

Artículos originales

AISLAMIENTO Y ESTUDIO DE CUATRO VIRUS COXSACKIE DE ENFERMOS DE POLIOMIELITIS

Prof. ADALBERTO STEEGER y Dres. GUILLERMO CONTRERAS y CELSO SANTIBANEZ

Cátedra Extraordinaria de Pediatría del Prof. A. Steeger — Hospital Avriarán — Instituto Bacteriológico de Chile

Hace un poco más de 4 años que se realizaron los aislamientos iniciales de un nuevo grupo de virus llamados posteriormente virus coxsackie o virus C (1, 2). Durante el tiempo transcurrido se ha comprobado que tales virus infectan con una gran frecuencia a la especie humana y su presencia se la ha verificado en muy distantes áreas geográficas (3 y 5).

Con frecuencia se los ha encontrado en materias fecales y lavados de la garganta de enfermos de poliomiélitis clínicas típicas, como también en casos de poliomiélitis no paralítica y así mismo en otros casos de variadas infecciones de carácter benigno.

También los virus C han sido aislados de muestras de alcantarillado y de moscas atrapadas durante el desarrollo de epidemias de poliomiélitis.

Una particularidad muy notoria de los virus coxsackie es su patogenicidad restringida al ratón recién nacido, la que decrece rápidamente al aumentar la edad de este huésped (6 y 7); en este animal produce principalmente extensa miocitis, que se traduce por parálisis de curso rápidamente fatal (7).

El rol patógeno del virus C en la especie humana aun no ha sido precisado con exactitud, salvo en ciertos cuadros clínicos bien definidos, como son:

1) En la herpangina o angina herpética, como lo han demostrado Hubne y colaboradores (8, 29, 30). Esta afección ya descrita en 1924 por Zahorski (31) como enfermedad específica ha sido analizada en su relación con el virus C y se ha demostrado que en el 80% de los casos se encuentra el virus C, tipo B (Hansen 32).

2) Enfermedad de Bornholm o pleurodi-

nia. En ella se ha encontrado especialmente un virus A en las deposiciones de estos enfermos y reacciones inmunológicas de importancia, en ausencia de otros agentes causales. Frindlay (33), Heller (11), Lazurus (34), Brown (35) han hecho trabajos extensos sobre esta materia. Van Crevelf (36) pudo comprobar el virus en las deposiciones, sangre, líquido, céfalo-raquídeo y garganta de niños afectados de pleurodinia. Nickamin (37) cree haber obtenido resultados espectaculares, en estos casos con tratamiento de aureomicina en la dosis de 30 mgrs. por kilo de peso.

La relación del virus C con otras entidades clínicas aun está en una etapa de investigación, por ejemplo:

1) En la meningitis aséptica, Keller y Vivell (38), en Alemania, han descrito la presencia del virus C. Otros autores lo han encontrado en el síndrome de Guillain Barré.

2) Las gripes de verano, fiebre de los 3 días o fiebre de causas desconocidas, en parte también serían provocadas por el virus C, sin embargo, esa etiología requiere aún de mayores estudios.

3) Trenderberg (39) y otros autores describen la presencia del virus C, tipo A en el músculo de un lactante de 7½ meses, operado de una fractura intra-uterina de la epífisis proximal femoral; es la primera vez que el virus es encontrado en el tejido humano, donde estuvo albergado durante, por lo menos, 7½ meses.

4) Gran parte de la literatura se ocupa de la presencia del virus C en síndromes paralíticos semejantes a la poliomiélitis, o bien, en cuadros poliomiélicos típicos.

En caso de encontrarse en estos cuadros clínicos ambos virus, es posible que el agen-

te causal sea uno solo (polio) y el otro sea sólo un germen acompañante no patógeno (virus C). Otros autores, Hansen (32) suponen que el virus C, tipo A, exagera la malignidad del virus de la poliomiélitis y que el tipo B lo atenuaría, porque lo encuentra en los cuadros leves. Dahlsbron (40) describe 2 casos de virus C en cuadros típicos de poliomiélitis con restitución ad integrum.

Si se encuentra sólo el virus C en ausencia del virus de la poliomiélitis, cuyo estudio sistemático es muy difícil, es posible establecer cierta relación entre el virus C y cuadros semejantes a poliomiélitis de evolución atípica.

El estudio etiológico (virus) inmunológico y epidemiológico podrá, en el futuro, establecer bases más sólidas para apreciar el rol patógeno del virus C en la especie humana.

Con el deseo de averiguar lo relacionado con la presencia del virus C en nuestro medio, decidimos realizar un estudio de conjunto, partiendo de nuestros enfermos de poliomiélitis hospitalizados en el Servicio de Infecciosos del Hospital Arriarán, en los cuales examinamos las muestras fecales y muestras de sangre en distintas épocas de su evolución.

Métodos y materiales. Las muestras de materias fecales son congeladas a 25 grados C, hasta el momento de ser preparadas para la inoculación. Para esto se descongelan, se muelen y se mezclan al 10 ó 20% con agua destilada en un molino eléctrico. En el agua se agregan 500 U. de penicilina y estreptomycinina por cc. y la suspensión se deja más o menos una hora a temperatura ordinaria. Luego se hace una centrifugación clarificante a 2.000 rpm. durante 20 minutos. El sobrenadante que resulta es, a su vez, centrifugado a 18.000 rpm. durante 30 minutos y a 2 grados de temperatura en una centrifuga refrigerada. Con este tratamiento se consigue eliminar la contaminación bacteriana siempre presente en tales muestras.

Del sobrenadante de las 18.000 rpm. se inocula, 0,03 cc. por vía intracerebral en 8 ratones de unos 7 grs. de peso y en 2 camadas de ratones blancos recién nacidos, los que reciben 0,03 cc. por vía subcutánea.

En los ratones se observa la aparición de signos de parálisis o de encefalitis y aquellos que los presentan son sacrificados con

éter. En la autopsia, junto con hacer los controles bacteriológicos necesarios, se extraen los órganos aparentemente afectados: en este caso el cerebro y los músculos. De estos órganos se parte para nuevos pasajes que se guardan en congelación a menos 25 grados C y se toman, además, muestras para histopatología.

De algunos de los pasajes posteriores se prepara antígeno para la fijación de complemento, usando torsos (músculos, huesos y médula) suspendidos en agua destilada al 20% y que provienen de ratones inoculados en el momento de nacer y que fueron sacrificados cuando, por lo menos, el 50% de ellos presentaron signos claros de parálisis (15-17). Los antígenos para fijación de complemento son luego parcialmente purificados mediante su precipitación con sulfato de protamina (16).

De las muestras de sangre recibidas se extrae el suero en la forma corriente y se le guarda congelado a menos 25 grados C, hasta el momento de ser usado.

Los sueros experimentales usados se han preparado hiperinmunizando ratones blancos adultos y empleando como vacuna los virus tipo obtenido del laboratorio Yale.

En el momento de usar los sueros, ya sea en fijación de complemento o en neutralización se descongelan, se diluyen e inactivan a 60 grados C por 20 minutos (5-17).

La prueba de fijación de complemento se ha hecho usando la técnica del micro-test, en el que se usan gotas de cada reactivo (16). El complemento es suero de cuyo liofilizado. La positividad es expresada en milímetros cúbicos de complemento fijado. La experiencia nos indica como específica en las condiciones empleadas la fijación de 0,2 o más milímetros cúbicos de complemento. La prueba de neutralización se ha hecho empleando la técnica de poner concentraciones crecientes de virus frente a una sola dilución de suero normal control y del o de los sueros que se investigan (4). Su resultado se expresa por la diferencia de título del virus en presencia de los sueros, o lo que lo mismo, por el número de dosis letal, 50% DL_{50} , del virus que los sueros son capaces de neutralizar. La neutralización de 100 ó más DL_{50} , tiene por lo general carácter específico (18).

Los estudios histológicos se han hecho en cerebro, hígado y especialmente en

músculos, usando las técnicas habituales de preparación, corte, inclusión y tinción.

Estas investigaciones se iniciaron en el verano del presente año, recurriendo al examen sistemático de las deposiciones y de la sangre de todos los enfermos que llegaron a nuestros servicios de poliomiélitis.

De un total de 53 enfermos llegados hasta el 4 de mayo de 1953, los resultados positivos los hemos encontrado sólo en 4 de ellos y cuyas historias clínicas son las siguientes:

Caso N° 1. P. V. Niño de 9 meses con 8.500 grs. de peso traído desde Curacautín al Hospital Arriarán el 18 de febrero, a los 9 días de haber comenzado su afección, que se manifestó por fiebre, que solamente dura un día, por malestar y dolores generalizados, sudoraciones moderadas y diarreas desde el tercer día, época en que se le comprueba una parálisis flácida del miembro inferior izquierdo, que al día siguiente se extiende al miembro inferior derecho y al hombro izquierdo, con arreflexias correspondientes. Al 9º día se agrega una parálisis facial periférica y al 10º un compromiso de los músculos de la nuca y del hombro derecho.

Se le indica el tratamiento acostumbrado y a los 22 días de enfermedad se aprecia una regresión de la parálisis facial y poco después de la musculatura del hombro derecho; en el hombro izquierdo no hubo recuperación. En cuanto a los miembros inferiores sólo se observó en ellos una rehabilitación en el muslo derecho, quedando el miembro inferior izquierdo en las mismas condiciones de su ingreso. El líquido céfalo-raquídeo examinado a los 10 días de enfermedad dió una albuminosis de 0.38 y una reacción leucocitaria de 28 elementos por mm.³.

Las deposiciones examinadas al 11º día revelaron la presencia del virus Coxsackie. La sangre examinada ese mismo día dió un resultado negativo con respecto a la presencia de anticuerpos neutralizantes; pero en la muestra tomada a los 54 días se encontraron anticuerpos neutralizantes.

Diagnóstico: Polioencefalomiélitis. Infección virus Coxsackie.

Caso N° 2. M. V. Niño de 9 meses con 7.860 grs. de peso, que vive en Santiago y que se hospitaliza el 11 de marzo de 1953 después de 5 días de enfermedad, que se inicia con fiebre que se prolonga durante 15 días. Al 2º día de enfermedad se presenta la parálisis flácida, que compromete ambos miembros inferiores con abolición de los reflejos patelar y plantar; todo esto fué precedido de abundantes sudoraciones, vómitos y dolores generalizados.

Su tratamiento consistió en compresas húmedas calientes en forma continuada y después en la movilización pasiva. La recuperación comenzó a manifestarse a los 10 días de estada, pero únicamente en el miembro inferior derecho, quedando el izquierdo sin ninguna actividad.

El líquido céfalo-raquídeo examinado al 7º día dió una albuminosis de 0.45 y una leucocitosis de 21 elementos por mm.³.

El examen de deposiciones practicado al 7º día reveló el virus Coxsackie y la sangre tomada a los 21 días fué positiva con respecto a la presencia de anticuerpos.

Un nuevo control de líquido céfalo-raquídeo a los 23 días dió una albuminosis de 0.35 y solamente 4 elementos por mm.³.

Diagnóstico: Poliomiélitis en forma espinal. Infección virus Coxsackie.

Caso N° 3. J. O. Niño de 1 año 2 meses con 9 kilos de peso, residente en Santiago, que es ingresado al servicio el 8 de abril, después de 2 semanas de enfermedad, que le produce fiebre durante 10 días, abundantes sudoraciones, vómitos y dolores generalizados. Al 6º día presenta parálisis flácida del miembro superior izquierdo, al 7º parálisis del miembro inferior izquierdo y al 9º del miembro inferior derecho con pérdida de los reflejos respectivos. En su examen de ingreso se le comprueba, además, compromiso de los músculos abdominales izquierdos y solamente parálisis de ambos deltoides.

Se le trata en la forma acostumbrada y se observa una recuperación completa de la musculatura de ambos hombros, pero parcial en los miembros inferiores y nula en la musculatura abdominal. A los 49 días se comprueba, además, un compromiso de la musculatura intercostal, felizmente de carácter fugaz y sin mayor compromiso en la mecánica respiratoria.

El líquido céfalo-raquídeo examinado a los 18 días dió una albuminosis de 0.40 y una leucocitosis de 39 elementos por mm.³.

Las deposiciones correspondientes al 17º día demostraron la presencia de virus Coxsackie.

Diagnóstico: Poliomiélitis espinal (respiratoria). Infección con virus Coxsackie.

Caso N° 4. F. E. Niño de 1 año que pesa 9.100 grs., residente en Lo Espejo, que llega al Hospital el 2 de mayo de 1953, al 5º día de enfermedad, que se inicia con escalofríos, decaimiento, vómitos, constipación y fiebre durante 2 días. Al 3.er día presenta parálisis flácida del miembro superior derecho y parálisis facial derecha. Al 8º día parálisis del diafragma derecho. Poco después presenta algunos trastornos respiratorios que se tratan con oxígeno, estimulantes cardíacos y penicilina, esta última a modo preventivo. En la tercera semana vuelve a presentar alza febril acompañada de un compromiso de los músculos aductores del miembro inferior derecho, pero de rápida evolución.

La parálisis facial desapareció a los 25 días de enfermedad y la parálisis diafragmática ya no fué comprobada en el control radioscópico practicado a los 43 días de iniciada su enfermedad. No hubo recuperación de la musculatura del miembro superior izquierdo.

El líquido céfalo-raquídeo examinado a los 8 días sólo dió un leucocito por mm.³. Las deposiciones examinadas ese mismo día demostraron la existencia en ellas de virus Coxsackie.

Diagnóstico: Polioencefalomiélitis. Infección virus Coxsackie.

Las historias precedentes nos presentan 4 enfermos afectados de poliomiélitis clínica típica con instalación de la parálisis dentro de la primera semana. El líquido céfalo-raquídeo demostró las alteraciones que habitualmente se describen en estos casos. La edad de los enfermos oscila alrededor del año y en cuanto a su procedencia cabe es-

tablecer que 2 son de la capital, uno de sus alrededores y otro del sur del país.

En dos de estos niños hubo compromiso de los núcleos de los nervios craneales y en uno de ellos se produjo, además, una complicación del mecanismo respiratorio local.

La evolución fué la observada corrientemente en esta enfermedad, iniciándose la recuperación de algunos miembros o grupos musculares en épocas también variables y con resultados también diferentes.

PROCEDENCIA	EDAD	DIAS ENFERMEDAD	FIEBRE	PARALISIS			DIAGNOSTICO	DEPOSICIONES	SANGRE	RECUPERACION		
				3º	4º	9º						
P.V. CURACAUTIN	9m.	9	1.	3º M.I.I.	4º M.I.D. DELTOIDES I.D.	9º FACIAL I	POLIOMIE- CEFALO- MIELITIS	11º día COX. + 19- <u>II</u> .	11º día (-) 54º + 15- <u>IV</u> .	13º FACIAL	23º DELTOIDES II	
M.V. SANTIAGO	9m.	4.	10.	2º M.I.I.D.			POLIOMIE- LITIS ESPINAL	7º día COX. + 13- <u>III</u> .	21º día + 27- <u>III</u>	10º M.I.D.		
J.O. SANTIAGO	1 AÑO	15.	10.	6º M.S.I.	7º M.I.I.	8º M.I.D.	9º AROD- MINA- LES INTER- COSTA- LES	POLIOMIE- LITIS ESPINAL RESPIRA- TORIA.	17 día COX. + 9- <u>IV</u> .		49º M.S.I.	
F.E. LO ESPEJO	1 AÑO	5.	5.	3º M.S.I. FACIAL D.	8º DIAFRAG- MA I.		17º M.I.I.D.	POLIOMIE- CEFALO- MIELITIS (RESPIRA- TORIA)	8º día COX. + 4- <u>V</u> .		25º FACIAL M.I.I.D.	43º DIAFRAG- MA

Resultados. El cuadro N° 1 nos demuestra que todas las deposiciones, salvo las de J. O., fueron obtenidas más bien precozmente en el curso de la enfermedad. También resulta claramente que sólo las muestras de sangre de P. V. y F. E. han sido obtenidas en tiempo adecuado para buscar apareamiento o alzas significativas de anticuerpos. La de M. V. es única a los 20 días y la primera de J. O. es relativamente tardía en el curso de la enfermedad.

En el cuadro N° 2 vemos el resultado de las inoculaciones en ratones recién nacidos. Vemos que en general en la primera inoculación algunos de los animales inoculados mostraron signos de enfermedad después de un período de incubación, que se extiende entre los 6 y los 10 días. De estos primeros animales se obtiene material para estudio histológico y para siembra en medios de cultivos adecuados para el desarrollo bacteriano. De la histología se hablará más adelante. La búsqueda de agentes bacterianos fué negativa.

CUADRO N° 2
RESULTADOS DE LAS INOCULACIONES
EN RATONES RECIEN NACIDOS

MUESTRA	P.V.	M.V.	J.O.	F.E.	
1º PASAJE	RESULTADO PERIODO DE INCUB. MEDIO	8/12 (3) ^a 8 DÍAS	8/14 (7) 6-8 DÍAS	3/4 (2) 10-5 DÍAS	3/11 (3) 8-3 DÍAS
2º PASAJE	RESULTADO PERIODO DE INCUB. MEDIO	9/9 (9) 4 DÍAS	8/8 (8) 2-7 DÍAS	14/14 (13) 3 DÍAS	23/23 (14) 2 DÍAS
3º PASAJE	RESULTADO PERIODO DE INCUB. MEDIO	9/9 (9) 2 DÍAS	16/16 (9) 3 DÍAS	nh ^{b,c}	10/10 (14) 3-6 DÍAS
4º PASAJE	RESULTADO PERIODO DE INCUB. MEDIO	nh	20/20 (14) ^d 2 DÍAS	nh	10/10 (14) 2 DÍAS
TITULO ^e		10 ^{6.4}	10 ^{6.7}	10 ^{6.7}	nh

^a Número de animales muertos / Número de animales inoculados. Entre paréntesis, el número de animales con signos de enfermedad.
^b nh significa: no ha sido hecho.
^c De este pasaje del virus M.V. se hizo una filtración, ver detalle en el texto.
^d Título expresado como la menor concentración de virus capaz de dar la DC₅₀.

La enfermedad observada es una parálisis que suele comenzar en uno u otro miembro, que aparece inmóvil en extensión o flectado; o en la nuca con imposibi-

lidad para levantar la cabeza, etc. La parálisis es progresiva sin afectar mayormente el estado nutritivo y produce postración, en general cianosis y luego la muerte en unas 24 a 48 horas después de iniciada.

En el cuadro N° 2 podemos apreciar que en general, en los pasajes posteriores, la mortalidad es de 100% y se acorta el período de incubación. El poder patógeno de estos virus para el ratón recién nacido se le puede apreciar por los títulos de virulencia que van indicados en la última línea y que fluctúan entre el $10^{-0.4}$ y $10^{-0.7}$ expresados como las mayores diluciones, capaces de dar la dosis letal 50%. Los títulos indicados están entre las cifras que se observan corrientemente entre los virus Coxsackie (7).

De los torsos de los ratones del 4º pasaje de M. V. se hizo una titulación de virulencia, que dió el valor indicado de $10^{-0.7}$, de esta misma titulación se filtró la dilución 10^{-8} por una membrana de colodión preparada en nuestro laboratorio y que aun cuando no ha sido exactamente calibrada, experiencia previa nos indica que no permite en general el paso de bacterias; permite, en cambio, el paso del virus de vacuna (de unos 250 milimicrones de diámetro) y, por lo tanto, debe permitir el paso de todos los virus de pequeño tamaño, entre los que se encuentran los virus C. En nuestro experimento se observó que todos los ratones inoculados con la dilución 10^{-8} murieron a los 4 y 5 días de inoculados y 3 de ellos alcanzaron a ser observados con la parálisis característica. Esto nos indica que si hubo una pérdida del título del virus por la filtración, ésta fué despreciable, o lo que es lo mismo, que el virus M. V. filtró satisfactoriamente por un filtro cuyos poros retienen bacterias.

En el cuadro N° 3 vemos el resultado de las otras inoculaciones practicadas. La muestra P. V., la primera ensayada, que dió claros signos de encefalitis en los ratones de 8 grs. inoculados por vía intracerebral. Como veremos luego, este virus pertenece a uno de los escasos virus C que tienen cierta patogenicidad para ratones mayores. Sin embargo, ya en el segundo pasaje el poder patógeno había bajado al límite de lo perceptible y sólo para ratones no mayores de 4 semanas de edad. El resultado de uno muerto entre 6 inoculados del

CUADRO N° 3
RESULTADOS DE OTRAS INOCULACIONES PRACTICADAS

MUESTRA	RATON ADULTO			EMBRION DE POLLO			CULTIVO DE TEJIDOS
	1º PASAJE	2º PASAJE	3º PASAJE	VIA JACO-VITELINO	VIA MEM. CORIOALANTOIDEA		
					10 Días	21 Días	
P. V.	0/8 (7)	4/8 (1)	nh ^{KK}	(-)	(+) ^{KK}	(-)	INCIERTO ^{KK}
M. V.	nh	nh	1/6 (1)	(-)	(-)	nh	"
J. O.	0/6	0/3	nh	(-)	(-)	nh	"
F. E.	0/8	nh	0/7	nh	nh	-	nh

^{KK} Leyenda igual que para el cuadro N° 2

^{KK} En algunas membranas se observaron algunas pequeñas lesiones, mas detalles en el texto

^{KK} Resultado incierto por las lesiones no típicas observadas.

tercer pasaje de M. V., no alcanza a tener significación y se explica por las diferencias de edad que existen en los grupos de animales inoculados. Los resultados de J. O. y F. E. están perfectamente encuadrados en lo que es habitual.

La inoculación en embriones de pollo de 7 días de incubación, por vía saco-vitelino, fué negativa, en cuanto a que no produjo mortalidad de los embriones y que éstos no presentaron signos de enfermedad al ser sacrificados y examinados a los 10 días de la inoculación. Tampoco era apreciable una reducción en el peso, comparándolos con embriones no inoculados de la misma edad, mantenidos en iguales condiciones y sacrificados el mismo día. El primer pasaje del virus P. V. en membrana corioalantoidea produjo, en 2 de las 6 membranas inoculadas, el desarrollo de lesiones puntiformes, de aspecto proliferativo y de muy pequeño tamaño. Tales lesiones no fueron visibles en las inoculaciones de los virus M. V., J. O., ni en el segundo pasaje de P. V. (19, 20).

El resultado de la inoculación en tubos de cultivo de tejidos es incierto, porque todavía no hay experiencia suficiente que indique si hay o no multiplicación de los virus C en las células presentes en los tubos de cultivo de tejidos humanos (21, 23).

Cuando se tenía evidencia de que los torsos de ratones recién nacidos, en general provenientes de los pasajes segundo a cuarto, contenían el virus en alto título, se procedía a la elaboración de antígenos para fijación de complemento, tal como se ha indicado antes.

Estos antígenos se ponen en contacto, puros, con los sueros de los 12 tipos antígenicos de virus Coxsackie de que se dis-

pone. Los sueros se usan al 1: 4 y el complemento, en cantidades que permitan asegurar la especificidad de la reacción. Esto lo hemos resumido en el cuadro N° 4 y así vemos que el antígeno P. V. cruzó en forma satisfactoria con el suero Easton-14 y fué negativo con los 11 restantes. El antígeno M. V. lo hizo con el suero Easton-2; el de J. O. con el suero Easton-10 y el antígeno del virus F. E. no ha cruzado con ninguno de los 12 sueros, aun cuando se han usado dos preparaciones distintas de antígeno.

CUADRO N° 4
RESULTADOS DE LAS PRUEBAS SEROLÓGICAS

ANTIGENO O VIRUS	FIJACION DE COMPLEMENTO SUEROS				NEUTRALIZACION DE 10000 u. INJ. 1:800 CON SUERO
	EASTON-14	EASTON-8	EASTON-10	RESTO (1)	
P.V.	++++ ¹⁰	-	-	-	EASTON-14
M.V.	-	++++	-	-	EASTON-2
J.O.	-	-	++++	-	EASTON-10
F.E.	-	-	-	-	nb

(1) La siguiente es la lista del resto de los sueros que dieron resultados negativos.
P.V., Easton-1, Easton-3, Easton-7, Easton-9, Easton-11, Easton-12, Easton-13, Easton-15, Easton-16, Easton-17, Easton-18, Easton-19, Easton-20, Easton-21, Easton-22, Easton-23, Easton-24, Easton-25, Easton-26, Easton-27, Easton-28, Easton-29, Easton-30, Easton-31, Easton-32, Easton-33, Easton-34, Easton-35, Easton-36, Easton-37, Easton-38, Easton-39, Easton-40, Easton-41, Easton-42, Easton-43, Easton-44, Easton-45, Easton-46, Easton-47, Easton-48, Easton-49, Easton-50, Easton-51, Easton-52, Easton-53, Easton-54, Easton-55, Easton-56, Easton-57, Easton-58, Easton-59, Easton-60, Easton-61, Easton-62, Easton-63, Easton-64, Easton-65, Easton-66, Easton-67, Easton-68, Easton-69, Easton-70, Easton-71, Easton-72, Easton-73, Easton-74, Easton-75, Easton-76, Easton-77, Easton-78, Easton-79, Easton-80, Easton-81, Easton-82, Easton-83, Easton-84, Easton-85, Easton-86, Easton-87, Easton-88, Easton-89, Easton-90, Easton-91, Easton-92, Easton-93, Easton-94, Easton-95, Easton-96, Easton-97, Easton-98, Easton-99, Easton-100.

(2) Se ha trabajado con suero control y con suero de animales enfermos que se fijó con el antígeno correspondiente. Control de complemento y control negativo, prueba de fijación del complemento tipo.

En la mitad derecha del cuadro vemos los resultados de la prueba de neutralización realizada con cada uno de los 3 primeros virus frente al suero con el cual cruzó en fijación de complemento. Podemos observar que los resultados son francamente satisfactorios, pues la neutralización de tal número de DL⁵⁰ (más de 10.000) es considerada como indicación de que existe identidad entre el antígeno (virus) y su anticuerpo correspondiente.

CUADRO N° 5

PRUEBA DE NEUTRALIZACION CON LOS SUEROS DE P.V.

SUEROS	VIRUS P.V.				VIRUS EASTON-14			
	TITULO DEL VIRUS	DIF. RENCIA	INDICE DE NEUTRALIZACION	RESULTADO	TITULO DEL VIRUS	DIF. RENCIA	INDICE DE NEUTRALIZACION	RESULTADO
CABALLO NORMAL	6.7	-	-	-	7.5	-	-	-
P.V. AGUDO	6.0	7	3	NEGAT.	>5.0	<2.5	<320	NEGAT.
P.V. CONVAL.	2.8	3.9	8.000	POSIT.	3.0	4.5	32.000	POSIT.
EASTON-14	<2	>4.7	>8000	POSIT.	2.5	50	100.000	POSIT.

1. El título del virus se ha indicado como el valor recíproco del logaritmo de la menor concentración de virus que da la DL₅₀ en ratones recién nacidos.
2. Diferencia en logaritmos entre el título del virus frente al suero control de caballo normal y frente al suero a investigar.

En el cuadro N° 5 vemos los resultados de una prueba de neutralización en que se

usaron los virus P. V. y Easton-14, por un lado, y los sueros de P. V. del período agudo de la enfermedad y de la convalecencia, junto con el suero control de caballo normal y el suero experimental hiperinmune Easton-14. En la mitad izquierda aparecen los resultados con el virus P. V. y a derecha los correspondientes al virus Easton-14. En la primera columna se ha anotado el título del virus inoculado en ratón recién nacido en presencia de los sueros indicados. En la segunda columna se indica la diferencia expresada en logaritmos entre los sueros investigados y el control. En la tercera columna va el número correspondiente a tal logaritmo o índice de neutralización. El resultado que va a continuación del índice muestra que el suero del período agudo de la enfermedad no produjo neutralización del virus P. V., aislado del enfermo, en cambio, el suero convaleciente revela tal propiedad en un alto grado. Es natural que el suero Easton-14, hiperinmune posea un índice de neutralización todavía más alto. La presentación de los resultados para el virus Easton-14 es igual y los resultados obtenidos son similares.

CUADRO N° 6

PRUEBA DE NEUTRALIZACION CON EL SUERO M.V.

SUEROS	VIRUS M.V.			
	TITULO DEL VIRUS	DIFERENCIA	INDICE DE NEUTRALIZACION	RESULTADO
CABALLO NORMAL	6.2	-	-	-
M.V. CONVALESCIENTE	3.9	2.9	800	POSITIVO
EASTON-2	2.0	4.8	63.000	POSITIVO

Igual leyenda que para el cuadro N° 5

En el cuadro N° 6 se presenta una prueba de neutralización con el virus M. V. realizada en forma parecida a aquella descrita en el cuadro N° 5. En el caso de M. V. el único suero disponible evidenció un índice de neutralización francamente positivo de 800.

Discusión. De lo hecho más arriba descritos se desprende que de 4 enfermos de poliomiélitis clínica típica se han aislado 4 virus, que por sus características parecen corresponder al grupo Coxsackie.

Los 4 virus mostraron poder patógeno principalmente para ratón recién nacido, en el que produjeron parálisis progresiva y fatal. El tipo de la parálisis es en cierta medida característico; pero de ninguna

manera patognomónico. Esta parálisis se puede distinguir de aquella producida por la cepa MEF de poliomielitis adaptada a ratón recién nacido y de la encefalitis con mayor o menor grado de parálisis producida por el virus de herpes simple en el mismo huésped. Además, estos 2 últimos virus producen lesiones en el sistema nervioso central, que son las causantes de las parálisis. En el caso de los 4 virus descritos en este trabajo la parálisis se ha debido a extensas miositis observables en numerosos grupos musculares.

Histológicamente las lesiones consisten en una marcada degeneración hialina, degeneración de Zencker, de las miofibrillas, la que va acompañada de gran infiltración de polimorfonucleares, linfocitos, etc. Este tipo de lesiones aparece en los músculos de los 4 casos examinados y un ejemplo de ellas se muestra en las figuras 2 y 3. La descripción arriba descrita se refiere a los hechos observados con los 4 virus aislados y es evidente su parecido con la descripción de las lesiones histológicas descritas anteriormente para los virus Coxsackie (7, 24, 25). Cabría sólo agregar que cuando las dosis de virus C son pequeñas y los animales padecen una enfermedad de mayor duración, se alcanza a observar, al lado del proceso destructivo descrito, fenómenos de regeneración. También en algunos tipos de Coxsackie se han descrito lesiones en otros órganos (25). Como los virus aislados aquí no corresponden a ninguno de esos tipos, no pareció necesaria la búsqueda de otras lesiones.

Una característica muy notable y de interés teórico de los virus Coxsackie, es la patogenicidad restringida al ratón recién

nacido y que disminuye rápidamente al aumentar este huésped de edad (7). Sólo hacen excepción a esta regla algunos tipos de virus C, que revelan un poder patógeno para ratones hasta de 4 semanas de edad (7, 26). Una de tales excepciones aparece ilustrada en las dos primeras inoculaciones de la muestra P. V. Sin embargo, es apreciable aun en ese caso, que junto con aumentar notablemente la patogenicidad para ratones recién nacidos, el virus P. V. la perdía para los animales mayores.

Las inoculaciones de los otros 3 virus fueron negativas para el ratón adulto. Fueron así mismo negativas las inoculaciones en embriones de pollo por vía saco-vitelina y en la membrana corioalantoidea. Por el momento no se puede dar mayor importancia al hallazgo de algunas lesiones pequeñas en la primera inoculación en membrana con el virus P. V. (20).

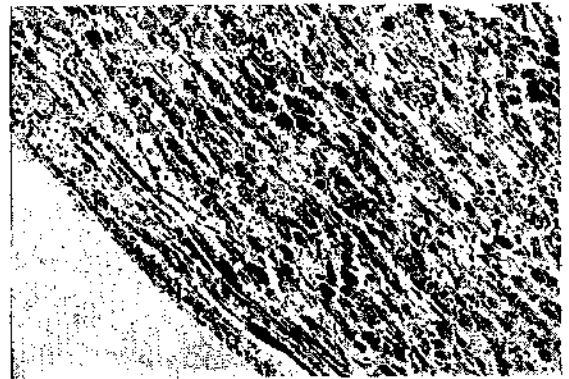


Fig. 2. Músculo de ratón recién nacido inoculado con el virus P. V.; se aprecia degeneración hialina de las miofibrillas e infiltración celular x 100.

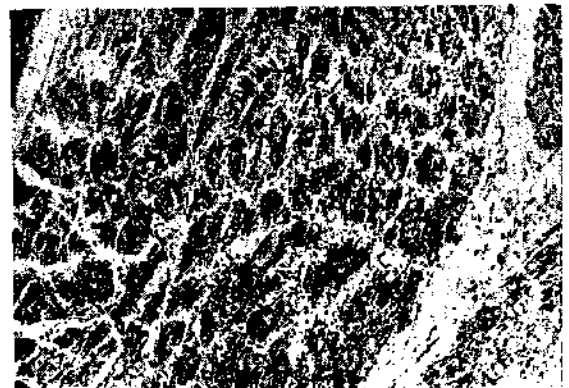


Fig. 3. Músculo de ratón recién nacido (distinto del de la figura 2), inoculado con el virus P. V. Se aprecian las mismas alteraciones, pero con mayor intensidad x 280.



Fig. 1. Músculo de ratón recién nacido normal x 40.

En otros laboratorios se ha investigado la posibilidad de multiplicación de distintos tipos de virus C en cultivos de testículos de mono y se ha encontrado que sólo uno o dos virus C muestran tal capacidad en forma evidente (21, 23). Sin embargo, existe la sospecha de que si se emplean "in vitro" tejidos humanos en lugar de los tejidos de mono, los virus C pudieran multiplicarse e interferir con las búsquedas que se hacen del virus de poliomiélitis, para las cuales se ha usado y se usa cultivo de tejidos humanos.

Es conveniente hacer notar que en los primeros animales que enfermaron al ser inoculados con tales muestras, se hizo una búsqueda de agentes bacterianos, la que fué negativa en cada uno de los 4 casos.

La filtración del agente patógeno P. V. tiende a confirmar la impresión que se tenía desde el comienzo de que tal agente patógeno era del orden de tamaño de los virus filtrables.

Las relaciones antigénicas que 3 de los 4 virus aislados han mostrado con 3 tipos antigénicos distintos y bien establecidos de virus Coxsackie, apoyan la suposición de que los aislamientos hechos corresponden a tal grupo. El resultado obtenido en cada caso con prueba de fijación de complemento fué corroborado por una prueba de neutralización, con la cual, además, se consiguió descartar la presencia de algún otro virus presente en el antígeno. Es importante hacer notar que los 3 virus que han cruzado lo han hecho con 3 distintos tipos antigénicos de virus C.

Se estudia actualmente la posibilidad de que el virus F. E., que no ha demostrado cruce antigénico, represente un tipo distinto, aun cuando no se puede descartar el hecho de que la negatividad se deba a otra rayón.

La prueba de neutralización hecha con los sueros de P. V. nos indica que el paciente, al comenzar su enfermedad, no tenía anticuerpos para tal virus y que a los 65 días de iniciada la poliomiélitis había desarrollado un alto título de anticuerpos para el propio virus P. V. y para el prototipo respectivo. Lo anterior parece indicar que el niño, junto con infectarse con el virus de poliomiélitis, de lo cual clínicamente no cabe ninguna duda, se infectó con este otro virus, única manera de explicar el apareamiento de anticuerpos en tal

alto título. En el otro caso estudiado en esta forma, el de M. V., el resultado sólo nos permite decir que a los 20 días de enfermedad había anticuerpos neutralizantes.

El hecho de que enfermos como el lactante P. V. haya hecho simultáneamente 2 infecciones a virus lleva a considerar el rol patógeno de los virus Coxsackie en la especie humana. Su relación con la poliomiélitis ha sido muy debatida y aun no es posible asignar a los virus C un papel preciso en la poliomiélitis (13, 14). Su carácter etiológico aparece bien demostrado en las herpanginas (8, 9) y tal vez en las pleurodinias (10, 11). También se han encontrado los virus C en muchos otros cuadros no tan bien caracterizados, como gripes de verano, mialgias, meningitis asépticas, etc. (7).

Queda, sin embargo, el interrogante de si un virus tan repartido en la especie humana no pueda encerrar un considerable poder patógeno potencial para el hombre. En el campo de los virus existen ya pruebas de que agentes provenientes de búsquedas sistemáticas en varias partes del globo, que por un tiempo mostraron sólo poder patógeno para algunos animales de laboratorio, en determinado momento dieron origen a enfermedades de mayor o menor gravedad en la especie humana (27, 28). Tales desajustes del equilibrio entre huésped y agente infeccioso se deben probablemente a mutaciones de estos últimos y toda la moderna experiencia en medicina preventiva apunta hacia la necesidad de estar preparados para contingencias futuras.

Resumen

1. Se han aislado 4 virus de las materias fecales de 4 lactantes en período agudo de poliomiélitis clínica típica.
2. Los virus aislados tienen los caracteres de los virus del grupo Coxsackie.
3. Para 3 de ellos se ha establecido mediante fijación de complemento y neutralización el parentesco antigénico con 3 tipos distintos de virus Coxsackie. El virus restante presenta todos los caracteres de virus C; pero no ha cruzado con ninguno de los 12 prototipos investigados.
4. En los sueros de un paciente se pudo demostrar el apareamiento de anticuerpos neutralizantes en el curso de la enfermedad para el virus propio y para el Coxsackie prototipo respectivo. En otro paciente se de-

mostró la presencia de tales anticuerpos para el virus propio y el Coxsackie respectivo en la única muestra de sangre disponible.

5. Se ha discutido el hallazgo de estos virus, sus caracteres y relaciones con el grupo Coxsackie y su posible poder patógeno.

Summary

4 viruses from the feces of 4 infants have been isolated, during the acute period of typical clinical poliomyelitis.

The isolated virus have the characteristics of the virus in the Coxsackie group.

For 3 of them there has been established through fixation of complement and neutralization the antigenic relationship with 3 different types of Coxsackie virus. The remaining virus presents all the characteristics of virus C; but has not reacted with any of the 12 prototypes already investigated.

In the serum of a patient the appearance of neutralizing antibodies could be demonstrated during the course of the illness for the virus proper and for the respective Coxsackie prototype. In another patient there was demonstrated the presence of these antibodies for the virus proper and the respective Coxsackie in the only sample of blood disposable.

The finding of these viruses, their characteristics and relationships with the Coxsackie group and its possible pathogenic role have been discussed.

BIBLIOGRAFIA

1. DALDORF, G. and SICKLES, G.—*Science* 108: 61, 1948.
2. MELNICK, J. L., SHAW, E. W. and CURNEN, E. C.—*Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 71: 344, 1949.
3. BANKER, D. D. and MELNICK, J. L.—*Am. J. Hyg.* 54: 383, 1950.
4. MELNIK, J. L. and LEDINKO, N.—*J. Exp. Med.* 92: 463, 1950.
5. CONTRERAS, G., MELNICK, J. L. and BARNETT, V. H.—*J. Immunol.* 69: 393, 1952.
6. MELNICK, J. L.—*Bull. N. Y. Acad. Med.* 26: 342, 1950.
7. MELNICK, J. L. and CURNEN, E. C.—*Viral and Rickettsial Infections of Man*, edited by T. M. Rivers, J. B. Lippincott Co. 2nd. edition. 1952.
8. HUEBNER, R. J., COLE, R. M., BEEMAN, E. A., BELL, J. A. and PEERS, J. H.—*J. Am. Med. Asan.* 145: 628, 1951.
9. PARROT, R. H., ROSS, S., BURKE, F. G. and RICE, E. G.—*New England J. Med.* 245, 275, 1951.
10. CURNEN, E. C.—*Bull. N. Y. Acad. Med.* 26: 335, 1950.
11. WELLER, T. H., ENDERS, J. F., BUCKINGHAM, M. and FINN, J. J.—*J. Immunol.* 65: 337, 1950.
12. MELNICK, J. L. and LEDINKE, N.—*J. Exp. Med.* 92: 463, 1950.
13. RHODES, A. J., CLARK, E. M., KNOWLES, D. S., SHIMADA, F. S., RITCHIE R. C., DONOHUE, W. L., ARMSTRONG, M. P., WILSON, F. H., MC LEAC, W. J. and SILVERTHORNE, N.—*Can. J. Pub. Health* 41: 183, 1950.
14. MELNICK, J. L., KAPLAN, A. S., ZABIN, E., CONTRERAS, G. and LARKUM, N. W.—*J. Exp. Med.* 94: 471, 1951.
15. MELNICK, J. L., LEDINKO, N., KAPLAN, A. S. and KRAFT, L. M.—*J. Exp. Med.* 91: 185, 1950.
16. KRAFT, L. M. and MELNICK, J. L.—*J. Exp. Med.* 92: 483, 1950.
17. CONTRERAS, G. and MELNICK, J. L.—*J. Immunol.* 70: 473, 1953.
18. SMADEL, J. E.—*Viral and Rickettsial Infections of Man*, edited by T. M. Rivers, J. B. Lippincott Co. 2nd edition. 1952.
19. HUEBNER, R. J., RANSON, S. E. and BEEMAN, E. A.—*Pub. Health Rep.* 65: 803, 1950.
20. GODENNE, M. O. and CURNEN, E. C.—*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 81: 81, 1952.
21. SLATER, F. A. and SYVERTON, J. T.—*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 74: 509, 1950.
22. RIORDAN, J., LEDINKO, M. and MELNICK, J. L.—*Am. J. Hyg.* 55: 339, 1952.
23. CONTRERAS, G.—*Trabajos no publicados.* 1951.
24. MELNICK, J. L. and GODMAN, G. C.—*J. Exp. Med.* 93: 247, 1951.
25. GODMAN, G. C., BUNTING, H. and MELNICK, J. L.—*Am. J. Path.* 28: 223, 1952.
26. GOBLUM, N.—*Informe personal.* 1951.
27. SMADEL, J. E. and WARREN, J.—*J. Clin. Invest.* 26: 1197, 1947.
28. GOBLUM, N.—*Informe personal en relación al rol patógeno del virus Nilo Oeste demostrado recientemente.* 1953.
29. HUBNER, R. J., ARMSTRONG, C., BEERMAN, E. A. and COLE, R. M.—*J. A. M. A.* 144: 609, 1950.
30. BREEFS, BIGESSE, S. S., WARREN, J., HUBNER, R. J.—*G. Bact.* 64: 737, 1951.
31. ZAHORSKY.—*Arch. Pediat.* 41: 181.
32. HANSEN, MONATXI.—*J. Quinder* 101: 277, 1953.
33. FRINDLAY.—*Brit. Med. J.* 1: 1233, 1950.
34. LAZANUS.—*Am. J. Public Health.* 42: 20, 36.
35. BROWN.—*Lancet* 475: 1952.
36. VAN CREVELD.—*Arch. Franc. Pediatie* 9: 689, 1952.
37. NICKAMIN.—*J. A. M. A.* 148: 1002, 1952.
38. KELLER und VIVÉLE.—*R. Wochenshif* 30: 289, 1952.
39. TRENDERBERG, ROULET and NICOLE.—*A. Pediat.* 178: 150, 1952.
40. DAHLSTRON.—*Acta Pediat.* 40: 235, 1951.