

# Aspectos Inmunológicos de la Parotiditis Epidémica\*

AMERICO MARQUEZ, BLANCA A. RAMOS y

JUAN C. RIVADENEIRA

*Este estudio se refiere a 497 soldados cuya susceptibilidad a la parotiditis se trató de determinar por medio de intradermorreacción, fijación del complemento, inhibición de la hemaglutinación y neutralización.*

*Se comparan los resultados serológicos con la historia de parotiditis de los sujetos para averiguar el grado de confianza de esta última. Se hacen indicaciones sobre posibles planes de vacunación de población de este tipo.*

La frecuencia de brotes epidémicos de parotiditis entre los soldados estacionados en nuestro medio, lleva a suponer que anualmente se incorporan, en número considerable, reclutas susceptibles a dicha enfermedad que favorecen su diseminación. Son comunes los brotes anuales y a veces la morbilidad es alta. Si bien no hay datos cuantitativos precisos sobre las complicaciones y secuelas parotídicas, es de suponer que éstas ocurren. Sin embargo, no se vacuna contra la parotiditis, quizás por su elevado costo.

Por ello, se consideró de interés iniciar un estudio tendiente a evaluar ciertos criterios sobre la determinación de infección por *Mixovirus parotiditis*, con miras a obtener datos que permitan hallar medios económicos de prevenirla. Se trató de estimar qué grado de confianza merecen los datos obtenidos por interrogatorio (antecedente de haber padecido parotiditis) y por intradermorreacción, para seleccionar tanto los posibles susceptibles como los resistentes al virus.

Con este objeto se hicieron estudios serológicos en un número representativo de soldados de una unidad militar de la ciudad

de Córdoba (Argentina), los que habían sido objeto de prueba cutánea y de interrogatorio sobre posibles antecedentes de la enfermedad. En este artículo se presentan los resultados obtenidos y también las conclusiones del análisis de éstos.

## MATERIAL Y METODOS

El grupo de soldados objeto de este estudio pertenecía a un regimiento de infantería de la ciudad de Córdoba, entre los que, en los últimos cinco años, había habido epidemias anuales de parotiditis. De los 1.157 soldados, nacidos en 1940, que integraban la unidad, se tomaron al azar 497, es decir, el 43% del total. De cada uno se extrajo una muestra de sangre, e inmediatamente se les sometió a la intradermorreacción. El antecedente de parotiditis se obtuvo por interrogatorio y se registró en la ficha correspondiente con otros datos personales, entre ellos los resultados de las distintas pruebas, para facilitar su oportuna tabulación.

### Intradermorreacción (IR)

En esta prueba se utilizó un antígeno provisto por E. Lilly and Co., Indianapolis,

Del Instituto de Virología, Universidad Nacional de Córdoba, Ministerio de Salud Pública, Córdoba, Argentina.

\* Manuscrito recibido en agosto de 1964.

Estados Unidos (Mumps Skin Test Antigen, v1059, AX 14038), elaborado con líquido amniótico y alantoideo de embrión de pollo infectado con el virus de la parotiditis. Este antígeno, inactivado por luz ultravioleta, es de probada potencia y especificidad antigénicas. No requiere el empleo simultáneo de antígeno testigo y se ajusta a las especificaciones exigidas por el Servicio de Salud Pública de Estados Unidos.

La prueba cutánea se hizo inmediatamente después de haberse obtenido una muestra de sangre de cada soldado, y consistió en inocular por vía intradérmica 0,1 ml. de antígeno en la cara anterior del antebrazo. La lectura consistió en medir el diámetro máximo del eritema resultante. Se hicieron dos lecturas, una a las 24 horas y otra a las 48, y se tuvo en cuenta la mayor de ellas. Se consideró positiva la reacción cuyo eritema tenía un diámetro de 15 mm. o más, con induración o sin ella; negativa, la de eritema de menos de 9 mm. de diámetro, y dudosa aquella de diámetro entre 10 a 14 mm.

#### Fijación del complemento (FC)

Los sueros fueron separados dentro de las 24 horas de obtenidas las muestras de sangre, se inactivaron a 56°C. durante 30 minutos y se conservaron por duplicado a -20°C. hasta el momento de usarlos.

Se empleó como antígeno la vacuna anti-parotidítica elaborada por E. Lilly and Co., en Estados Unidos (lote v1065, XB 6931). Esta vacuna es una suspensión de virus propagado en huevos embrionados, inactivado con formol, concentrado y purificado por centrifugación diferencial. En nuestro laboratorio, esta preparación dio un título de 1:32 en FC, respecto de un suero inmune de referencia.

Como complemento se utilizó una mezcla de sueros de cobayos macho, conservada a -70°C., cuyo título en presencia del antígeno fue de 1:150.

La prueba se hizo según la técnica de

Kolmer, modificada por el Centro de Enfermedades Transmisibles, de Estados Unidos (1). En ella se usan dos unidades de antígeno, dos unidades de complemento y una unidad completa de hemolisina. En la incubación primaria se siguió el método lento (durante la noche), o sea, más de 18 horas de incubación a 4°C.

Se trabajó siempre con un suero de referencia positivo, proveniente de una mezcla de sueros de convalecientes de parotiditis. Este suero dio de un modo consistente un título de 1:64. Se utilizaron, además, los siguientes controles: a) control de antígeno, en forma de líquido periembrionario de huevos normales; b) un suero negativo conocido; c) controles de unidades de complemento; d) control de los sueros problema, ante posibles propiedades anti-complementarias; e) patrones de hemólisis estándar para uniformar el método de lectura.

Se tomó como título de un suero la mayor dilución inicial que daba fijación del complemento de 3+ ó 4+, es decir, 35% ó menos de hemólisis en lectura ocular. Se consideraron positivos todos los sueros de título de 1:4 ó mayor.

#### Inhibición de la hemaglutinación (IH)

Antes de hacer la prueba, se trataron los sueros por el método del anhídrido carbónico, preconizado por el Comité de Expertos en Virosis del Aparato Respiratorio, Organización Mundial de la Salud (2), para eliminar los inhibidores inespecíficos (3).

Como antígeno se utilizó una mezcla de líquidos alantoideos de huevos infectados con la cepa Filadelfia 35 del *Mixovirus parotiditis*. La mezcla se hizo con este virus tras el 5° pasaje en nuestro laboratorio. La semilla de virus la proporcionó el Dr. A. Parodi, de la Universidad Nacional de Buenos Aires.

La prueba se efectuó según la técnica de Salk modificada (4). Se utilizaron los con-

troles de rutina. El título del suero de referencia fue de 160 en IH.

Por título de un suero se tomó el recíproco del número que expresaba la mayor dilución inicial que inhibió por completo la hemaglutinación. La menor dilución inicial de los sueros fue de 1:10, según resulta de la aplicación del método de eliminación de inhibidores.

Se consideraron positivos los sueros con un título de 20 ó mayor.

#### Prueba de neutralización en cultivo de tejidos

Se utilizaron en esta prueba cultivos de fibroblastos de embrión de pollo preparados por tripsinización (5). El medio de cultivo consistió en solución de Hanks a la que se agregó 0,5% de hidrolizado de lactoalbúmina, 5% de suero de ternera y antibióticos. Como medio de mantenimiento se empleó el de Eagle (6), sin agregados.

Como antígeno se utilizó una mezcla de líquido alantoideo de huevos infectados con la cepa Filadelfia 35 del *Mixovirus parotiditis* del 5° pasaje. Esta mezcla dio un título por hemoadsorción (7, 8) en cultivo de tejidos de  $10^{-4.5}/0,2$  ml. al 5° día de inoculación.

La prueba se efectuó utilizando una dilución de suero de 1:4 que se mezcló con igual volumen de antígeno; éste contenía alrededor de 320 dosis infecciosas hemoadsortivas de cultivo de tejido. Las mezclas suero-virus se incubaron por una hora a 37°C., y con cada una de ellas se inocularon 4 cultivos, a razón de 0,2 ml. por tubo. Al 5° día de inoculación, se hizo la hemoadsorción.

## RESULTADOS Y COMENTARIOS

### Antecedente de parotiditis

De los 497 individuos estudiados, 274 (55%) dijeron haber padecido la enfermedad, y los 223 (45%) restantes, negaron este antecedente.

Es posible que el porcentaje de personas

sin antecedentes de parotiditis, parezca ser muy elevado en un grupo de individuos de 20 años de edad, aun teniendo presente el alto número de infecciones subclínicas de esta enfermedad (9). Otro dato que podría tener relación con esta cifra es que, poco más o menos la mitad de los soldados estudiados, provenían de áreas rurales con menores posibilidades de exposición a la infección.

Sin embargo, los estudios serológicos posteriores indicaron, como se señala más adelante, que el tanto por ciento de personas totalmente negativas fue sensiblemente más bajo.

### Intradermorreacción

De 489 pruebas cuya lectura se logró, 189 (39%) fueron positivas, 241 (49%) negativas y 59 (12%) dudosas. De estos 59 individuos con prueba cutánea dudosa, 46 tuvieron uno o más criterios serológicos positivos y en 37 de éstos el criterio positivo fue la fijación del complemento.

Por lo tanto, parece razonable asumir que 46 de estos soldados eran inmunes y que la intradermorreacción fue dudosa por defectos de la inyección del antígeno o porque la sensibilidad cutánea estaba atenuada por alguna razón ignorada.

### Fijación del complemento

En el Cuadro I se da el número de positivos, según el título, obtenidos con esta prueba. Se observa en este cuadro que de 482 individuos, 273 tuvieron una FC positiva y de éstos, 200 tenían un título de 1:8 ó mayor. El nivel de anticuerpos de cuatro personas fue igual o mayor de 1:128; el examen de sus antecedentes reveló que 3 de ellos habían padecido parotiditis muy recientemente y también presentaron una IR intensa. El soldado restante, que manifestó no haber tenido la enfermedad, dio, además, una prueba cutánea francamente positiva, de lo que se deduce que había

CUADRO 1 — Resultados de la fijación del complemento (FC).

No. de positivos	Título
73	1:4
97	1:8
64	1:16
29	1:32
6	1:64
2	1:128
2	1:256

CUADRO 2 — Fijación del complemento (FC) en relación con la edad a que enfermaron los sujetos.

Edad a que enfermó		Fijación del complemento					
		Negativos		Positivos			
				a todos los títulos		a título mayor de 1:8	
Años	No.	No.	%	No.	%	No.	%
5-9	108	32	30	76	70	24	32
10-14	96	35	36	61	64	24	39
15-20	43	13	30	30	70	22	73
Total	247	80	32	167	68	70	41
		$\chi^2 = 1,248$		$P = 50\%$		$\chi^2 = 13,933$ $P = 1\%$	

CUADRO 3 — Resultados con la prueba de inhibición de la hemaglutinación (IH), según el título empleado.

Título	No. de positivos
1:20	123
1:40	54
1:80	25
1:160	15
1:320	6

de individuos de cada grupo no es muy elevado, los resultados sugieren que es tanto más probable encontrar títulos de 1:8 ó mayores cuanto más reciente ha sido la enfermedad.

Por otra parte, el número de individuos de cada grupo de edad indica que esta virosis fue más frecuente, en la población estudiada, entre los años 5 y 14, lo cual concuerda con lo sabido de esta infección.

#### Inhibición de la hemaglutinación

Conviene mencionar que la prueba de IH hecha con sueros tratados con anhídrido carbónico dio, en experimentos repetidos, resultados reproducibles. El Cuadro 3 muestra los resultados obtenidos por esta prueba, según el título empleado. De los 476 sueros que se sometieron a ella, 223 (47%), fueron positivos, y 253 (53%) negativos.

Confrontando los resultados obtenidos, del mismo grupo de sueros, por IH y FC, según se muestra en la Figura 1, se observa que 148 fueron positivos por los dos métodos y 135 negativos. Puede verse, también, que 117 sueros negativos por IH resultaron positivos por FC. Por otra parte, 70 sueros que no reaccionaron a la FC, fueron identificados por IH.

Estas discrepancias tal vez sean explicables suponiendo que ambas pruebas identifican anticuerpos diferentes. Por otro lado, la distribución que muestra la Figura 1 indica que es más probable que descubran anticuerpos circulantes la prueba de FC que la de IH.

padecido una infección subclínica; 209 soldados (43%) tuvieron FC negativa.

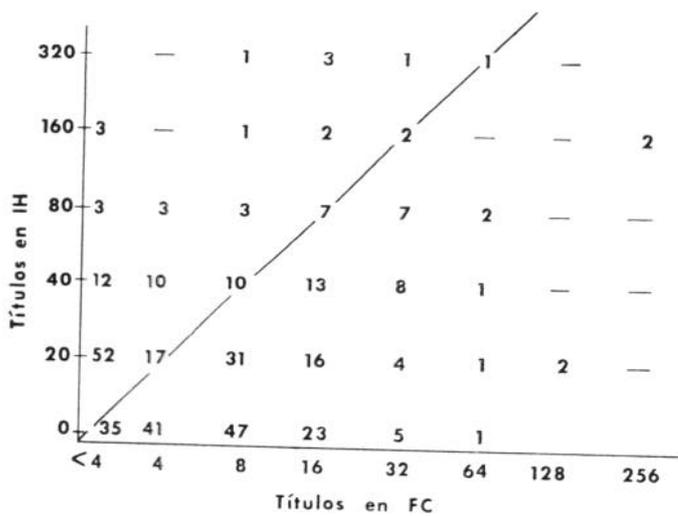
El Cuadro 2 presenta los resultados de la FC en relación con la edad en que los individuos manifestaron haber padecido la enfermedad. De acuerdo con esto, se agruparon en tres categorías.

Se observa en el Cuadro 2 que la distribución de negativos y positivos en los distintos grupos de edad es casi la misma, ya que las diferencias no son estadísticamente significativas ( $\chi^2 = 1,248$ ). Esto parece indicar que los anticuerpos FC perduran por largos períodos.

La última columna de la derecha muestra los porcentajes de positivos con títulos de anticuerpos igual o mayor de 1:8, en los tres grupos de edad. Como se ve, entre dicho tanto por ciento y el lapso transcurrido desde que se experimentó la enfermedad hay una correlación inversa. Si bien el número

Además, y en forma similar a lo hecho con los datos de FC, se hizo un análisis de los resultados de la prueba de IH en relación con la edad a que los individuos dijeron haber tenido parotiditis. Si bien la distribución de positivos en los tres grupos de edad tendía a ascender a medida que era menor el tiempo transcurrido desde que se padeció la enfermedad, estas cifras carecían de significado estadístico. Es decir, que según esta prueba, tenían la misma probabilidad de tener niveles identificables de anticuerpos,

FIGURA 1 — Relación de nivel de anticuerpos según IH y FC. Las cifras dentro del cuadrante corresponden al número de sueros.



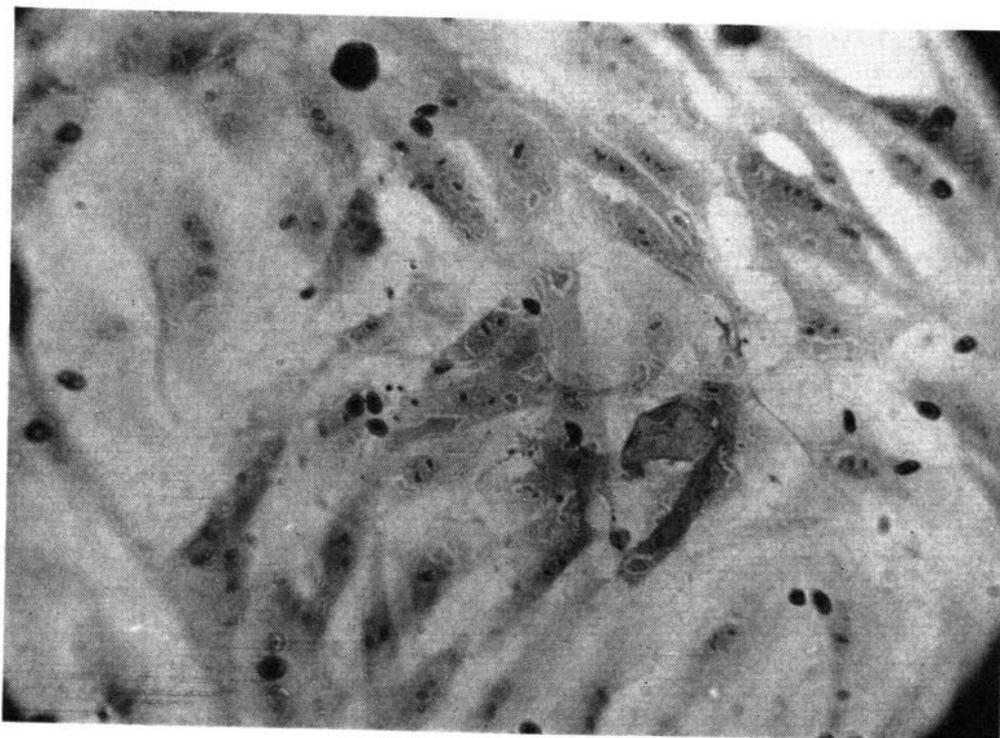
tanto los que habían tenido parotiditis en fecha reciente como los que la tuvieron en la niñez.

### Neutralización de la hemoadsorción

Conviene describir aquí algunos aspectos de la cepa Filadelfia 35 en cultivos de fibroblasto de embrión de pollo.

Ya desde el primer intento de propagación en este sistema, se observaron inclusiones citoplasmáticas eosinofílicas y formaciones sinciciales, al 4° ó 5° día de infección (Figura 2). Estas alteraciones, similares a las observadas por otros autores (10, 11) se visualizaban en preparaciones coloreadas; recién en cultivos frescos se manifestó un efecto citopático (ECP) patente, al 4° y sucesivos pasajes. Este ECP consistía en reducidos conglomerados de células refringentes, que, en pasajes posteriores, eran irregulares y difíciles de reproducir. Por lo tanto, no se consideró como criterio digno de confianza en una prueba de neutralización. Paralelamente a las alteraciones celulares mencionadas, se detectó por medio de la hemoadsorción la presencia del virus en los cultivos infectados, utilizando hematíes

FIGURA 2 — Fibroblastos de embrión de pollo infectados con *Mixovirus parotiditis*. Se observan inclusiones citoplasmáticas y sincicios.



de pollo. La hemoadsorción empezaba a evidenciarse al 2° día de inoculación, y ya al 5° día era intensamente positiva. Suspensiones de virus de diferentes pasajes en cultivo de tejidos, e incluso la preparación original derivada de huevos, dieron por hemoadsorción un título consistente de  $10^{-4.5}/0,2$  ml.

En consecuencia, se adoptó el criterio de la neutralización de la hemoadsorción para hacer esta prueba. De esta manera, el suero inmune de referencia dio un título de 1:64, frente a 320 DICT<sub>50</sub>.

De 420 sueros objeto de esta prueba, 194 (46%) fueron positivos y 226 (54%) negativos.

De 226 sueros negativos por neutralización, 92 reaccionaron positivamente a la FC, y de éstos, 60 acusaron títulos iguales a 1:8 ó mayores. Por otro lado, 43 sueros positivos por neutralización fueron negativos en FC.

Se observaron discrepancias de escasa importancia al comparar los resultados de la neutralización con los de la IH.

## RESUMEN Y CONCLUSIONES

Este estudio abarcó a 497 reclutas de 20 años incorporados a una unidad del ejército argentino estacionada en la ciudad de Córdoba, para su instrucción militar. Como otras unidades similares de dicha ciudad, ésta experimenta casi todos los años epidemias, a veces severas, de parotiditis.

De los 497 individuos, 391 (78,7%) acusaron una o más pruebas de laboratorio positivas, entre ellas la prueba cutánea, por lo que se considera que constituyen el grupo de "inmunes"; 99 (19,9%) dieron resultado negativo y, en consecuencia, pertenecen al grupo de los "no inmunes" o probables susceptibles, y en los 7 (1,4%) restantes no se completó el estudio.

Del grupo de los 391 "inmunes", 240 tenían historia positiva. Como se menciona en el texto, el total de soldados con antecedentes de parotiditis es de 274; de modo

que 240 fueron confirmados por el laboratorio (87,5%), lo que implica un alto índice de correlación e indica que el antecedente positivo fue, en este estudio, digno de confianza.

Por el contrario, de 223 individuos con historia negativa, en 150 (62%) se evidenció, por pruebas de laboratorio, el haber tenido infección previa. Este porcentaje es, sin duda, demasiado elevado para representar una incidencia real de infección inaparente. Parece más lógico suponer que la historia negativa, en el grupo estudiado, no fue fidedigna en un buen número de casos.

En las condiciones en que se hizo el estudio, la negatividad de la intradermorreacción (IR) acusó un escaso grado de correlación con los datos de índole serológica. De este modo, de 241 individuos con IR negativa, 132 dieron resultado serológico positivo a una o más pruebas. De los 59 soldados con pruebas cutáneas dudosas (eritemas de 10 a 14 mm. de diámetro), 46 fueron positivos a pruebas serológicas.

Cuando la IR fue positiva, los hallazgos serológicos acusaron correlación en 150 de 189 reclutas (79%). Pareciera que la IR positiva es un dato digno de crédito.

En el curso de un año de observación que abarcó esta encuesta, no ocurrieron casos de parotiditis en la unidad militar objeto del estudio.

Es posible que esto se haya debido al elevado número de "inmunes" en esta población. Por no haber habido brote epidémico, no se pudieron hacer otras correlaciones.

De esta investigación se deducen algunas recomendaciones sobre programas de vacunación de poblaciones de este tipo.

Con el propósito de elaborar un plan económico de inmunización se debe seleccionar, con ocasión de su ingreso en el ejército, a los probables susceptibles según la historia parotídica. Los individuos cuya historia es negativa, deben ser objeto de la prueba de intradermorreacción. Como lo indica la correlación serológica observada en este trabajo, parece ser suficiente considerar

positivos a la IR, a todo el que, a las 36-48 horas de inoculado, presente una zona de eritema de 10 mm. ó más.

De este modo, quedarían seleccionados de acuerdo con su historia e intradermorreacción los probables susceptibles a que se debe vacunar.

Quizás la época del año mejor para iniciar la inmunización sería mayo-junio, teniendo en cuenta que una primera dosis de vacuna de virus inactivado conferiría un período de resistencia a la infección de unos 6 a 8 meses. Como, por otra parte, las epidemias de parotiditis suelen ocurrir al final del invierno y en primavera, si en este lapso se observa el comienzo de un brote, la segunda dosis de vacuna se haría a una población parcialmente inmunizada.

De presentarse casos de parotiditis al comienzo del año de instrucción, el programa de vacunación debería iniciarse de inmediato, ya que, según parece, esto podría reducir la morbilidad.

Las autoridades sanitarias deben tener presente el número de posibles susceptibles en cada población, y de acuerdo con esto ajustar sus planes de vacunación.

#### Agradecimiento

Los autores expresan su reconocimiento al Capitán Dr. Juan Garimaldi, cuya cooperación facilitó este trabajo. De igual modo agradecen a la Eli Lilly and Co. el suministro de los antígenos y otros materiales utilizados.

#### REFERENCIAS

- (1) Communicable Disease Center. Manual for Course 8.20. Laboratory methods in the Diagnosis of Viral and Rickettsial Diseases. Atlanta, Ga., Estados Unidos, 1958.
- (2) Organización Mundial de la Salud. Comité de Expertos en Virosis del Aparato Respiratorio. Primer informe. *Ser. Inf. Técn.* No. 170, 1959.
- (3) Hirst, G. K.: The nature of virus receptors of cells. I. Evidence on the chemical nature of virus receptors of red cells and of the existence of a closely analogous substance in normal serum, *Jour. Exp. Med.*, 87:301, 1948.
- (4) Henders, J. F., y Habel, K.: En *Diagnostic Procedures for Virus and Rickettsial Diseases*, Asociación Americana de Salud Pública, New York, 1956.
- (5) Dulbecco, R., y Vogt, M.: Plaque formation and isolation of a pure line with poliomyelitis viruses, *Jour. Exp. Med.*, 99:167, 1954.
- (6) Eagle, H.: Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture, *Science*, 126:358, 1955.
- (7) Vogel, J., y Shelokov, A.: Adsorption-hemagglutination test for influenza virus in monkey kidney tissue culture, *Science*, 126:358, 1957.
- (8) Chanock, M. R.; Johnson, M. K.; Cook, M. K., y otros: The hemadsorption technique with special reference to the problem of naturally occurring simian para-influenza virus, *Am. Rev. Respiratory Diseases*, 83:125, 1961.
- (9) Henle, G.; Henle, W.; Wendell, K., y Rosenberg, P.: Isolation of mumps virus from human beings with induced apparent or inapparent infections, *Jour. Exp. Med.*, 88:223, 1948.
- (10) Gresser, I., y Enders, J. F.: Cytopathogenicity of mumps virus in cultures of chick embryo and human amnion cells, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 107:804, 1961.
- (11) Brandst, G. D.: Inclusion body formation with Newcastle disease and mumps viruses in cultures of chick embryo cells, *Virology*, 5:177, 1958.

#### Immunological Aspects of Mumps (*Summary and conclusions*)

This study covered 497 recruits aged 20 who were drafted into a Cordoba city unit of the Argentine army for military training. Like other

Cordoba units, this one is beset by epidemics of mumps almost every year and some of them are severe.

Of the 497 individuals examined, 391 (78.7%) gave positive reactions to one or more laboratory tests including the cutaneous test and for that reason were considered to be an immune group; 99 (19.9%) gave a negative reaction and consequently belong to the non-immune group or probably susceptible persons; and the remaining 7 (1.4%) did not complete the test.

Of the 391 persons in the immune group, 240 had a positive history. The total number of soldiers with a background of mumps was 274; in the case of 240 of them this was confirmed by laboratory tests (87.5%) which implies a high degree of correlation and shows that in this study a positive background was worthy of confidence.

On the other hand, of the 223 individuals with a negative history, 150 (62%) were shown by laboratory tests to have had a previous attack of the disease. This percentage is of course too high to represent the real incidence of inapparent infection. It is more logical to suppose that the negative history in the group studied was not reliable in a great many cases.

In the conditions under which the study was made, negative intradermal tests (IT) showed a very small degree of correlation with serological data. Thus, of the 241 individuals with a negative IT, 132 gave positive serological reactions to one or more tests. Of the 59 soldiers with doubtful cutaneous tests (erythemas measuring 10 to 14 mm. in diameter), 46 gave positive reactions to serological tests.

When the IT results were positive, the serological findings were correlated in 150 out of 189 recruits (79%). It would appear that a positive IT is a reliable finding.

In the course of one year of observation covered by this inquiry, no cases of mumps occurred in the military unit under study. This was

possibly due to the high number of immunes in the population. Since there were no epidemic outbreaks, it was not possible to make other correlations.

Some recommendations concerning vaccination programs for populations of this type may be deduced from this study.

In order to formulate an economic immunization plan, persons who are probably susceptible to this disease, according to their medical history, should be chosen when entering military service. Those individuals whose history is negative should be given the intradermal test. As is shown by the serological correlation reported in this paper, it appears sufficient to consider positive all persons who within 36 to 48 hours after inoculation show an area of erythema measuring 10 mm. or more.

In this way the probably susceptible persons who should be vaccinated would be chosen according to their clinical history and the intradermal test.

Perhaps the best time of the year to start the immunization program would be May-June, since the first dose of inactivated virus vaccine would confer resistance to the infection lasting for 6 to 8 months. As epidemics of mumps usually occur at the end of winter and in the spring, a second dose of vaccine should be given to the partially immunized population if an outbreak starts during this period.

If outbreaks of mumps occur at the beginning of the year of military service, the vaccination program should be started immediately since it appears that this would reduce morbidity.

The health authorities should ascertain the number of possible susceptible persons in the population and should adjust their vaccination plans accordingly.