus. No quadro 2 estuda-se a associação da resposta imunológica com o intervalo observado entre as doses da vacina. O esquema

vacinal empregado pelo Departamento de Saúde Pública da Secretaria de Saúde da Guanabara preconizou o intervalo de um ou dois meses entre as três primeiras doses de vacina. Este esquema foi observado em 73,33% das crianças examinadas, e em apenas 26,66% o intervalo entre as doses foi maior. Analisando-se estatisticamente esses dados, concluiu-se que o intervalo maior de dois meses não alterou significativamente a resposta imunitária em relação aos três tipos de poliovírus.

Resultados significativos foram encontrados nos níveis de anticorpos em relação ao tempo transcorrido após a terceira dose de vacina. Os títulos de anticorpos encontrados para os poliovírus 1 e 2 no período estudado, de menos de seis meses até mais de um ano, não sofreram alteração significativa. Já em relação ao poliovírus 3 verificou-se, após transcorridos seis meses, uma queda significativa dos níveis (gráfico 1), onde há um aumento do número de crianças sem níveis protetores de anticorpos (menos de 1:5) após um período de seis meses.

Comparando-se estatisticamente os níveis de anticorpos para os três tipos de poliovírus, verificou-se existir diferença significativa na distribuição de respostas para o poliovírus 2 em relação aos poliovírus 1 e 3, que apresentam igual distribuição. O nível de imunidade para o poliovírus 2 foi maior em relação aos outros dois tipos (quadro 1).

O quadro 3 mostra a distribuição das crianças suscetíveis em relação aos tipos de poliovírus. Consideramos suscetíveis ou sem proteção as crianças que apresentam título abaixo de 1:5.

Queremos assinalar que, apesar de terem recebido três doses de vacina, duas crianças não apresentaram nível protetor para os três tipos de poliovírus, concomitantemente. Por outro lado, outro grupo foi suscetível para dois tipos associados, ou poliovírus 1 ou 3, isoladamente, perfazendo um total de 51 crianças suscetíveis. Levando em conta que há probabilidade de cada tipo de poliovírus produzir por si a infecção, tivemos um total

QUADRO 1—Titulação de anticorpos^a para poliovírus 1, 2 e 3 de acordo com a idade e doses de vacina oral.

Idade em anos	Doses	Tipo 1										Tipo 2										Tipo 3										Total
		< 5	5	10	20	40	80	160	320	640	< 5	5	10	20	40	80	160	320	640	< 5	5	10	20	40	80	160	320	640				
0-1	{ 3	5	—	2	—	1	5	2	2	—	—	—	—	3	3	6	2	1	2	2	2	—	2	2	4	2	3	—	17			
	{ >3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—			
1-2	{ 3	10	—	5	6	10	8	5	3	2	3	4	2	9	8	7	9	4	3	15	4	4	7	9	6	3	1	—	49			
	{ >3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—			
2-3	{ 3	5	—	2	1	1	4	3	—	1	3	—	2	3	1	3	2	1	2	4	3	2	—	3	4	—	1	—	17			
	{ >3	2	—	—	3	—	—	1	1	—	—	—	1	1	1	—	3	1	—	3	1	—	—	1	1	1	—	—	7			
≥3	{ 3	2	1	2	4	5	3	3	2	1	—	—	—	7	2	5	5	3	1	2	1	2	2	6	4	4	—	2	23			
	{ >3	2	2	1	7	8	2	2	6	4	1	—	2	3	10	5	1	4	8	9	4	3	1	5	4	2	3	3	34			
Total		26	3	12	21	25	22	16	14	8	7	4	7	26	25	26	22	14	16	35	15	11	12	26	23	12	8	5	147			

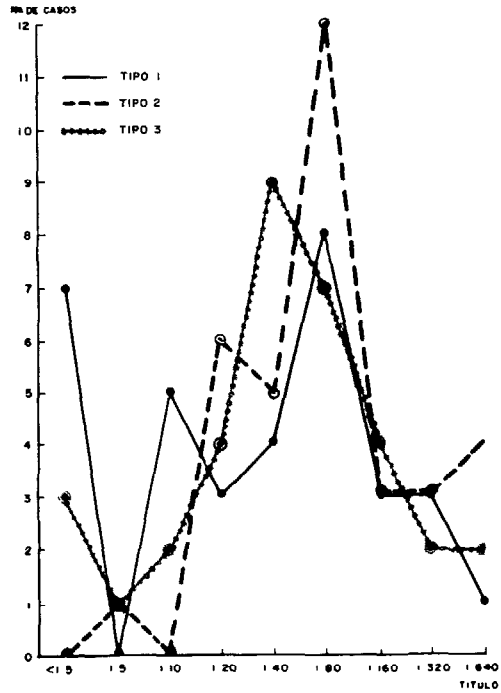
^a Recíproca da diluição do soro.

QUADRO 2—Titulação de anticorpos^a para poliovírus 1, 2 e 3 de acordo com o intervalo entre as doses de vacina oral.

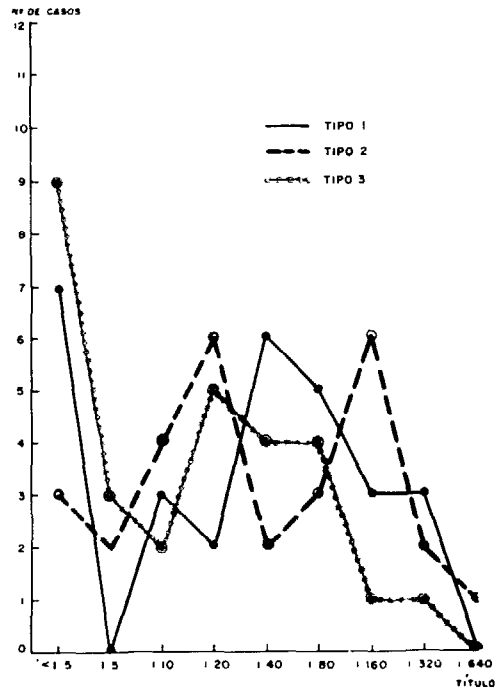
Intervalo entre as doses		Tipo 1										Tipo 2										Tipo 3										Total
		< 5	5	10	20	40	80	160	320	640	< 5	5	10	20	40	80	160	320	640	< 5	5	10	20	40	80	160	320	640				
1-2 meses		16	1	7	10	11	14	10	6	2	4	4	4	11	14	14	11	9	6	16	7	4	7	18	15	6	3	1	77			
>2 meses		6	—	4	1	6	6	2	1	2	2	—	1	9	—	7	6	1	2	7	3	4	4	1	3	3	2	1	28			

^a Recíproca da diluição do soro.

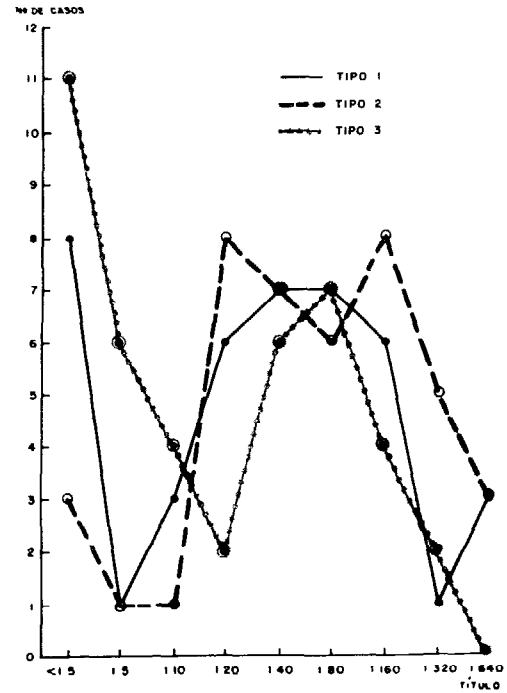
GRÁFICO 1—Titulação de anticorpos para poliovírus 1, 2 e 3 de acordo com o tempo transcorrido após a terceira dose de vacina oral.



TRANSCORRIDOS MENOS DE 6 MESES



TRANSCORRIDOS 6 MESES A 1 ANO



TRANSCORRIDO MAIS DE 1 ANO

QUADRO 3—Distribuição de suscetíveis (título 1:5) segundo o tipo de poliovírus.

Tipos de vírus	No. de suscetíveis	%
1	13	25,5
2	—	—
3	23	45,1
1 e 2	3	5,9
1 e 3	8	15,7
2 e 3	2	3,9
1, 2 e 3	2	3,9
Total	51	100

de 68 suscetíveis (quadro 1), ou seja, 26 suscetíveis ao poliovírus 1 (5,8%), 7 (1,5%) ao poliovírus 2 e 35 (7,9%) suscetíveis ao poliovírus 3, no total de casos estudados.

Discussão

Desde 1961 vem-se fazendo rotineiramente a tentativa de isolamento de poliovírus em Brasil, em crianças com quadro clínico compatível com a poliomielite. Chamou-nos atenção o fato de haver nesses casos um grupo de crianças que receberam 2 a 3 doses de vacina oral (4, 9, 11, 12).

Em vista disso, foi realizada uma primeira pesquisa de conversão sorológica em crianças vacinadas em região semi-rural (10). As taxas de conversão encontradas alcançaram 82,7%, 98,5% e 75,4% respectivamente para os tipos 1, 2 e 3, após as três doses de vacina, continuando suscetíveis 17,3%, 1,5% e 24,6% respectivamente para os poliovírus 1, 2 e 3. Em trabalho sobre vacinação antipoliomielítica em crianças realizado em São Paulo (6), os resultados mostraram que houve conversão de 77,7%, 88,8% e 77,7% respectivamente para os poliovírus 1, 2 e 3, havendo igualmente melhor conversão sorológica para o tipo 2.

Baseados nesses trabalhos os autores planejaram desenvolver a presente pesquisa, sobre avaliação do grau de imunidade de 147 crianças, provenientes da zona urbana, suburbana e rural da Guanabara e vacinadas com três ou mais doses de vacina. Comparados com os trabalhos acima os resulta-

dos encontrados revelam que o número de suscetíveis foi menor, continuando a predominância de suscetíveis para o poliovírus 3 com 7,9% seguido do poliovírus 1 com 5,8% e do poliovírus 2 com 1,5%.

Poder-se-ia explicar a relativa baixa imunitária para o poliovírus 3 pela sua estabilidade não totalmente satisfatória, o que já sugeriu o estudo de novas linhagens atenuadas para o tipo 3 (1).

Por outro lado, tem-se verificado a interferência de outros vírus intestinais sobre os vírus da vacina oral, impedindo sua implantação total e provocando assim falha na resposta imunológica (2, 5). Há também referência a interferência entre si dos três tipos de poliovírus atenuados quando aplicados conjuntamente, como é o caso da vacina trivalente aplicada em Brasil. O problema de baixa conversão sorológica em países de clima tropical está igualmente sendo investigado por uma equipe da OMS, para estudos especiais sobre virologia em Entebbe (Uganda), e outro grupo do Christian Medical College de Vellore (Índia) (8). É possível que dessas investigações surja uma nova luz sobre o mecanismo básico da resistência à vacinação oral.

Além disso, os autores tiveram sua atenção voltada para a queda significativa de título do poliovírus 3, decorridos apenas seis meses após a última dose da vacina, o que não foi observado em relação aos poliovírus 1 e 2.

Outra linha de argumentação é a que se refere ao grupo de crianças que recebeu três doses de vacina, comparado com outro que recebeu também 1 ou 2 doses de reforço (quadro 1). Dos resultados da titulação de anticorpos concluiu-se que praticamente os resultados são semelhantes. Observou-se ainda que a resposta imunitária em relação à faixa etária não sofreu influência significativa. Chamou atenção porém o fato de existir o maior número de suscetíveis (título inferior a 1:5) para os poliovírus 1 e 3, na faixa etária de um a dois anos. Preconiza-se portanto que se faça uma boa

campanha de vacinação de crianças com menos de um ano de idade.

Em síntese, os resultados desse estudo permitem concluir que, em relação ao poliovírus 2, a resposta imunitária é bastante satisfatória, sendo porém bem menor para o poliovírus 1, e menor ainda para o poliovírus 3.

Resumo

Em 147 crianças, residentes na Guanabara, foram pesquisados os títulos de anticorpos para poliovírus. De acordo com a informação colhida, as crianças haviam recebido três ou mais doses de vacina oral nos diversos postos de saúde da Guanabara. Em 73,33% dos casos o intervalo entre as vacinas foi de um a dois meses. Em 26,66% o intervalo foi de mais de quatro meses.

A titulação de anticorpos foi feita pelo teste de neutralização em micropalacas, usando a linhagem de células LLCMK₂.

Foram usados como vírus padrões para os poliovírus 1, 2 e 3 respectivamente as amostras de Mahoney, Lansing e Leon. A análise dos resultados mostrou, que a resposta imunológica para o poliovírus 2 foi mais alta do que para os poliovírus 1 e 3.

Para o poliovírus 1, não houve formação de títulos de anticorpos em 5,8%. Para o poliovírus 2 a percentagem foi de 1,5 e para o poliovírus 3 de 7,9%.

Os títulos de anticorpos neutralizantes para os poliovírus 2 e 3 permaneceram estáveis por mais de um ano. Para o poliovírus 3 houve uma queda do título após seis meses de vacinação. □

Agradecimentos

Os autores agradecem à Direção do Instituto Estadual de Saúde Pública o apoio e incentivo dados e ao Departamento de Saúde Pública da Guanabara a coleta de sangue. Agradecem também a todos do Laboratório de Virologia Louis Pasteur a colaboração prestada.

REFERÊNCIAS

- (1) Beale, A. J. "Inmunización contra la poliomiélitis". *Bol Of Sanit Panam* 73:516-527, 1972.
- (2) Feldman, R. A.; Holguin, A. H. e Gelfand, H. M. "Oral Poliovirus Vaccination in Children: A Study Suggesting Enterovirus Interference". *Pediatrics* 33:526-533, 1964.
- (3) Green, R. H. e Opton, E. M. "A Micromethod for Determination of Poliovirus Antibody Suitable for Mass Surveys." *Am J Hyg* 72: 195-203, 1960.
- (4) Hubinger von, M. G.; Villas Boas, D. M. e Schatzmayr, H. G. "Estudos sobre casos de poliomielite aguda no Estado da Guanabara. Predominância do tipo 1 em casos de paralisia." *O Hospital* 71:107-110, 1967.
- (5) Mora, B. R. O. e Sains, C. C. "Aplicación simultánea de las vacunas antituberculosas BCG y antipoliomiéltica Sabin a recién nacidos." *Bol Of Sanit Panam* 61:488-494, 1966.
- (6) Neves, W. E.; Rodrigues, M. C.; Kipnis, J.; Carvalho, R. P. S. e Amato Neto, V. "Vacinação Antipoliomiéltica, Tipo Sabin em Crianças com Um e Três Meses de Idade." *Rev Inst Med Trop São Paulo* 10:376-382, 1968.
- (7) Organização Mundial da Saúde. Información epidemiológica y estadística. La poliomiélitis en 1970. *Crónica de la OMS* 25:554-561, 1971.
- (8) Organização Mundial da Saúde. "Las enfermedades transmisibles en 1971." *Crónica de la OMS* 26:275-294, 1972.
- (9) Schatzmayr, H. G.; Homma, A.; Meilman, I. e Villas Boas, D. M. "Levantamento epidemiológico e virológico de casos suspeitos de poliomielite no Hospital Jesus no período de janeiro de 1967 a março de 1968." *Rev Soc Bras Med Trop* 2:229-235, 1968.
- (10) Schatzmayr, H. G., e Homma, A. "Avaliação sorológica de vacina oral tipo Sabin contra a poliomielite, em região semi-rural: I. Formação de anticorpos em vacinados". *Rev Soc Bras Med Trop* 3:317-322, 1969.
- (11) Schatzmayr, H. G.; Homma, A.; Costa, E. A.; Frias, L. A. M. e Meilman, I. "Poliomyelitis: Epidemiological Aspects in Rio de Janeiro (Guanabara State) and Adjacent Areas in the Period from 1961 to 1970". *Mem Inst O Cruz* 70:207-220, 1972.
- (12) Villas Boas, D. M.; Hubinger von, M. G.; Abrunhosa, M. L. e Meilman, I. "Predominância de poliovírus tipo 3 em crianças internadas no centro de isolamento do Hospital Jesus, da Guanabara, no período de 1968 a 1969." *Bol Of Sanit Panam* 71:247-252, 1971.

Estudio serológico del virus poliomiélfico en Guanabara, Brasil (Resumen)

Se investigaron los títulos de anticuerpos de poliomiélfitis en 147 niños residentes en Guanabara que, según la información reunida, habían recibido tres o más dosis de vacuna oral en diversos puestos de salud. En el 73.33% de los casos había transcurrido un período de uno a dos meses entre una vacuna y la siguiente; en el 26.66% el intervalo excedía de cuatro meses.

Se procedió a la titulación de anticuerpos mediante la prueba de neutralización en microplacas utilizando la estirpe celular LLCMK₂. Como virus patrón para el virus poliomiélfico 1, 2 y 3 se utilizaron respectivamente, muestras

Mahoney, Lansing y Leon. El análisis de los resultados indicó que la reacción inmunológica al virus poliomiélfico 2 fue mayor que la correspondiente al virus de los tipos 1 y 3.

En el 5.8% de los casos no se formaron títulos de anticuerpos del virus de tipo 1. En cuanto al virus de tipo 2, el porcentaje fue de 1.5 y para el virus 3, de 7.9.

Los tipos de anticuerpos neutralizantes de virus poliomiélfico 2 y 3 permanecieron estables durante más de un año. El título correspondiente al virus de tipo 3 disminuyó a los seis meses de la vacunación.

Serologic Study of Poliovirus in Guanabara, Brazil (Summary)

A serologic survey of poliovirus antibody levels was conducted in 147 children from Guanabara, Brazil. According to the information given, all of them had received three or more doses of oral vaccine at the Guanabara public health station.

In 73.33 per cent of them the interval between vaccine doses was from one to two months; in the remaining 26.66 per cent it was greater than four months.

Antibody titers were determined by the serum neutralization test using the LLCMK₂ cell line

on microplates. The Mahoney, Lansing, and Leon strains were employed as standard virus for types 1, 2, and 3, respectively.

Analysis of the results showed a higher immune response to type 2 than to types 1 and 3. In 5.8 per cent of the specimens there were no antibodies to type 1, while the corresponding proportions for types 2 and 3 were 1.5 and 7.9 per cent, respectively. Neutralizing antibodies for types 1 and 2 remained stable for over a year but there was a postvaccination fall with type 3 after six months.

Etude sérologique des poliovirus à Guanabara, Brasil (Résumé)

Les titres d'anticorps pour poliovirus ont été étudiés chez 147 enfants résidant à Guanabara. Conformément aux informations recueillies, ces enfants avaient reçu trois doses ou plus de vaccin oral dans les divers postes de santé de l'Etat en question. Dans 73,33 pour 100 des cas le vaccin avait été administré à un intervalle de un à deux mois; dans 26,66 pour 100, à un intervalle de plus de quatre mois.

Le titrage des anticorps a été effectué par neutralisation, sur microplaques, en recourant au type de cellules LLCMK₂. Comme virus type pour les poliovirus 1, 2 et 3 on a respectivement

utilisé les échantillons Mahoney, Lansing et Leon. L'analyse des résultats a montré que la réponse immunologique du poliovirus 2 a été supérieure à celle des poliovirus 1 et 3.

Pour ce qui est du poliovirus 1 il n'y a pas eu formation de titres d'anticorps dans 5,8 pour 100 des cas. Pour le poliovirus 2, le pourcentage a été de 1,5 et pour le poliovirus 3 de 7,9.

Les titres d'anticorps neutralisants sont restés stables pendant plus d'un an pour les poliovirus 2 et 3. Toutefois, on a constaté chez le poliovirus 3 une baisse du titre six mois après la vaccination.