

INMUNIZACION DEL HOMBRE CON VIRUS VIVO DE POLIOMIELITIS

HILARY KOPROWSKI, M.D.

Director auxiliar del Departamento de Investigación Viroológica y Rickettsial de la División Lederle de Laboratorios, American Cyanamid Company, Pearl River, Nueva York, Estados Unidos

Y cuando se les recitan nuestras lúcidas aleyas, dicen: 'Este no es sino un hombre que quiere apartarnos de lo que adoraban nuestros padres.' Y dicen aún: 'Este Corán no es más que una mentira inventada!' Y los incrédulos dicen de la verdad, cuando les llega: '¡Esto no es más que pura magia!'.

El Corán, Libro XXII, Sura 34, "La ciudad de Saba", 43.

Los estudios iniciales sobre la inmunización de sujetos humanos con una cepa de virus atenuado de poliomielitis administrada por vía oral, se emprendieron para ver si el procedimiento es seguro y para determinar el grado de la respuesta de anticuerpos obtenida.

MATERIAL Y METODOS

Virus

La cepa TN de poliomielitis es un virus tipo 2 aislado durante los intentos de adaptar la cepa Brockman (tipo 1) a ratones. Después de pasarla por ratones, las pruebas de neutralización cruzada en ratones y ratas algodonerías mostraron que la cepa TN es idéntica al virus tipo 2. Los datos resumidos en el Cuadro No. 1 muestran que al nivel del octavo pase por el cerebro del ratón, la cepa TN tiene un grado de virulencia notablemente bajo en monos inoculados intracerebralmente. Esa característica se conservó después de adaptar el virus a ratas algodonerías, siempre que se mantuviera a niveles de pase bajos, pero el cultivo prolongado de la cepa TN en ratas algodonerías provocó una intensificación de sus propiedades patógenas. Sin embargo, en monos rhesus siguió siendo menos patógena que las demás cepas del virus tipo 2. El aumento de virulencia estaba relacionado probablemente con el cultivo en tejidos de rata algodonería, puesto que el virus parecía

disminuir de virulencia para los monos después de su adaptación a hámsters lactantes. Conservó un elevado título DI₅₀ en ratones (Cuadro No. 1). Esta curiosa intensificación de las propiedades patógenas de un virus mantenido en el sistema nervioso central (SNC) de la rata algodonería, merece atención mayor, pero no viene al caso en el presente estudio.

Ni la cepa TN adaptada al ratón ni la adaptada a la rata algodonería mostraron el menor efecto citopatógeno sobre el epitelio renal o los fibroblastos testiculares del mono (*cynomolgus*), pero después de uno o dos pases del virus por cultivo de tejidos, esa propiedad cambió. En algunos casos, se sacrificaron los monos que habían mostrado signos de parálisis y sus tejidos de la médula espinal se utilizaron para subinocular cultivos de tejidos y monos. La presencia del virus se descubrió invariablemente, ya sea por el efecto citopatógeno directo, ya sea, con más frecuencia, por pases ciegos por cultivo de tejidos, pero las diluciones seriadas de tejido medular no provocaron signos de enfermedad al ser inoculadas intracerebralmente en monos.

Antes de ensayarlo en sujetos humanos, hicimos una valoración más detenida de las propiedades antigénicas del virus. En primer lugar, monos que no habían mostrado síntomas después de ser inoculados intracerebralmente con la cepa TN, recibieron una inyección de prueba de virus homólogo virulento, y se vió que estaban inmunes.²⁰ En segundo lugar, en chimpancés a los cuales se

« Fenómeno bastante curioso: el virus TN pareció provocar también en los monos una resistencia contra los dos tipos heterólogos 1 y 3.²⁰ Sin embargo, esto estaba condicionado por inyección intracerebral de la cepa, y no parece que tenga influencia alguna en la respuesta inmunológica de sujetos humanos.

CUADRO NO. 1.—Inoculación intracerebral de monos Rhesus con cepa TN en diferentes niveles de pase.

Pase	Título en DP ₅₀ en ratones*	Resultados cumulativos de la inoculación en monos					Administración al hombre	
		Grado de parálisis			Tasa de incidencia de morbilidad**	Tasa de mortalidad	Grupo de ensayo clínico	Número de sujetos
		Ninguno**	Moderado	Grave				
8 CR	3.10	18	0	0	0/18	0/18	—	0
1-4 RA	1,10-4,00	169	14	0	25/183	0/183	A†	9
							B	53
							C	5
							D	3
12-17 RA	1,10-3,40	26	3	1	4/30	0/30	—	0
32-35 RA	3,50-4,50	61	46	23	76/130	22/130	A	11
							B	8
30 RA + 30 HL	6,20	9	1	0	1/10	0/10	—	0

* Logaritmo negativo en la base 10.

** Se incluyen en estas columnas monos que mostraron signos de una forma benigna de enfermedad por ej., tremor y/o fiebre.

† Véase Cuadro No. 2.

CR = Pase por cerebro de ratón

RA = Pase por cerebro de rata de algodón

HL = Pase por cerebro de hámster lactante

había administrado cepa TN por vía oral, se probó que habían desarrollado anticuerpos neutralizantes.¹⁶ Se evidenció, pues, que la cepa TN, después de su pase por ratones y por ratas aldononeras, o sólo por uno de los dos, tenía sólo una ligera virulencia residual para el sistema nervioso del mono, pero había conservado su poder antigénico.

Sujetos humanos

El criterio primordial para la selección de los individuos que iban a recibir el virus TN, fué la susceptibilidad a la infección por el tipo 2, deducida de la ausencia en su sangre de anticuerpos neutralizantes de dicho tipo. Además, se procuró obtener el mayor número posible de individuos cuya sangre no contuviera anticuerpos contra ninguno de los tres tipos de virus.^b Fué relativamente fácil hallar

^b Aunque los estudios serológicos se basaban en la mayoría de los casos en pruebas de neutralización de ratones, se obtuvo una nueva valoración negativa en varios casos por medio de prueba de neutralización en cultivo de tejidos. Los resultados de las últimas, en las cuales se empleó una dosis de virus mínima (10-30 unidades citopatógenas), confirmaron plenamente los datos obtenidos en las pruebas de neutralización en ratones.

sujetos carentes de anticuerpos contra el tipo 2. Así ocurrió con 85 de los 89 individuos del Cuadro No. 2. Más difícil fué obtener gran número de personas que no tuviera anticuerpos contra los otros dos tipos de virus, y sólo se hallaron 18 individuos de esta clase entre 85, como se muestra en el Cuadro No. 2. Los 89 se dividieron en cuatro grupos de ensayo: dos grupos mayores, A y B, y dos pequeños, C y D.

Método de administración

Si bien subsisten diferencias de opinión sobre la patogénesis de la poliomiélitis en el hombre, en los últimos tiempos ha ganado terreno la teoría de que la boca es la vía de acceso y de que las mucosas del conducto intestinal contribuyen a la multiplicación del virus.³ En consecuencia, el virus TN se administró por vía oral, ya sea mediante sonda estomacal, ya por alimentación directa. Otra razón de la preferencia de la vía oral a la parenteral, es la posibilidad de que una inoculación subcutánea o intramuscular, prescindiendo del contenido de virus del inóculo, provocara por sí misma la parálisis en una persona en trance ya de incubación de la poliomiélitis. Se han referido

CUADRO No. 2.—Resultados de inmunización del hombre contra virus de poliomiélitis con virus vivo administrado oralmente

Grupo de ensayo clínico	Número de sujetos	Estudios de preinmunización				Estudios de postinmunización	
		Número de sueros que mostraron anticuerpos contra tipos de virus			Número de sujetos sin anticuerpos contra ningún tipo de virus	Número de sujetos que excretaron virus en las heces*	Número de sujetos que desarrollaron anticuerpos contra virus del tipo 2
		1	2	3			
A**	20	{ 5 2 }	0 4	2 0 }	10	12 2	16 —
B	61	43	0	37	6	31	53 (+8)††
C	5†	3	0	0	2	0	4
D	3†	0	0	3	0	2	3
Total	89	53	4	42	18	47	76 (+8)††

* Para la definición de portador intestinal, véase nota c al pie de esta página.

** Los números con corchete indican los cuatro individuos que tenían anticuerpos del tipo 2 antes de la administración.

† Se incluyen en este grupo sujetos que recibieron simultáneamente globulina de suero inmune y virus (véase el texto).

†† En el texto se describe el subsiguiente desarrollo de anticuerpos en estos 8 individuos.

accidentes de esta índole con ocasión de inmunizaciones contra la difteria y contra la tos ferina.^{22, 25}

El material que se administró por vía oral consistió en tejido del cerebro y de la médula de rata algodónera infectada, en suspensión al 20% en agua destilada. El Cuadro No. 1 indica el número de personas que recibieron virus proveniente de diversos países. Se administraron dosis de 10, 5 ó 1 ml; la mayoría de los individuos recibieron 5 ml. La suspensión se dió por sonda estomacal o bien diluída en 1 ó 2 onzas de leche, o chocolate con leche, y se administró en una sola sesión. La primera administración de virus a un ser humano se llevó a cabo por sonda estomacal el día 27 de febrero de 1950,¹⁴ y en vista de la completa ausencia de todo signo de enfermedad asociado con la presencia de virus en el intestino se decidió administrar el virus a otras personas. Durante los tres años sub-

siguientes, 88 personas más recibieron virus oralmente.^{15, 19}

RESULTADOS

Debe afirmarse de una manera categórica que en ninguna persona se advirtieron signos o síntomas de enfermedad que pudieran atribuirse a la ingestión del virus. Las observaciones clínicas se hicieron con vigilancia sumamente estricta a base de 24 horas durante tres semanas contadas a partir de la administración del virus y la mayoría de los individuos permanecieron bajo observación clínica durante un año o más. Se tomaron con frecuencia las temperaturas, pero en ninguno de los 89 sujetos se registró aumento de importancia de la temperatura del cuerpo. Además, observadores expertos examinaron a los pacientes en busca de posibles manifestaciones de trastornos, tanto del sistema nervioso central o periférico, como del muscular o de la vía gastrointestinal. No se observó ningún trastorno.

Como se desprende de los datos del Cuadro No. 2, no todos los que recibieron virus se convirtieron en portadores intestinales. Sin

† En este caso y en otros subsiguientes, se definió como "portador" al individuo de cuyas muestras de heces, recogidas al quinto día de la administración oral o en cualquier momento posterior, se aisló el virus.

CUADRO No. 3.—Examen para la presencia del virus en la sangre.

Grupo de ensayo	Número de sujetos	Plan de recolecciones sanguíneas*	Número de aislamientos positivos	Tasa de presencia del virus en el intestino
B	30	1, 3, 5, 7, 9, 11	0	15/30
	31	2, 4, 6, 8, 10, 12	0	15/31
C	2	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8	0	0/2
	3	5, 6, 7, 8	0	0/3

* Considerando día 0 el de la administración del virus.

embargo, sólo en un número relativamente pequeño de casos se analizaron todas las heces para determinar la presencia del virus, pues en la mayoría de los casos, dichas heces se recogieron cada tres o cuatro días. Por consiguiente, es posible que pasara inadvertido algún virus que se excretara durante el período de intercoleción. El uso de ratones como animal de prueba puede haber contribuido también a la determinación de un coeficiente de portadores bastante bajo. Por lo tanto, la cifra debe considerarse como número *mínimo* de individuos que se convirtieron en portadores intestinales del virus.

Viremia

Si se acepta la concepción de la patogénesis de la poliomiélitis corrientemente expuesta, la presencia del virus en la sangre debe considerarse factor de primordial importancia para la valoración de la seguridad^d de cualquier procedimiento de inmunización dado. En vista de este hecho, se extrajo sangre a intervalos a los individuos de los grupos de ensayo B y C (véase Cuadro No. 2), como se ve en el Cuadro No. 3.

El análisis de muestras de sangre no reveló la presencia del virus, independientemente del estado de portador de los donadores. Puede suscitarse entonces la duda de si el ratón, como animal de prueba, es suficientemente sensible para ensayos de virus. Todas las muestras de sangre obtenidas de varios individuos que se convirtieron en portadores intestinales del virus, fueron ensayadas de nuevo en busca del virus me-

dante subinoculación en gran volumen en cultivo de tejidos, siguiendo técnicas recientemente descritas.¹² Este nuevo ensayo comprendía muestras de sangre de seis individuos que no tenían anticuerpos neutralizantes demostrables contra ninguno de los tres tipos de virus de poliomiélitis antes de la administración de la cepa TN (véase grupo B, Cuadro No. 2). A pesar de numerosos intentos de aislar el virus de estas muestras de sangre por medio de pases ciegos, no se observaron efectos citopatogénicos en el cultivo de tejidos.

Inmunidad y persistencia de anticuerpos

Los datos de la última columna del Cuadro No. 2 indican que un gran número de sujetos respondieron al estímulo antigénico del virus activo. Pruebas positivas de que se habían desarrollado anticuerpos homólogos se obtuvieron ya siete días después de la administración por vía oral del virus, y la mayoría de las muestras de suero obtenidas un mes después de la administración contenían anticuerpos.^e

Ocho individuos del grupo de ensayo B siguieron, al parecer, sin respuesta inmunológica.¹⁹ Un examen más detenido del estado clínico de estos ocho pacientes, reveló un desarrollo mental sumamente bajo, particularmente evidenciado por peculiares

^e Como se mencionó antes en relación con estudios sobre suero obtenido antes de la inmunización, los resultados de las pruebas de neutralización en ratones se cotejaron con los obtenidos mediante la técnica de cultivo de tejidos. La titulación protectora de los sueros siguió siendo la misma tanto si el criterio de protección era la supervivencia de un ratón como si lo era la falta de efecto citopatogénico.

^d Esto significa la ausencia de síntomas clínicos de enfermedad subsiguientes a la administración de un virus activo.

hábitos de alimentación. Surgieron dudas sobre si el virus había sido ingerido. Para cerciorarse de la exposición de estos individuos, bajo estricta supervisión se les volvió a administrar el virus diez meses después de la primera vez, con resultados muy satisfactorios. Los ocho se convirtieron en portadores, y todos acusaron anticuerpos dentro de un mes después de haberseles administrado de nuevo el virus. También se le administró de nuevo a un noveno miembro del grupo B que se había convertido en portador y había acusado anticuerpos después de la primera administración. Después de la segunda no se aisló virus de las heces de este individuo, ni se observó ningún cambio de nivel de los anticuerpos homólogos presentes en su sangre.

Como cabía esperar, los niveles de anticuerpos variaron considerablemente de unos individuos a otros. Los resultados de los ensayos serológicos no revelaron diferencias de importancia en cuanto a la respuesta de anticuerpos subsiguiente a una o más administraciones del virus. La aparición de anticuerpos homólogos contra el tipo 2 no influyó en modo alguno en el estado serológico en relación con los otros dos tipos de virus, y los sujetos que antes no habían tenido anticuerpos contra ningún tipo de virus, lo acusaron solamente contra el tipo 2.

La respuesta uniforme de los individuos del grupo de ensayo A a la administración del virus TN¹⁵ permitió, gracias a una observación a largo plazo de 14 de los 20 originarios, obtener datos sobre la persistencia de anticuerpos.¹⁷ Como enseñan los datos resumidos en el Cuadro No. 4, el nivel de anticuerpos homotípicos^f permaneció esencialmente invariable en la sangre de todos los sujetos, con la posible excepción del número 8, por períodos que

^f Con el objeto de proporcionar una base para valorar los resultados, se hizo un intento para incluir en toda prueba un suero previamente obtenido del mismo individuo, y de título protector conocido. En consecuencia, los resultados están registrados en una serie de tres pruebas de neutralización (a, b y c).

van de 26 a 41 meses a contar de la administración oral del virus. Cabría objetar que esa respuesta inmune persistente, en vez de ser resultado del estímulo antigénico originario, se hubiera mantenido por inaparente reexposición al virus del tipo 2; sin embargo, parece sumamente improbable que hubiesen ocurrido contactos durante el período de observación de tres años, con exposiciones limitadas al tipo 2 y ninguna a los tipos 1 y 3; mas los sueros de 9 de los 14 sujetos que no habían tenido anticuerpos contra los tipos 1 y 3 cuando empezó el programa de inmunización (Cuadro No. 4), no acusaron esos anticuerpos. Otra refutación del argumento de las "exposiciones múltiples" estriba en la respuesta inmunológica de los sujetos números 10, 13 y 14 (véase Cuadro No. 4), que sólo recibieron el virus una vez, y cuya respuesta fué sin embargo similar en magnitud y duración a la de los demás sujetos que habían recibido múltiples administraciones de cepa TN.

Es razonable suponer que el período de inmunidad va más allá de los tres años que abarca este ensayo, y se piensa hacer un estudio a largo plazo del estado serológico de los individuos.

Nivel de anticuerpos y protección

La prueba decisiva del valor protector de este procedimiento de inmunización sería a todas luces la exposición a una grave epidemia de poliomiélitis. En vista del reducido número de personas a las cuales se administró el virus, parece sumamente improbable que se presente semejante ocasión de prueba natural. Por otra parte, puede obtenerse alguna información comparando los niveles de anticuerpos que se ven en el Cuadro No. 4 con los obtenidos pasivamente mediante la administración de globulina de suero inmune y que se consideran necesarios para proteger a los chimpancés o monos *cynomolgus*^{2, 4} contra la parálisis provocada por la administración oral de un virus virulento. Estos datos indican que un título $\frac{1}{2}$ - $\frac{1}{10}$ de anticuerpo pasivo circulante se consideró suficiente para

proteger a los animales contra la viremia y la parálisis subsiguiente observada en los testigos. A causa de la mayor susceptibilidad de la especie humana a la infección de la poliomielitis (véase infra), es discutible la aplicación a la profilaxis humana de los resultados obtenidos en monos cynomolgus, pero el nivel de anticuerpos obtenido en el hombre mediante la administración oral del virus TN, probablemente sea bastante para fines de protección. Sin embargo, este nivel de anticuerpos no impidió completamente que el virus estuviera presente en el intestino. La cepa TN se administró de nuevo a 12 sujetos del grupo de ensayo A¹⁵ (véase Cuadro No. 2), 10 de los cuales excretaron virus después de la primera administración. De estos 12 individuos 10 dejaron de convertirse en portadores después de la segunda administración. De los otros 2, uno se convirtió en portador 2 veces, y el otro 3 veces tras administraciones sucesivas del virus y en presencia de un elevado título de anticuerpos. En cambio, uno de los sujetos que había tenido originariamente anticuerpos homotípicos, recibió 4 administraciones masivas del virus a intervalos diarios sin evidenciar presencia del virus en el intestino.¹⁵

De lo que llevamos dicho resulta patente que la inmunidad serológica obtenida por administración oral del virus, no siempre corre pareja con la protección del conducto intestinal contra la infección con virus homotípico.

Concentración de virus en inóculo

Aunque a la mayoría de los individuos de los grupos de ensayo A y B se les dió una sola dosis de 5 ml de una suspensión al 20% de cerebro y médula espinal de rata algodónera infectada, la cantidad de inóculo de virus se redujo en algunos casos a 1 ml. A tres sujetos del grupo A (véase Cuadro No. 5) se les administraron distintas cantidades de la misma mezcla de virus.¹⁵ Se comprobó la presencia del virus en el intestino en los dos individuos que recibieron, respectivamente, 5 ml y 10 ml de suspensión de virus. No se recogieron virus de las muestras de

heces del sujeto al cual se administró 1 ml del virus. Sin embargo, en las muestras de sangre de los tres individuos se encontraron anticuerpos homólogos al mismo nivel aproximadamente.

Mejor prueba aún de la potencia infectiva de 1 ml de virus se obtuvo en dos sujetos del grupo D (67 y 68), en quienes se observó la presencia del virus en el intestino después de administración oral de esta cantidad de la cepa TN (véase Cuadro No. 5). El coeficiente de portador del sujeto 68 era igual al de un miembro del grupo B que había recibido 5 ml de suspensión de virus de la misma mezcla, y el del sujeto 67 lo rebasaba. Una vez más dejaron de observarse marcadas diferencias de respuesta serológica en relación con dosis de diferentes cantidades de virus.

La administración del virus en suspensión en leche dió tan buenos resultados como la hecha mediante sonda estomacal. No corresponde a los límites del presente artículo el estudio de los diversos esquemas de dosificación del virus para el hombre. Sin embargo, es evidente que la infección intestinal puede provocarse con cantidades de virus muy pequeñas, y cantidades muy pequeñas producirán también la formación de anticuerpos homólogos en la sangre.

Efecto de la inmunidad pasiva

A dos de los cinco miembros del grupo C (véase Cuadro No. 2) se les administró una mezcla de virus y globulina de suero inmune de origen humano. Se había demostrado que esta mezcla era avirulenta para ratones inoculados intracerebralmente. Ninguna persona adquirió el estado de portador, y sólo una de ellas acusó anticuerpos homólogos. Otros tres sujetos a quienes se había administrado al mismo tiempo la misma cantidad de virus pero sin la globulina de suero inmune, no presentaron evidencia de ser portadores intestinales, pero sí acusaron anticuerpos.

Los resultados de otro ensayo, resumidos en el Cuadro No. 6, quizás sean interesantes, aunque no tengan mayor valor estadístico. El sujeto C recibió parenteralmente globu-

CUADRO NO. 4.—*Persistencia de anticuerpos contra el virus tipo 2 de poliomielitis en*

Sujeto No.	Administración oral de virus		Pruebas de neutralización	Titulación protectora mínima del suero					
	Número de administraciones	Meses entre la primera administración y la última		0	1	2	3	4	11
2	2	1	a b c	1/6	1/22	1/90 1/74 1/220			
3	3	3	a b c	<1/2 <1/2	1/15		1/75		
4	3	3	a b c	<1/2	1/38		1/141 1/43		
5	3	3	a b c	1/4 1/4	1/514		1/250 1/526		
6	2	2	a b	<1/2 <1/2	1/200			1/200 1/600	
7	2	2	a b c	1/3	1/302		1/426 1/100		
8	2	2	a b	1/3 1/3	1/200	1/266	1/200**		1/15**
9	2	2	a b c	<1/2†	1/422		1/390 1/290		
10	1	—	a b c	<1/2** <1/2 1/2	1/111 1/1186				
12	2	3	a b c	<1/2** <1/2 <1/2	1/386 1/332				
13	1	—	a b c	<1/2 <1/2 <1/2	1/32 1/14				
14	1	—	a b c	1/15** 1/12 1/7	1/378 1/72 1/200				
16	4	10	a b	<1/2 <1/2		1/218			
17	3	8	a b c	<1/2 <1/2	1/200	1/242			

Los resultados de las pruebas de neutralización contra los tipos 1 y 3 indicaron:

sueros de 14 sujetos a quienes se administró cepa TN en el ensayo A (véase Cuadro No. 2).

obtenido (meses después de la administración oral de virus)

12	14	15	18	20	26	27	28	29	33	34	36	41
				1/656							1/640*	
			1/39 1/118							1/100*		
			1/31 1/34							1/28*		
			1/148 1/98							1/60*		
					1/121*							
		1/39 1/98						1/90*				
	1/75 1/380						1/320†					
1/692 1/200					1/280**							
						1/100 1/520						1/96**
1/20 1/28							1/60*					
						1/74**						
1/91									1/60*			
				1/200 1/280						1/94*		

* ausencia de anticuerpos.

** presencia de anticuerpos contra virus tipo 1.

† presencia de anticuerpos contra los tipos 1 y 3.

CUADRO No. 5.—*Relación entre la cantidad de virus ingerido, el estado de portador y la respuesta de anticuerpos.*

Grupo de ensayo	Sujeto No	Cantidad de virus administrada oralmente* (ml)	Recolección de deposiciones (días después de la administración)	Aislamiento de virus de las heces (días después de la administración)	Nivel de anticuerpos	
					Antes de la administración de virus	Después de la administración de virus**
A	4	10	4, 7, 10, 14, 17, 24	4, 7, 10	<1/2	1/260
	3	5	4, 7, 10, 14, 17, 24	4, 7, 10, 14	<1/2	1/120
	5	1	4, 7, 10, 14, 17, 24	ninguno	1/4	1/514
D	67	1	2, 3, 4, 6, 9, 11, 14, 16, 20, 23, 25, 29	2, 3, 4, 6, 9, 11, 16, 20, 25	1/6	1/2.048
	68	1	4, 7, 11, 18, 21, 22	11, 18, 21, 22	<1/2	1/22
B	40	5	6, 9, 12, 15, 18, 20, 23	12, 15, 18, 20	1/3	1/105

* En forma de suspensión al 20% de tejido cerebral y médula de rata algodónera.

** 30 días.

CUADRO No. 6.—*Efecto de la inmunidad pasiva en la respuesta al virus activo.*

Sujeto	Dosis de virus (ml)	Fuente de los anticuerpos pasivos	Presencia del virus en el intestino	Título de los anticuerpos séricos (días después de la administración del virus)						
				0	1	3	6	7	21	28
C.	5	Inyección de globulina inmune	0	<1/2	<1/2	Vestigio**		1/90	1/512	1/512
St.	Ninguna	Inyección de globulina inmune*	-	<1/2	<1/2	Vestigio**	<1/2	<1/2		
S.	1	Ninguna	+	<1/2						1/22
M.	1	Materna	+	1/6						1/2.048

* 0,1 ml por kg de peso del cuerpo, inyectada intramuscularmente en el momento de la administración oral de virus.

** Prevención parcial de efectos citopatogénicos del virus se notó en tubos con cultivos de tejidos inoculados con suero sin diluir.

0 = negativo - = ningún resultado + = positivo

lina de suero inmune, y así también St., y al primero se le administró virus simultáneamente. Es interesante notar que los vestigios de anticuerpos neutralizantes al tercer día de la administración de globulina humana, eran la única indicación de inmunidad pasiva en estos sujetos.

Además, es completamente claro que esto no impidió el desarrollo de inmunidad activa, que se pudo advertir en el individuo C a los siete días a contar de la administración del virus y globulina.

Ia probable presencia de inmunidad pasiva de origen materno en la sangre de uno de los sujetos, M., de tres meses de edad en

el momento en que se le administró el virus no impidió la presencia del virus en el intestino y hasta pudo haber intensificado la respuesta activa al virus, como lo indica el título inusitadamente alto de anticuerpos neutralizantes.

REFLEXIONES

“el oficio de aprendizaje tan largo...”
Chaucer

Pasando del punto de vista experimental al especulativo, nos encontramos frente a la siguiente cuestión: ¿Cuáles son las características fundamentales de un agente vivo que

determinan su aceptación como vacuna? Recientemente, a base de observaciones experimentales realizadas en poliomielitis y otras enfermedades causadas por virus, esas características de una cepa de virus atenuada se definieron y dividieron en cuatro categorías:¹³

(1) Incapacidad del virus para producir enfermedad grave en el huésped vacunado;

(2) Intransmisibilidad del virus de un huésped "infectado" a otro no-infectado; o, si la transmisión se da, fijación de las propiedades modificadas;

(3) Presencia de una cantidad suficiente de virus vivo en un producto final que satisfaga los requisitos mínimos de título.

(4) Evidencia de antigenicidad subsiguiente a una sola administración de virus.

Todas las características precedentes son de fundamental importancia, si bien la primera y la segunda constituyen los criterios principales para aceptar un virus atenuado como idóneo para su empleo como agente inmunizante.

En medicina veterinaria es relativamente fácil probar la "seguridad" de un preparado de virus atenuado. La inoculación del huésped natural sin percarce, presenta la prueba convincente. En la profilaxis humana no ocurre lo mismo. Aunque no se vacilaría en exponer al hombre directamente a infección con formas no atenuadas de virus benignos que se dan naturalmente, como los de rubéola, parotiditis o varicela, resultaría francamente indeseable hacerlo así con virus de poliomielitis. Los criterios de seguridad presentan en este último caso un problema formidable, puesto que el grado de atenuación tiene que calcularse mediante observaciones de laboratorio, esto es, basándose en los resultados de la inoculación de animales experimentales. Conviene recordar que un criterio universal aplicable igualmente a todos los virus atenuados, es un mito que se desvanece fácilmente teniendo en cuenta la gran variación existente entre dichos virus. Por ejemplo, así como la epidemiología, curso clínico, coeficiente de mortalidad y otros rasgos de la fiebre amarilla difieren de

los de la poliomielitis, así también el criterio de atenuación aplicable a la cepa 17D de la fiebre amarilla tiene que ser diferente del aplicable a una cepa modificada de virus de poliomielitis.

La virulencia de una cepa de virus de poliomielitis se suele determinar en función de la capacidad del virus para producir signos clínicamente discernibles de haber afectado el SNC en el mono. Más recientemente, se ha adoptado la práctica de calificar una cepa de "avirulenta" o "atenuada" si causa una incidencia elevada de infección en roedores y en cultivo de tejidos o en cualquiera de ellos por separado, pero va seguida de poca o ninguna incidencia de parálisis en monos inyectados intracerebralmente.

En este punto cabe plantear dos cuestiones. ¿Es indicio de avirulencia para los seres humanos la ausencia de patogenicidad intracerebral para los monos? Inversamente, ¿seguirá siendo una amenaza para el hombre un virus que sea patógeno para monos inyectados intracerebralmente? Antes de intentar dar una respuesta a ambas cuestiones, o de eludir las—lo que tal vez requiera mayor dosis de valor—sería conveniente examinar brevemente la susceptibilidad relativa del hombre y del mono al virus de la poliomielitis.

De los datos reunidos en el Cuadro No. 7 y descritos en detalle en otra parte,¹⁸ resulta evidente que, por lo que se refiere a la infección del aparato digestivo, el hombre es más susceptible que el chimpancé y que el mono *cynomolgus*.

Estos resultados no pueden generalizarse, a causa de la naturaleza de la cepa TN, pero es posible postular que hay cepas de virus de poliomielitis (enteramente desprovistas de virulencia para monos, aun cuando se los inyecte intracerebralmente) que pueden empero infectar el tracto intestinal humano. Tal vez esas cepas fuesen preferibles para la inmunización humana a las que tienen la propiedad de producir parálisis a los monos. Sin embargo, si por una u otra razón, una cepa que fuera patógena para monos, fuese indicada como agente inmunizante para el

CUADRO No. 7.—Resultados de la administración oral de cepa TN a tres especies de primate.*

Mezcla No.	Especie	Dosis de virus (ml)	No. de sujetos que recibieron virus	No. de excretantes de virus	No. de sujetos que mostraron anticuerpos	Título de anticuerpos
16	Hombre	1, 5 ó 10	9	7	9	1/20-1/500
	Chimpancé	10	2	1	2	1/85-1/95
21	Hombre	10	2	1	2	1/60-1/700
23		10	5	3	5	1/32-1/2.500
24		5 ó 10	8	5	8	1/10-1/600
F ₁	Chimpancé	2 × 10	3	1	3	1/7 -1/300
31	Hombre	5	54	31	54	1/15-1/500
	Chimpancé	10	4	0	4	1/2 -1/35
	Cynomolgus	3 × 2	11	0	0	
	Cynomolgus	2 × 6	5	0	0	
YHP N-63	Cynomolgus	3 × 2	5	1	2	1/2
Total	Hombre		78	47	78	
	Chimpancé		9	2	9	
	Cynomolgus		21	1	2	

* En ninguno de los casos incluidos en este cuadro se notaron signos de enfermedad.

hombre, no debiera por ello considerarse como necesariamente "insegura". La cepa 17D de la fiebre amarilla y los virus de rabia vivientes son patógenos para monos inyectados intracerebralmente, y sin embargo ambos virus parecen desprovistos de patogenicidad si se inyectan por vía parentérica al hombre.¹³

¿ADONDE VAMOS DESDE AQUI?

"Baja, loh doncella! de aquella altura montañosa"

Tennyson

Nos hacen falta dos cosas: una es una reserva de virus de poliomiélitis "atenuados", de cepas que representen los tres tipos, de preferencia desprovistas de excesivo neurotropismo (véase infra); la otra son criterios de seguridad más estrictos, aplicables al hombre mismo, que eliminen los azares de un procedimiento de inmunización. El confiar exclusivamente en datos obtenidos después de vacunar a gran número de sujetos, no basta.

La creciente investigación de los últimos

años en el terreno de la poliomiélitis, ha permitido que se disponga de un número, cada vez mayor, de cepas que llenan los requisitos de variantes "atenuadas". Además de la cepa TN, el tipo 2 está representado por la variante adaptada al huevo de la cepa MEF₁.^{8, 9 y 27} de virulencia marcadamente disminuída para el sistema nervioso de los monos tanto cynomolgus como rhesus.⁹ La patogenicidad de otra cepa del tipo 2 (Y-SK) ha sido cambiado mediante rápidos pases seriados por cultivo de tejidos,²³ y la variante obtenida parece ser también "atenuada". La cepa Mahoney del virus tipo 1 parece haber perdido la mayor parte de sus propiedades patógenas para los monos después de su adaptación a los ratones,²³ como ocurrió con la misma cepa después de pases rápidos por cultivo de tejidos.²⁸

El mecanismo de atenuación seguirá siendo un enigma mientras no se comprenda el complejo proceso de interacción entre la célula y el virus. La labor que se viene haciendo con el virus de la influenza⁷ sugiere que la virulencia está determinada por la distribución de ciertas unidades genéticas

CUADRO No. 8.—Virulencia observada en monos después de administrarles la cepa SM (tipo 1) de poliomiélitis adaptada a roedores.

Inóculo				Proporción de casos paráliticos entre monos inyectados intracerebralmente con dilución de virus								
Huésped*	Pase No.	Título DP ₅₀ ** en:		Título DT ₅₀ †	10 ⁻⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	Especie de monos
		Ratones	Ratas del algodón									
Rata del algodón	12 + 11 CT	2,75	N.P.	6,70	2/4	4/4	4/4	3/4	1/4	0/4	0/4	Java
	16	2,80	N.P.	5,50	—	8/10	1/2	2/2	1/2	2/2	—	rhesus
Ratones (cepa suiza)	12	2,75	N.P.	5,50	—	0/5	—	—	—	—	—	rhesus
	22	<1,00††	2,15	4,50	—	2/4	0/3	0/2	0/2	0/2	0/2	rhesus
	35 + 1 CT	N.P.	N.P.	6,00	1/3	1/3	0/3	0/3	—	—	—	rhesus
Ratones (cepa PRI)	22 + 1 CT + 1 ratón	2,00	<1,00	5,20	—	0/4	0/4	0/4	0/4	0/2	—	Java

* Virus pasado previamente por 3 albinos suizos y 4 ratones PRI.

** Expresado como logaritmo negativo en la base 10.

† Efecto citopatogénico en cultivo de tejidos.

†† Ratones que se paralizaron con dilución 10⁻¹.

CT = Pasado por cultivo de tejidos.

N.P. = No probado.

en una población viral. Así uno se siente inclinado a suponer que la atenuación del virus de la poliomiélitis puede ocurrir cuando ciertas partículas del mismo adquieren una distribución de las unidades genéticas distinta de la existente en la cepa "virulenta" original. También es concebible que, sin "redistribución" de las unidades genéticas, las propiedades de superficie de las partículas del virus adquieren durante el proceso de atenuación nuevas características no hereditarias atribuibles directamente al medio celular en que se propaga el agente.⁹ Como mejor pueden ilustrarse los cambios de virulencia resultantes de la propagación de la misma cepa durante el mismo lapso de tiempo en dos huéspedes diferentes, es con el ejemplo de la cepa SM (Sickle-Mahoney) de poliomiélitis del tipo 1 adaptada a ratones y ratas algodonerías en nuestro laboratorio, y que se somete a pruebas periódicas en monos para establecer sus propiedades parálitogénicas.²¹

⁹ Esta hipótesis ha sido bien presentada por Luria.²⁴

Los datos presentados en el Cuadro No. 8 indican que, a pesar de la similitud de los resultados finales de infectividad en ratones y cultivos de tejidos de diversas subcepas de virus, la virulencia de los preparados individuales fué influida directamente por la especie de tejido se utilizó para la propagación del virus. El material adaptado a la rata algodonería era tan virulento para los monos rhesus como la cepa originaria no-adaptada. En marcado contraste, el mismo virus propagado en ratones tanto suizos como PRI, mostró escasa o ninguna virulencia para monos inyectados intracerebralmente. Es interesante notar que tejidos medulares obtenidos de monos que no ofrecen signos clínicos de parálisis, parecen estar exentos de alteraciones histopatológicas; sin embargo, los datos preliminares indican que esta cepa de virus no patógena (para monos) no ha perdido la capacidad de producir la infección en el aparato digestivo.

Que se sepa, el acervo de virus atenuados representantes de los tipos 1 y 2 es actual-

mente más abundante que el de las variantes del tipo 3, pero eso no excluye la posibilidad de que en un futuro próximo se encuentren mutaciones del tipo 3 que ostenten propiedades similares a las de las variantes de los tipos 1 y 2.

Aun después de haberse desarrollado y administrado a sujetos humanos cepas modificadas de los tipos 1 y 3, las propiedades patógenas de estos agentes con relación al hombre seguirán siendo desconocidas. Como se indicó antes (pág. 615), no es lícito exponer gran número de personas a la poliomielitis con el objeto de obtener una prueba de importancia estadística del procedimiento. Además, a causa del bajo coeficiente de parálisis de la enfermedad que se produce naturalmente, cabe objetar que la vacunación de diez mil personas acaso no prueba nada, puesto que, primero, no puede darse prueba alguna sobre la susceptibilidad a la infección de los sujetos (ausencia de anticuerpos homólogos), y, segundo, el sujeto diez mil uno puede empero resultar víctima de parálisis causada por el llamado virus atenuado.

En estas circunstancias, hace mucha falta concretar otros criterios de seguridad aplicables al hombre mismo. Recientes estudios sobre viremia en poliomielitis^{1, 3 y 12} encauzan nuestros pensamientos en una cierta dirección. ¿Se podría considerar como criterio válido de la atenuación la ausencia de viremia después de administración oral del virus al hombre? Aunque sobre este punto sigue habiendo opiniones discrepantes¹⁻¹⁰ apoyadas en los principios básicos de la patogénesis de la poliomielitis, el caudal de testimonios de origen experimental señala la viremia como una fase esencial de la infección, que *precede* a una posible invasión del SNC.^{1, 2, 3, 4, 12} En otras palabras: la viremia fué regularmente demostrable en el período de incubación que sigue a la administración de virus a monos *cynomolgus* y chimpancés, y siempre se aisló virus de la sangre de los animales que subsiguientemente quedaron paráliticos.²⁻⁴ La prevención de la viremia y de la parálisis mediante la administración de antisuero homólogo a chimpancés a los

cuales se había administrado el virus,⁴ señala de nuevo a la corriente sanguínea como ruta de invasión del SNC. Como la respuesta de anticuerpos ocurrió en la fase intestinal de la infección y no estaba condicionada por viremia, el hecho de que no se aislara virus de la sangre de un individuo en quien se observó la presencia del virus en el intestino, puede considerarse como indicio de la seguridad del procedimiento de inmunización.

Antes de considerar este punto, es esencial examinar brevemente la incidencia de viremia en infecciones humanas producidas naturalmente, y valorar de esta suerte la importancia estadística del fenómeno. En un estudio reciente,^{5, 6} se analizaron en busca del virus, los sueros de 84 niños que eran contactos familiares de casos paráliticos de poliomielitis. De estos 84 casos, 25 mostraban un aumento de anticuerpos del tipo 1 entre la primera extracción de sangre y las subsiguientes 30 días después. Además, sólo nueve de los 25 niños no tenían ningún anticuerpo homólogo en el momento de la primera extracción de sangre. Se hizo patente que el virus estaba presente en el suero de cinco de esos nueve sujetos. En este gran grupo de sujetos no se demostró viremia en ningún otro individuo. Cuatro de las cinco personas en que se demostró viremia, sufrían de síntomas de enfermedad menor, y tenían fiebre en el momento de la viremia. Una era asintomática. Los importantes resultados de este estudio señalan una alta incidencia de viremia en las infecciones naturales, como lo prueba el hecho de que la presentaron cinco de los nueve sujetos no inmunes.

Aplicando esto a un estudio de la vacunación de sujetos humanos con virus vivo, no parece que lo inteligente sea administrar indiscriminadamente el virus a miles y más miles de individuos. Como se hizo con el experimento de administración del TN, parece preferible que el estudio se limite a sujetos que no tengan anticuerpos homólogos en el momento de administrarse el virus. Después de administrar el virus, la sangre de

los individuos debe someterse a examen exhaustivo para cerciorarse de su posible presencia, particularmente en casos en que el virus se encuentra en el intestino. Si aceptamos la "hipótesis de la viremia",¹ la ausencia de virus en los sueros de un número importante de portadores intestinales no-inmunes, puede indicar la incapacidad de una cepa dada para ir más allá de la primera fase intestinal de la infección humana y, por ende, su relativa apatogenicidad. En vista de la elevada incidencia de viremia (véase supra) en infecciones de poliomielitis que se producen naturalmente, el número de individuos utilizados en el estudio puede ser relativamente pequeño y, no obstante, los resultados serán de mayor importancia que los obtenidos vacunando miles de individuos tomados

al azar. Hay pues motivo para creer que el hecho de que no se demostrara virus en la sangre de 66 individuos no inmunes (véase Cuadro No. 3) que se infectaron de modo asintomático después de haberseles administrado la cepa TN¹⁹, es un fuerte argumento en favor de las propiedades atenuadas de esta cepa. La Fig. 1 presenta un diagrama que resume los datos clínicos y de laboratorio obtenidos de sujetos imaginarios, inmunizados (como en el grupo anterior) por administración oral de un virus vivo y atenuado de poliomielitis. Los datos están esquematizados "de modo optimista", en contraste con los presentados por D. Bodian¹ (véase Fig. 2) como se presentarían en una infección "natural" con una cepa de virus virulenta.

La infección por vía oral con el virus sus-

FIG. 1.—Curso cronológico de los eventos clínicos, patogénicos e inmunogenéticos que ocurren en una infección causada por administración oral de virus vivo atenuado, esquematizados de modo optimista en una forma parcialmente especulativa.

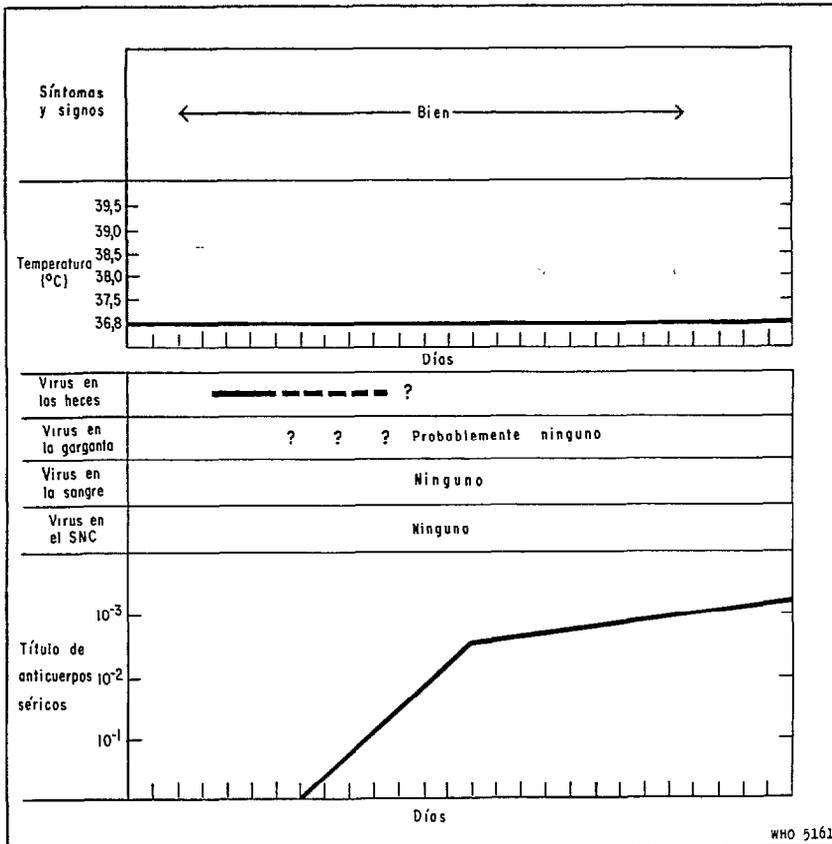
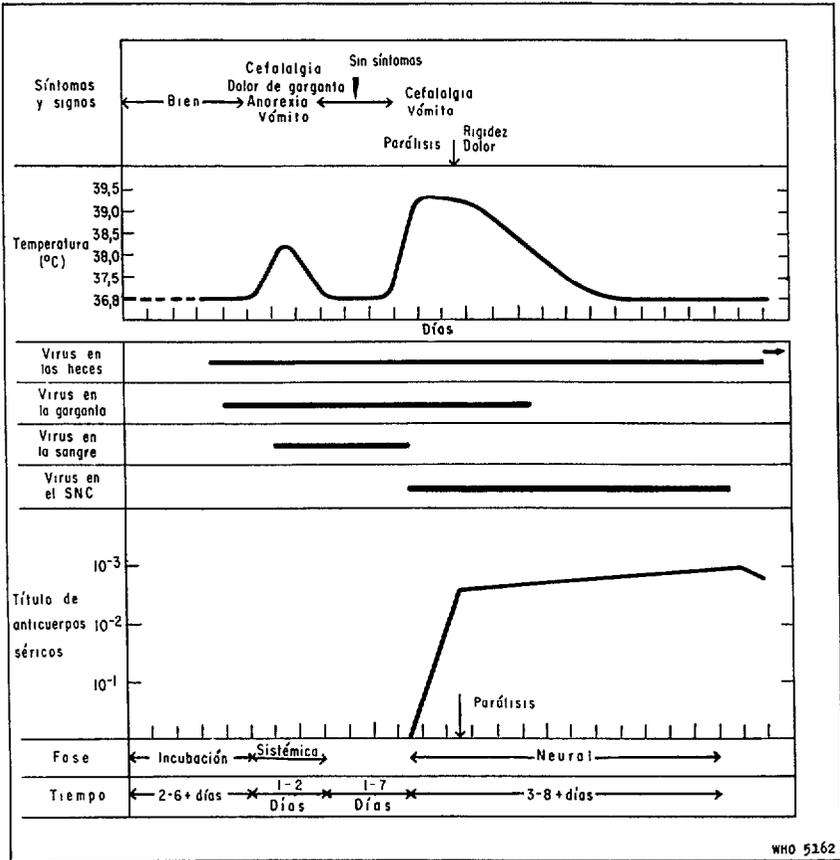


FIG. 2.—Curso cronológico de los eventos clínicos, patogénicos e inmunogénicos que ocurren en la infección paralítica "natural".



Según Bodian¹ con la autorización de los editores del *American Journal of Hygiene*

cita, de otra parte, otro problema de seguridad, a saber la transmisibilidad de la infección y la fijación de las características modificadas de la cepa. En otras palabras: ¿pierde un virus, durante el proceso de su modificación, su capacidad de propagarse por contagio de un individuo a otro? O bien, suponiendo que conserve la capacidad de propagarse, ¿puede recuperar en definitiva propiedades patógenas? Es evidente que la respuesta a estas preguntas sólo puede darla la experiencia. Sin embargo, una vez que la virulencia de un virus se ha modificado, otras características pueden sufrir también cambios profundos. Por ejemplo, el virus virulento del cólera de los cerdos presente en los excrementos de un animal infectado, es sumamente infeccioso,¹¹ y, no obstante, la

cepa atenuada, modificada por numerosos pases en conejos, causa en animales vacunados un tipo de infección autolimitada.^{14, 26} Algunas de las cepas del virus de poliomiелitis consideradas adecuadas para su administración al hombre, pueden tener propiedades similares, y cabe imaginar un ensayo clínico en un grupo de individuos no inmunes, de los cuales sólo uno recibiera el virus por vía oral. Todo el grupo, mantenido en íntimo contacto durante un lapso de tiempo que se extienda más allá del período en que el virus se encuentra en el intestino del individuo a quien se haya administrado éste, podría examinarse con frecuencia en busca de infección, es decir, de presencia de virus en las heces y de desarrollo de anticuerpos homólogos, o de cada una de las dos cosas por separado.

Resultados que indicaran una transmisibilidad baja, no causarían sorpresa. Por otra parte, la concentración de virus en las heces fecales puede ser también un factor para determinar su transmisibilidad a otros individuos susceptibles de la misma especie. Cabe conjeturar si, en tal caso, el contenido de virus del inóculo podría disminuir hasta el punto de evitar la presencia del virus en el intestino aunque siguiera siendo suficiente para producir una respuesta de anticuerpos. Los datos obtenidos con la cepa TN parecen apoyar la hipótesis que acabamos de exponer, puesto que cierta proporción de sujetos inmunizados pareció mantener su condición de no portador, dentro de los límites del procedimiento experimental.

Por último, hay que tener en cuenta la posible supresión del virus en el intestino mediante la administración de sustancias antivirales; pero los datos experimentales de que se dispone hasta ahora no son muy alentadores, principalmente a causa de la toxicidad del único compuesto conocido que hasta la fecha se ha empleado para estos fines.²⁹

CONCLUSION

"Fata viam inveniunt."

Séneca, siguiendo a los estoicos

En esta breve reseña no se consideró prudente ensalzar las ventajas de la inmunización con virus vivo respecto de cualquier otro método de vacunación, puesto que los datos científicos hablan por sí solos. Lo que se intentó hacer ver—y se espera haber logrado—es que el primer ensayo de inmunización eficaz del hombre contra la poliomiélitis con la cepa TN de virus justifica otros ensayos para obtener testimonios sobre el uso de otras cepas de virus vivos que resistan las objeciones de los más severos críticos de tales procedimientos de inmunización.

Testimonios como los aquí aducidos por observadores científicos exentos de prejuicios, respecto a la vacunación con virus vivo, pueden muy bien colocar a los que la impugnan en el trance de probar que dicha vacunación es improcedente. Si esto llegara a suceder, cabría decir, contra el aserto de Madame de Sévigné: "No siempre la fortuna favorece a los ejércitos más numerosos".

RECONOCIMIENTO

Para el estudio de la administración oral del virus de poliomiélitis fué necesario un esfuerzo de colaboración en gran escala. El principal mérito corresponde al Dr. George A. Jervis, de la División de Laboratorios, Departamento de Higiene Mental del Estado de Nueva York, Letchworth Village, Thiells, N. Y., y a Thomas W. Norton, de los Laboratorios Lederle, Pearl River, N. Y. Importante apoyo para disponer uno de los ensayos clínicos, y sobresaliente cooperación durante el ensayo, deben acreditarse al Dr. Karl F. Meyer, de la George Williams Hooper Foundation, Universidad de California; al Dr. T. L. Nelson, de la Sonoma State House, y al Dr. W. Halvorson, Director del Departamento de Sanidad del Estado de California. Desearía expresar también mi gratitud y aprecio a todos ellos, y asimismo a los siguientes por su inestimable ayuda: Dr. F. F. Tallman, Director del Departamento de Higiene Mental del Estado de California; Drs. Marshall E. Porter y Charles H. Ludwig, de la Sonoma State House; Dr. Crawfis, del Departamento de Higiene Mental del Estado de California; Drs. Malcolm Merrill, Frederick M. Kriete, A. C. Hollister, William Allen Longshore y Robert M. Drake, del Departamento de Sanidad del Estado de California; Dr. Ellen Simpson y Miss Katryn Smith, del Hospital de la Universidad de California; Dr. Bernice Eddy, de la George Williams Hooper Foundation, y a Doris J. Nelsen, de los Laboratorios Lederle. La lista de funcionarios civiles, personal técnico y de oficinas de laboratorios es demasiado larga para hacer llegar a cada uno de ellos el agradecimiento del autor, que queda consignado en estas palabras de gratitud.

REFERENCIAS

1. Bodian, D.: *Am. Jour. Hyg.*, 55:414, 1952.
2. Bodian, D.: *Am. Jour. Hyg.*, 56:78, 1952.
3. Bodian, D.: *Am. Jour. Publ. Hlth.*, 42:1388, 1952.
4. Bodian, D.: *Am. Jour. Hyg.*, 58:81, 1953.
5. Bodian, D.: In: Hartman, F. W. y otros. *The dynamics of virus and rickettsial infections*, Nueva York, 1954.

6. Bodian, D. y Paffenberger, R. S.: *Fed. Proc.*, 12:437, 1953.
7. Burnet, F. M.: *Med. Jour. Aust.*, 40:841, 1953.
8. Cabasso, V. J.; Stebbins, M. R.; Dutcher, R. M.; Moyer, A. W., y Cox, H. R.: *Proc. Soc. Exp. Biol.*, (N. Y.), 81:525, 1952.
9. Cox, H. R.: *Bull. N. Y. Acad. Med.*, 29:943, 1953.
10. Faber, H. K.; Silverberg, R. J., y Dong, L.: *Jour. Exp. Med.*, 97:69, 1953.
11. Hagan, W. A. y Bruner, D. W.: *The infectious diseases of domestic animals*, 2nd ed., Ithaca, N. Y., p. 787, 1951.
12. Horstmann, D. M. y McCollum, R. W.: *Proc. Soc. Exp. Biol.* (N. Y.), 82:434, 1953.
13. Koprowski, H.: *Practical application of living virus vaccines*. En: Hartman, F. W. y otros. *The dynamics of virus and rickettsial infections*, Nueva York, 1954.
14. Koprowski, H.; James, T. R., y Cox, H. R.: *Proc. US Livestock Sanit. Assn.*, 55:214, 1951.
15. Koprowski, H.; Jervis, G. A., y Norton, T. W.: *Am. Jour. Hyg.*, 55:108, 1952.
16. Koprowski, H.; Jervis, G. A., y Norton, T. W.: *Arch. Ges. Virus-forsch.* (en prensa), 1954.
17. Koprowski, H.; Jervis, G. A., y Norton, T. W.: *Pediatrics*, 13:203, 1954.
18. Koprowski, H.; Jervis, G. A., y Norton, T. W.: *Proc. Nat. Acad. Sci.* (Wash.), 40:36, 1954.
19. Koprowski, H.; Jervis, G. A.; Norton, T. W., y Nelsen, D. J.: *Proc. Soc. Exp. Biol.* (N. Y.), 82:277, 1953.
20. Koprowski, H.; Norton, T. W., y Jervis, G. A.: (Extracto en *Bact. Proc.* 92), 1951.
21. Koprowski, H.; Norton, T. W., y Pfeister, K.: *Proc. Soc. Exp. Biol.* (N. Y.), 86:238, 1954.
22. Korns, R. F.; Albrecht, R. M., y Locke, F. B.: *Am. Jour. Publ. Hlth*, 42:153, 1952.
23. Li, C. P. y Shaeffer, M.: *Proc. Soc. Exp. Biol.* (N. Y.), 82:477, 1953.
24. Luria, S. E.: *General virology*, Nueva York, 1953.
25. McCloskey, B. P.: *Med. Jour. Aust.*, 38:613, 1951.
26. Percival, R. C.; Harvey, M. J.; James, T. R., y Koprowski, H.: *Vet. Med.*, 158:359, 1953.
27. Roca-García, M.; Moyer, A. W., y Cox, H. R.: *Proc. Soc. Exp. Biol.* (N. Y.), 81:519, 1952.
28. Sabin, A. B.: *Am. Jour. Dis. Child.*, 86:301, 1953.
29. Ward, R.; Lo Grippo, G. A.; Earle, D. P., jr., y Graef, I.: *Fed. Proc.*, 12:464, 1953.