

*the English in II International Conference
on Live Poliovirus Vaccines, 5-11, 1960*

BOLETIN de la Oficina Sanitaria Panamericana

Año 40

Vol. L

Febrero, 1961

No. 2

DECIMO ANIVERSARIO DE LA VACUNA DE VIRUS POLIOMIELITICO VIVO*

DR. HILARY KOPROWSKI

"The Wistar Institute", Filadelfia, Pensilvania, Estados Unidos

Hace diez años, observamos que la administración de virus poliomielítico vivo atenuado a un reducido grupo de niños no inmunes, originaba una infección intestinal asintomática, seguida de la aparición de anticuerpos en la sangre (1). Los informes que se presentarán en esta Segunda Conferencia Internacional sobre Vacunas de Virus Poliomielítico Vivo, pondrán de relieve que son ya 60 millones los individuos de todo el mundo que han recibido virus poliomielítico vivo atenuado, con fines de inmunización.

Estos dos acontecimientos encuadran un decenio de progreso en unos trabajos de investigación que empezaron de una manera modesta, pero llena de esperanzas, y han llegado a adquirir la magnitud actual. El presente trabajo tiene por objeto examinar el lienzo de este cuadro, con el fondo esbozado en 1950 y las figuras que, pintadas durante el resto del decenio, ocupan ahora el primer plano. Para ello, me han de servir de guía estas palabras de Salvador Dalí: "Yo no pinto un retrato para que se parezca al modelo; lo que ocurre es más bien que el modelo acaba pareciéndose al retrato".

Desarrollo de cepas atenuadas de virus poliomielítico

Si nos remontamos a los primeros momentos, veremos que la elaboración de virus poliomielítico atenuado era una especie de juego en el que se trataba de obtener algo que no se tenía al empezar. Después que

Armstrong logró propagar el virus de Lansing en un huésped no primate (2), adaptamos un virus poliomielítico al ratón y a la rata algodonera, ignorando cuál sería el resultado, y así obtuvimos un virus relativamente no virulento. Esta fue la cepa TN tipo 2, la primera que se administró al hombre. Ahora bien, a pesar de tratarse de un juego en que influía la fortuna, no era totalmente un juego de azar, y la elaboración de nuevas cepas fue siguiendo cada vez caminos más determinados. El advenimiento de métodos de cultivo de tejido, por Enders y sus colaboradores (3), adelantó el desarrollo de cepas atenuadas y dio lugar a la labor de Sabin para seleccionar virus atenuados mediante el pase rápido en células de cultivo de tejido (4). Otra innovación, o sea la técnica de placas de Dulbecco (5), permitió hacer una selección más precisa de la progenie de partículas de un sólo virus. Más recientemente ha sido posible separar un virus atenuado mediante una determinada manipulación de las condiciones fisiológicas de cultivo, como la selección de sistemas específicos de cultivo de tejido, cambios del pH (6, 7) y especialmente, el cultivo a diferentes temperaturas de incubación (8, 9). Hoy, se ha avanzado ya hasta el punto de que es posible lograr la mutación completa de partículas de virus poliomielítico, cambiando la composición de las bases de ácido nucleico con ácido nitroso (10).

"Es steht doch alles im Faust" (Hans Zinsser citando a su padre)

Antes de que se precipiten los acontecimientos, volvamos a 1952, fecha en que

* Trabajo presentado en la Segunda Conferencia Internacional sobre Vacunas de Virus Poliomielítico Vivo, celebrada en Washington, D. C. del 6 al 10 de junio de 1960.

apareció el primer trabajo sobre el tema (1). En él se suscitaron ciertas cuestiones y se plantearon algunos problemas, y se señalaron ya algunas soluciones. Trataremos de recordar lo ocurrido.

Las primeras cuestiones que surgieron fueron acerca de si la ingestión de virus poliomiéltico vivo conducía a una verdadera infección del tubo intestinal, si la infección iba seguida de pruebas serológicas de inmunidad y si el procedimiento de administrar por vía oral virus poliomiéltico vivo podía ser asintomático. Los resultados de esta primera serie de observaciones dieron una respuesta afirmativa a estas preguntas. Otra cuestión que se planteó fue la siguiente: ¿Provoca el virus vivo un estado de inmunidad intestinal local y, de esta forma, evita el estado de portador de la poliomiéltis? La resistencia que mostraron a la reinfección 10 de cada 12 niños vacunados, da también una respuesta afirmativa. Se sugirió en aquel entonces, y más tarde se confirmó, que los niños inmunes se infectan ocasionalmente, y, en tales casos, sólo de manera transitoria.

Todavía surgió otra cuestión en 1950, a saber, si la administración de un tipo de vacuna conferiría protección contra la poliomiéltis de otro tipo. En la Conferencia del año pasado se informó acerca de los ambiguos resultados obtenidos en un experimento hecho en Singapur, a base de esta especulación (11).

La cepa de vacuna ensayada en 1950 se eligió basándose en su relativamente baja patogenicidad para los monos inoculados por vía intracerebral. No obstante, se reconoció al mismo tiempo que era "imposible establecer definitivamente un paralelo" entre "la inocuidad" para los monos y la ausencia de todo riesgo para el ser humano.

La introducción de las pruebas intraespinales por Sabin (12), y el perfeccionamiento de la técnica por Melnick (13)—todavía en monos—ofrecieron un índice más sensible de patogenicidad para los monos, pero no se pusieron en claro el significado y la pertinencia de esta mayor sensibilidad. Los resultados de las pruebas intraespinales

llevadas a cabo por distintos investigadores son todavía contradictorios, y, naturalmente, cada vez adquiere mayor relieve la importancia, o mejor dicho la necesidad, de obtener datos comparados que definan los virus poliomiélticos atenuados y en estado natural, en función de la neuropatogenicidad en los monos.

Hay también otra cuestión que viene preocupando a muchos investigadores, y es, ¿qué estabilidad tiene la cepa de la vacuna después del pase por el tubo digestivo humano? Las observaciones iniciales a este respecto indicaron que el virus excretado en las heces "retenía casi el mismo grado de virulencia en los monos" que el que poseía la cepa original de la vacuna.

Por último, se señaló en el trabajo de 1952, que la introducción de virus poliomiéltico atenuado, como agente inmunizador, dependía de los resultados de estudios más amplios en los que se pudiera evaluar la inocuidad con validez estadística, concediendo el debido margen a la casual coincidencia de que ocurran enfermedades no relacionadas con la vacunación entre las personas vacunadas.

Así pues, aunque las investigaciones sobre la vacuna de virus vivo atenuado han progresado hasta las altas esferas de las conferencias internacionales, las cuestiones y problemas que se plantean en ellas no son nuevos.

Elección de sujetos

Con la importante excepción de ciertos casos, a los que me referiré luego, la multiplicación del virus de vacuna en el tubo intestinal va generalmente acompañada de la producción de anticuerpos. Además, la presencia de anticuerpos circulantes, salvo los producidos por infección con virus poliomiéltico vivo, no afecta a la inmunización.

A este respecto son particularmente importantes, tanto práctica como teóricamente, las observaciones de Lipson *et al.* (14), Horstmann *et al.* (15) y Fox y Gelfand (16), en el sentido de que la vacunación anterior con virus inactivado no obstaculiza

la inmunización posterior con virus vivo, ni produce ningún efecto importante en la prevención de la infección intestinal de virus poliomielítico natural. Tal vez más importantes aún para el futuro fueron las observaciones que, en relación con esto, formulamos en 1955 y 1956, y que después confirmaron Martins da Silva y otros investigadores (17), en el sentido de que los anticuerpos maternos homotípicos en la circulación de los niños recién nacidos no impiden que el virus poliomielítico vivo atenuado produzca infección intestinal.

No sabemos todavía si será posible o no adoptar como medida general la inmunización de todos los niños en el primero o segundo día de vida, pues, como veremos más adelante en la presente reunión, los niños, en sus primeras semanas, tienen relativamente poca capacidad para producir anticuerpos en respuesta al estímulo de la infección intestinal con vacuna de virus poliomielítico atenuado (18, 19). La situación de los niños recién nacidos representa el único caso en que se ha observado disociación entre la infección con virus atenuado y la respuesta de anticuerpos. Y si bien el aumento de la dosis de virus podría vencer la relativa resistencia de los lactantes menores de tres meses a la infección intestinal de virus poliomielítico, es dudoso que se pueda vencer fácilmente la relativa incapacidad inmunológica intrínseca del recién nacido.

El tema de la infecciosidad nos lleva a otro campo crucial de la investigación. Basándose en las pruebas de que se dispone, se puede conseguir la inmunización con virus poliomielítico atenuado, sin viremia. Sin embargo, este aspecto de las investigaciones invita a un mayor estudio desde el punto de vista teórico, ahora que se disponen de métodos más sensibles para descubrir el virus circulante. Puesto que algunos de los aspectos de la patogénesis de la infección poliomielítica en el hombre son todavía un enigma, estamos explorando el problema de la viremia y de la patogénesis mediante la determinación de la ruta de infección

humana con cepas atenuadas, siguiendo la aparición de virus en las heces, en los glóbulos blancos del conducto torácico, en la linfa y en el suero.

Transmisión

La transmisión de virus atenuado de una persona a otra se demostró por primera vez en los estudios realizados en una institución de California para niños retardados (20). Este aspecto de la acción de la vacuna volvió a ser investigado, más tarde, por Martins de Silva *et al.* (17), Horstmann y Paul (15), Dick y Dane (21), Gelfand y Fox (22), y Plotkin *et al.* (23). El grado de propagación del virus a las personas susceptibles en contacto con los individuos vacunados depende de la cepa empleada, de la edad de la persona vacunada y las condiciones sociales y económicas prevalentes. Parece ser que la ruta de transmisión es fecal-oral, más bien que por medio de secreciones faríngeas, aunque este punto es todavía objeto de discusión por parte de algunos investigadores. En general, cabe esperar que se infectarán asintóticamente hasta el 50% de los contactos familiares susceptibles. Las pruebas existentes sugieren que el virus atenuado, aunque se propaga con relativa facilidad en las instituciones, no se disemina extensamente en la colectividad en que ha sido introducido. De todos modos, no hay pruebas en apoyo de que la inmunización de parte de una colectividad inmunizará, con el tiempo, a todos los individuos que la componen, ni tampoco las hay en favor de que el virus queda con carácter permanente en la colectividad.

Estabilidad

Al principio se emplearon dos métodos para calibrar la estabilidad de los virus transmitidos. Uno de ellos consistió en la medición de la patogenicidad intraneural de cepas aisladas en contactos. El otro fue la transferencia seriada deliberada de virus de un niño a otro, para reproducir artificialmente—pero con las debidas precauciones—lo que habría podido ocurrir en la natura-

leza. Se hicieron seis pases seriados en el hombre, con la cepa SM (24), y Smorodintsev (25) llevó a cabo 10-12 pases similares de las cepas LSc, P-712 y Leon KP-34. Estos pases no mostraron una alteración significativa de la patogenicidad para el hombre ni para el mono. Es evidente que, en el curso de los estudios de campo, se ha producido una enorme cantidad de pases seriados, y, sin embargo, no hay pruebas de un mayor número de casos paráliticos entre los contactos de los individuos vacunados.

El descubrimiento, por Vogt y sus colaboradores (26) del desarrollo diferencial, en un medio ácido, de los virus poliomiélfíticos atenuados y virulentos fue el primer indicador empleado para la caracterización de cepas atenuadas. Ahora poseemos toda una serie de técnicas para la apreciación, más o menos precisa, de la estabilidad o inestabilidad de las cepas transmitidas. El desarrollo diferencial de virus en células de línea estable y en cultivo de tejido renal de mono, que describen Kanda y Melnick (27), es otro indicador genético, pero el más práctico actualmente en uso es el indicador de temperatura creado por Lwoff (9). Otro indicador, objeto de investigación, es el desarrollo diferencial de virus atenuados en un sistema de cultivo de tejido humano, en comparación con el tejido de mono (7). La prueba de serodiferenciación intratípica, investigada por McBride (28), Gard (29) y Wecker (30) es la que ofrece mejores perspectivas para la identificación de cepas de virus.

Puesto que la biología es una ciencia integradora—en la que, como dijo Chargaff, hay que mirar siempre a ambos lados de la calle al mismo tiempo—la estabilidad absoluta de un agente repetidor es un contradictorio. La condición de que un producto permanezca absolutamente estable después de pasar por el tubo digestivo puede aplicarse al sulfato de magnesio o a otros laxantes químicos, pero no a un agente que se multiplica, como ocurre con el virus poliomiélfítico. Por consiguiente, deberíamos aclarar bien lo que queremos decir al aplicar

el término “estabilidad” a las cepas de virus poliomiélfítico. Las dos características esenciales son la no patogenicidad para el hombre y la capacidad inmunizadora también para el hombre, y no debemos olvidar que los indicadores de laboratorio de los que comúnmente se dispone ahora señalan el límite de atenuación, y no la virulencia. Así pues, es una presunción muy arriesgada la selección de uno o varios de los numerosos indicadores posibles, que sirva de alerta en cuanto a la patogenicidad humana o para indicar las posibilidades de inmunización. Es posible que ocurran cambios en estos indicadores sin que se produzcan cambios concomitantes de las dos características de primordial importancia, es decir, la inocuidad y la eficacia.

Virus extraños

Los partidarios de la vacunación con virus vivo buscan, con frecuencia, en las preparaciones de vacunas otros virus que no sean los poliomiélfíticos, y generalmente los encuentran en los productos de sus colegas pero no en los suyos propios; esto confirma la frase del Conde de Chesterfield, quien dijo que “la mayoría de los hombres se alegran de la inferioridad de sus amigos”. Y muchas veces se olvidan del consejo de Benjamín Franklin: “Límpiate el dedo antes de señalar mis manchas”.

Naturalmente, el que quiera escudriñar la vacuna de virus vivo, tal vez encuentre un virus no poliomiélfítico en todas las preparaciones de que se dispone actualmente, pero esta circunstancia difícilmente disuadirá a nadie de aceptar el producto. La idea de descartar una vacuna de virus vivo porque contiene un virus extraño que no se sabe que sea patógeno para el hombre, sugiere inmediatamente las consideraciones siguientes:

- 1) Casi todos los intentos de aislar un agente viral de los tejidos vivos, de cualquier organismo, han tenido resultado satisfactorio, y este camino no parece tener fin.
- 2) La vacuna antivariólica se viene utilizando con todo éxito desde hace casi 200

años. Sin embargo, se encontrarán, indudablemente agentes virales extraños siempre que se busquen en la linfa de ternera. ¿Acaso deberíamos suspender la vacunación por este motivo?

3) Las vacunas de virus vivo preparadas de tejido de embrión de pollo podrían muy bien contener un virus de cáncer de pollo. La existencia de un agente de esta naturaleza ha sido ya demostrada por Rubin (31) en cultivos en huevos de gallina fértiles, presuntamente normales. En consecuencia, ¿a qué viene ahora esto en relación con la vacuna inyectable 17D o el virus de viruela en embrión de pollo?

La vacuna antipoliomielítica se administra por vía oral, y muchos virus se introducen en el organismo humano por la boca. Si nos pusiéramos en un plan purista en esta cuestión, la Administración de Alimentos y Drogas debería exigir que todos los artículos que se consumen sin cocer fuesen analizados en relación con la presencia de agentes virales.

En mi condición de hombre de ciencia, estoy plenamente de acuerdo con que se estudie constantemente la importancia de los agentes virales que pueden encontrarse en estado latente en las células de todos los organismos vivos y que pueden manifestarse cuando se cultiven estas células en condiciones que las liberen de la influencia restrictiva ejercida por el organismo en su conjunto. Si alguien desea dedicarse a un estudio que se eternice, aquí tiene tarea para los próximos mil años. Además, los agentes virales no poliomiélticos que hayan podido descubrirse en la vacuna antipoliomielítica de virus vivo han estado sometidos, tal vez, a pruebas de inocuidad más rigurosas que las aplicadas a ningún otro agente biológico, por la amplia utilización de la vacuna en millones de individuos en todas partes. Si se ha demostrado que en un adecuado número de personas expuestas a estos agentes se han desarrollado anticuerpos específicos sin la presencia de ninguna enfermedad clínica, esto debería considerarse como prueba,

extraordinariamente favorable, de la inocuidad de tales agentes.

Interferencia

En nuestros primeros estudios, observamos que la administración simultánea de dos tipos de virus atenuado daba lugar a interferencia entre los tipos (32).

Estas observaciones indicaban que quizás no fuera factible la inmunización simultánea con los tres tipos de virus poliomiéltico. Más tarde, Cox y sus colaboradores (33) informaron de que mediante el empleo de mayores dosis de virus, se había vencido la dificultad que presentaba la ingestión simultánea de virus distintos. No obstante, nuestras recientes observaciones, así como las efectuadas en gran escala por Smorodintsev con otras cepas (34) vienen a apoyar los primeros hallazgos, según los cuales las cepas de virus administradas simultáneamente se interfieren unas con otras. El fenómeno de la interferencia entre cepas señaló también uno de los problemas de la inmunización con virus atenuado, es decir, la interferencia contra el virus poliomiéltico causada por la infección ya existente del tubo digestivo con otros virus entéricos (35-37). No se sabe todavía si la acción adversa de la interferencia puede cambiarse en beneficiosa mediante el empleo de virus homotípicos atenuados durante una epidemia de poliomiéltis, aunque debemos advertir a los que quieran dedicarse con entusiasmo a un estudio de esta naturaleza, que los adversarios de la vacunación con virus vivo tienen dos estereotipadas observaciones aplicables a cualquiera de los resultados: si la epidemia disminuye considerablemente, dirán que la vacuna no logró detenerla por completo; si la epidemia termina a raíz de la vacunación, dirán que, de todas maneras, hubiera terminado, aún sin el empleo de la vacuna. *Tertium non datur.*

Perseverancia u obstinación

El cuadro No. 1 debiera llevar las siguientes palabras, escritas por Laurence Sterne hace 200 años: "Lo que para una buena causa se llama perseverancia, para un

CUADRO No. 1.—*Persistencia de anticuerpos de poliomyelitis a los 10 años de la vacunación.*

Sujeto	Titulación tipo 2 después de la vacunación	
	8 años	10 años
2	128	256
5	32	16
7	64	>1.024
8	64	256
9	128	256
13	16	64
14	16	16

mal fin se llama obstinación". Este cuadro presenta los niveles de anticuerpos de tipo 2 en el suero de niños que recibieron virus TN hace 10 años. Dada la notable persistencia de inmunidad ¿podrá calificarse esto de "perseverancia"?

Conclusión

Por último, una parábola que sometemos a la consideración de los partidarios de todas

las escuelas, las que sostienen la teoría del virus vivo y las que apoyan la del virus muerto. El mejor de los detectives, Sherlock Holmes, se sintió menos sorprendido por la presencia en el local de un individuo extraño, que por el hecho de que el perro no hubiera ladrado durante la noche. Tal vez, como en la novela, los misteriosos agentes que encontramos en los laboratorios son menos significativos que el silencio de todos los niños sanos, que nunca se quejan. Como dijo el propio Holmes, "En la solución de un problema de esta naturaleza, lo importante es poder razonar retrospectivamente. Es éste un procedimiento muy útil y muy sencillo, pero la gente no lo practica con frecuencia". Creo que si razonamos retrospectivamente, a partir de la culminación de esta primera década, se pueden predecir nuevos éxitos y creciente seguridad, y así como aniversarios más dignos aún de celebración.

REFERENCIAS

- (1) Koprowski, H.; Jervis, G. A., y Norton, T. W.: Immune responses in human volunteers upon oral administration of a rodent-adapted strain of poliomyelitis virus, *Am. Jour. Hyg.*, 55:108-126, 1952.
- (2) Armstrong, C.: The experimental transmission of poliomyelitis to the eastern cotton rat, *Sigmodon hispidus hispidus*, *Pub. Health Rep.*, 54:1719-1721, 1939.
- (3) Enders, J. F.; Weller, T. M., y Robbins, F. C.: Cultivation of Lansing strain of poliomyelitis virus in cultures of various human embryonic tissues, *Science*, 109:85-86, 1949.
- (4) Sabin, A. B.; Hennessen, W. A., y Winsser, J.: Studies on variants of poliomyelitis virus. I. Experimental segregation and properties of avirulent variants of three immunologic types, *Jour. Exp. Med.*, 99:551-576, 1954.
- (5) Dulbecco, R., y Vogt, M.: Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses, *Jour. Exp. Med.*, 99:167-182, 1954.
- (6) Li, C. P.; Schaeffer, M., y Nelson, D. B.: Experimentally produced variants of poliomyelitis virus combining *in vivo* and *in vitro* techniques, *Ann. N. Y. Acad. Sc.*, 61:902-910, 1955.
- (7) Gard, S.: Field and laboratory experiences with the CHAT strain Type 1 poliovirus. En: *Live Poliovirus Vaccines, Second International Conference*. Publicación Científica No. 50 de la Organización Panamericana de la Salud, Washington, D. C., 1960, pág. 187.
- (8) Dubes, G. R., y Wenner, H. A.: Virulence of polioviruses in relation to variant characteristics distinguishable on cells *in vitro*, *Virology*, 4:275-296, 1957.
- (9) Lwoff, A., y Lwoff, M.: Remarques sur quelques caractères du développement du virus de la poliomyélite, *C. Rend. Acad. Sc.*, 248:1725-1727, 1959.
- (10) Boeye, A.: Induction of a mutation in poliovirus by nitrous acid, *Virology*, 9:691-700, 1959.
- (11) Hale, J. H.; Doraisingham, M.; Kanagaratnam, K.; Leon, K. W., y Monteiro, E. S.: Large-scale use of Sabin Type 2 attenuated poliovirus vaccine in Singapore during a Type 1 poliomyelitis epidemic, *Brit. Med. Jour.*, 1 (5137):1541-1549 (20 junio), 1959.
- (12) Sabin, A. B.: Characteristics and genetic potentialities of experimentally produced and naturally occurring variants of poliomyelitis virus, *Ann. N. Y. Acad. Sc* 61:(4), 924-939, 1955.
- (13) Melnick, J. L.; Benyesh-Melnick, M., y Brennan, J. C.: Studies on live poliovirus vaccine: Its neurotropic activity in mon-

- keys and its increased neurovirulence after multiplication in vaccinated children, *Jour. Am. Med. Assn.*, 171:1165-1172, 1959.
- (14) Lipson, M. J.; Robbins, F. C., y Woods, W. A.: The influence of vaccination upon intestinal infection of family contacts of poliomyelitis patients, *Jour. Clin. Invest.*, 35:722, 1956.
- (15) Horstmann, D. M.; Niederman, J. C.; Melnick, J. L., y Paul, J. R.: Poliomyelitis: Comparison of responses of vaccinated and naturally immune humans to ingestion of attenuated poliovirus, *Tr. Assn. Am. Phys.*, 70:91-101, 1957.
- (16) Fox, J. P.; Gelfand, H. M.; LeBlanc, D. R., y Rowan, D. F.: The influence of natural and artificially induced immunity on alimentary infections with polioviruses, *Am. Jour. Pub. Health*, 48:1181-1192, 1958.
- (17) Martins da Silva, M.; Prem, K. A.; McKelvey, J. L.; Bauer, H.; Cooney, M. K., y Johnson, E. A.: Studies of orally administered attenuated live virus poliomyelitis vaccine in newborns and infants under six months. *Univ. Minn. Med. Bull.*, 29:133-150, 1957.
- (18) Pagano, J. S.; Plotkin, S. A.; Cornely, D., y Koprowski, H.: Experimental infection with CHAT attenuated poliovirus in premature infants. En *Live Poliovirus Vaccines, Second International Conference*. Publicación Científica No. 50 de la Organización Panamericana de la Salud, Washington, D. C., 1960, pág. 287.
- (19) Plotkin, S. A.; Pagano, J. S., y Koprowski, H.: Vaccination of full-term infants with attenuated polioviruses. En: *Live Poliovirus Vaccines, Second International Conference*. Publicación Científica No. 50 de la Organización Panamericana de la Salud, Washington, D. C., 1960, pág. 294.
- (20) Koprowski, H.; Norton, T. W.; Jervis, G. A.; Nelson, T. L.; Chadwick, D. L., Nelsen, D. J., y Meyer, K. F.: Clinical investigations on attenuated strains of poliomyelitis virus. Use as a method of immunization of children with living virus, *Jour. Am. Med. Assn.*, 160:954-966, 1956.
- (21) Dick, G. W. A.; Dane, D. S.; Fisher, O. D.; Connolly, J. H., y McKeown, F.: A trial of SM Type 1 attenuated poliomyelitis virus vaccine, *Brit. Med. Jour.*, 1(5010):65-70, 1957.
- (22) Gelfand, H. M.; Potash, L.; LeBlanc, D. R., y Fox, J. P.: Intrafamilial and interfamilial spread of living vaccine strains of polioviruses, *Jour. Am. Med. Assn.*, 170:2039-2048 (22 agosto), 1959.
- (23) Plotkin, S. A.; Koprowski, H.; Richardson, S., y Stokes, J.: Vaccination of families against poliomyelitis by feeding and by contact spread of living attenuated virus: Including studies of virus properties after human intestinal passage, *Acta Paediat.*, mayo, 1960.
- (24) Koprowski, H.: Discussion of properties of attenuated polioviruses and their behavior in human beings, *Spec. Pub. N. Y. Acad. Sc.*, 8:128-133, 1957.
- (25) Smorodintsev, A. A.; Davidenkova, E. F.; Drobyshevskaya, A. I.; Klyuchareva, T. E.; Ilyenko, V. I.; Chalkina, O. M.; Vasiliev, K. G.; Glynskaya, E. V.; Votikov, V. I., y Feldman, E. V.: Material for the study of the harmlessness of the live poliomyelitis vaccine prepared from Sabin strains. En: *Live Poliovirus Vaccines, First International Conference*. Publicación Científica No. 44 de la Organización Panamericana de la Salud, Washington, D. C. 1959, págs. 324-332.
- (26) Vogt, M.; Dulbecco, R., y Wenner, H. A.: Mutants of poliomyelitis viruses with reduced efficiency of plating in acid medium and reduced neuropathogenicity, *Virology*, 4:141-155, 1957.
- (27) Kanda, Y., y Melnick, J. L.: *In vitro* differentiation of virulent and attenuated polioviruses by their growth characteristics on MS cells, *Jour. Exp. Med.*, 109:9-24, 1959.
- (28) McBride, W. D.: Antigenic analysis of polioviruses by kinetic studies of serum neutralization, *Virology*, 7:45-58, 1959.
- (29) Gard, S.: Immunologic strain specificity within Type 1 poliovirus, *Bull. World Health Org.*, 22:235-252, 1960.
- (30) Wecker, E.: A simple test for serodifferentiation of poliovirus strains within the same type, *Virology*, 10:376-379, 1960.
- (31) Rubin, H.: Remarks at *Symposium on Phenomena of Tumor Viruses*, Virology and Rickettsiology Study Section of National Institutes of Health, Nueva York, marzo, 1960.
- (32) Koprowski, H.: Immunization of man against poliomyelitis with attenuated preparations of living virus, *Ann. N. Y. Acad. Sc.*, 61(4):1039-1049, 1955.
- (33) Cox, H. R.; Cabasso, V. J.; Markham, F. S.; Moses, M. J.; Moyer, A. W.; Roca-García, M., y Rueggsegger, J. M.: Immunological response to trivalent oral poliomyelitis vaccine, *Brit. Med. Jour.*, 2:591-597, 1959.
- (34) Smorodintsev, A. A.; Drobyshevskaya, A. I.;

- Bulychev, N. P.; Chalkina, O. M.; Groisman, G. M.; Ilyenko, V. I.; Kantorovich, R. A.; Kurnosova, L. M.; Vasiliev, K. G.; Votiakov, V. I., y Zhilova, G. P.: Material on the immunological and epidemiological effectiveness of live poliomyelitis vaccine. En: *Live Poliovirus Vaccines, Second International Conference*. Publicación Científica No. 50 de la Organización Panamericana de la Salud, Washington, D. C., 1960, pág. 482.
- (35) Benyesh-Melnick, M.; Melnick, J. L., y Ramos Alvarez, M.: Poliomyelitis infection rate among Mexican children fed attenuated poliovirus vaccines. En: *Live Poliovirus Vaccines, First International Conference*. Publicación Científica No. 44 de la Organización Panamericana de la Salud, Washington, D. C., 1959, págs 272-285.
- (36) Gelfand, H. M.; Potash, L.; LeBlanc, D., y Fox, J. P.: Revised preliminary report on the Louisiana observations of the natural spread within families of living vaccine strains of poliovirus. En: *Live Poliovirus Vaccines, First International Conference*. Publicación Científica No. 44 de la Organización Panamericana de la Salud, Washington, D. C., 1959, págs 203-217.
- (37) Plotkin, S. A.; Lebrun, A., y Koprowski, H.: Vaccination with the CHAT strain of Type 1 attenuated poliomyelitis virus in Leopoldville, Belgian Congo. 2. Studies of the safety and efficacy of vaccination, *Bull. World Health Org.*, 22:215-234, 1960.