

## ESTUDIOS PRELIMINARES SOBRE LA PRIMERA CEPA DEL VIRUS DE LA POLIOMIELITIS AISLADA EN MEXICO \*

ALEJANDRO VELASCO ZIMBRÓN

Académico de número

ENRIQUETA PIZARRO SUÁREZ Y GAMBA

MANUEL RAMÍREZ VALENZUELA

El Hospital de Nuestra Señora de Guadalupe, que tiene el doble aspecto de la atención de los niños con secuelas poliomiélicas, estableciendo un plan asistencial que abarca todos sus problemas, realiza también dentro de su programa puntos de investigación científica, unos ya terminados y otros todavía en evolución.

Uno de los temas que el Hospital investiga sobre la enfermedad de Heine Medin, es el aislamiento del virus, partiendo de materias fecales de enfermos con poliomiélitis.

La comunicación que presentamos a esta docta corporación comprende los trabajos preliminares que se han efectuado y las conclusiones a que hemos llegado.

### MATERIAL USADO

I. Materias fecales de enfermos con poliomiélitis; tomadas durante los primeros quince días de evolución de la enfermedad.

II. Cuatro monos adultos machos, de la especie *Macaca mulatta*, aproximadamente de 1½ años de edad y de 2.800 a 3 Kg. de peso.<sup>1</sup>

III. Conejos criollos de cinco meses de edad y de 2 a 2.500 Kg. de peso.

IV. Cobayos de dos a tres meses de edad y de 0.300 a 0.400 Kg. de peso.

V. Ratonos suizos de tres a cuatro semanas de edad y de 12 a 15 gramos de peso.

VI. Embriones de pollo de diez días de incubación.

VII. Medios de cultivo (aerobiosis y anaerobiosis).

\* Trabajo reglamentario leído en la sesión del 28 de mayo de 1952.

## TÉCNICA

Se emplearon tres muestras de materias fecales de enfermos con poliomielitis en estado agudo, tomadas dentro de los primeros quince días de la aparición de los síntomas, las cuales se purificaron para ser después inoculadas en el mono. Estas muestras se conservaron congeladas a  $-25^{\circ}$  C desde su recolección.

Las materias fecales se prepararon haciendo una suspensión de 5 a 10 gramos de heces en 50 c.c. de solución salina estéril.<sup>2</sup> Esta suspensión se agitó durante media hora, mecánicamente, y se dejó en refrigerador a  $4^{\circ}$  C, durante 24 horas. Después de ese tiempo se separó la capa sobrenadante y se desechó el sedimento. El sobrenadante se centrifugó media hora a 2,000 revoluciones por minuto. El sedimento resultante de esta centrifugación se separó y se conservó congelado a  $-25^{\circ}$  C, para ser después inoculado por vía intranasal. A la capa acuosa se le agregaron de 15 a 20 c.c. de éter y se agitó mecánicamente durante media hora. Esta agitación se repitió seis días, manteniéndola durante todo este tiempo a  $4^{\circ}$  C.; después se centrifugó a 2,000 revoluciones por minuto durante media hora, se separó la capa intermedia y se desecharon el sedimento y la capa superior. Se eliminó al éter aplicando vacío y se hicieron las pruebas de esterilidad bacteriológica, sembrando el material en gelosa sangre, caldo hígado, gelosa triptosa y caldo dextrosado. Durante todo este tiempo se conservó la suspensión, en el congelador, a  $-25^{\circ}$  C. Los resultados de los cultivos fueron negativos, lo que comprobó que la muestra se hallaba libre de bacterias.

Una vez efectuada la prueba de esterilidad bacteriológica, se descongeló el material y se separó en dos porciones: una para la inoculación intracerebral y la otra para la intraperitoneal. La porción que se separó para la inoculación intraperitoneal, se centrifugó durante media hora a 4,000 revoluciones por minuto en centrífuga refrigeradora. Se separó el sobrenadante que se conservó congelado hasta su inoculación. La otra porción se centrifugó a 4,000 revoluciones por minuto durante una hora en la misma centrífuga y el sobrenadante se conservó congelado; se repitieron las pruebas de esterilidad bacteriológica.

Las tres muestras estudiadas se trataron en la misma forma.

## INOCULACIÓN EN "MACACA MULATTA"

Cada una de las muestras se inoculó en un mono, y se empleó para ello inoculación múltiple.

Desde diez días antes de la inoculación se vigiló clínicamente al mono, por los métodos habituales, para saber si guardaba buena condición de salud. El día anterior a la inoculación se pesó y se le extrajeron 25 c.c. de sangre por punción cardíaca para conservar el suero como testigo negativo.

Al mono anestesiado se le aplicaron 0.8 c.c. del material purificado, por vía intracerebral. Para esto, se hizo una pequeña incisión en la piel rasurada de la cabeza, en la región frontal, cerca de la línea media, se trepanó eléctricamente el hueso y se introdujo el inóculo, del que se depositó 0.2 c.c. a 1 cm. de profundidad y el resto a una profundidad de 2.5 cm.; se cubrió la herida con tela adhesiva; inmediatamente después se le aplicaron 10 c.c. de la suspensión preparada para tal efecto, por vía intraperitoneal y 2 c.c. del primer sedimento separado, por vía intranasal.

El mono número 4 se inoculó en la misma forma que los anteriores.

### RESULTADOS

La primera muestra de materias fecales se inoculó en el mono número 1, usando la técnica antes indicada y, al no aparecer síntomas después de cinco días, se reinoculó tres veces por vía intranasal, cada tercer día.

#### *Inoculación en Macaca mulatta*

<i>M. mulatta</i> Nº	Material inoculado	Dosis y vía	Día de la aparición de los síntomas			
			Temblores	Fiebre	Paresia	Parálisis
1	Materias fecales purif. Muestra Nº 1	0.8 c.c. i-c 10.0 c.c. i-p 1.0 c.c. i-n 2.0 c.c. i-n 2.0 c.c. i-n 2.0 c.c. i-n	..	..	..	..
2	Materias fecales purif. Muestra Nº 2	0.8 c.c. i-c 10.0 c.c. i-p 2.0 c.c. i-n	4°	5°	8° I 9° III	9° I
3	Materias fecales purif. Muestra Nº 3	0.8 c.c. i-c 10.0 c.c. i-p 2.0 c.c. i-n	..	..	..	..
4	Suspensión al 10% de la medula Nº 2	0.8 c.c. i-c 5.0 c.c. i-p 1.0 c.c. i-n	5°	7°	9° I 10° III	10° I

I, ataque a un miembro; III, ataque a 3 miembros; i-c, intracerebral; i-p, intraperitoneal; i-n, intranasal.

Como se puede observar en el cuadro, los resultados de este primer intento fueron negativos; este mono se ha observado durante tres meses. Tampoco presentó ningún síntoma el mono número 3 inoculado con la tercera muestra de materias fecales.

El mono número 2, inoculado con la segunda muestra de materias fecales, presentó los primeros síntomas al quinto día después de la inoculación, que se manifestaron por una pequeña elevación de la temperatura:  $40.2^{\circ}\text{C}$ ; esta elevación se hizo más ostensible al sexto día:  $40^{\circ}\text{C}$ ; en el séptimo día se notaron temblores en la oreja izquierda, erizamiento de pelo, debilidad muscular de los miembros anteriores y disminución de la temperatura a  $40.2^{\circ}\text{C}$ ; al octavo, hubo paresia del miembro torácico izquierdo, anorexia y temblores de todo el cuerpo, y, al noveno, parálisis del miembro torácico izquierdo y paresia de los otros tres miembros, anorexia y postración. Se tomó sangre para los estudios serológicos que se efectuarán posteriormente y se sacrificó al mono. A la autopsia no se observaron alteraciones macroscópicas en las meninges, medula y encéfalo; se tomaron porciones de los engrosamientos cervical y lumbar, así como de la parte media de la medula dorsal, para estudios histológicos, y se hicieron cultivos en aerobiosis y anaerobiosis para comprobar la esterilidad bacteriológica, sin que se encontrase bacteria alguna en ellos. El resto del tejido nervioso se conservó en congelador a  $-25^{\circ}\text{C}$  para la investigación virológica. Este mono presentó los síntomas de poliomielititis, y llenó así el primer requisito para el reconocimiento de este virus en los animales inoculados.

En los estudios histológicos practicados en los segmentos de medula, el patólogo, doctor Dionisio Nieto, nos comunicó el haber obtenido los siguientes resultados:

“Tanto los cortes de medula lumbar, como los segmentos dorsal y cervical, presentan marcados signos de congestión. Todas las áreas de sustancia gris muestran fenómenos inflamatorios que son más intensos en las astas anteriores. Los vasos se encuentran infiltrados con polinucleares, linfocitos, histiocitos y algunos elementos microgliales. En el parénquima se observa una proliferación marcada de la microglia, sobre todo en las astas anteriores, y las células nerviosas presentan intensas alteraciones. Muchas de éstas se encuentran rodeadas por acúmulos de microglia, reproduciendo la imagen típica de la neuronofagia. En la sustancia blanca se encuentran también, aisladamente, algunos vasos infiltrados. Son muy escasos los fenómenos inflamatorios en la pía. De los tres niveles medulares que hemos estudiado, se encuentra mayor intensidad de las lesiones en la región lumbar. Estas observaciones han sido hechas en trozos de medula incluidos en celoidina y con el método de coloración de Nissl.”

Estos resultados nos demuestran otra vez la presencia de este virus por su acción sobre los tejidos.

Posteriormente, se hizo una suspensión de la medula al 10 por ciento, la que se inoculó por vía intracerebral y usando dosis altas, en conejos, cuyes y ratones, sin que se observase trastorno patológico alguno dos meses después de la inoculación. Se hicieron también inoculaciones por vía subdural en ratones, con el mismo resultado negativo, y se inoculó en embriones de pollo de diez días de incubación, por vía corioalantoidea, sin que causara ningún efecto en el desarrollo del embrión.

Esta misma suspensión se inoculó en un segundo mono (mono número 4) de 2.860 Kg. de peso. Para la inoculación intracerebral se diluyó esta suspensión al 1:2 y se inocularon 0.8 c.c. por esta vía; se le aplicaron 1 c.c. del sedimento de la suspensión por vía intranasal y 5 c.c. de dicha suspensión por vía intraperitoneal. Cuatro días después se presentó una ligera elevación de temperatura: 39.5°C; al quinto día volvió a su temperatura normal: 39.2°C, pero se notaron temblores en la oreja izquierda y disminución del tono muscular de los miembros torácicos; al sexto día la temperatura fué normal: 39.1°C, pulso normal y respiración un poco acelerada; al séptimo día hubo fiebre: 40.2°C, y respiración muy acelerada; al octavo día aumentó la fiebre: 41°C, se presentaron temblores en todo el cuerpo, erizamiento de pelo, catarro nasal ligero y respiración muy acelerada; al noveno día bajó un poco la fiebre: 40°C, y se notó una disminución franca del tono muscular del miembro torácico derecho, erizamiento del pelo y flexión del cuello hacia adelante; al décimo día bajó la fiebre: 40.3°C, y se presentaron parálisis flácida del miembro torácico derecho, incontinencia de orina y debilidad general; al undécimo día, temperatura normal: 39°C, parálisis flácida del miembro torácico derecho y parálisis parcial del miembro torácico izquierdo, debilidad y postración; al duodécimo día su estado general mejoró y se iniciaron algunos movimientos del miembro torácico izquierdo y recuperación completa de los miembros pélvicos; los músculos han mejorado progresivamente y la incontinencia de orina ha terminado.

A este mono no se le sacrificó, pues se le conserva para los estudios de neutralización del virus que se efectuarán más adelante. Se conserva el suero sanguíneo obtenido antes y después de la inoculación, que servirá para llevar a cabo dichas pruebas.

#### COMENTARIOS

En el presente trabajo se tomaron como pauta las premisas comentadas por Kessel, Moore, Stimpert y Fisk, 1941,<sup>3</sup> y por Trask y Paul y Melnick,

1943,<sup>4</sup> fueron satisfechas las condiciones impuestas por estos investigadores para establecer la conclusión de que un virus de poliomiélitis había sido aislado.

Que tengamos noticia, es la primera vez que en México y en Latino América se lleva a cabo el aislamiento del virus de la poliomiélitis. Para hacer esta afirmación se ha realizado una revisión minuciosa de la literatura que existe al efecto.

Ya otros investigadores: Moore y Kessel en 1943,<sup>5</sup> y Nelson en 1947,<sup>6</sup> han señalado los complejos procedimientos que existen para el manejo y aislamiento de estos virus.

El virus de la poliomiélitis es un organismo muy difícil de trabajar, debido principalmente a su especificidad. La necesidad de usar monos para las investigaciones ha detenido a muchos investigadores.

Es difícil aprender a llevar a cabo y analizar los experimentos en el mono. Es importante tener en cuenta, para los estudios cuantitativos, el riesgo de infección accidental, las inoculaciones previas, los efectos de la dilución del material, la conservación de éste, la edad y tamaño del animal y hasta la estación del año en que se trabaja, como lo señalan Kessel, Moore y Pait, 1946.<sup>7</sup>

Además, en los monos inoculados con diferentes cepas, hay diferencias en la gravedad de los síntomas, por lo que interesa conocer y dominar todos los factores para interpretar los resultados.

Indudablemente que no es posible afirmar si la cepa que se ha aislado en el Laboratorio de Palo Alto puede considerarse como una cepa autóctona, y sólo lo será después de los estudios que se vienen realizando desde el punto de vista inmunológico; esta investigación se practicará con las cepas descubiertas por Armstrong, 1939,<sup>8,9</sup> Kessel y colaboradores, 1946,<sup>10</sup> y por Bodian y colaboradores, 1949,<sup>11</sup> y que corresponden a las cepas de Lansing, León y Brunhilda. Para ello ya se ha estabilizado la cepa Lansing y sólo se incrementa el título del virus, como es de costumbre, a través de pases por ratones suizos; y se trata de establecer conexiones con las instituciones que vienen conservando las cepas León y Brunhilda para poder fijar la conclusión de si la cepa aislada en la ciudad de México corresponde a un nuevo tipo inmunológico.

Diversos puntos de investigación han sido planeados, partiendo del aislamiento del virus que se ha realizado: la posibilidad de hacer inoculaciones en los monos que existen en la República Mexicana, lo que facilitaría en gran parte las investigaciones, pues la adquisición de *Macaca mulatta* es bien difícil de realizar y, sobre todo, el animal es difícil de aclimatar a nuestro medio. La inoculación en otros animales como el hámster y el

murciélago y su cultivo en tejidos, está dentro del programa de investigación; desde el punto de vista histopatológico se practican investigaciones para mayor conocimiento de las lesiones producidas por el virus de la polio en los diferentes aparatos y sistemas y, desde el punto de vista de la prevención de la poliomiélitis, se trata de consolidar las investigaciones efectuadas.

### CONCLUSIÓN

En este trabajo se informa del aislamiento de una cepa de virus de poliomiélitis, realizado en la ciudad de México, en *Macaca mulatta*, llenando los requisitos indispensables que han sido señalados para la identificación del virus.

### RESUMEN

Se aísla por primera vez en México una cepa del virus de la poliomiélitis en *Macaca mulatta* partiendo de materias fecales de un paciente en el estado agudo de la enfermedad.

Se comprueba la identidad del virus por la parálisis producida en el mono, los estudios histológicos de la médula, su inocuidad para otros animales de laboratorio y embrión de pollo, y, por pase a un segundo mono en el que se reprodujeron los síntomas clásicos de la enfermedad.

### SUMMARY

A strain of the poliomyelitis virus is isolated, in *Macaca mulatta*, from fecal material of a patient in the acute stage of the disease, for the first time in Mexico.

The identity of the virus is confirmed by the paralysis produced in the monkey, the histological studies of the spinal cord, the innocuity to other laboratory animals and the chick embryo, and by passage to a second monkey in which all the classic symptoms of the disease were reproduced.

### RESUMÉ

On a isolé pour la première fois, au Mexique, une souche du virus de la polyomélie chez le *Macaca mulatta* en partant des matières fécales d'un malade en crise aiguë.

On vérifie l'identité du virus par la paralysie produite chez le singe, les études histologiques de la moelle épinière, l'innocuité chez les autres animaux de laboratoire et chez l'embryon de poulet.

L'innocuité du virus a été vérifiée chez d'autres animaux, mais il est actif chez un second singe dans lequel on a reproduit les syndromes classiques de la maladie.

## BIBLIOGRAFIA

1. The Care and Breeding of Laboratory Animals. John Wiley and Sons, Inc., 1-42, 1950.
2. Diagnostic Procedures for Virus and Rickettsial Diseases. Am. Public Health, Ass., 178-186, 1948.
3. Kessel, J., F. J. Moore, F. D. Stimpert y R. T. Fisk: J. Exp. Med., 74, 601-609, 1941.
4. Trask, J., J. Paul y J. Melnick: J. Exp. Med., 77, 531-544, 1943.
5. Moore, F. J., y J. F. Kessel: Am. J. Hyg., 38, 323, 1943.
6. Nelson, N.: J. Imm., 56, 311-316, 1947.
7. Kessel, J. F., F. J. Moore y C. F. Pait: Am. J. Hyg., 43, 82, 1946.
8. Armstrong, C.: Pub. Health Rep., 54, 1719-1721, 1939.
9. Armstrong, C.: Pub. Health Rep., 54, 2302-2305, 1939.
10. Kessel, J., F. J. Moore y C. F. Pait: Am. J. Hyg., 43, 82, 1946.
11. Bodian, D., J. M. Morgan y H. A. Howe: Am. J. Hyg., 49, 234, 1949.

**VOTO DE GRACIAS:** La realización de este trabajo fué facilitada por la cooperación amplia que prestaron los señores Dr. Gerardo Varela, Dr. Fernando Camargo, Lic. Oscar Flores y Dr. Lauro Ortega, así como el personal en general de los Laboratorios de Palo Alto.