

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

## Aislamientos de poliovirus vacunal y respuesta inmune con diferentes dosis de vacuna oral antipoliomielítica

*Dr. Pedro Más Lago,<sup>1</sup> Dra. Janepsy Díaz,<sup>2</sup> Dr. Manuel Díaz Gonzalez,<sup>3</sup> Dr. Ángel Goyenechea Hernández,<sup>4</sup> Dr. Julio Barrio Olivera,<sup>5</sup> Lic. Magile Fonseca Quintana,<sup>6</sup> Lic Luis Morier Díaz,<sup>7</sup> Lic. Luis Sarmiento Pérez<sup>8</sup> y Téc. Rosa Palomera Puente<sup>9</sup>*

### RESUMEN

Se estudiaron muestras de heces y sueros obtenidos en niños menores de 3 años de edad para incrementar el conocimiento de las circulaciones de los virus vacunales durante las campañas masivas. El uso de vacuna oral antipoliomielítica (VOP) con esquemas de campañas masivas, permite la circulación del virus vacunal 2 meses después de concluidas estas. El empleo de esquemas de vacunación continua permite la circulación del virus vacunal a períodos de tiempo mayor e incluso, en poblaciones con baja cobertura de inmunidad, pueden surgir brotes epidémicos de los virus derivados de la vacuna. El total de poliovirus vacunal aislados en los niños de 2 años (11 casos, 11,0 %) y las reactivaciones de anticuerpos neutralizantes (51 casos, 51,0 %), demuestran una contradicción entre la verificación de las infecciones por aislamientos de los virus y los resultados de reactivación. Los bajos porcentajes de aislamientos de virus vacunal y los porcentajes significativamente altos de seroconversiones o reactivaciones a poliovirus, permiten inferir la ocurrencia de circulación silenciosa. La circulación silenciosa autolimitada a los 2 meses de concluida la campaña es debida, entre otras causas, a la respuesta inmune, homóloga o no, inducida por la infección primaria con la primera dosis de la VOP y por las infecciones secundarias. La autolimitación de la circulación de los poliovirus en campañas masivas es una excelente prevención de los riesgos que representan los virus derivados de la vacuna surgidos en vacunaciones con esquemas continuos.

**Palabras clave:** Poliomieltis, poliovirus, vacuna oral antipoliomielítica, inmunización, seroconversión, circulación silenciosa, Cuba.

Desde la aprobación de la resolución para la erradicación mundial del poliovirus salvaje, meta trazada en 1988 por la Asamblea Mundial de la Salud y la Organización Mundial de la Salud, que debía cumplirse para finales del año 2000,<sup>1</sup> la incidencia de la poliomieltis ha disminuido sustancialmente. Este plan ha debido prolongarse hasta el año 2005. Si en el año 2004 se erradicara la circulación del poliovirus salvaje, habrá que continuar durante un tiempo más con una política

y estrategia de inmunización en los países, los cuales tienen muchas diferencias ambientales, de recursos económicos, organización y posibilidades de los sistemas de salud. En última instancia, la decisión se tomará de acuerdo con los resultados de investigaciones, dirigidas a dar respuestas a varias incógnitas relacionadas con la circulación del poliovirus vacunal, su regresión de la atenuación y los sistemas más efectivos para contener la circulación de los poliovirus.

<sup>1</sup> Doctor en Ciencias Médicas. Especialista de II Grado en Microbiología. Investigador de Mérito.

<sup>2</sup> Especialista de I Grado en Epidemiología.

<sup>3</sup> Especialista de II Grado en Epidemiología.

<sup>4</sup> Especialista de II Grado en Microbiología. Investigador Titular.

<sup>5</sup> Máster en Virología. Especialista de I Grado en Microbiología.

<sup>6</sup> Máster en Virología. Licenciado en Microbiología.

<sup>7</sup> Licenciado en Microbiología. Investigador Auxiliar.

<sup>8</sup> Máster en Virología. Licenciado en Microbiología. Investigador Agregado.

<sup>9</sup> Técnico en Microbiología.

Se nombra “brotes silenciosos” de poliovirus a una forma de circulación incógnita. Esta se manifiesta cuando en una población con alta cobertura de vacunación, no se presentan manifestaciones clínicas de parálisis flácidas y se obtienen aislamientos de poliovirus derivados de la vacuna (PDV) en las aguas albañales que proceden de esas poblaciones.<sup>2</sup> Desde 1989 hasta 1996 se han reportado 4 “brotes silenciosos” en Israel, 3 fueron producidos por poliovirus salvajes tipo 1 y uno por el tipo 3. Posteriormente se ha reportado otra circulación “silente”, en este caso de PDV tipo 2.<sup>3</sup> Un cambio de 8,3 % de nucleótidos en la región P1 de la cápsida se ha estimado toma un tiempo de circulación de aproximadamente 6 años. Los cambios antigénicos, así como la virulencia observada en ratón transgénico permiten inferir la peligrosidad de esta cepa.

Otras circulaciones prolongadas de poliovirus derivados de la vacuna (cPDV) en poblaciones con bajas coberturas de inmunización, se han detectado por la presentación de formas clínicas de la enfermedad como en Egipto,<sup>4</sup> República Dominicana,<sup>5,6</sup> Filipinas<sup>7</sup> y Madagascar.<sup>8</sup> En estos países con PDV, se presentan o no formas clínicas de acuerdo con altas o bajas coberturas de inmunidad por vacuna oral antipoliomielítica (VOP). Además, tienen en común características como las malas condiciones higiénicas, climas tropicales y estrategias de vacunación con VOP de formas continuas solas o asociadas a las campañas masivas de vacunación (NIDs, siglas del inglés *national immunization days*).

En Cuba, durante 42 años se ha mantenido el programa antipoliomielítico, basado exclusivamente en la estrategia de 2 dosis de VOP administradas en campañas masivas durante 1 semana cada una. Con esta estrategia se ha demostrado que la circulación de los poliovirus (vacunal y salvaje) dura no más de 2 meses después de concluida la campaña de vacunación (generalmente en el mes de junio). Hasta febrero del próximo año, con el inicio de la nueva campaña, se inicia la circulación del polio vacunal, lo cual se ha demostrado con varias investigaciones por métodos serológicos y virológicos.<sup>9-12</sup> En previas publicaciones se presentó la circulación silenciosa autolimitada de poliovirus vacunal en las campañas masivas, demostradas por la interferencia con enterovirus no polio.<sup>13,14</sup>

Los objetivos de esta publicación consisten en: a) demostrar la interrelación entre respuesta inmune y aislamiento de poliovirus vacunal con distintas dosis de VOP, b) verificar la existencia de circulación silenciosa autolimitada de poliovirus vacunal demostrada por respuesta en niños con anticuerpos previos inducidos por la VOP y c) evaluar la circulación silenciosa autolimitada de los poliovirus vacunales en campañas masivas y la prevención de las cPDV.

## MÉTODOS

*Universo:* el universo esta constituido por los niños menores de 1 año y los de 2 años de edad residentes del área de salud Cristóbal Labra, del municipio La Lisa en Ciudad de La Habana. Los niños fueron vacunados con las 2 dosis de VOP administradas en campañas masivas de vacunación en el año 2001.

*Muestras de heces fecales (HF):* del universo fueron seleccionados al azar 50 niños de cada grupo; se obtuvo la voluntariedad de los padres o tutores por escrito para ser incluidos en la investigación. De cada niño se obtuvieron 2 muestras de HF. Las primeras muestras fueron recogidas 4 semanas después de la primera dosis en la campaña de vacunación. Las segundas muestras fueron recogidas con el mismo tiempo después de la segunda dosis. Las muestras fueron tomadas por las madres en frascos estériles y transportados al consultorio médico, donde se mantuvieron a + 4 °C. Fueron transportadas en frío hasta el Instituto de Medicina tropical “Pedro Kourí” (IPK), conservándose a - 20 °C hasta ser investigadas.

*Muestras de sueros y determinación de anticuerpos neutralizantes:* en los 50 niños de 2 años de edad se obtuvieron 3 muestras de sangre por punción del talón del pie, las cuales fueron absorbidas en papel de filtro marca Advantec, facturada por Toyo Rishi Kaisha, Ltad, Japón. La primera muestra de sangre se obtuvo antes de la primera dosis en esa campaña. Las segundas y terceras muestras fueron obtenidas 4 semanas después de la primera y segunda dosis de VOP (en los niños de 2 años correspondieron a las quinta y sexta dosis de VOP). El papel de filtro con la sangre se dejó secar unos 5-10 min y se identificaron por escrito en el propio papel. Los

papeles con las muestras de sangre absorbidas fueron conservados a + 4 °C hasta ser trabajados. La elución de la muestra fue realizada según las instrucciones al papel de filtro Advantec; se obtuvo una dilución de 1:10 con solución salina buferada (PBS) que contenía antibióticos de uso y concentraciones habituales. La determinación de anticuerpos neutralizantes a los poliovirus se realizó por el método recomendado por el Programa Ampliado de Inmunización de la OMS según las modificaciones reportadas anteriormente.<sup>12,15</sup>

*Aislamientos e identificación de los poliovirus:* los aislamientos de los poliovirus fueron realizados con los métodos recomendados por la OMS, con algunas modificaciones.<sup>15</sup> De cada muestra de heces se realizó una suspensión a 20 % con PBS que contenía antibióticos. La suspensión fue tratada con cloroformo utilizando una décima del volumen y clarificada por centrifugación a 10 000 rpm en una centrífuga Eppendorf. El sobrenadante fue inoculado en células de Rhabdomiosarcoma (RD), utilizando 0,2 mL de cada uno en 2 tubos. Los tubos fueron incubados a 37 °C y examinados diariamente para detectar la presencia del efecto citopatogénico (ECP) por observación microscópica. Los tubos que mostraron ECP fueron congelados y descongelados y pasados para nuevos tubos. El tiempo total de observación de los tubos fue de 12 d y si no se presentaba ECP se informaban las muestras como negativas. Las muestras que causaron ECP se pasaron a 2 tubos de células L20B. En los casos que se mantuvo el ECP se procedió a identificar el tipo del poliovirus mediante neutralización del aislamiento, utilizando mezcla de sueros hiperinmunes de los tipos 1+2, 1+3, 2+3 y 1+2+3 que contenían 50 unidades neutralizantes de cada tipo y 100 TCD<sub>50</sub> (rango de 32-320) de cada aislamiento. Los aislamientos que no fueron neutralizados con los sueros hiperinmunes a poliovirus no se procedieron a neutralizarlos con sueros de otros enterovirus.

#### DEFINICIONES DE TÉRMINOS

*Seroconversión:* cuando se presenta un título por debajo de 1:10 en el suero obtenido antes de administrada la VOP y 4 semanas después se incrementó el título hasta 1:20 o más.

*Reactivación:* cuando se tenía un título en suero de 1:10 o más y 4 semanas después de administrada la VOP se incrementó 4 veces o más.

*Cálculos de los títulos promedio geométricos (TPG):* para obtener los TPG fueron considerados exclusivamente los sueros que tenían títulos 1:10 o más.

*Análisis estadísticos:* para el análisis de tablas con porcentajes se utilizó el programa Epidat. En la comparación de los TPG se utilizó la prueba t de Student.

## RESULTADOS

El porcentaje de aislamientos de poliovirus vacunal fue de 88,0 % en los niños menores de 1 año, de los cuales se obtuvieron las muestras de heces en la cuarta semana después de la primera dosis de VOP. El aislamiento que predominó fue el de poliovirus tipo 1 (42,0 %), seguido por el tipo 2 (30,0 %) y por último el tipo 3 (16,0 %). Los aislamientos después de la segunda dosis de VOP fueron de 14 poliovirus (28,0 %), de los cuales predominó el tipo 3 con 9 cepas (18,0 %), seguidos con el tipo 1 (6,0 %) y el tipo 2 (4,0 %). La diferencia entre los aislamientos después de la primera y la segunda dosis fue altamente significativa (p con corrección de Yates = 0,002). Los aislamientos en las muestras después de la quinta y sexta dosis fueron muy bajos (12,0 y 10,0 %, respectivamente), y el predominante fue el polio tipo 3. Los aislamientos en niños menores de 1 año, 4 semanas después de recibidas las primera y segunda dosis de VOP, fueron significativamente más altos que los obtenidos en los niños de 2 años después de haber recibido la quinta y sexta dosis (p con corrección de Yates = 0,02) (tabla 1).

Los porcentajes de anticuerpos neutralizantes a los poliovirus tipos 1 y 3 se incrementaron en ambos de 83,7 % antes de la quinta dosis hasta 91,8 y 95,9 %, respectivamente, después de la sexta dosis.

En 12 niños se detectaron 30 pruebas que dieron anticuerpos neutralizantes que significa con título menor de 1:10, de los cuales 17 aparecieron antes de la quinta dosis, 6 antes de la sexta dosis y 7 después la sexta dosis. En un niño se demostraron títulos menores de 1:10 en los 3 sueros a los 3 poliovirus después de las 6 dosis de vacuna.

**TABLA 1.** Poliovirus aislados en niños menores de 1 año y 2 años según dosis de VOP-T y tipos de virus

Edad	Dosis	No. casos	Polio 1	Polio 2	Polio 3	Total
< 1 año	1ra.	50	21 (42,0 %)	15 (30,0 %)	8 (16,0 %)	44 (88,0 %)
< 1 año	2da.	50	3 (6,0 %)	2 (4,0 %)	9 (18,0 %)	14 (28,0 %)
2 año	5ta.	50	2 (4,0 %)	1 (2,0 %)	3 (6,0 %)	6 (12,0 %)
2 año	5ta.	50	2 (4,0 %)	1 (2,0 %)	3 (6,0 %)	6 (12,0 %)
2 año	6ta.	50	0 (0,0 %)	1 (2,0 %)	4 (8,0 %)	5 (10,0 %)
Total		200	26 (13,0 %)	19 (9,5 %)	24 (12,0 %)	69 (34,5 %)

**TABLA 2.** Porcentaje de casos con anticuerpos neutralizantes  $^3$  1:10, según número de dosis, tipo de poliovirus y título promedio geométrico (TPG)

Polio	n	Antes 5ta. dosis			Después 5ta. dosis			Después 6ta. dosis		
		Inmune	%	TPG <sup>1</sup>	Inmune	%	TPG <sup>2</sup>	Inmune	%	TPG <sup>3</sup>
P 1	49	41	83,7	49,0	45	91,8	59,7	45	91,8	99,3
P 2	49	48	97,9	102,2	48	97,9	193,0	48	97,9	343,9
P 3	49	41	83,7	34,4	48	97,9	54,2	47	95,9	107,4

Polio 1: 1-2 p= 0,34; 2-3 p= 0,04; 1-3 p= 0,001.

Polio 2: 1-2 p= 0,01; 2-3 p= 0,02; 1-3 p≤ 0,000001

Polio 3: 1-2 p= 0,03; 2-3 p= 0,005; 1-3 p≤ 0,000001

**TABLA 3.** Porcentaje de casos sin reactivación según número de dosis de OPV-T, tipo de virus y título promedio geométrico (TPG)

Polio	n	No cambios inmunológicos	%	TPG (1 S.) <sup>a</sup>	TPG (2 S.) <sup>b</sup>	TPG (3 S.) <sup>c</sup>
P 1	49	34	69,4	60,6	48,9	59,2
P 2	49	25	51,0	151,0	160,0	174,5
P 3	49	27	55,1	45,9	48,2	47,2

a = sueros antes 5ta. dosis. b = sueros después 5ta. dosis. c = sueros después 6ta. dosis.

Polio 1: a-b p= 0,2; b-c p= 0,2; a-c p= 0,9

Polio 2: a-b p= 0,8; b-c p= 0,7; a-c p= 0,6

Polio 3: a-b p= 0,8; b-c p= 0,9; a-c p= 0,9

**TABLA 4.** Porcentaje de casos con reactivación según número de dosis de OPV-T, tipo de virus y título promedio geométrico (TPG)

Polio	n	Sueros con reactivación <sup>a</sup>	%	TPG (1 S) <sup>b</sup>	TPG (2 S) <sup>c</sup>	TPG (3 S) <sup>d</sup>
P 1	49	11	22,4	27,4	66,2	300,4
P 2	49	24	48,9	69,2	232,9	718,0
P 3	49	16	32,6	22,8	64,4	281,0

a = Incrementó 4 veces o más el título. b = sueros antes 5ta. dosis. c = sueros después 5ta. dosis. d = sueros después 6ta. dosis.

Polio 1: b-c p= 0,08; c-d p= 0,01; b-d p< 0,000001

Polio 2: b-c p= 0,0006; c-d p= 0,001; b-d p< 0,000001

Polio 3: b-c p= 0,004; c-d p= 0,0007; b-d p< 0,000001

**TABLA 5.** Porcentajes de casos con seroconversión con 5 ó 6 dosis de VOP-T según tipo de polio y los título promedio geométrico (TPG)

Polio	n	Seroconversión <sup>a</sup>	%	TPG (1 S) <sup>b</sup>	TPG (2 S) <sup>c</sup>	TPG (3 S) <sup>d</sup>
P 1	49	4	8,2	< 1:10	75,6	269,1
P 3	49	6	12,2	< 1:10	63,5	201,3

a: Seroconversión es incremento del título < 1:10 antes de VOP-T y título 1:20 o más 4 semanas después. b= sueros antes 5ta. dosis. c= sueros después 5ta. dosis. d= sueros después 6ta. dosis.

Los niños con anticuerpos neutralizantes a poliovirus tipo 2 constituyeron 97,9 % desde antes de la quinta dosis hasta después de la sexta dosis de VOP (tabla 2).

En el estudio serológico realizado a los 49 niños de 2 años de edad, se encontró que para los poliovirus tipo 1, 2 y 3 en 34, 25 y 27 sueros sin reactivación, respectivamente, los TPG registrados antes de la quinta dosis y posteriores a las quinta y sexta dosis no mostraron diferencias significativas ( $p > 0,2$ ) (tabla 3). Por el contrario, se observó reactivación a los polios tipos 1, 2 y 3 en 11, 24 y 16 determinaciones de anticuerpos neutralizantes, respectivamente (tabla 4). De estas 51 reactivaciones a los 3 poliovirus, 27 se produjeron por la quinta dosis y 24 por la sexta (datos no mostrados). De las 27 reactivaciones producidas por la quinta dosis solo en 4 (14,8 %) se alcanzó el más alto título 4 semanas después de la sexta dosis (datos no demostrados). En las reactivaciones se elevó el TPG a polio 1, 2 y 3 desde 27,4, 69,2 y 22,8, respectivamente, antes de la quinta dosis, hasta 300,4, 718,0 y 281,0 en los sueros obtenidos después de la sexta dosis ( $p < 0,000001$  a los 3 poliovirus).

En 8 niños que tuvieron 10 seroconversiones, 6 fueron a polio tipo 3 y 4 a polio tipo 1 (tabla 5). De las seroconversiones se produjeron 9 por la quinta dosis. En 6 de estas seroconversiones el título mayor de anticuerpos neutralizantes se alcanzó 4 semanas después de la quinta dosis y 3 en la sexta.

## DISCUSIÓN

En Cuba predominó el aislamiento del poliovirus tipo 2 hasta 1992, año en el cual se cambió la VOP de fórmula 0,5-0,2-0,3 por la que tiene 1,0-0,1-0,6 de los poliovirus tipos 1, 2 y 3 respectivamente.<sup>9,11</sup> Sin embargo, a pesar del predominio de los aislamientos de los poliovirus tipos 1 y 3, los anticuerpos al poliovirus tipo 2 tuvieron TPG significativamente más alto ( $p \leq 0,0007$ ) y el porcentaje en el suero antes de la quinta dosis también fue más alto.

En las muestras de sueros obtenidas antes de la quinta y la sexta dosis de VOP existieron 23 determinaciones que dieron títulos menores de 1:10 (12 a polio 1, 2 a polio 2 y 9 a polio 3). Las

reacciones por debajo de 1:10 se produjeron en 12 niños. De las 17 reacciones con título  $< 1:10$  en los sueros antes de la quinta dosis se produjeron 9 seroconversiones (52,9 %): 3 a polio 1 y 6 a polio 3. De las 6 reacciones con iguales títulos antes de la sexta dosis, se produjo una seroconversión (16,7 %) a polio 1. La diferencia de la cantidad de seroconversión entre la quinta y sexta dosis pudiera explicarse por el incremento a 9 semanas del intervalo en la campaña el año 2001. Desde 1970, las campañas de vacunación tienen un intervalo de unas 6 semanas. El porcentaje menor de la seroconversión por sexta dosis pudiera explicarse por el incremento de la circulación de enterovirus no polio ocurrido a las 7-8 semanas después de campañas masivas de VOP. El porcentaje de seroconversión por la quinta dosis fue menor que 80,0 % obtenido en niños "triple negativos" en 1971-1972.<sup>11</sup> Sin embargo, la gran diferencia radica en el número bajo de aislamientos de virus homólogo en niños con seroconversiones que tienen anticuerpos previos a 1 ó 2 serotipos de polio. En esta investigación se obtuvieron aislamientos homólogos solamente en 10,0 % de las seroconversiones (1:10) y la excreción de poliovirus ocurrió en uno de los 2 niños que tenía previamente anticuerpos a un solo serotipo de polio. En un niño no se observó seroconversión a ningún poliovirus después de 6 dosis de VOP. Por entrevista con el médico del niño se informó que existen antecedentes clínicos de inmunodeficiencias.

*Lu CY* y otros<sup>16</sup> reportaron 11,0 % de aislamiento 28 d después de la vacunación con 2 dosis de vacuna inactiva contra la poliomieltis (VIP) (2 y 4 meses) y 2 dosis de VOP (6 y 18 meses), lo cual fue significativamente inferior a 28,0 % encontrados con igual dosis de VOP en los niños menores de 1 año ( $p$  con corrección de Yates = 0,02). La diferencia con estos resultados podría explicarse por la mayor sensibilidad de los sistemas de aislamientos aquí en este estudio o quizás por el incremento de la inmunidad intestinal en los casos estudiados por *Lu CY* debido a la administración de VIP previa a las 2 dosis de VOP.

En la revisión realizada por *Alexander* y otros<sup>17</sup> se ha reportado que el intervalo de 15 d posteriores a los primeros signos de parálisis es el tiempo con mayores posibilidades de aislamientos si los pacientes han tenido antes vacunación con vacuna

inactivada o infección a otro poliovirus. En este trabajo se han obtenido las muestras en un tiempo similar (3-4 semanas) al recomendado por *Alexander*, si se tiene en cuenta otros 15 d de incubación de la enfermedad como promedio. A pesar de lo expresado antes, el aislamiento de poliovirus homólogo en 10,0 % de los casos con seroconversión fue muy bajo en los niños con el tiempo óptimo para obtener las muestras, a pesar de que pudieran tener anticuerpos previos a 1 ó 2 poliovirus heterólogos.

Los porcentajes y los TPG de anticuerpos neutralizantes se incrementaron ligeramente al polio 1 y 3 de las muestras de sueros obtenidos antes de 5 dosis, en relación con los obtenidos después de 5 y 6 dosis de VOP. Por otro lado, el porcentaje de niños con anticuerpos neutralizantes al poliovirus tipo 2 se mantuvo igual en los 3 grupos de muestras, mientras el TPG se incrementó de 102,2 antes de la quinta dosis hasta los 193,0 y 343,9 después de la quinta y la sexta dosis respectivamente. Los porcentajes de niños con títulos iguales o superiores de 1:8 a los poliovirus tipos 1 y 2 en el año 1992, fueron similares a los encontrados en esta investigación.<sup>18</sup> Sin embargo, se ha encontrado un incremento a la inmunidad al tipo 3 de 73,4 % en 1992 hasta 95,9 % en 2001. Esto pudo ser explicado por el incremento al doble de este virus en la VOP utilizada desde 1992.<sup>11</sup>

De los 49 niños de 2 años, a los cuales se les pudieron realizar las investigaciones serológicas en las 3 muestras de sueros en cada niño, en 17 (34,7 %) no se demostraron cambios en la inmunidad a los poliovirus. En estos sueros se demostró la repetibilidad del método para detectar anticuerpos neutralizantes a los 3 poliovirus ( $p$  con corrección de Yates  $> 0,2$ ).

En 32 (65,3 %) niños se demostraron cambios de la inmunidad a los poliovirus, en los que se encontraron 10 seroconversiones antes mencionadas y 51 reactivaciones, de las cuales 11 fueron a polio tipo 1, 24 a polio tipo 2 y 16 a polio tipo 3. Tratando de dar una explicación al estímulo antigénico para las reactivaciones pudieron darse las causas siguientes:

a) En 8 niños con 10 seroconversiones ocurrieron además 12 reactivaciones (4 a polio 1, 7 a polio 2 y 1 a polio 3). De esas reactivaciones se obtuvo

un aislamiento a polio 1 homólogo y otro polio 3 heterólogo. El estímulo antigénico podría explicarse como una respuesta inmunológico-anamnésica a infecciones previas.

b) En otros 8 niños con 9 aislamientos se produjeron 14 reactivaciones. Los aislamientos homólogos a las reactivaciones fueron 1 de polio 2 y 4 polio 3. Por otro lado, los aislamientos heterólogos a las reactivaciones pudieran ser respuestas anamnésicas por infecciones: 1 por polio 1, 1 por polio 2 y 2 por polio 3. En total las reactivaciones fueron 3 a polio 1, 6 a polio 2 y 5 polio 3.

c) En 16 niños que no tuvieron seroconversiones ni aislamientos de poliovirus se produjeron 25 reactivaciones, de las cuales fueron 4 a polio 1, 11 a polio 2 y 10 a polio 3.

En la revisión de *Cáceres y Sutter*<sup>19</sup> se refiere que en niños inmunizados con VOP-M y con infecciones concurrentes por enterovirus no polio, se producen reactivaciones homólogas. En los resultados de este estudio tampoco existe la explicación de la reactivación por infección concurrente de enterovirus no polio, porque los aislamientos fueron similares en los niños con reactivación y los que no la tuvieron (datos no demostrados).

Los niños que no tuvieron un incremento al menos de 4 diluciones a algún serotipo de poliovirus en los títulos de los sueros obtenidos antes de la quinta dosis en relación con los detectados después de la quinta o sexta dosis de la VOP, se considera que no tuvieron un estímulo antigénico. En estos niños que no mostraron ninguna reactivación, los TPG en los sueros antes de la quinta dosis de VOP fueron de 60,6, 151,0 y 45,9 a los poliovirus tipos 1, 2 y 3, respectivamente. En las muestras de sueros obtenidas después de la quinta y sexta dosis no hubo diferencia significativa ( $p > 0,1$ ) entre los TPG a los 3 de poliovirus. Sin embargo, los TPG de anticuerpos neutralizantes a los 3 serotipos de poliovirus en los niños que mostraron reactivación en los sueros antes de la vacunación, fueron más bajos (27,4, 69,2 y 22,8 a polio tipos 1, 2 y 3, respectivamente). La diferencia entre los TPG de los sueros con reactivación y sin esta antes de la vacunación se determinó con  $p = 0,000005$ . Por otro lado, en 17,6 % (9/51) de los casos con reactivación

tuvieron títulos iguales o superiores al doble de los TPG en los sueros con niños sin reactivación.

Los TPG de anticuerpos a los poliovirus tipos 1 y 3 en los niños con reactivación fueron similares a los de los casos con seroconversión en los sueros obtenidos después de la quinta dosis (66,2 y 64,4 a los polio 1 y 3 con reactivación y 75,6 y 63,5 a estos virus en seroconversión). Después de la sexta dosis los TPG fueron más altos en las reactivaciones que en las seroconversiones (300,4 y 281,0 a los polio 1 y 3 con reactivación y 269,1 y 201,3 en casos con seroconversiones). La comparación de los TPG en los sueros de niños con seroconversión y reactivación mostró que tuvieron el comportamiento habitual según fueran las respuestas inmune primaria o secundaria. La influencia de estas respuestas en los títulos de anticuerpos neutralizantes se constata por los métodos de pruebas de metabolismo o por inhibición del ECP, según *Vonka*, y lo referido por *Cáceres* y *Sutter*.<sup>19</sup>

El hallazgo de bajos TPG de reactivación en los sueros de algunos niños antes de la quinta y sexta dosis, pudiera ser la explicación de la posibilidad de que ocurra infección por poliovirus, a pesar de que en este trabajo se presentan bajos aislamientos en muestras obtenidas en tiempo óptimo.

*Chin* (1984) reportó 75 % de aislamientos de poliovirus de heces si no se detectaban anticuerpos en sueros antes de administrar la VOP, mientras que solo en 25 % de niños con anticuerpos inducidos por VIP tenían títulos igual o mayor 1:128. Si los anticuerpos fueran inducidos por VOP con igual título no existiera ningún aislamiento de polio de las heces, y de la faringe se recuperaba el virus en 10 % de los niños con anticuerpos entre 1:8-1:64.<sup>20</sup> Los resultados en este estudio de aislamientos obtenidos en niños con anticuerpos previos por VOP fueron similares. No obstante existió la excepción de 2 aislamientos de polio 3 con título previo de 1:160 y otro 1:320 inducido por la VOP. Sin embargo, la gran diferencia de estos resultados en relación con los reportados por *Chin* radica en que se ha realizado la reactivación como indicador de la multiplicación del poliovirus, porque el TPG en los primeros sueros con niños de reactivación fue inferior a 1:128 a los 3 poliovirus (títulos 27,4, 69,2 y 22,8 a poliovirus tipos 1, 2 y 3, respectivamente).

Las contradicciones entre los resultados de aislamientos y los anticuerpos neutralizantes, pueden interpretarse como una circulación silenciosa. Los aislamientos más altos en los niños de 2 años de edad fueron a poliovirus tipo 3 (7 cepas) y más bajos e iguales a los poliovirus tipos 1 y 2 (2 cepas). Sin embargo, los anticuerpos neutralizantes al poliovirus tipo 2 fueron significativamente más altos que a los poliovirus tipos 1 y 3 en el grupo de niños estudiados desde antes de la vacunación hasta después de la sexta dosis. Las diferencias entre los polios tipo 1 y 2 fueron 0,0007, 0,000009 y 0,0000007, y las diferencias entre polio 3 y 2 fueron 0,000004, 0,0000007 y 0,00002, en cada uno de los 3 momentos de la medición. El incremento de la diferencia en los anticuerpos a polio 2 pudiera explicarse, en parte, por una mayor circulación de polio 2.

Los “brotes silenciosos” constituyen una de las incógnitas en las circulaciones de los poliovirus (comunicación del doctor *David Wood*). Las mayores circulaciones prolongadas sean o no silenciosas han sido por polio tipo 2 y en segundo lugar el polio tipo 1. La circulación silenciosa que aquí se reporta está relacionada con los brotes silenciosos, aunque esta es diferente por ser autolimitada al administrar la VOP en campañas masivas.<sup>9-12,21</sup>

Los países que han tenido epidemias por cPDV tienen en común climas tropicales o subtropicales, malas condiciones higiénicas, bajas coberturas de inmunidad y estrategias de vacunaciones con VOP de formas continuas, asociadas o no a campañas masivas.<sup>4-8</sup> Cuba es el único país que mantiene el proyecto antipoliomielítico con VOP administrada en campañas masivas exclusivamente y con varias investigaciones se ha demostrado que no se producen circulaciones prolongadas.<sup>9-12</sup> Por el contrario, se ha demostrado que las campañas masivas interrumpen las circulaciones de poliovirus vacunal y salvajes<sup>9,11,13,21</sup> y son recomendadas como tratamiento efectivo de los brotes por cPDV.<sup>22,23</sup>

Lo ocurrido en Filipinas ha sido una gran lección en las causas del brote epidémico. Junto a las causas antes mencionadas, se incluye el hecho de que en las regiones afectadas por el brote se estableció el sistema de vacunación continua,

mientras no se presentaron casos en las regiones de ese país que mantuvieron campañas subregionales.<sup>24</sup> Unido a las causas de ocurrir la cPDV en esa epidemia pudiera ser considerada el cambio del sistema de vacunación, si bien no puede ser definitorio.

Desde el 2002 se ha establecido la vigilancia de los cPDV en las cepas aisladas en la red de Laboratorios de la OMS para el estudio de las parálisis flácidas agudas (PFA). En el informe de la OMS para la vigilancia desde enero de 2002 hasta junio de 2003, se han detectado en la red de Laboratorios 17 poliovirus en 9 pacientes. De los 9 pacientes, 4 procedían del brote en Madagascar y 5 reportados de las PFA ocurridas en 4 países. En el mismo reporte se informan 3 PDV no aislados en la red de Laboratorios y de ellos uno fue de un niño y 2 de aguas de albañal, los 3 procedentes de países de Europa.<sup>25</sup> Con este informe se permite pensar que la circulación de PDV puede ocurrir en países con climas tropicales y templados.

Las conclusiones de esta investigación son: a) al concluir las campañas masivas, las infecciones y reinfecciones detectadas por métodos inmunológicos, en niños con anticuerpos previos por la VOP, son significativamente más altas que las detectadas por aislamientos de poliovirus; b) las infecciones y reinfecciones de poliovirus detectados por métodos inmunológicos en las campañas masivas permiten verificar una circulación silenciosa en niños con anticuerpos previos inducidos por la VOP-T y c) al confirmar una circulación silenciosa autolimitada de los poliovirus en campañas masivas por VOP-T se comportan como excelentes métodos para prevenir y controlar los surgimientos de las circulaciones de virus derivados de la vacuna.

#### AGRADECIMIENTOS

A la doctora Patricia Jiménez, profesora de la Escuela Nacional de Salud Pública, por revisar la redacción de este trabajo.

#### Isolates of poliovirus vaccine and immune response to different doses of oral polio vaccine

#### SUMMARY

Samples of feces and sera obtained from children under 3 year old were studied to increase the knowledge about the circulations

of virus vaccines during the massive campaigns. The use of the oral polio vaccine with schemes of massive campaigns allows the circulation of the virus vaccine 2 months after their completion. The use of continual vaccination schemes makes possible the circulation of the virus vaccine for longer periods of time. Even in populations with a low immunity coverage, epidemic outbreaks of the vaccine-derived virus may appear. The total of poliovirus vaccine isolated in 2-year-old children (11 cases, 11.0 %) and the boosts of neutralizing antibodies (51 cases, 51.0 %), show a contradiction between the verification of the infections caused by isolations of the viruses and the results of boosts. The low percentage of isolations of virus vaccine and the highly significant percentages of seroconversions or boosts to polio virus, allow to infer the occurrence of silent circulation. The silent circulation self limited to 2 months after concluding the campaign is due, among other causes, to the homologous or not induced response by the primary infection with the first dose of oral polio vaccine and by the secondary infections. The self limitation of the circulation of the polio viruses in massive campaigns constitutes an excellent prevention of the risks represented by the vaccine-derived viruses appearing in vaccinations with continual schemes.

**Key words:** Poliomyelitis, polio virus, oral polio vaccine, immunization, seroconversion, silent circulation, Cuba.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Assembly. Global eradication of poliomyelitis by the year 2000. Geneva. Switzerland. World Health Organization 1988. Resolution No. 41.28.
2. Manor Y, Handsheer R, Halmut T, Neuman M, Bobrov A, Rudich H. Detection of poliovirus circulation by environmental surveillance in the absence of clinical cases in Israel and the Palestinian Authority. *J Clin Microbiol* 1999;37:1670-5.
3. Shulman LM, Manor Y, Handsheer R, Delpeyroux F, McDonough MJ, Halmut T. A highly evolved derivative of the type 2 Oral Poliovaccine Strain isolated from sewage in Israel: Molecular and antigenic characterization. *J Clin Microbiol* 2000;38:3729-34.
4. WHO. Circulation of a type 2 vaccine-derived poliovirus, Egypt. *WER* 2001;76:27-9.
5. CDC. Outbreak of poliomyelitis-Dominican Republic and Haiti, 2000. *MMWR* 2000;49:1094-103.
6. ----- . Outbreak of poliomyelitis-Dominican Republic and Haiti, 2000-2001. *MMWR* 2001;50:147-8.
7. WHO. Acute flaccid paralysis associated with circulation vaccine-derived poliovirus, Philippines, 2001. *WER* 2001;76:319-20.
8. ----- . Paralytic poliomyelitis in Madagascar, 2002. *WER* 2002;77:241-2.
9. Más LP, Louzara C, Beltran J, Jacobo M, Palomera R. Circulación de poliovirus en la población infantil de Cuba. *Bol Sanit Panam* 1979;87:443-9.
10. Más LP, Aguirre SR, Comellas MM, Galindo MA, Balmaseda A. Marcador serológico como indicador de no circulación de poliovirus en Cuba. *Rev Cubana Med Trop* 1992;44:177-80.
11. Más LP. Eradication of poliomyelitis in Cuba: a historical perspective. *Bull WHO* 1999;77:681-7.
12. Más LP, Cáceres VM, Galindo MA, Gary HE Jr, Valcarcel M, Barrios J. Persistence of vaccine-derived poliovirus following a mass vaccination campaign in Cuba: implications for stopping polio vaccination after global eradication. *Inter J Epidemiol* 2001;30:1029-34.



13. Más Lago P, Ferrer HG, Goyenechea AH. Infección con poliovirus vacunal en niños con anticuerpos neutralizantes homólogos inducidos por vacunaciones previas con VOP. *Rev Cubana Hig Epidemiol* 2003;41:235-8 (versión electrónica).
14. Más Lago P, Sarmiento L, Barrios J, Díaz J, Goyenechea A, Díaz M. Circulación silenciosa de poliovirus demostrada por interferencia a los enterovirus no polio. *Rev Cubana Med Trop* 2004;56(2):117-25.
15. Manual for the virological investigation of polio. WHO/EPI/GEN/97:01.
16. Lu CY, Kao CL, Lee CY, Lee PI, Huang LM. Immunogenicity and fecal poliovirus excretion in sequential use of inactivated and oral poliovirus vaccine. *J Formos Med Assoc* 2001;100:513-8.
17. Alexander JP Jr, Gary HE Jr, Pallansch MA. Duration of poliovirus excretion and its implications for acute flaccid paralysis surveillance: a review of the literature. *J Infect Dis* 1997;175(Suppl1):176-82.
18. Más LP, Bravo JR, Andrus JK, Comellas MM, Galindo MA, de Quadros CA, Bell E. Lessons from Cuba: mass campaign administration of trivalent oral poliovirus vaccine and seroprevalence of poliovirus neutralizing antibodies. *Bull WHO* 1994;72:221-5.
19. Cáceres MV, Sutter WR. Sabin monovalent oral polio vaccines: review of past experiences and their potential use after polio eradication. *Clin Infect Dis* 2001;33(4):531-41.
20. Chin TDY. Immunity induced by inactivated poliovirus vaccine and excretion of virus. *Rev Infect Dis* 1984;6(Suppl 2):369-70.
21. Más Lago P, Gary HE Jr, Sarmiento L, Cáceres V, Barrios J, Palomera R. Poliovirus detection in wastewater and stools following an immunization campaign in Habana, Cuba. *Int J Epidemiol* 2003;32:772-7.
22. Technical Consultative Group to the World Health Organization on the Global Eradication of Poliomyelitis. "Endgame" issues for the Global Polio Eradication Initiative. *Clin Infect Dis* 2002;34:72-7.
23. Dowdle WR, De Gourville E, Kew OM, Pallansch MA, Wood DJ. Polio eradication: the OPV paradox. *Rev Med Virol* 2003;13:277-91.
24. Kew OM, Wright PF, Agol VI, Delpeyroux F, Shimizu H, Nathanson N. Circulating vaccine-derived poliovirus: current state of knowledge. *Bull WHO* 2004;82:16-23.
25. World Health Organization. Laboratory surveillance for wild and vaccine-derived poliovirus, January-June 2003. *Weekly Epidemiol Record* 2003;78:341-8.

Recibido: 5 de noviembre de 2004. Aprobado: 25 de febrero de 2005.

Dr. *Pedro Más Lago*. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", Autopista Novia del Mediodía, Km 6, entre Autopista Nacional y Carretera Central, La Lisa, Ciudad de La Habana, Cuba. Correo electrónico: pmasl@ipk.sld.cu