

## ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES IgM ESPECIFICOS FRETE A POLIOVIRUS EN CASOS DE POLIOMIELITIS

Francisco Salmerón García<sup>1</sup>

*Se demuestra la presencia de anticuerpos neutralizantes IgM específicos frente a poliovirus de los tipos 1, 2 y 3, tras el fraccionamiento en gradiente de sacarosa de 30 sueros de casos de poliomiélitis. Se propone dicha técnica para su uso en el diagnóstico virológico de esa enfermedad.*

### Introducción

En los últimos 15 años se han desarrollado con finalidad diagnóstica numerosas técnicas que permiten demostrar la presencia de anticuerpos IgM específicos frente a diversos virus. En general, los estudios sobre la presencia o ausencia de anticuerpos IgM específicos frente a poliovirus no se han usado con fines de diagnóstico, aunque se han empleado en la valoración de la llamada memoria inmunológica (1, 2), o en la exclusión de infección por virus poliomiélticos, en estudios retrospectivos de sueros de enfermos con cuadros similares a la poliomiélitis (3).

En el diagnóstico virológico, la utilidad del estudio de dos sueros para poner de manifiesto un aumento del título de anticuerpos neutralizantes está condicionada por la toma adecuada del primer suero, sobre todo si se tiene en cuenta que en la poliomiélitis "los anticuerpos neutralizantes del virus se encuentran ya presentes a los pocos días de la exposición, muy a menudo antes de la iniciación de la enfermedad" (4).

El objeto del presente trabajo es deter-

minar la eficacia, como método de diagnóstico virológico en casos de poliomiélitis, de una técnica serológica que permita demostrar la presencia o ausencia de anticuerpos neutralizantes IgM específicos frente a poliovirus, tras el fraccionamiento de sueros en gradiente de sacarosa.

### Material y métodos

#### Sueros

Se estudiaron sueros de 30 casos de poliomiélitis, confirmados virológicamente por aislamiento de un poliovirus, durante 1977 a 1980, en España. Los sueros correspondían a enfermos de cuatro meses a tres años de edad. En 16 casos se obtuvo una pareja de sueros y en los otros 14 sólo un suero agudo. Todos los sueros se estudiaron en el momento de aparición del cuadro y se congelaron a -20°C hasta que se determinó la presencia de anticuerpos IgM frente a poliovirus.

Se estudiaron, además, otros 30 sueros agudos, procedentes de personas entre 1 y 55 años que presentaban miocarditis, endocarditis, pericarditis y diabetes juvenil. La elección de estos cuadros se debió fundamentalmente a que los sueros se fraccio-

<sup>1</sup> Servicio de enterovirus, Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología Sanitarias. Majadahonda, Madrid, España.

naron también para determinar la existencia de anticuerpos neutralizantes IgM específicos frente a virus Coxsackie B.

#### *Centrifugación en gradiente de sacarosa*

Los sueros previamente inactivados se diluyeron 1:2 en solución salina amortiguadora de fosfato (pH=7,2) y 0,2 ml se colocaron en la parte superior de un gradiente de sacarosa (10-50%); se centrifugaron en un rotor SW65 de una ultracentrífuga Beckman L5-50B a 38 500 rpm durante 18 horas y, a continuación, se recogieron las fracciones de cada tubo (10 fracciones de 0,5 ml). La linealidad del gradiente se probó con posterioridad mediante un refractrómetro.

#### *Técnica serológica*

Se utilizaron poliovirus de los tipos 1, 2 y 3 aislados durante brotes de poliomielitis en España. A cada dilución de suero se añadieron 0,025 ml de aproximadamente 100 DICT<sub>50</sub> de estos virus. Los virus se titularon en cada ensayo utilizando cuatro diluciones logarítmicas (log<sub>10</sub>) y seis pocillos por dilución, para confirmar que se empleaban a 100 DICT<sub>50</sub>/0,025 ml. Los medios empleados en la microprueba fueron el medio A (diluyente de virus y sueros) y el medio B (diluyente de las células) (5).

Para la realización de los ensayos se utilizaron placas de fondo plano de 96 pocillos, estériles y tratadas para el cultivo de tejidos. Se realizaron diluciones 1:2 en 0,025 ml, comenzando por la dilución 1:2 y terminando en las 1:256 y 1:4 096 para fracciones y sueros respectivamente. Las parejas de sueros se estudiaron por triplicado y las fracciones 1 a 6 de los sueros una sola vez frente a cada virus. El período de incubación virus-suero fue de dos horas a temperatura ambiente, seguido de 18 horas a 4°C para favorecer la detección de

anticuerpos IgM específicos (6).

Se añadieron células Vero a los pocillos de cada prueba a razón de 12 000 células por pocillo en 0,1 ml. Se establecieron controles de células con 12 000, 6 000, 3 000 y 1 500 células por pocillo, así como controles de toxicidad para las fracciones y los sueros. Tras la adición de las células se sellaron las placas con papel estéril y se incubaron a 37°C durante tres días. Después de este tiempo se efectuó la lectura para determinar alteraciones citopáticas. Los títulos de las parejas de sueros estudiadas por triplicado se calcularon por el método de Kärber (7).

#### *Comprobación de la eficacia del fraccionamiento*

Cuando se observaron anticuerpos neutralizantes frente a alguno de los poliovirus en las fracciones 2 ó 3 del gradiente, se comprobó la ausencia de anticuerpos IgG y la presencia de anticuerpos IgM. El estudio se realizó en las seis primeras fracciones de cada suero y se llevó a cabo en placas de inmunodifusión, con antisueros frente a anticuerpos IgG e IgM humanos (Lc-partígen IgG y Lc-partígen IgM, Behring).

#### *Factor reumatoide*

Se estudió la presencia del factor reumatoide en los 30 sueros de casos de poliomielitis, mediante el reactivo Latex del Instituto Behring.

#### **Resultados**

En los 30 casos de poliomielitis estudiados, se observó la presencia de anticuerpos neutralizantes IgM específicos frente al virus poliomielítico asociado. En un caso, que correspondía a una niña vacunada con vacuna oral monovalente tipo 1 un

mes antes de la aparición de síntomas, se observó, además, la presencia de anticuerpos IgM frente a poliovirus de los tipos 1 y 3. En los restantes 29 casos se puso de manifiesto la existencia de anticuerpos IgM frente a poliovirus del tipo 1 en 17 ocasiones, frente a los del tipo 2 en siete y frente a los del tipo 3 en cinco.

La presencia de anticuerpos neutralizantes IgM específicos, se mantuvo en la segunda muestra de las 16 parejas de sueros estudiadas; estas segundas muestras se tomaron dos semanas después de las primeras. El ensayo para determinar la presencia del factor reumatoide dio resultados negativos en todos los casos. De las 16 parejas de sueros estudiadas, sólo en cuatro ocasiones (25%) se apreció un aumento, de por lo menos cuatro veces, del título de anticuerpos neutralizantes frente al poliovirus correspondiente.

En ninguno de los 30 sueros obtenidos de casos de miocarditis, endocarditis, pericarditis y diabetes juvenil, se observó la presencia de anticuerpos neutralizantes IgM específicos frente a cualesquiera de los tres poliovirus, aunque se encontraron anticuerpos frente a virus poliomiélticos de los tipos 1, 2 y 3, en el 87, 94 y 87% de los sueros respectivamente.

## Discusión

En el diagnóstico virológico de la poliomiéltis, además del aislamiento del virus, que permite por una parte identificar el tipo de virus asociado con el cuadro y por otra su caracterización de similar a los virus vacunales o distintos de ellos (8, 9), la serología de neutralización sobre dos muestras de suero, tomadas en el momento de la sospecha clínica de poliomiéltis y en la fase convaleciente de la enfermedad, proporciona un dato adicional para la demostración del virus asociado con el cuadro. En el presente estudio, se observó un aumento de por lo menos cuatro veces del

título de anticuerpos neutralizantes únicamente en el 25% de los casos en que se analizaron dos muestras de suero, mientras que tras el fraccionamiento del suero en gradiente de sacarosa, en las condiciones anteriormente descritas, el porcentaje de eficacia diagnóstica fue del 100%. El hecho de que en las segundas muestras también se observara la presencia de anticuerpos IgM específicos frente al virus asociado permite un diagnóstico, incluso cuando las muestras se toman algo tardíamente con respecto a la aparición de síntomas, fenómeno que debe esperarse cada vez más en casos aislados de poliomiéltis, debido a la poca frecuente aparición de la enfermedad en países con buenos sistemas de vacunación. El hecho de que en 30 casos de pericarditis, miocarditis, endocarditis y diabetes juvenil no se demostrara la existencia de anticuerpos IgM específicos frente a ninguno de los poliovirus permite asegurar, si se controla la presencia del factor reumatoide y se realiza un buen fraccionamiento de los sueros, que no aparecerán falsos resultados positivos.

Esta técnica, aunque no puede considerarse como de diagnóstico rápido, ya que se necesitan por lo menos seis días para completar el estudio, sí permite en cambio, en los casos en que el nivel de anticuerpos del primer suero sea suficiente, establecer un diagnóstico serológico fiable sin esperar al estudio del segundo suero. Hubiera sido deseable realizar un seguimiento de los casos, desde el inicio de la enfermedad, para conocer durante cuánto tiempo se manifestaba la existencia de anticuerpos IgM específicos, utilizando la técnica descrita. Sin embargo, debido a que los enfermos, en los meses posteriores a la aparición del cuadro, fueron vacunados con vacuna antipoliomiéltica trivalente, los resultados de un seguimiento serían de difícil interpretación.

Por todo lo anterior, debería estudiarse la posibilidad de que, en los sistemas de vigilancia de la poliomiéltis (10-12), se utili-

zaran técnicas de diagnóstico serológico que permitieran la detección de anticuerpos IgM específicos frente a poliovirus.

## Resumen

En el presente estudio se intenta determinar la eficacia, como método de diagnóstico virológico de casos de poliomiелitis, de una técnica serológica que permita demostrar la presencia de anticuerpos neutralizantes IgM específicos, tras el fraccionamiento de los sueros en gradiente de sacarosa. En los 30 casos de poliomiелitis que se estudiaron empleando esta técnica, la eficacia fue del 100%, a diferencia de la

que se encontró al comparar dos muestras de suero en que la eficacia fue del 25%. Además, en 30 sueros adicionales de casos de miocarditis, pericarditis, endocarditis y diabetes juvenil, que se estudiaron de modo similar, la técnica no dio falsos positivos. Se propone la conveniencia de aconsejar el uso de esta técnica en los sistemas de vigilancia de la poliomiелitis. ■

## Agradecimiento

El autor agradece la ayuda prestada por sus colaboradores, los auxiliares de investigación Sras. Margarita López Ortiz y Teresa Baso, y el técnico de laboratorio Sr. Jesús María de la Fuente Lobo.

## REFERENCIAS

1. Bottiger, M. Antibody stimulation in individuals without demonstrable poliovirus antibodies following a fifth injection of inactivated poliovirus vaccine. *Acta Pathol Microbiol Scand (B)* 81:795-798, 1973.
2. Bass, C. J. W., S. B. Halstead, M. G. W. Fischer, M. J. K. Podgove y R. A. Wiebe. Effect of booster vaccination one to 14 years after primary series. *JAMA* 239(21):2252-2255, 1978.
3. Kong, R., K. Miyamura, E. Tajiri, A. Sasagawa, P. Phuapradit, N. Roongwithu, A. Vejajiva, C. Jayvasu, P. Thongcharoen, C. Wasi y P. Rodprassert. Virological and serological studies of neurological complications of acute hemorrhagic conjunctivitis in Thailand. *J Infec Dis* 135(5):706-713, 1977.
4. Melnick, J. L. Ventajas e inconvenientes de las vacunas antipoliomielíticas elaboradas con virus vivos o con virus muertos. *Bol Of Sanit Panam* 88(6):507-529, 1980.
5. Kyriazopoulou, V. G. y E. J. Bell. A micrometabolic inhibition test for the estimation of poliovirus neutralizing antibodies. *Bull WHO* 47(2):171-175, 1972.
6. Sabin, A. B. Vaccination against poliomyelitis in economically underdeveloped countries. *Bull WHO* 58(1):141-157, 1980.
7. Lennette, E. H. y N. J. Schmidt. Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections. 5ª edición. Washington, D.C., American Public Health Association, 1979.
8. Van Wezel, A. y A. G. Hazendouk. Intratypic serodifferentiation of poliomyelitis virus strains by strain-specific antisera. *Intervirology* 11:2-8, 1979.
9. Organización Mundial de la Salud. Poliomyelitis surveillance. *Wkly Epidemiol Rec* 10:79, 1980.
10. Organización Mundial de la Salud. Technical guide for a system of poliomyelitis surveillance. *Wkly Epidemiol Rec* 22:205-209, 1975.
11. Organización Mundial de la Salud. Vigilancia de la poliomiелitis. *Cron OMS* 30(2):77-80, 1976.
12. Dömök, K. y D. I. Magrath. *Guía para el aislamiento de poliovirus y técnicas serológicas de vigilancia de la poliomiелitis*. Publicación en offset 46. Ginebra, Organización Mundial de la Salud, 1980.

### **IgM-specific neutralizing antibodies to poliovirus in patients with poliomyelitis (Summary)**

This study reports, as a method for the virological diagnosis of cases of poliomyelitis, the efficacy of a serological technique that makes it possible to show the presence of IgM-specific neutralizing antibodies after fractionation of sera in sucrose. It was found to be 100% effective in the 30 cases of poliomyelitis studied as compared to the results

obtained in comparing two sera samples in which the effectiveness was 25%. Furthermore, the technique gave no false positives in 30 additional sera of patients with myocarditis, pericarditis, endocarditis, and juvenile diabetes. Advocacy of the use of this technique in poliomyelitis-control systems is recommended.

### **Anticorpos neutralizantes IgM específicos em presença de poliovirus em casos de poliomielite (Resumo)**

Neste estudo procura-se determinar a eficácia, como método de diagnóstico virológico em casos de poliomielite, de uma técnica serológica que permita demonstrar a presença de anticorpos neutralizantes IgM específicos, depois do fracionamento dos soros em gradiente de sacarose. Nos 30 casos de poliomielite estudados com esta técnica, a eficácia foi de 100%, bem diferente da que se

encontrou ao comparar duas amostras de soro em que a eficácia foi de 25%. Além disso, em 30 soros mais de casos de miocardite, pericardite, endocardite e diabetes juvenil, que se estudaram de maneira semelhante, a técnica não deu falsos positivos. Propõe-se a conveniência de aconselhar o emprego desta técnica nos sistemas de vigilância da poliomielite.

### **Anticorps neutralisants IgM spécifiques face au poliovirus dans les cas de poliomyélite (Résumé)**

Dans cette étude on cherche à déterminer l'efficacité, comme méthode de diagnostic virologique dans des cas de poliomyélite, d'une technique sérologique qui permettrait de démontrer la présence d'anticorps neutralisants IgM spécifiques, après fractionnement des sérums en gradation de sacarose. Par l'emploi de cette technique, dans les 30 cas de poliomyélite qui furent étudiés, l'efficacité fut de 100%, par rapport à l'efficacité de 25%

observée en comparant deux échantillons de sérum. De même, dans 30 sérums supplémentaires de cas de myocardite, péricardite, endocardite et diabète juvénile, investigués de façon similaire, la technique ne donna pas de faux positifs. On pense qu'il serait pertinent de conseiller l'utilisation de cette technique dans les systèmes de surveillance de la poliomyélite.