T-62

AMANDA NEGREROS PENEDO

Anticuerpos neutralizantes de Poliovirus y Lisinas de ESCHERICHIA COLI enteropatógena en el suero de madres y de sus recién nacidos. (Cordón Umbilical)

INSTITUTO DE NUTRICION DE CENTRO AMERICA Y PANAMA
GUATEMALA, C. A.
BIBLIOTECA

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia

Anticuerpos neutralizantes de Poliovirus y Lisinas de ESCHERICHIA COLI enteropatógena en el suero de madres y de sus recién nacidos (Cordón Umbilical)

Trabajo realizado en la Sección de Microbiología del Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP)

TESIS

presentada a la Junta Directiva de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, por

AMANDA NEGREROS PENEDO

en el acto de su investidura de

QUIMICO BIOLOGO

GUATEMALA, CENTRO AMERICA, MAYO DE 1964

JUNTA DIRECTIVA

DE LA

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

DE LA

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

Decano Interino	Lic. Carlos E. Molina
Vocal 1º	Lic. Francisco Aguirre
Vocal 3º	Br. Alfredo Ordóñez
Vocal 4º	Br. Héctor Aguilar
Secretario	Lic. Rubén Mayorga

Tribunal que practicó el Examen General Privado:

Decano	Lic. Ricardo Antillón
Examinador	Dr. Eduardo Bregni
Examinador	Dr. Jorge Aycinena
Examinador	Lic. Leonel Carrillo
Secretario	Dr. Mario Villanueva

3523ABC-1c.-10-65 Impreso Nº 790

Impreso en Guatemala, Centro América — Imprenta Universitaria

DEDICO ESTE ACTO:

A MIS PADRES:

MARIO NEGREROS

JOSEFINA PENEDO

A MI HERMANA:

ALICIA

DEDICO ESTA TESIS:

A LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

A LA FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

AL INSTITUTO DE NUTRICION DE CENTRO AMERICA Y PANAMA (INCAP)

A MIS MAESTROS y EX-JEFES, EN ESPECIAL AL:

Dr. LEONARDO MATA

DEDICO ESTA TESIS:

AL:

Dr. MARIO A. VILLANUEVA

con todo aprecio y reconocimiento

HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR:

Me honra someter a vuestra elevada consideración, el trabajo que he titulado: "ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES DE POLIOVIRUS Y LISINAS DE ESCHERICHIA COLI ENTEROPATÓGENA EN EL SUERO DE MADRES Y DE SUS RECIÉN NACIDOS (CORDÓN UMBILICAL)", *el cual elaboré como Tesis de Graduación, previo a obtener el título de Químico Biólogo.*

Al mismo tiempo me complace presentar al Honorable Tribunal Examinador, las muestras de mi más alta y distinguida consideración.

CONTENIDO

I. INTRODUCCION
II. ANTECEDENTES

A. Epidemiología de la Poliomielitis
1. La poliomielitis en Guatemala
2. Estudios clínicos y epidemiológicos
3. Estudios virológicos

B. Epidemiología de las Infecciones por *Escherichia coli* enteropatógena
1. La diarrea del recién nacido y del pre-escolar en Guatemala

III. MATERIAL Y METODOS

A. Población
1. Colección de las muestras de sangre

B. Determinación del Título de Anticuerpos Neutralizantes
1. Preparación del antígeno de poliovirus 1
2. Dilución del suero
3. Preparación de la mezcla suero-virus
4. Incubación de la mezcla
5. Inoculación a los tubos de cultivos de tejidos
6. Lecturas
7. Cálculo del nivel de anticuerpos del suero

C. Técnica para determinar Bacteriolisinas del Suero
1. Cultivos
2. Preparación del antígeno
3. Investigación de bacteriolisinas

IV. RESULTADOS

A. Características de la Muestra

B. Nivel de Anticuerpos Neutralizantes a Poliovirus 1

1. Consideraciones en cuanto a la técnica
2. Anticuerpos neutralizantes a poliovirus 1 en el suero materno
3. Anticuerpos neutralizantes a poliovirus 1 en el suero del cordón
4. Comparación entre los niveles de aticuerpos neutralizantes a poliovirus 1 del suero materno y del cordón umbilical correspondiente

C. Presencia de Bacteriolisinas a *Escherichia coli* enteropatógena 055:B5 y 0111:B4

1. Consideraciones en cuanto a las técnicas
2. Bacteriolisinas en el suero materno
3. Bacteriolisinas en el suero del cordón umbilical
4. Comparación del poder bacteriolítico del suero materno y del cordón umbilical hacia *E.C.E.*055:B5 y 0111:B4

D. Sinopsis sobre el Estado Inmunitario Humoral en madres e hijos, determinado mediante el estudio de Anticuerpos Neutralizantes (Poliovirus 1) y Bacteriolisinas (*E.C.E.* 055:B5 y 0111:B4)

V. DISCUSION

VI. RESUMEN

VII. RECONOCIMIENTO

VIII. BIBLIOGRAFIA

I. INTRODUCCION

El Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP) ha establecido, a través de múltiples investigaciones, la importancia de los procesos infecciosos como factores agravantes y desencadenantes de la desnutrición en la población infantil de Guatemala y de otros países donde prevalecen condiciones de vida similares(6).

Los estudios epidemiológicos realizados en el propio medio rural han demostrado que la morbilidad y la mortalidad infantil están determinadas principalmente por la alta prevalencia de enfermedades diarreicas, procesos respiratorios y enfermedades comunes de la primera infancia tales como el sarampión y la tos ferina.

Después de varios años de estudios sobre la morbilidad y mortalidad en esas áreas, y de extensas investigaciones en cuanto a la prevalencia de parásitos intestinales y bacterias enteropatógenas(9, 49, 67, 81), se logró establecer claramente la importancia de los procesos diarreicos como uno de los principales flagelos de la salud de nuestro pueblo. Estos estudios también revelaron deficiencias en nuestros conocimientos sobre la etiopatogenia de esos procesos.

Por ejemplo, el porcentaje considerable de casos de diarrea en que no es posible identificar alguno de los organismos enteropatógenos reconocidos (*Shigella, Escherichia coli* enteropatógena, *Salmonella*), ha inducido a pensar en otras posibles causas etiológicas, entre éstas, los virus(48).

Con el fin de explorar la participación que los virus puedan tener como agentes causales de diarrea, se diseñó un estudio longitudinal de acuerdo con el cual se seguiría la observación de niños, desde su nacimiento y por un período no menor de dos años. Este estudio ya se inició,

y los niños son clínica y microbiológicamente examinados a intervalos predeterminados, con el propósito de establecer el mayor número de colonizaciones por parásitos, bacterias, y virus. Se espera que los datos microbiológicos colectados puedan ser correlacionados con el estado de salud del niño.

Las investigaciones serológicas en sangre del cordón umbilical y en los sueros obtenidos periódicamente después del nacimiento son, según se sabe, de suma utilidad para conocer las fuerzas infecciosas que actúan sobre la población.

Fue este trabajo precisamente el que inició el estudio del estado inmunitario del suero del cordón umbilical de niños y del suero de sus respectivas madres, provenientes de sectores de población de bajo nivel socioeconómico de Guatemala. El propósito de la investigación fue, por un lado, establecer la metodología a emplear en el estudio longitudinal y, por el otro, aportar nuevos datos al conocimiento de la epidemiología de la poliomielitis en Guatemala.

En los siguientes capítulos de esta tesis se incluye una reseña de algunos aspectos de la epidemiología de la poliomielitis en general y de los estudios clínicos y virológicos realizados en Guatemala sobre el mismo tema. Luego se presenta un breve resumen sobre la importancia de la *Escherichia coli* enteropatógena en la etiología de las diarreas y de los trabajos que sobre este particular figuran en la literatura médica guatemalteca. Se describe, finalmente, el material y los métodos empleados en el estudio de anticuerpos de poliovirus y de *Escherichia coli* enteropatógena en sueros de madres y del cordón, así como los resultados obtenidos y la discusión de los mismos.

II. ANTECEDENTES

Puesto que la presente investigación consistió en la determinación de anticuerpos neutralizantes de poliovirus y de bacteriolisinas de *Escherichia coli* enteropatógena, se ha juzgado conveniente hacer una breve revisión de la bibliografía relacionada con la polimielitis y con la diarrea del niño recién nacido y del preescolar.

A. EPIDEMIOLOGIA DE LA POLIOMIELITIS

En una revisión bibliográfica realizada por Salas *et al.*(79) se cita como hecho probable el reconocimiento de la poliomielitis como entidad nosológica, 18 siglos antes de la era cristiana. En ese trabajo se señala también que la poliomielitis fue descrita por Heine en 1840, y que en el mismo año se definió su carácter epidémico. Además, Vickman, durante la epidemia que azotó a Suecia en 1905, concluyó que la propagación era por contacto directo y, como resultado de las investigaciones de Flexner y Lewis, se hizo evidente que el agente etiológico de la poliomielitis era un virus.

En otra reseña bibliográfica, la de Nieto y Villasana(58), se cita que en 1931 Burnet y McNamara señalaron la existencia probable de más de una variedad inmunológica del virus.

Sabin y Olitsky(76) en 1936, por otra parte, cultivaron por primrea vez el virus en tejido nervioso embrionario humano, y Enders *et al.*(22), en 1949, lograron cultivar el virus en tejidos no nerviosos desarrollando técnicas de grandes repercusiones en el conocimiento de la poliomielitis y de la virología en general.

Ya en 1900(64) se sabía que la poliomielitis era una enfermedad mundial que presentaba variaciones clínicas y

epidemiológicas en las diversas regiones geográficas; que ocurre endémicamente en los niños pequeños de las áreas tropicales en vías de desarrollo, o bien en forma epidémica, atacando a individuos de diversas edades en las áreas industrializadas.

De acuerdo con Paul(65) la propagación del virus es óptima en colectividades donde el saneamiento ambiental es deficiente, y en aquellas donde hay aglomeración y pobreza y presentan elevadas tasas de mortalidad infantil. En estas comunidades, los niños, desde sus primeros años de vida, tienen mayores oportunidades de estar en contacto con los tres tipos del virus, a tal punto que a la edad de 3 a 4 años, la mayoría han sido infectados por lo menos con alguno de los tres serotipos.

Las estadísticas oficiales, al igual que las investigaciones virológicas efectuadas indican que la infección ocurre en una gran proporción de las poblaciones de los países en vías de desarrollo, siendo la enfermedad esporádica y rara vez epidémica. Por el contrario, en aquellos países donde las condiciones sanitarias son mejores, la exposición de los niños al virus es menor, existiendo así una menor oportunidad para que éstos adquieran inmunidad natural.

En regiones en que las cuatro estaciones del año están bien demarcadas, la poliomielitis manifiesta cierta tendencia epidémica estacional, ocurriendo el mayor número de casos durante el verano(64, 74), lo que no sucede en las regiones tropicales.

En varios lugares del globo se ha observado una relación inversa entre la mortalidad infantil y la tasa de poliomielitis. Así, por ejemplo, en ciertos países de Ibero-América se ha podido constatar que a una disminución de la tasa de mortalidad infantil, hasta de 75 por 1,000 nacidos vivos, se acompaña un incremento del número de casos de poliomielitis(63).

Los primeros estudios sobre anticuerpos a poliovirus en el suero humano se iniciaron cerca de 40 años después

del descubrimiento de los virus causantes de la poliomielitis. En estos trabajos se hicieron pruebas de neutralización utilizando monos como sistema, y se demostró que el suero de adultos sin historia de enfermedad y provenientes de áreas en donde la poliomielitis aparece en forma epidémica, así como de regiones en donde esta enfermedad es prácticamente desconocida, casi invariablemente neutraliza el virus(75).

El hecho de que la gran mayoría de los elementos de una población adquieran anticuerpos hacia la poliomielitis sin manifestaciones clínicas, se acepta como evidencia de la extensa diseminación y transmisión del virus.

Como consecuencia del desarrollo de nuevos métodos y técnicas de cultivo de tejidos, se ha realizado un buen número de estudios de los aspectos epidemiológicos de la poliomielitis.

Borgoño(11), por ejemplo, describió un brote epidémico de poliomielitis de 610 casos y 79 defunciones, causado por el poliovirus 1, que ocurrió en Santiago, Chile, en 1955 y 1956. Los tipos 2 y 3 casi no contribuyeron a ese brote y los virus Coxsackie se aislaron en ciertas ocasiones conjuntamente. En esta epidemia, el 80 por ciento de los casos fueron menores de 3 años, observándose además una mayor incidencia en el sexo masculino y en niños pertenecientes a los niveles socioeconómicos más altos.

Gelfand *et al.*(27) examinaron 1,430 sueros de individuos sanos de varias localidades del Perú pertenecientes a grupos de nivel socioeconómico alto y bajo y de varios grupos étnicos. Los resultados revelaron que un alto porcentaje de personas poseían anticuerpos a los tres tipos de virus. La adquisición de éstos empieza a una edad temprana y el título sube a medida que ésta aumenta. A los 3 años de edad, de 75 a 80 por ciento de las muestras mostraban anticuerpos hacia la poliomielitis. Este hecho sugiere que la población se infecta progresivamente con tales agentes y que las infecciones subclínicas ocurren con gran

frecuencia. Se observaron también títulos ligeramente más altos en los grupos de bajos ingresos.

Bernkopf y colaboradores (10), en Israel, hicieron un estudio sobre la frecuencia de anticuerpos en relación a los factores socioeconómicos, que consistió en el examen del suero de 155 niños de 6 meses a 2 años de edad. El 50 por ciento de los sueros colectados del grupo de 2 a 3 años mostró anticuerpos a los tres tipos de virus, y el 95 por ciento de los correspondientes a niños de 6 a 7 años presentó anticuerpos a los tres tipos. Además se observó que los anticuerpos eran más frecuentes en niños pertenecientes a familias numerosas, de higiene precaria, sin encontrar diferencias en relación al nivel socioeconómico.

En Alaska, Reinhard *et al.* (71) investigaron el estado inmunitario hacia los tres tipos de poliovirus de nativos vacunados y no vacunados, y encontraron que gran proporción de no-vacunados tenían anticuerpos a uno o más tipos de poliovirus. Los anticuerpos hacia el tipo 2 estuvieron presentes en todos los grupos de edad mientras que aquéllos con anticuerpos a los tipos 1 y 3 aparecieron en mayor cantidad en la segunda década de la vida. Todos los anticuerpos decrecieron en prevalencia y título a la edad de 30 a 40 años.

Ashihara y colaboradores (5) en el Japón, investigaron la presencia de anticuerpos neutralizantes en el suero de 370 individuos sanos, grupo éste que abarcaba desde recién nacidos (sangre del cordón) hasta adultos de 30 años. Un alto porcentaje de las muestras del cordón presentaron anticuerpos; el porcentaje fue menor en el grupo de niños de 6 a 11 meses pero incrementó a partir de esa edad.

Abad-Gómez y otros (1) publicaron los resultados de un programa de vacunación oral llevado a cabo en el altiplano de Antioquia, Colombia, en niños de 2 meses a 6 años, con motivo de la aparición de un brote de poliomielitis en el que todos los casos de parálisis ocurrieron en niños menores

de 6 años. Previo a la vacunación se hizo un estudio virológico de 6 familias en las cuales se había registrado un caso de polio paralítico, aislándose poliovirus 1 de dos pacientes y de algunos de los familiares. El estudio serológico hizo manifiesta un alza significativa en el nivel de anticuerpos. Estudiaron también el estado de inmunidad natural de la población susceptible, observando que los anticuerpos para el tipo 1 eran los más frecuentes y que el mayor número de triple negativos había ocurrido en el grupo de niños de 6 meses a 2 años de edad. Cabe señalar que este programa incluyó un total de 7,378 niños al inicio de la campaña de vacunación y que, de éstos, el 94.5 por ciento desarrollaron anticuerpos a los tres tipos de poliovirus.

En un estudio epidemiológico realizado en un grupo seleccionado de Polonia, Debrowolska (19), encontró que cerca del 50 por ciento de la población presentaba anticuerpos a poliovirus a la edad de 6 meses a 3 años. En las zonas de gran aglomeración, tales como centros industriales, los títulos en niños jóvenes fueron más elevados que los de niños de los distritos rurales, diferencia ésta que no se observó entre las poblaciones de mayor edad.

Chin *et al.* (17) describen una epidemia ocurrida en 1959 en Des Moines, Iowa, que atacó principalmente a niños menores de 5 años, registrándose 174 casos con 4 defunciones. El estudio virológico pertinente reveló 86 casos con poliovirus tipo 1, dos con Coxsackie B2, dos con echovirus 7, y siete con virus no identificados. De acuerdo con varios autores (44, 45), algunos inmunotipos de virus Coxsakie A y B y ciertos echovirus pueden estar implicados como probables agentes etiológicos de parálisis.

Peña y otros (66), en Costa Rica, recopilaron las manifestaciones clínicas de la poliomielitis de acuerdo a los registros: a) del Hospital San Juan de Dios, b) del Departamento de Bioestadística del Ministerio de Salubridad Pública, y c) de otras fuentes. Los autores enumeran casos

y brotes epidémicos, destacando la epidemia de 1954. Mencionan, además, que la poliomielitis en Costa Rica tiene carácter de parálisis infantil, no habiendo diferencias estacionales en la incidencia de los casos, ni en la distribución de acuerdo a los grupos etarios, así como tampoco entre las zonas rurales y las urbanas. Se hizo una encuesta serológica en una muestra representativa de la población que incluyó desde recién nacidos (sangre del cordón) hasta adultos. Los resultados de las pruebas de neutralización en cultivos de tejido indicaron que la infección ocurre desde el primer año de vida, habiendo inmunidad en casi todos los individuos del grupo de edad de 5 a 10 años. El porcentaje de doble o triple negativos fue menos de 1 y la menor frecuencia de anticuerpos correspondió al poliovirus 1.

Sabin(74), hizo un resumen de las características epidemiológicas de la poliomielitis en el Brasil, el Uruguay, la Argentina y Chile (países en los que esta enfermedad cobra cada vez mayor importancia), a fin de determinar el tipo de programa de vacunación más adecuado para cada uno de ellos. Las estadísticas indicaron que en el Brasil el 94 por ciento de los casos ocurría en menores de 5 años, siendo las epidemias poco frecuentes y sin manifestación de diferencias estacionales. En el Uruguay, la Argentina y Chile, la mayor incidencia se observó en los meses calurosos (de diciembre a abril), presentándose epidemias con periodicidad variada. El Uruguay experimentó un 90 por ciento de casos en los grupos etarios de 20 a 30 años, mientras que en la Argentina éstos ocurrieron entre niños de 10 a 13 años y en Chile en los comprendidos entre 7 y 9 años. En el período 1956-1961, Chile sufrió cambios en la epidemiología de la poliomielitis que se reflejaron en la incidencia por grupos etarios (11, 74). Este fenómeno se ha observado también en varios países del norte de Europa después del desarrollo de epidemias. En contraposición, durante la era pre-epidémica, la poliomielitis se manifestaba como una enfermedad típica de niños menores de cinco años(64).

Melnick *et al.*(53) en Surinam, llevaron a cabo un estudio serológico en 1960 con el objeto de determinar el estado de inmunidad a la poliomielitis en diversas áreas del país y en diferentes grupos étnicos. Aun cuando en Surinam no se habían registrado casos de poliomielitis, se pudo notar que los poliovirus eran ubicuos, a tal grado que a la edad de 10 años, 3 de cada 4 niños poseían ya inmunidad hacia los tres tipos del virus. Además se pudo establecer que en los adultos de más de 30 años, los anticuerpos al poliovirus 2 persistían en niveles fácilmente demostrables, mientras que los anticuerpos a los tipos 1 y 3 tendían a decrecer.

Según se desprende de esta revisión, los factores principales que favorecen la infección por el virus y, por ende, el desarrollo de anticuerpos neutralizantes son: localidad geográfica, clima, inmunidad pasiva, edad, estado socioeconómico, relaciones socioculturales y condiciones sanitarias del medio ambiente.

1. La poliomielitis en Guatemala

El hallazgo de una figura de cerámica chorotega proveniente de la región de Guanacaste, Costa Rica, que ilustra lesiones compatibles con las secuelas de la poliomielitis ha inducido el pensamiento de que esta enfermedad era conocida por los aborígenes de la América Central aún antes de la llegada de Colón(66). No obstante, no hay datos estadísticos reales para el área centroamericana que indiquen con exactitud la historia de dicha enfermedad en esta centuria. Los casos descritos en revistas científicas o registrados en las estadísticas son pocos y provienen únicamente de sectores en donde existen centros hospitalarios y en los que, por lo tanto, es más factible diagnosticar el mal(36). En vista de estos problemas, se sospecha que la poliomielitis

es más común en Centro América de lo que hasta ahora se acepta(82).

2. Estudios clínicos y epidemiológicos

La poliomielitis clínica es una enfermedad relativamente rara en Guatemala. Se ha mencionado que la tasa de ataque anual es de menos de 5 por 100,000 habitantes, y que los niños menores de 5 años son los más afectados(36).

Monsón-Malice(54), describe una epidemia en Guatemala que tuvo lugar en 1949 en varios departamentos del país, y que fue muy severa a juzgar por los 54 casos descritos (la mayoría paralíticos) y por el saldo de 7 muertes que ésta dejó. La zona más afectada fue, al parecer, la capital de la República, tal vez debido a las mejores facilidades de diagnóstico y transporte que aquí existen. La mayor incidencia de casos se observó en los meses de junio, julio y agosto y entre los niños menores de 5 años. A pesar de que los factores socioeconómico y étnico parecieron no tener significación en esta epidemia, se ha insinuado que la poliomielitis rara vez ocurre en indígenas de raza Maya. Este fenómeno podría explicarse teniendo en cuenta el hecho de que los indígenas se exponen a los agentes infecciosos desde muy temprana edad, desarrollando una inmunidad precoz que se sobrepone a la inmunidad pasiva.

A principios de 1959 se registró un brote de 14 casos de polliomielitis entre 100 niños de un orfelinato, 6 de los cuales tuvieron parálisis y 3 murieron(82).

En el mismo año se presentó una epidemia en una institución cerrada (Hogar Temporal de la Asociación de Bienestar Infantil), resultando afectados 16 niños entre una población de 59, con 4 casos paralíticos y 3 defunciones(73).

En estas publicaciones se insinúa que la distribución de la poliomielitis en Guatemala para ambos sexos es semejante. Los casos descritos no fueron tabulados de acuerdo a grupos etarios, pero sí se informó que fueron los niños los primariamente afectados.

El único programa de vacunación efectuado en Guatemala se llevó a cabo desde 1956 a 1959, habiéndose vacunado (vacuna Salk) un total de 1,671 niños de 6 meses a 5 años de edad. Hasta la fecha no se ha observado el desarrollo de cuadros compatibles con la poliomielitis que puedan asociarse a la vacunación(3).

Para resumir, es poco lo que se la investigado y publicado sobre la poliomielitis en Guatemala. Tomando como base estos pocos estudios y extrapolando a lo que ocurre en otras áreas del globo, puede decirse que la infección por poliovirus es frecuente en este país debido a la situación geográfica, al bajo nivel socioeconómico de sus habitantes y a la precaria higiene ambiental y personal. Como consecuencia de los factores mencionados, la inmunidad se desarrolla desde muy temprana edad, observándose pocos casos clínicos de la enfermedad.

3. Estudios virológicos

Sólo se han publicado cuatro estudios sobre los aspectos virológicos del problema, tres de ellos en la población general(3, 36, 86), correspondiendo el otro, a la epidemia que ocurrió en el Hogar Temporal de la Asociación de Bienestar Infantil(73), ya citada. En estos estudios se determinó la inmunidad natural a la poliomielitis en niños y adultos normales(36, 82). Se hizo una comparación de títulos de anticuerpos en los distintos grupos de edad(36) y se logró establecer los enterovirus que estaban involucrados en la producción de infecciones aparentes o inaparentes (36, 73, 82). Hay que advertir que las pruebas de laboratorio que rindieron estos datos fueron hechas en el extranjero.

Sellers *et al.*(82) estudiaron 100 sueros pertenecientes a pacientes no poliomielíticos del Hospital General de San Juan de Dios, Guatemala, mostrando que la tasa de sueros positivos (33%) para los tres tipos de poliovirus era mayor que la tasa en 100 sueros de estudiantes de un colegio de

enseñanza superior de California (8%) que dichos investigadores usaron para comparación. La tasa de sueros positivos a los tres serotipos del virus en adultos guatemaltecos resultó menor al comparar ésta con la de los adultos del Perú, que acusó un 76 por ciento (27).

Los enterovirus aislados de heces de individuos sanos y de pacientes con poliomielitis y de sus contactos mediante el uso de cultivos de tejido de riñón de mono, y también de individuos sanos, han sido polivirus, coxsackievirus y echovirus (36, 37, 73). La revisión de estos trabajos deja la impresión de que la prevalencia de poliovirus en la población de Guatemala es considerable, lo que hace sospechar que la enfermedad es más frecuente de lo que las estadísticas señalan.

B. EPIDEMIOLOGIA DE LAS INFECCIONES POR ESCHERICHIA COLI ENTEROPATOGENA

Las enfermedades diarreicas constituyen causa importante de morbilidad en todo el mundo y una de las principales causas de mortalidad entre lactantes y niños de corta edad. Existe gran número de agentes y factores que pueden considerarse como responsables de los procesos diarreicos. Sin embargo, los agentes biológicos son los que inducen el mayor número de casos y epidemias (48).

Extensas investigaciones a este particular han demostrado que la *Escherichia coli* enteropatógena *(E.C.E.)* es el agente etiológico responsable de una proporción considerable de brotes de diarrea que se presentan en salas-cuna y guarderías infantiles, así como en las salas-cuna de hospital (35, 38, 41, 42, 84).

La *E.C.E.* se considera como agente patógeno para los recién nacidos y se asume que tiene poca importancia en la etiología de la diarrea en niños mayores y en adultos. A pesar de ello, se ha logrado producir diarrea experimentalmente en adultos voluntarios por ingestión de altas dosis de *E.C.E.* (24, 25, 40). En las regiones en vías de desa-

rrollo donde la falta de medidas sanitarias adecuadas hace posible la ingestión de grandes dosis de gérmenes, es posible que la *E.C.E.* tenga importancia en la génesis de las diarreas en niños mayores y en adultos (16, 48).

Se considera que ciertos serotipos de *E.C.E.* son agentes causales de brotes y casos esporádicos de diarrea infantil, porque éstos se han aislado con frecuencia de niños enfermos, mientras que rara vez se encuentran en niños sanos y no diarreicos (8, 12, 13, 23, 39, 41, 62, 87, 88). De todos los serotipos, los más importantes son: 0111:B4, 055:B5, 0127:B8, y 026:B6 (26, 49, 59, 60, 61, 69, 72, 78, 80, 90).

La prevalencia de *E.C.E* en la puoblación general ha sido poco explorada. Giles *et al.* (29) encontraron que sólo el 3 por ciento de 324 niños sanos estaban infectados con el serotipo 055:B5. Por otra parte, Graber y Dunlap (33), examinaron 410 niños de 7 a 13 años de edad y no lograron aislar ninguna de las cepas patógenas investigadas. Asimismo, Cooley y Schliessman (18) investigaron la prevalencia de 4 serotipos de *E.C.E.* en una población de 172 niños preescolares durante un período de 6 meses, y encontraron un total de 6 niños positivos a uno de los 4 tipos incluidos. En la región centroamericana, Moore y colaboradores, en Costa Rica (55), estudiaron también la prevalencia de la *E.C.E.* en niños sanos menores de 4 años de edad, encontrando una tasa de 0.55 por ciento en las áreas rurales y una de 0.7 por ciento en las zonas urbanas.

1. *La diarrea del recién nacido y del preescolar en Guatemala*

Como se señaló antes, el INCAP ha llevado a cabo una serie de estudios con el fin de conocer la epidemiología y etiología de las diarreas en Guatemala, investigaciones éstas que en su mayoría corresponden a sectores rurales del país, y que figuran en la bibliografía que acompaña a este trabajo de tesis.

En Guatemala la frecuencia de las diarreas es muy elevada, considerándose como la causa principal de muerte entre los niños de 1 a 4 años de edad (32). En vista de que los agentes biológicos son considerados como causas principales en el desencadenamiento de casos de diarrea, la mayor parte de los estudios sobre el problema han sido enfocados desde ese punto de vista.

Sánchez Reyes (80), hizo una investigación de 112 casos de diarrea infantil en las salas-cuna del Hospital General de Guatemala, encontrando que la infección por *Shigella* (7%) era más alta que la de *Salmonella* (0.8%). La *E.C.E.* se encontró en 13 niños (11.6%) como agente etiológico responsable de diarrea infantil, en varias ocasiones asociada a otros gérmenes enteropatógenos, siendo los serotipos 0111:B4, 026:B6, 0127:B8 y 055:B5, los más frecuentes.

Ordóñez (61) por su parte, estudió en cuatro Dispensarios Municipales de la ciudad de Guatemala un total de 318 niños de 0 a 6 años de edad, de los cuales 160 presentaron síntomas diarreicos francos, siendo el resto un grupo testigo. Dicho autor encontró en el curso de esta investigación un mayor número de trastornos diarreicos asociados a infecciones por microorganismos del género *Shigella* (14%). En cambio la presencia de *E.C.E.* en niños con y sin diarrea, no fue significativa en ninguno de los dos grupos, ya que su prevalencia alcanzó 4.4% en el grupo de niños diarreicos y 3.8% en el grupo control. Sin embargo, los serotipos 0111:B4 y 055:B5 fueron aislados con mayor frecuencia en niños diarreicos menores de dos años. La diarrea producida por gérmenes del género *Salmonella* fue rara (1.3%).

Pierce *et al.* (67), realizaron un estudio en 100 casos de diarrea de la consulta externa del Hospital Roosevelt y 101 casos de diarrea de 10 comunidades del área rural del país. Utilizaron como controles (niños sin diarrea) tanto de la zona rural como urbana, un número semejante de niños. La *E.C.E.* fue aislada de dos niños diarreicos (1.9%), y de dos testigos (1.8%) que pertenecían al área rural. En la zona urbana ésta se identificó en 3 casos de diarrea (3%) y en 4 controles (3.7%). En dicho estudio únicamente la *Shigella* demostró ser más frecuente en niños con diarrea que en niños sin diarrea.

Gordon y otros (31) investigaron una epidemia de diarrea en Santa María Cauqué, comunidad rural del Departamento de Sacatepéquez, que afectó a gran parte de la población (559 casos), y originó 7 muertes. El examen bacteriológico de las heces de los pacientes reveló que el 21.3 por ciento de los casos de diarrea estaban infectados con bacterias enteropatógenas conocidas. La *Shigella dysenteriae* 1 fue uno de los agentes causantes y se aisló del 2.2 por ciento; *Shigella flexneri* y otras se confirmaron en el 15.5 por ciento y se comprobó *Salmonella* en el 0.2 por ciento. La *E.C.E.* se observó en un 3.4 por ciento.

Mata *et al.* (49) llevaron a cabo una investigación sobre la prevalencia de bacterias enteropatógenas en seis pueblos de origen Maya del altiplano de Guatemala, que incluyó un total de 712 niños menores de 9 años de edad. Como en los estudios anteriores, la mayor incidencia fue de microorganismos del género *Shigella* (7.7%), pero la prevalencia de *Salmonella* (1.5% demostró ser mayor que la que revelaron otros estudios. En cuanto a *E.C.E.*, se aislaron 35 cepas (4.4%), las que en varias ocasiones figuraron en combinación con otras bacterias patógenas. Su profusión en los pueblos estudiados indica que este germen es ubicuo y muy diseminado. La prevalencia de los serotipos mayormente incriminados en los casos de diarrea, esto es, 0111:B4, 055:B5, 0127:B8 y 026:B6, fue de 2.2 por ciento.

Mata *et al.* (51), practicaron también un estudio bacteriológico en 60 niños, en su mayoría menores de dos años, que presentaban cuadros diarreicos serios, motivo por el cual fueron admitidos en el Servicio de Hidratación y Emergencia del Hospital Roosevelt. La prevalencia encontrada

para *Shigella, E.C.E.* y *Salmonella* es, hasta la fecha, la más alta en Guatemala, ya que estos gérmenes fueron hallados solos o asociados entre sí, en 38.3 por ciento de los casos. La *Shigella* se encontró en 25 por ciento, la *E.C.E.* en el 16.6 por ciento y la *Salmonella* en 10 por ciento de los casos.

A pesar de que se han llevado a cabo algunas investigaciones encaminadas a esclarecer las causas de la diarrea infantil en nuestro medio, hay aspectos que aún no han sido considerados; tal es el caso del estado inmunitario de la población a los microorganismos enteropatógenos que se han reconocido como principales causas etiológicas en el desencadenamiento de esta enfermedad (esto es, *Shigella, E.C.E.* y *Salmonella*). Los estudios sobre inmunidad son, pues, necesarios para confirmar o esclarecer el papel etiológico de estos agentes y para complementar los hallazgos de interés epidemiológico.

III. MATERIAL Y METODOS

A. POBLACION

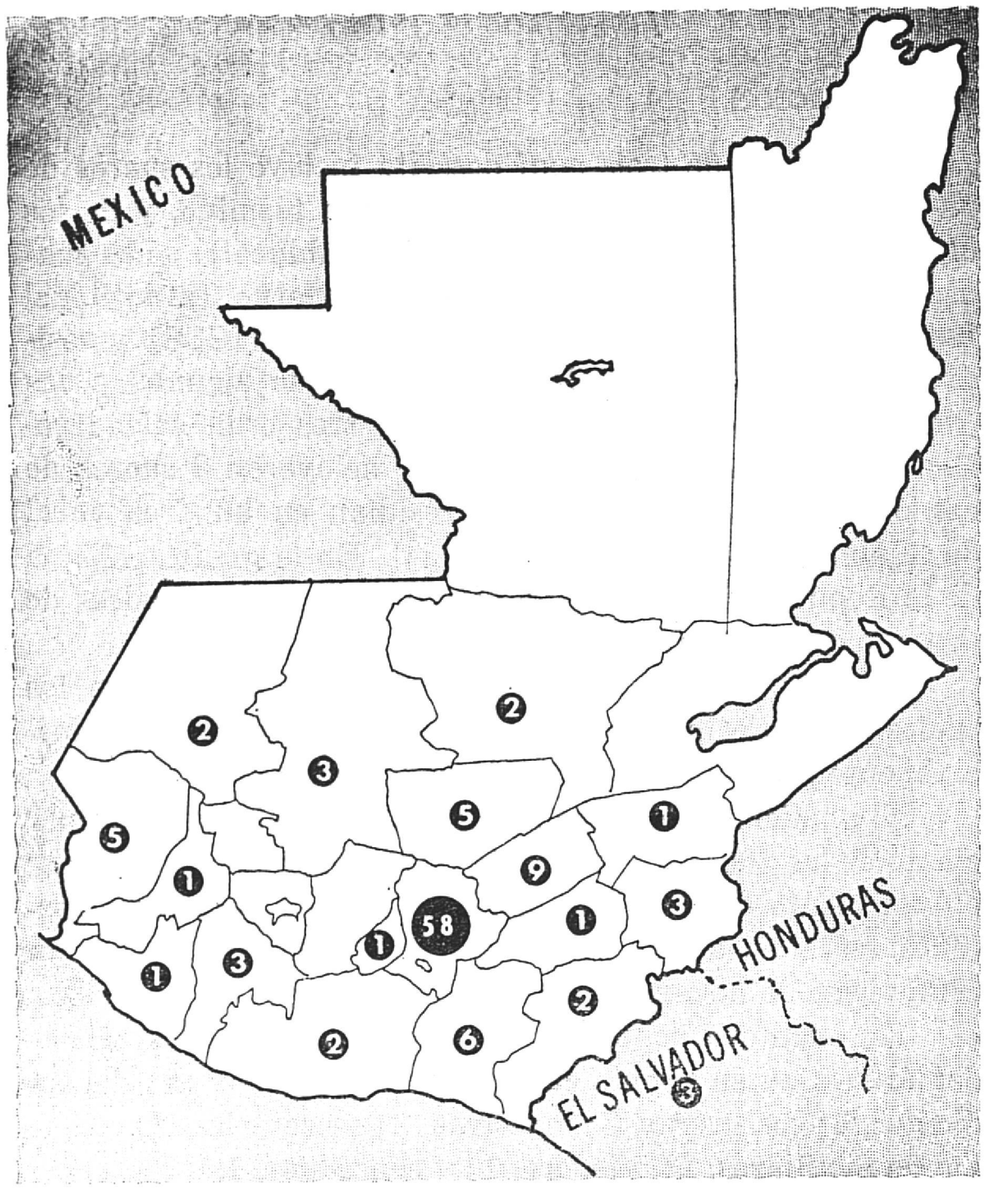
El trabajo de tesis aquí descrito incluyó los sueros de un total de 100 mujeres embarazadas, a término, y de los hijos respectivos (sangre del cordón umbilical). Las madres fueron atendidas en el Centro Materno Infantil del Instituto Guatemalteco de Seguridad Social (IGSS) y residían en su mayoría en la Capital, aunque algunas pocas provenían de otros departamentos y tres eran salvadoreñas. Además de estas muestras se incluyeron 8 sueros de cordón de niños cuyas madres residían en un área rural de Guatemala (San Antonio La Paz). En la gráfica (Mapa de la República) se indica la distribución de las madres de acuerdo con el lugar de origen.

Además, se colectaron ciertos datos sobre la madre, los cuales se anotaron en una hoja de registro preparada especialmente para el caso (véase hoja adjunta).

El análisis de algunos de los datos reveló que el 83 por ciento de las 100 madres investigadas sabían leer y escribir; 60 por ciento de ellas eran casadas, y el 40 por ciento restante, solteras, de las que 32 por ciento convivían con un compañero de hogar.

En cuanto a ocupación, 84 se dedicaban a los oficios domésticos en su propia casa, y las restantes eran: dependientes, 5; costureras, 3; maestras, 2; secretarias, 2; enfermeras auxiliares, 2; tejedora, 1; y contadora, 1.

Todas oscilaban entre 15 y 42 años de edad. El 37 por ciento de las madres pertenecían al grupo de 15 a 24 años; 43, al de 25 a 34, y el 20 por ciento restante eran mujeres de 35 años o más.



Incap 64—447

HOJA DE REGISTRO DE DATOS

Nº de serie ..... Nº del registro.....
Nº suero madre ..... Fecha .....
Nº suero cordón ..... Lee .....
Nombre ..... Escribe .....
Edad ..... Localidad de origen .....
Profesión ..... Estado civil .....

Ingreso mensual (familia) Q.....
Antecedentes de poliomielitis .....

El nivel socioeconómico de dicho grupo se definió arbitrariamente con base en el ingreso mensual de la familia a la cual pertenecía la madre. De este modo se describieron tres categorías: muy baja cuando dicho ingreso era de menos de Q50.00 por familia; baja si el ingreso alcanzaba de Q50.00 a Q99.00, y media si excedía de Q100.00. De acuerdo con esta clasificación, el 28 por ciento de las madres del estudio pertenecían a la clase muy baja y, de éstas, dos provenían de familias cuyo ingreso mensual no llegaba a Q25.00; el 54 por ciento pertenecían a la clase baja y el 18 por ciento a la clase media.

1. *Colección de las muestras de sangre*

La colección de muestras se llevó a cabo en el momento del parto con ayuda del médico y de las enfermeras a cargo de la atención de las pacientes.

Las muestras consistían de sangre de la madre y sangre del cordón umbilical correspondiente, tomadas asépticamente en tubos estériles. Para la extracción de sangres maternas se utilizaron tubos vacutainer estériles de 13 × 100, y para recoger la sangre del cordón, tubos de 15 × 148 estériles con tapón de algodón.

Las sangres fueron dispuestas inmediatamente después de su extracción en gradillas de madera que se colo-

caron dentro de un termos con hielo, donde se dejaron durante la noche. Luego se trasladaron a los laboratorios del INCAP en los mismos termos para su consiguiente examen.

Al recibo de las muestras en el laboratorio central, se procedió a desprender el coágulo con un aplicador de madera estéril y luego los especímenes fueron centrifugados a 3000 rpm durante 10 minutos en una centrífuga corriente. Los sueros se extrajeron con pipetas estériles y se pasaron a frascos "vials" de 13 × 50 o bien a tubos con tapón de rosca 13 × 125, también estériles, los cuales fueron guardados a —4°C en el congelador de una refrigeradora de uso corriente o bien a —65°C en un congelador eléctrico.

Los estudios inmunoserológicos llevados a cabo en el grupo de población mencionado, serán descritos posteriormente en detalle. Por el momento basta citar que éstos consistieron en la determinación del nivel de anticuerpos neutralizantes (polio 1) en 108 sueros, 50 madres y sus respectivos hijos, y 8 sueros del cordón umbilical correspondientes a niños cuyas madres residían y dieron a luz en San Antonio La Paz. También se determinaron las bacteriolisinas (*E.C.E.* 0111:B4 y 055:B5) en 100 sueros diferentes de los anteriores (50 obtenidos de las madres y 50 de sus respectivos hijos) pero provenientes de la misma población descrita con anterioridad y examinada durante el mismo período.

B. DETERMINACION DEL TITULO DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES

La técnica empleada constituye una modificación del método de Marine *et al.*(46), usando cultivos de células de riñón y de amnios humano primario de aproximadamente 8 días de edad; además se utilizó como diluyente una solución amortiguadora de fosfatos (PBS).

Los sueros a investigar fueron inactivados durante 30 minutos a 56°C. La cristalería (tubos de ensayo de 10 × 100 y pipetas de 1, 5 y 10 c.c. serológicas) se lavó y preparó de acuerdo con procedimientos ya estandarizados.

1. *Preparación del antígeno de poliovirus 1*

En la preparación del antígeno viral se utilizó la cepa Sc., 2ab del poliovirus tipo 1 atenuado de Sabin(77), la cual fue remitida por el Dr. W. Pelon, miembro del *International Center for Medical Research and Training* (ICMRT) con sede en San José de Costa Rica. Cabe destacar que el virus había sido subcultivado varias veces en células de riñón de mono y en células diploides.

Los cultivos de tejidos usados en la preparación del antígeno consistieron en células HEp-2(89) cultivadas en botellas de "dilución de leche" en un medio consistente de hidrolizado de lactoalbúmina en solución de Hanks (LH), suplementado con 5 por ciento de suero de bovino precalentado a 56°C durante 30 minutos.

Se emplearon dos cultivos en botellas, los cuales presentaban un monoestrato confluente. El medio de crecimiento fue extraído y reemplazado por 10 ml. de solución amortiguadora de Hanks (H), a fin de eliminar parte del medio, suero y detritos celulares que se encontraban sobre la superficie de las células. Al cabo de 5 minutos de "lavado", se extrajo también la solución de Hanks y se procedió a inocular los monoestratos.

La inoculación se llevó a cabo con 0.2 ml. de flúido infeccioso (poliovirus 1) obtenido de la ampolla original. El título de este lote de virus era desconocido. Luego de 5 minutos de incubación se adicionaron 10 ml. de medio en Earle (LE) a cada botella y se incubaron a 37°C en posición estática.

Las botellas fueron examinadas al microscopio a fin de determinar el inicio del efecto citopatogénico. Al cabo de 24 horas de incubación el monoestrato presentaba de 90

a 100 por ciento de células destruidas, por lo que las botellas se colocaron en la congeladora a —65°C.

Las células se sometieron a seis ciclos de congelación y descongelación y a continuación se mezcló el contenido de las dos botellas, centrifugándolo en frío a 2500 rpm. durante 10 minutos para clarificarlo. El líquido claro fue luego distribuido en frascos vials estériles de 13 × 50, que se conservaron a —65°C. En la titulación del virus se empleó como diluyente la solución amortiguadora de fosfatos (PBS).

El virus fue titulado dos veces usando en una oportunidad cultivos de células HEp-2 de 5 días de edad, y en la otra, cultivos de células de riñón humano primario, de 8 días de edad. En ambos casos se utilizó la técnica de titulación que seguidamente se describe:

a) En una gradilla de metal se alinearon 7 tubos estériles de 10 × 100, en cada uno de los cuales se colocó 1.8 ml. de PBS utilizando una pipeta estéril de 5 ml.
b) Se añadió 0.2 ml de la suspensión de virus al primer tubo de la serie mediante una pipeta estéril de 1 ml., la que luego se descartó.
c) Con otra pipeta estéril de 1 ml. se mezcló el contenido del primer tubo (dilución 10^{-1}), pasando 0.2 ml. de esta dilución al tubo siguiente y descartando luego la pipeta. La operación se repitió hasta obtener la dilución 10^{-7}.
d) Se inoculó O.1 ml. de las diluciones 10^{-3} a 10^{-7} en cada uno de tres tubos de cultivos de tejidos (riñón humano primario o HEp-2). La inoculación se inició con la dilución mayor a fin de evitar contaminaciones significativas. Los tubos se incubaron a 37°C en posición estática.
e) La lectura final de la titulación se hizo a los 5 días, y el título se calculó de acuerdo al método de Reed y Muench (70).

f) El título del lote de poliovirus 1 fue de $10^{-6.5}DICT_{50}$ por ml. en células HEp-2 y de $10^{-7.5}DICT_{50}$ por ml. en células de riñón humano primario.

Para los propósitos de esta investigación se decidió tomar en título obtenido en células de riñón humano primario, esto es, el título de $10^{-7.5}DICT_{50}$ como el más aceptable, por ser el más alto y por usarse esas células en casi todas las neutralizaciones practicadas en esta investigación.

La dilución de virus a ser usada en las neutralizaciones se calculó de acuerdo a la fórmula:

$$Concentración_1 \times Volumen_1 = Concentración_2 \times Volumen_2$$

Considerando que se deseaba usar 250 $DICT_{50}$ (contenidas en 0.1 ml.) por tubo, fue necesario preparar una suspensión que tuviera el doble (500 $DICT_{50}$) a fin de corregir para la dilución al mezclar el virus con el suero. De este modo:

$$10^{-6.5}DICT_{50} \times 0.1 \text{ ml.} = 500DICT_{50} \times X$$
$$6310 = X$$

Por lo tanto, una dilución del lote original de virus de 1:6310 habría de dar una suspensión que contuviese 500 $DICT_{50}$ por 0.1 ml, esto es, la cantidad de virus deseada.

2. *Dilución del suero*

Se dispuso una gradilla de metal con 8 tubos de ensayo de 10 × 100 debidamente numerados para obtener diluciones desde 1:8 hasta 1:1024. Se colocó 2.8 ml. de PBS en el primer tubo y 1 ml. en los restantes. Se añadió 0.4 ml. de suero al primer tubo con una pipeta de 1 ml. y luego la pipeta fue descartada. Con otra pipeta de 1 ml. se mezcló el contenido y se pasó 1 ml. al tubo 2. De nuevo se descar-

tó la pipeta y con una nueva de 1 ml., se mezcló el contenido del segundo tubo y se pasó 1 ml. al tubo siguiente. Esta operación se repitió hasta llegar al octavo tubo.

3. *Preparación de la mezcla suero-virus*

En otra gradilla se dispusieron 8 tubos de ensayo de 10 × 100 para las diluciones de 1:16 a 1:2048, y se agregó a cada uno 0.5 ml. de antígeno viral. Usando pipetas individuales, se pasó 0.5 ml. de dilución de suero 1:8 al tubo que contenía virus etiquetado 1:16, y 0.5 ml. de la dilución 1:16 al tubo marcado 1:32 y así sucesivamente, hasta el tubo 1:2048. Se obtuvieron así diluciones finales del suero de 1:16 a 1:2048.

4. *Incubación de la mezcla*

Las mezclas dilución de suero más virus, y un tubo con sólo 0.5 ml. de antígeno viral (control), fueron incubadas en baño maría a 37°C durante una hora.

5. *Inoculación a los tubos de cultivos de tejidos*

Se inoculó 0.1 ml. de cada mezcla suero-virus en cada uno de tres cultivos de tejidos (riñón o amnios humano primario). El control del virus consistió en inocular 0.1 ml. del antígeno previamente incubado a 37°C por una hora, en cada uno de tres cultivos de tejidos. El control del suero se hizo inoculando 0.1 ml. de la dilución de suero 1:8 en cada uno de tres cultivos. Se dejaron además, varios tubos sin inocular con el fin de utilizarlos como controles de la negatividad de los cultivos.

6. *Lecturas*

El punto final de la titulación se determinó mediante la observación microscópica de la inhibición del efecto citopático del virus; la lectura final se hizo dos días después de que los tubos con virus (controles) mostraron degeneración en más del 50 por ciento de las células.

7. *Cálculo del nivel de anticuerpos del suero*

El nivel de anticuerpos neutralizantes de cada suero se calculó por el método de Reed y Muench (70).

Las primeras 10 neutralizaciones consistieron en el análisis de los sueros, de 5 madres y sus hijos, seleccionados al azar. En este análisis se sometieron a prueba todas las diluciones ya citadas (1:16 a 1:2048). Con el fin de simplificar la rutina se procedió como sigue:

a) Se probaron 40 sueros (20 madres y sus hijos) haciendo sólo las diluciones 1:16, 1:32, 1:28, 1:512 y 1:2048.
b) Como los títulos de cada par de sueros (madre y cordón) fueron semejantes o iguales, se analizaron sólo los 25 sueros de las madres restantes, sometiendo a prueba las mismas diluciones ya mencionadas.
c) Luego, del total restante, se analizaron diez sueros del cordón a la dilución en que la madre todavía mostraba anticuerpos neutralizantes y a la dilución inferior inmediata. El criterio de esta norma se basó en que cuando había diferencia entre el título del par de sueros, el título mayor era el de la madre.
d) Los 15 sueros restantes, sin embargo, fueron analizados como en el caso anterior, pero se incluyó también la dilución superior inmediata. Cabe advertir que la inclusión de las tres diluciones se debió a que el uso de dos diluciones no permitió en algunos casos determinar el título del suero; ello hizo necesario una repetición de la prueba, usando, esta vez, tres diluciones.

Siempre que hubo necesidad de repetir las titulaciones, se hicieron todas las diluciones y se utilizó el mismo tipo de cultivo de tejidos (riñón o amnios humano) a fin de disminuir el error inherente a diferencias en la susceptibilidad de los diversos sistemas de cultivos de tejidos.

C. TECNICA PARA DETERMINAR BACTERIOLISINAS DEL SUERO

1. *Cultivos*

En esta investigación se utilizaron dos cepas de *E.C.E.* (0111:B4 y 055:B5) aisladas de hisopos rectales de niños con diarrea severa que recibían atención médica en el Hospital Roosevelt(51).

Estos organismos fueron identificados por aglutinación con sueros polivalentes y específicos OB. Las colonias que aglutinaron con estos sueros se trasplantaron a agar nutritivo, y al cabo de 18 horas de crecimiento se suspendieron en solución salina. Después de hervir esta suspensión durante 30 minutos, fue aglutinada con sueros polivalentes y específicos 0. La presencia del antígeno 0 se confirmó por titulación usando el suero específico 0 y por pruebas bioquímicas(21).

Para el desarrollo de este estudio se seleccionaron cepas que habían mostrado antígeno 0 a una dilución mayor de 1:1280 con el antisuero 0 correspondiente. Se usaron sueros de la Casa Difco y medios de cultivo de las firmas comerciales BBL y Difco, respectivamente.

2. *Preparación del antígeno*

El antígeno consistió de cultivos de *E.C.E.* 0111:B4 y 005:B5 de 18 horas de crecimiento en caldo tripticasa soya, diluidos de tal manera que contuvieran de 1,000 a 2,000 bacterias por mililitro.

Un cultivo bacteriano de 18 horas de edad contiene un promedio aproximado de 100 millones de bacterias por ml.(83). El número de bacterias de antígeno de *E.C.E.* fue determinado haciendo diluciones del cultivo de 18 horas que oscilaban desde 10^{-1} hasta 10^{-6}. Empleando el método de "dilución en placa" se trató así de establecer cuál de las diluciones daría como resultado un total de 1,000 a 2,000 bacterias por mililitro.

Para hacer la cuantificación en placa se colocó, valiéndose de una pipeta estéril, 0.1 ml. de cada dilución bacteriana en una placa de Petri, a la que luego se agregó agar tripticasa soya licuado y enfriado a 47°C. Se prepararon así 5 cajas por cada dilución. Las lecturas se realizaron a las 24 horas de incubación a 37°C y consistieron en la enumeración de las colonias de cada caja, para obtener promedios.

Los resultados indicaron que 0.1 ml. de la dilución 10^{-6} contenía la cantidad deseada de bacterias (100 a 200). De acuerdo con estos resultados, el material de trabajo fue una dilución de 10^{-6} del caldo de 18 horas.

3. *Investigación de bacteriolisinas*

En la investigación de bacteriolisinas se usaron dos procedimientos: técnica "cualitativa en tubo" y técnica "cuantitativa en placa".

El desarrollo de estos procedimientos fue el resultado de una serie de ensayos que serán referidos posteriormente; en síntesis, éstos indicaron que la técnica cuantitativa en placa es la más adecuada de las dos, ya que permite hacer una estimación más exacta y significativa del poder bacteriolítico de los sueros.

Método cualitativo en tubo. En un tubo estéril de 10 × 100, con tapón de algodón, se mezcló 0.1 ml. del suero a investigar, 0.1 ml. de complemento (suero fresco de cobayo) y 0.1 ml. de la dilución bacteriana 10^{-6} (antígeno).

La mezcla suero-complemento-antígeno fue incubada a temperatura ambiente durante 3 horas. Al cabo de este

período de incubación se añadió aproximadamente 2 ml. de agar tripticasa soya licuado y enfriado a 47°C.

Se incluyeron 4 controles, a saber:

a) Uno que contenía 0.1 ml. de antígeno en el agar;
b) Otro con 0.1 del suero a investigar en el agar;
c) 0.1 ml. de complemento en el agar; y
d) 0.1 ml. de antígeno más 0.1 ml. de complemento en el agar.

Todos los tubos fueron incubados a 37°C durante 18 horas. La interpretación se hizo observando el tubo a trasluz. En aquellos casos en que hubo inhibición total de las bacterias, se consideró que el suero contenía bacteriolisinas.

Método cuantitativo en placa. Se preparó una mezcla de 0.1 ml. de suero y 0.1 ml. de antígeno bacteriano en un tubo estéril de 10 × 100, con tapón de algodón.

La mezcla suero-antígeno fue incubada durante 3 horas a temperatura ambiente y al cabo de este período se colocó en una caja de Petri estéril, adicionándose después 20 ml. de agar tripticasa soya licuado y enfriado a 47°C. Las cajas inoculadas se incubaron a 37°C durante 18 horas.

Seguidamente se prepararon controles del antígeno y del suero, como a continuación se detalla:

a) Usando una pipeta estéril se puso 0.1 ml. de la dilución bacteriana 10^{-6} en cada una de 5 cajas de Petri estériles y luego se añadió 20 ml. de agar tripticasa soya, y se homogenizó el contenido mediante rotación suave;
b) Luego se colocó 0.1 ml. de suero y 20 ml. del medio de cultivo en una caja de petri estéril. Estas cajas también se incubaron a 37°C durante 18 horas.

La interpretación se hizo a partir del siguiente criterio: si había inhibición de 50 por ciento de las bacterias o más, se consideró que el suero contenía bacteriolisinas.

IV. RESULTADOS

Con el propósito de facilitar la comprensión de este Capítulo, los datos pertinentes han sido agrupados en secciones, considerándose en primer lugar:

a) Las características de la muestra, enumerando a continuación:
b) Los datos resultantes del estudio de los niveles de anticuerpos neutralizantes a poliovirus 1, y
c) Aquellos relativos a la presencia de bacteriolisinas a *E.C.E.* 055:B5 y 0111:B4 en sueros de madres y sus hijos respectivos.

Finalmente,

d) Recopilando todos los resultados con fines de comparación.

A. CARACTERISTICAS DE LA MUESTRA

Como ya se mencionó en el capítulo sobre metodología, el estudio incluyó un total de 100 sueros de mujeres embarazadas colectados en el momento del parto y 108 sueros del cordón umbilical.

Las características de la muestra fueron descritas también en el Capítulo III "Material y Métodos". Ninguna de las madres, con excepción de cuatro, tenían historia de vacunación contra la poliomielitis, hecho que refleja el panorama existente en Guatemala con respecto a programas de vacunación contra esta enfermedad, tanto a nivel general como individual, en clínicas particulares y prenatales. Según se dijo, la recolección de datos sobre el estado marital, ingresos mensuales y otra información similar permitie-

ron identificar a la población estudiada, dentro de la categoría de bajo nivel socioeconómico. Sin embargo, no debe pasar desapercibido el hecho de que en nuestro país existen otros grupos de población de nivel mucho más bajo, que ni siquiera llegan a solicitar los servicios de centros como el Materno Infantil del IGSS.

La procedencia de las madres señaló una diversidad de localidades, por lo que bien puede decirse que los resultados de que aquí se da cuenta son representativos de las poblaciones de bajo nivel socioeconómico de toda la República.

B. NIVEL DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES A POLIOVIRUS 1

1. *Consideraciones en cuanto a la técnica*

Según se mencionó en el Capítulo "Material y Métodos", se obtuvieron dos títulos del lote de poliovirus 1, de acuerdo al sistema de células empleado. En la presente investigación el título utilizado para calcular la dilución de virus a usar, fue el más alto de los dos.

A pesar de que la mayoría de los autores emplean la misma cantidad de virus en los tubos controles y en los de dilución de virus-suero, en este estudio se usó el doble de virus en los tubos controles que en las mezclas.

Con el fin de determinar si la cantidad doble de virus que se usó en los tubos controles podría haber tenido cierto efecto en la prueba de neutralización en el sentido de adelantar significativamente el punto final de la misma, con perjuicio del título del suero, se hizo un experimento que consistió en la inoculación de cultivos de riñón humano primario de 12 días de edad y de amnios humano primario de la misma edad, con 500$DICT_{50}$ por tubo. Como control de este lote de cultivos se inocularon cultivos de las mismas células pero que contenían 250$DICT_{50}$ por tubo, esto es, una cantidad de virus comparable a la que se utilizó en cada tubo inoculado con las mezclas dilución del suero-virus en

las determinaciones de anticuerpos en los sueros. Los resultados revelaron que el efecto citopático aparecía con la misma rapidez en ambos casos, por lo que es de presumir que la variación introducida en la técnica no tuvo ningún efecto significativo en la lectura final de las pruebas.

2. *Anticuerpos neutralizantes a poliovirus 1 en el suero materno*

Se estudiaron anticuerpos neutralizantes anti-poliovirus en el suero de 50 mujeres embarazadas cuya sangre se obtuvo en el momento del parto.

Todas las madres estudiadas presentaron títulos de anticuerpos a un nivel de 1:8 ó mayores. Según se aprecia en el Cuadro Nº 1, los títulos variaron desde 1:8 hasta 1:2000, mostrando la mayoría de los sueros (64%) valores que fluctuaban entre 1:32 y 1:255. Seis madres (12%) tuvieron títulos que oscilaron de 1:8 a 1:31; diecisiete

Cuadro Nº 1

TITULO DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES A POLIOVIRUS 1 EN EL SUERO DE 50 MADRES Y EN EL SUERO DE 50 NIÑOS RECIEN NACIDOS (CORDON UMBILICAL)

Título recíproco ($DICT_{50}$)	Suero de la madre		Suero del cordón	
	Nº	%	Nº	%
- 8	0	0	2	4
8– 15	2	4	4	8
16– 31	4	8	5	10
32– 63	16	32	17	34
64– 127	1	2	2	4
128– 255	15	30	13	26
256– 511	8	16	6	12
512–1023	0	0	1	2
+ 1024	4	8	0	0

(34%) entre 1:32 y 1:127; veintitrés (46%) entre 1:128 y 1:511, y cuatro (8%), mostraron títulos de 1:2000.

Los resultados en cuestión se expresan gráficamente en la Figura 1. La distribución de los niveles de anticuerpos, por edad, se sumariza en el Cuadro Nº 2.

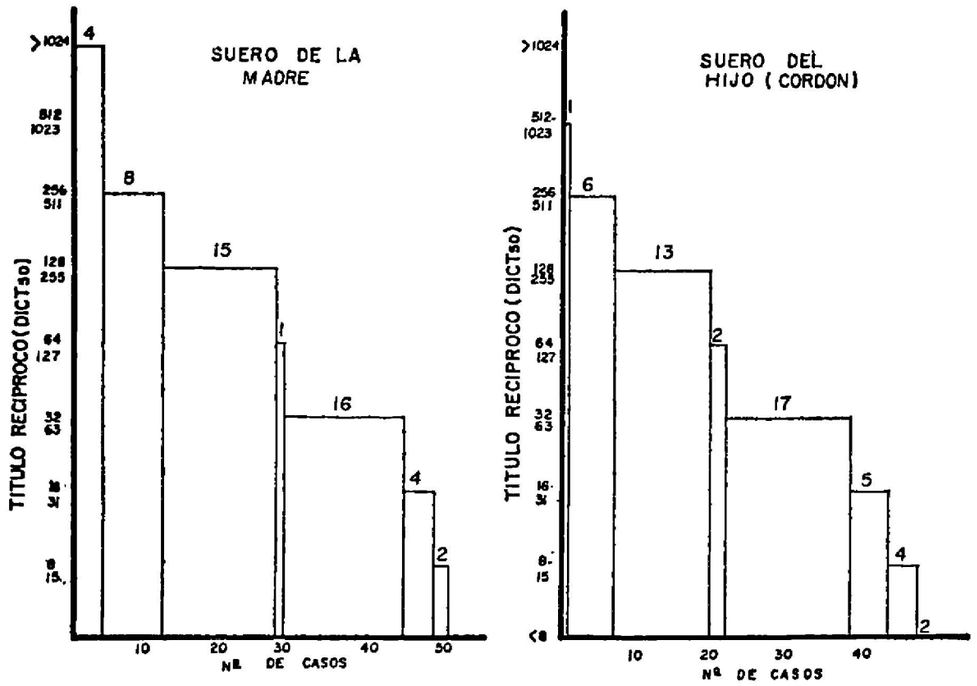


FIGURA Nº1 Títulos de anticuerpos neutralizantes a poliovirus I, en sueros de madres y del cordón. Los numeros sobre las columnas indican el numero de casos

Incap 64-448

Cuadro Nº 2

TITULO DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES A POLIOVIRUS 1 EN 50 MADRES, POR EDAD

Madres Nº	Edad años	Títulos recíprocos ($DICT_{50}$)							
		8-31		32-127		128-511		512-2048	
		Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
15-24	17	3	17.6	6	35.3	7	41.2	1	5.8
25-34	23	3	13.0	7	30.4	10	43.8	3	13.0
35-44	10	0	0	4	40.0	6	60.0	0	0

A pesar de que el número de madres por grupo de edad fue pequeño como para establecer conclusiones definitivas, puede aseverarse que como se indica en la Figura 2, no se encontraron diferencias en cuanto a edad en la distribución de los títulos.

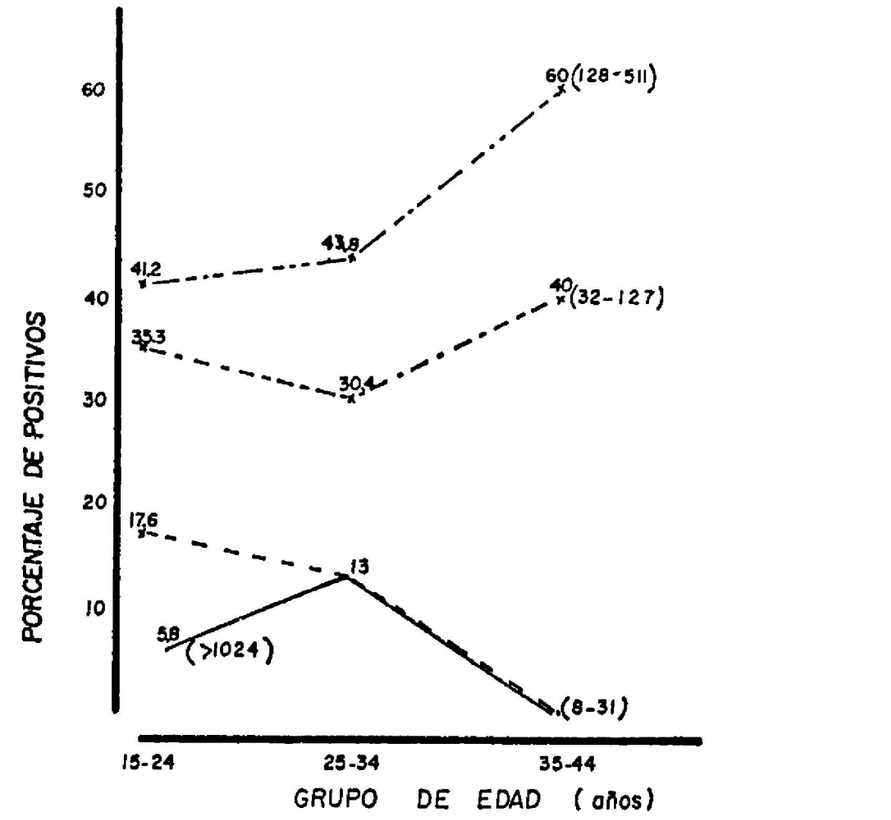


FIGURA Nº 2 Anticuerpos neutralizantes a poliovirus I en 50 madres de acuerdo al título y al grupo de edad.

De las cuatro madres que habían sido vacunadas, tres tuvieron títulos de 1:250 y una de 1:2000. Sin embargo, en el grupo sin vacunar se observaron también títulos semejantes. Debido al pequeño número de casos investigados no es posible hacer comparaciones entre los dos grupos (vacunadas y no-vacunadas).

3. *Anticuerpos neutralizantes a poliovirus 1 en el suero del cordón*

Se investigaron 58 sueros del cordón umbilical de los cuales 50 pertenecían a los niños de madres cuyo suero fue estudiado también, como se refirió en el párrafo anterior. Los sueros restantes se colectaron de partos observados en San Antonio La Paz.

En todos los primeros 50 sueros del cordón, se encontraron títulos de 1:8 ó mayores, con excepción de dos que mostraron anticuerpos, uno a la dilución de 1:3 y el otro a la dilución 1:6.

Los valores de los títulos observados con mayor frecuencia (64%) fluctuaron entre 1:32 y 1:255. El título más alto fue de 1:708, que correspondió al suero de un niño cuya madre mostró un título de 1:2000. Nueve sueros (18%) presentaron títulos de anticuerpos de 1:8 a 1:31; diecinueve (38%) de 1:32 a 1:127; diecinueve (38%) de 1:128 a 1:511, y uno (2%) de 1:512 a 1:1023 (Cuadro Nº 1).

Estos resultados se presentan también gráficamente en la Figura 1.

Los 8 sueros del cordón umbilical provenientes de niños cuyas madres residían en San Antonio La Paz, mostraron títulos menores de 1:25 (4 sueros), de 1:63 (dos sueros) y de más de 1:128 (dos sueros).

4. *Comparación entre los niveles de anticuerpos neutralizantes a poliovirus 1 del suero materno y del cordón umbilical correspondiente*

Los títulos de anticuerpos neutralizantes a poliovirus 1 del suero materno y del cordón se presentan en el Cuadro Nº 1. Como puede observarse en este Cuadro, los títulos correspondientes al cordón umbilical tienden a ser ligeramente menores que los maternos. Esta tendencia se aprecia con mayor claridad en la Figura 3.

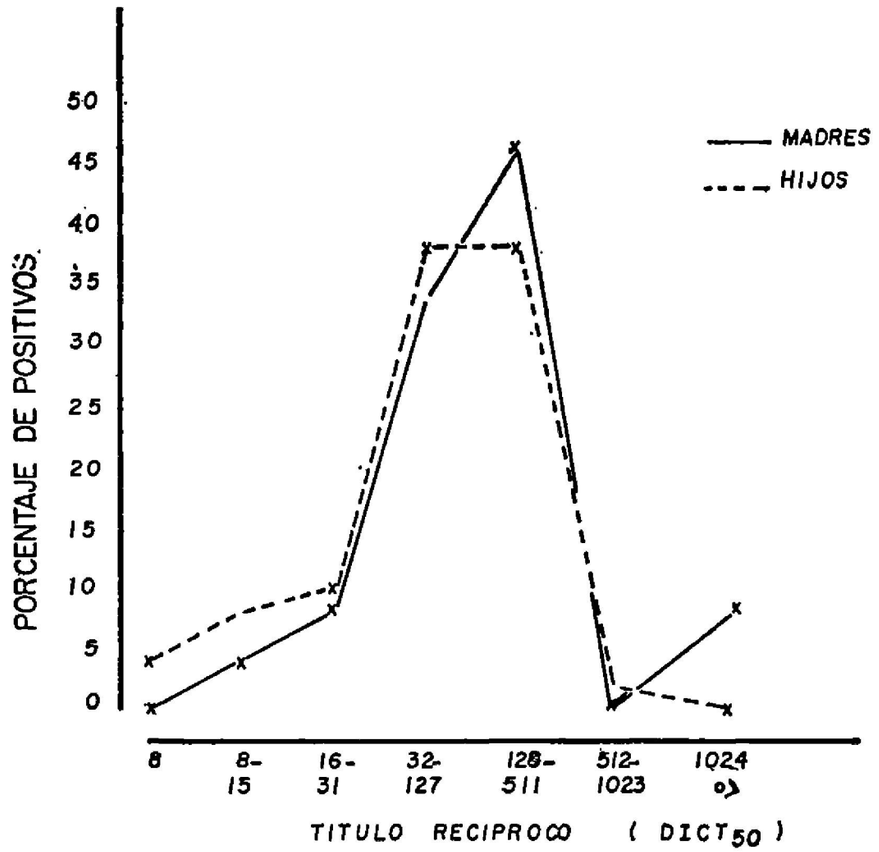


FIGURA Nº3 *Distribución de los niveles de anticuerpos a poliovirus I en 50 sueros de madres y en 50 sueros del cordón umbilical de sus respectivos hijos*

En 20 casos (40%) los títulos fueron iguales, tanto en los sueros maternos como en los correspondientes al cordón. En el 22 por ciento de los pares de sueros el título de la madre fue mayor que el del suero de su hijo, en una dilución de 2X. En 17 pares de sueros (34%) el título materno excedió al título correspondiente del cordón umbilical en más de una dilución de 2X. Estos casos se sumarizan en el Cuadro Nº 3.

Dos sueros del cordón (4%) mostraron niveles de anticuerpos mayores que el título en el suero de la madre, en una dilución de 2X.

Cuadro Nº 3

CASOS EN QUE EL TITULO DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES A POLIOVIRUS 1 EN LA MADRE FUE MAYOR QUE EL DEL CORDON UMBILICAL RESPECTIVO DE UNA DILUCION (2X)

Edad de la madre años	Recíproco del $DICT_{50}$	
	Madre	Cordón
20	9	3
22	44	6
25	44	13
38	63	11
23	178	25
26	178	63
23	178	83
19	252	63
25	252	63
26	252*	63
36	252	83
22	332	178
32	332	178
21	2000*	252
28	2000	332
26	2000	332
30	2000	708

* Madres que habían recibido por lo menos una dosis de vacuna Salk.

C. PRESENCIA DE BACTERIOLISINAS A ESCHERICHIA COLI ENTEROPATOGENA 055:B5 y 0111:B4

1. *Consideraciones en cuanto a las técnicas*

En vista de los numerosos procedimientos descritos en la literatura, que existen para investigar bacteriolisinas en el suero, y ya que se carecía de información sobre estos anticuerpos en la sangre de madres e hijos guatemaltecos, fue necesario llevar a cabo una serie de estudios preliminares que condujeran a determinar las mejores condiciones de trabajo de acuerdo a los objetivos y conforme a las facilidades disponibles en los laboratorios del INCAP.

Los "ensayos piloto" a que se alude se resumen brevemente a continuación:

Ensayo Nº 1

Este tuvo como objetivo determinar la variación del nivel de bacteriolisinas de acuerdo a la dilución del suero. Se aprovechó el experimento para estudiar también si la incubación de la mezcla dilución suero-bacterias por 1 ó 3 horas a temperatura ambiente, o por 18 horas a 4°C, previo a su mezcla con el agar, daba origen a alguna diferencia.

Se procedió así a diluir el suero fresco obtenido de 5 madres hasta obtener diluciones de 1:2 a 1:32. Se tomaron sólo sueros de madres, asumiéndose momentáneamente que las bacteriolisinas podrían estar ausentes en el niño con más frecuencia que en la madre. Las diluciones se mezclaron con el antígeno (preparado como se indicó en el Capítulo "Material y Métodos") y se incubaron a la temperatura ambiente por 1 ó 3 horas, o a 4°C durante 18 horas. Al cabo de la incubación se adicionó agar tripticasa soya a la mezcla. Los resultados se leyeron a las 24 horas de incubación a 37°C.

El uso de este diseño experimental no permitió demostrar la existencia de bacteriolisinas en ninguno de los sueros.

Ensayo Nº 2

En vista de los resultados negativos del primer ensayo, se acordó someter a prueba los mismos sueros sin diluir, a fin de determinar si esta negatividad se debía al hecho de haber usado suero diluido. Para controlar mejor el experimento, se incluyó la dilución 1:2 que anteriormente había demostrado ser negativa. El procedimiento seguido fue exactamente igual al ya descrito.

En este caso tampoco se pudo demostrar la presencia de bacteriolisinas en ninguno de los sueros.

Ensayo Nº 3

Este ensayo tuvo por propósito estudiar el efecto de la adición de complemento en la prueba. Con base en las propiedades inmunológicas de las bacteriolisinas (56, 86), se consideró que el agregado de complemento hacía la técnica más sensible, permitiendo así demostrar el poder bacteriolítico del suero.

El complemento usado en este experimento, así como en los subsiguientes, consistió de suero fresco, libre de hemólisis, de cobayos jóvenes, sanos, cuya sangre se obtuvo por punción del corazón.

De nuevo se procedió aprobar los 5 sueros ya investigados en los dos ensayos anteriores, usando la "técnica del tubo" ya descrita.

Una vez más fue imposible demostrar bacteriolisinas en ninguno de los sueros.

Teniendo en cuenta los resultados negativos que rindieron los tres ensayos a que se ha hecho referencia, se consideró que este método no permitía la determinación de bacteriolisinas en el suero. Sin embargo, ya que bien podría ser que, por azar, los 5 sueros investigados hubiesen sido negativos, se decidió examinar los sueros restantes.

Este examen consistió en probar 100 sueros frescos (50 procedentes del grupo de madres y 50 de los cordones umbilicales respectivos), por el método del tubo que se detalla en el Capítulo "Material y Métodos".

La mezcla suero-bacterias fue incubada por un período de 3 horas, que es el tiempo que se recomienda para la producción de bacteriólisis. En esta prueba se adicionó 0.1 ml. de complemento a la mezcla suero-antígeno, con el fin de favorecer la reacción que, como se sabe, necesita de la presencia de éste para llevarse a cabo.

Se logró determinar bacteriolisinas a *E.C.E.* 0111:B4 en 17 sueros de madres y en 10 sueros de cordones umbilicales del total de 50 pares de sueros incluidos en el ensayo. En 7 casos se encontraron bacteriolisinas, tanto en el suero de la madre como en el del cordón respectivo. En 10 pares de sueros se observaron bacteriolisinas en los correspondientes a las madres, pero no así en los sueros procedentes del cordón umbilical.

En cambio, en 3 sueros del cordón de niños cuyas madres no mostraron bacteriolisinas, sí se observó poder bacteriolítico. En los 30 pares de sueros restantes (60%) no se pudo constatar la presencia de bacteriolisinas (Cuadro Nº 4).

Cuadro Nº 4

BACTERIOLISINAS A E.C.E 0111:B4 EN EL SUERO DE 50 MADRES Y DE SUS RESPECTIVOS HIJOS (Técnica del TUBO)

SUJETOS	Pares de sueros Nº	%
Bacteriolisinas presentes en el suero de la madre y del cordón	7	14
Bacteriolisinas presentes en el suero de la madre y ausentes en suero del cordón	10	20
Bacteriolisinas ausentes en el suero de la madre y presentes en el suero del cordón	3	6
Bacteriolisinas ausentes en el suero de la madre y del cordón	30	60

Con referencia a la investigación de bacteriolisinas a *E.C.E.* 055:B5 mediante la técnica descrita, cabe mencionar que sólo en uno de los sueros analizados (de una madre) se comprobó la presencia de estos anticuerpos.

Ensayo Nº 4

Considerando que la técnica del tubo no permitía determinar el grado de inhibición bacteriana, fenómeno que sólo podía apreciarse cualitativamente, se trató de aplicar otro procedimiento que permitiese establecer los diversos grados de lisis de las bacterias, lo que condujo al desarrollo de la técnica cuantitativa de placa ya descrita. En las pruebas que incluyó este ensayo se agregó 0.1 ml. de complemento a cada mezcla suero-bacterias.

El experimento en cuestión tuvo por objeto determinar bacteriolisinas a *E.C.E.* 0111:B4, usando la técnica de placa. Se sometieron a prueba 32 sueros ya investigados por la técnica del tubo, 23 de los cuales habían presentado bacteriolisinas a *E.C.E.* 0111:B4.

La variante que se introdujo a este método permitió hacer manifiestas las bacteriolisinas a *E.C.E.* 0111:B4 en 28 sueros; en otras palabras, hubo un incremento en el número de sueros positivos.

Ensayo Nº 5

Con el propósito de averiguar si era posible recuperar el poder bactericida de 100 sueros que habían sido calentados a 56°C durante media hora, y con el fin de estudiar el nivel de anticuerpos neutralizantes de poliovirus 1, se adicionó complemento fresco para "reemplazar" el que había sido destruido. Los sueros inactivados (50 maternos y 50 procedentes del cordón de sus respectivos hijos), se mezclaron con antígeno 0111:B4 y con el complemente. La técnica usada fue exactamente igual a la seguida en el ensayo Nº 6. En este experimento, sin embargo, se usó un

lote nuevo de complemento debido a que el anterior se consumió en los ensayos precedentes. Como control se utilizó la mezcla suero inactivado-antígeno, pero sin el agregado de complemento.

El suero de cobayo (complemento), inhibió por sí solo el crecimiento bacteriano. Consecuentemente no se pudo demostrar la presencia de bacteriolisinas en los sueros inactivados y suplementados.

De los sueros originales (calentados) que se examinaron sin complemento, 7 presentaron poder bactericida y, de éstos, 2 eran maternos y 5 del cordón. En el Cuadro Nº 5 se presenta una comparación entre estos datos y los resultados finales.

Cuadro Nº 5

BACTERIOLISINAS A E.C.E. 0111:B4 EN EL SUERO FRESCO Y EN EL SUERO INACTIVADO (56°C, 30 MINUTOS) DE MADRES Y SUS RESPECTIVOS HIJOS (Técnica de placa)

SUJETOS	SUEROS Nº	Fresco	Inactivado
Madre (sangre venenosa)	50	22 (44%)	
Hijo (sangre del cordón)	50	15 (30%)	
Madre (sangre venenosa)	50		2 (4%)
Hijo (sangre del cordón)	50		5 (10%)

Ensayo Nº 6

De acuerdo con el procedimiento clásico mencionado (Ensayos Nos. 3, 4 y 5), las lisinas reaccionan con el antígeno en presencia de complemento. Sin embargo, en los trabajos del Ensayo Nº 5 se demostró que la adición de

suero fresco de cobayo (complemento) inhibía *per se* el crecimiento de la *E.C.E.*, encubriendo así los resultados obtenidos por el sistema suero-complemento-antígeno, e impidiendo establecer, por consiguiente, si los sueros de madres e hijos tenían poder bactericida. Las pruebas realizadas en el Ensayo Nº 6 se llevaron a cabo mezclando sólo el suero (de madres e hijos) con el antígeno (suspensión de *E.C.E.*), y utilizando dos controles en cada prueba: a) *control de suero*, para averiguar si éste eliminaba *per se* el crecimiento bacteriano, y b) *control de antígeno*, para verificar la cantidad de bacterias en el mismo.

Se sometieron a prueba los mismos sueros que en el Ensayo Nº 4 y demostraron ser positivos a lisinas anti *E.C.E.* 0111:B4, lográndose los mismos resultados. Se pudo, pues, demostrar, que sí es factible estudiar lisinas anti *E.C.E.* mediante la reacción suero fresco-antígeno, incubando éste a temperatura ambiente durante 3 horas y sin el agregado de más complementos.

Arbitrariamente se dio por sentado que una inhibición del 50 por ciento o más de las bacterias denotaba la presencia de bacteriolisinas en el suero. Con base en las exploraciones anteriores, se acordó usar esta última técnica para analizar el total de los 50 pares de sueros disponibles. Estos, cabe mencionar, pertenecían a un grupo de población semejante a aquél en el que se estudiaron los anticuerpos neutralizantes de poliovirus.

2. *Bacteriolisinas en el suero materno*

El estudio de la presencia de bacteriolisinas a *E.C.E.* 055:B5 y 0111:B4 en el suero de 50 madres dio los siguientes resultados.

Se demostró la presencia de bacteriolisinas a *E.C.E.* 0111:B4 en 22 sueros (44%) y de bacteriolisinas a *E.C.E.* 055:B5 en un suero (2%) que, a su vez, presentó poder bacteriolítico hacia el serotipo 0111:B4.

La relación entre la presencia de bacteriolisinas a *E.C.E.* 0111:B4 y la edad de las madres se indica en el Cuadro Nº 6, donde, según se observa, las bacteriolisinas se pudieron determinar con mayor frecuencia a medida que aumentaba la edad de la madre. Esta diferencia, sin embargo, no fue estadísticamente significativa probablemente porque la muestra analizada fue muy pequeña.

Cuadro Nº 6

BACTERIOLISINAS A E.C.E 0111:B4 EN EL SUERO DE 50 MADRES AGRUPADAS SEGUN LA EDAD (Técnica de placa)

EDAD años	SUEROS	
	Nº	Positivos
15-19	4	0 (0%)
20-24	16	6 (37.5%)
25-29	14	7 (50.0%)
30-34	6	3 (50.0%)
35-39	10	6 (60.0%)

3. *Bacteriolisinas en el suero del cordón umbilical*

Se encontraron bacteriolisinas a *E.C.E.* 0111:B4 en 15 sueros (30%) y bacteriolisinas a *E.C.E.* 055:B5 únicamente en uno de ellos (2%) que, a su vez, presentó poder bacteriolítico sobre la *E.C.E.* 0111:B4.

4. *Comparación del poder bacteriolítico del suero materno y del cordón umbilical hacia* E.C.E: *055:B5 y 0111:B4*

E.C.E. 055:B5. Solamente uno de los pares de sueros mostró poder bactericida hacia este serotipo.

E.C.E. 0111:4. Los resultados obtenidos con este serotipo se presentan en el Cuadro Nº 7. Como se puede apreciar, 22 madres revelaron bacteriolisinas a este serotipo y, de éstos, la mitad 11 demostraron anticuerpos en sus hijos respectivos (esto es, en la sangre del cordón).

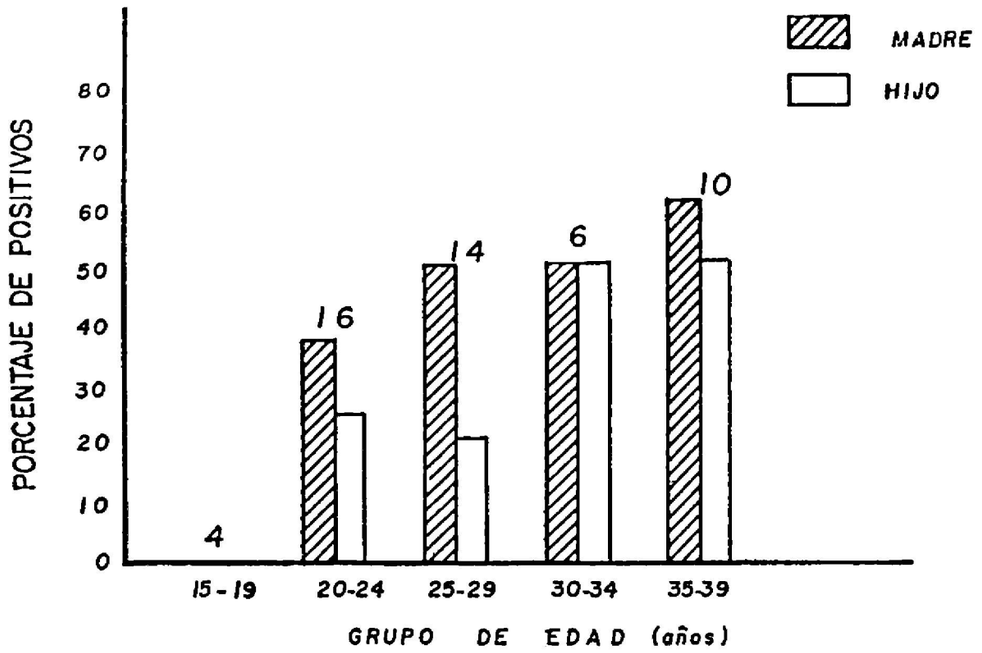


FIGURA Nº 4 *Bacteriolisinas de E.C.E. 0111:B4 en 50 madres por grupo de edad y en sus hijos respectivos*

Cuadro Nº 7

BACTERIOLISINAS A E.C.E 0111:B4 EN EL SUERO DE 50 MADRES Y DE SUS RESPECTIVOS HIJOS (Técnica de placa)

SUJETOS	Pares de sueros Nº	%
Bacteriolisinas presentes en el suero de la madre y del cordón	11	22
Bacteriolisinas presentes en el suero de la madre y ausentes en el suero del cordón	11	22
Bacteriolisinas ausentes en el suero de la madre y presentes en el suero del cordón	4	8
Bacteriolisinas ausentes en el suero de la madre y del cordón	24	48

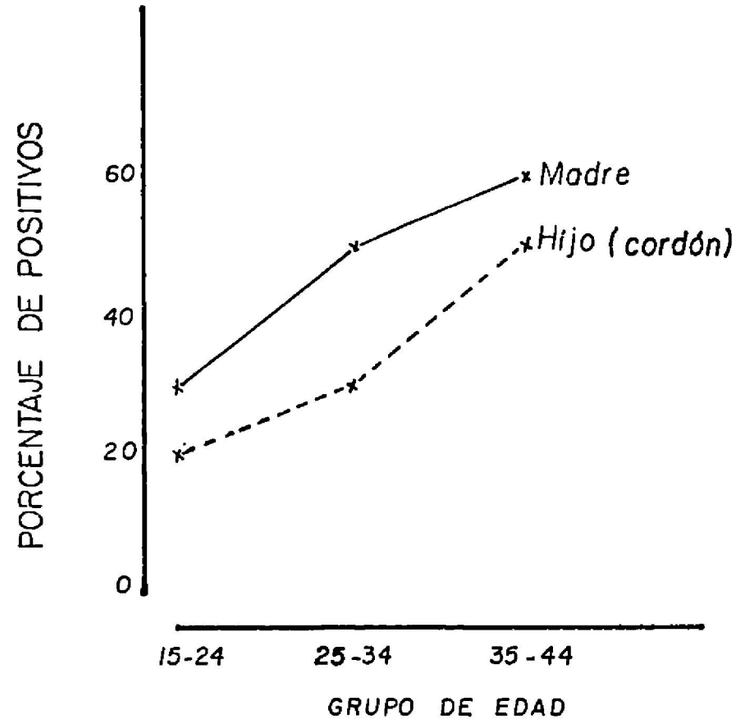


FIGURA Nº 5 *Bacteriolisinas de E.C.E 0111:B4 en 50 madres por grupo de edad y en sus hijos respectivos*

En 4 sueros del cordón umbilical se determinó bacteriolisinas a *E.C.E.* 0111:B4, anticuerpos cuya existencia no se pudo comprobar en los sueros maternos respectivos.

D. SINOPSIS SOBRE EL ESTADO INMUNITARIO HUMORAL EN MADRES E HIJOS, DETERMINADO MEDIANTE EL ESTUDIO DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES (POLIOVIRUS 1) Y BACTERIOLISINAS (E.C.E. 055:B5 Y 0111:B4)

En la Figura 6 se compara el estado inmunitario de madres e hijos en lo referente a anticuerpos neutralizantes a polivirus 1 y bacteriolisinas a *E.C.E.* 055:B5 y 0111:B4. En este estudio se partió del supuesto de que tanto madres como recién nacidos que mostraran anticuerpos neutralizantes a una dilución de 1:8 ó más, poseían inmunidad. En el caso de la poliomielitis, ésta fue determinada por los

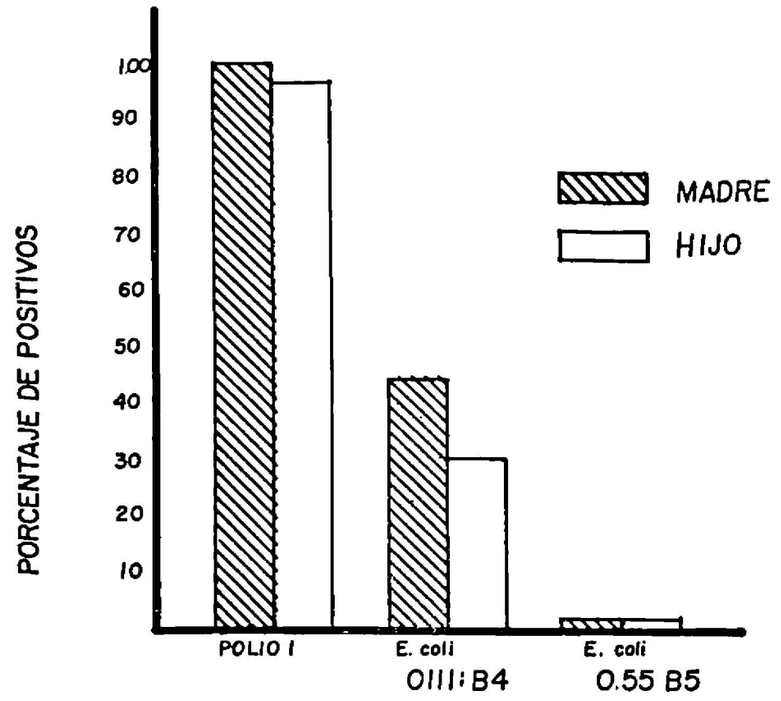


FIGURA Nº6

Comparación del estado inmunitario del suero de madres y del cordón con referencia a anticuerpos neutralizantes a poliovirus 1 y bacteriolisinas a E.C.E. 055:B5 y 0111:B4.

Se considera positivo el suero que neutraliza al virus en la dilución 1:8 y el que inhibe el 50% de las bacterias de E.C.E. en la técnica de placa.

niveles de anticuerpos neutralizantes a poliovirus 1, en el suero de 50 madres y sus respectivos hijos. Según se estableció bajo las condiciones de este estudio, dicha inmunidad fue alta, ya que la presencia de estos anticuerpos se demostró a una dilución de 1:8 ó más en el 100 por ciento de los sueros maternos y en el 96 por ciento de los sueros del cordón.

Con respecto a las bacteriolisinas a *E.C.E.* 0111:B4 se logró establecer que no existe un grado de protección tan alto como en el caso de la poliomielitis, ya que menos de la mitad de los sueros de madres estudiados, exhibieron esos anticuerpos, y aparentemente sólo la mitad de sus hijos los heredaron. Más aun, las bacteriolisinas a *E.C.E.* 055:B5 estuvieron prácticamente ausentes, tanto en los sueros de los niños como en los de las madres.

V. DISCUSION

Cuando se trata de elucidar los aspectos epidemiológicos de las enfermedades que más afectan a la población, sobre todo a la infantil, son muchos los aspectos que deben tenerse en consideración. Teniendo en cuenta que Guatemala es un país fundamentalmente en vías de desarrollo, es fácil de explicar la poca información disponible en cuanto a la epidemiología de esas enfermedades.

Por los motivos expuestos se juzgó que el trabajo de tesis aquí descrito sería de utilidad en el inicio de exploraciones sobre los aspectos inmunitarios de ciertas enfermedades prevalentes en nuestro medio. Lógicamente cualquier investigación encaminada a conocer los aspectos inmunitarios del organismo huésped, habría de principiar por el estudio de los anticuerpos del suero de la sangre del cordón umbilical, y del suero de la madre de cada niño.

La selección del estudio de anticuerpos neutralizantes de poliovirus, y de bacteriolisinas de *E.C.E.*, sobre el cual versa este trabajo, la justifican, en nuestra opinión, el gran número y la importancia de las infecciones causadas por estos microorganismos y por otros afines. La investigación de estos anticuerpos, al mismo tiempo, proporciona una idea de la situación que con respecto a otros agentes infecciosos rige en el medio guatemalteco.

La mitad de la población investigada procedía del departamento de Guatemala y el resto de casi todos los otros departamentos. Ya que dicha población estaba constituida por madres de bajo nivel socioeconómico, los hallazgos de este estudio pueden generalizarse a la mayor parte de los habitantes del país.

La determinación de anticuerpos neutralizantes antipoliovirus 1 a un título de 1:8 ó más en el suero de todas las madres que formaron parte del estudio, indica clara-

mente la abundante diseminación y transmisión de los poliovirus. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Horstmann *et al.*(36), autores que en sus estudios encontraron que casi el 100 por ciento de los adultos investigados presentaban anticuerpos hacia ese virus. Sin embargo, en otro trabajo que abarcó el estudio de sueros de 100 adultos guatemaltecos mayores de 20 años(82), y en el cual se utilizó el mismo procedimiento, se pudo determinar que sólo 56 por ciento presentaban anticuerpos neutralizantes del virus a la dilución de 1:8 ó más. Si se consideran como títulos significativos aquéllos de 1:4 ó mayores, el 76 por ciento de los adultos investigados por Sellers *et al.*(82) presentaron anticuerpos anti-poliovirus 1. Aún así el porcentaje es más bajo que el que se observó en el trabajo aquí descrito y en el de Gelfand y colaboradores(27), en poblaciones básicamente comparables. La magnitud del título fue comparable al observado por otros autores ya que cerca del 50 por ciento mostró títulos de más de 1:64 y aproximadamente el 15 por ciento un título mayor de 1:250.

Si se analiza la magnitud del título en función de la edad de la madre, parece ser que existe cierta tendencia de los títulos a ser más altos conforme la edad de los sujetos avanza, tendencia que, sin embargo, no llega a ser significativa.

El nivel de anticuerpos en el suero del cordón umbilical, en muchos casos no varió significativamente del observado en el suero respectivo de la madre, lo que sugiere que no existe interferencia en la transmisión de la globulina gamma de la madre al hijo. Este hecho ya fue sugerido por Aycock y Kramer en 1930(7) y confirmado posteriormente por otros autores(4, 14, 15). Por otro lado, investigadores como Lipton y Steigman(43) y Gibbels *et al.*(28) han encontrado que los niveles de anticuerpos en la madre son más altos que los del hijo. Martins da Silva y sus asociados(47) estudiando una población semejante a la que nos ocupa, demostraron cierta discrepancia entre los títulos correspondientes a los sueros de madres e hijos en un

porcentaje similar al observado en este estudio. Debe destacarse aquí que en la mayoría de los estudios citados se ha comprobado que un número apreciable de sueros del cordón umbilical están exentos de anticuerpos de poliovirus, mientras que en Guatemala, por el contrario, se observó transferencia de anticuerpos a un nivel de 1:8 ó más en todos los sueros analizados, salvo en 2, en los que se demostró la presencia de anticuerpos a diluciones de 1:3 y 1:6, respectivamente.

La situación en cuanto a la transferencia placentaria de anticuerpos bactericidas de *E.C.E.* es un tanto diferente. En primer término, la ubicuidad de estos anticuerpos es mucho menor que en el caso de los anticuerpos anti-poliovirus. Así, sólo el 44 por ciento de las madres mostró bacteriolisinas de *E.C.E.* 0111:B4, y sólo 2 por ciento, del serotipo 055:B5. En segundo lugar, es evidente que en el paso de anticuerpos a través de la barrera placentaria, ocurre, cierta discriminación, factor éste responsable de que sólo ciertas globulinas sean transferidas al feto.

La frecuencia de bacteriolisinas de *E.C.E.* 0111:B4 en las madres varió en relación directa con la edad de las mismas, hecho que parece indicar que el desarrollo de las globulinas específicas depende del mayor número de experiencias que se adquieren con la edad. No debe pasarse por alto que las probabilidades de la madre de su asociación con niños (que son los principales contaminadores), aumentan con la edad, por lo que resulta más factible la inmunización de la madre por su contacto con ellos.

Como ya se mencionó, se logró comprobar la presencia de bacteriolisinas de *E.C.E.* 0111:B4, en el 44 por ciento de los sueros maternos, y de éstos sólo hubo transferencia de los anticuerpos al niño en la mitad de los casos. Este hallazgo confirma las experiencias de autores como Adamson *et al.*(2), Stulberg y Zuelzer(85) y Neter y colaboradores(57) quienes en sus estudios emplearon la técnica de hemoaglutinación. La falla en la transmisión pasiva de anticuerpos de *Escherichia coli* ha sido atribuida a la dis-

criminación que ocurre a nivel placentario de las globulinas gamma 19S (macroglobulinas), anticuerpos que son responsables de la inmunidad específica a la *E.C.E.*(30). En aquellos casos en que existe actividad bacteriolítica en el suero de recién nacidos, ésta se debe a otro tipo de globulinas gamma de menor peso molecular, como la 7S, que es capaz de atravesar la barrera placentaria.

No se pudo explicar satisfactoriamente la falta de capacidad bacteriolítica en el suero de 4 madres, en cuyos hijos sí se pudo determinar. Cabe la suposición de que el poder bactericida de esos 4 sueros bien puede haber sido consecuencia de:

a) substancias (anticuerpos) cuya existencia en el suero del cordón podría asumirse que es la consecuencia de procesos hereditarios independientes de la presencia de bacteriolisinas en el suero de la madre;
b) una concentración de anticuerpos en la sangre placentaria; y
c) inhibidores no específicos presentes en el suero del cordón.

La presencia de anticuerpos neutralizantes de los virus de poliomielitis en la sangre del cordón umbilical desempeña un papel muy importante en la protección del niño durante los primeros meses de vida. En países subindustrializados, como Guatemala, la contaminación con enterovirus ocurre profusamente desde muy temprana edad, produciéndose una inmunidad efectiva cuando los anticuerpos heredados de la madre todavía suministran al niño protección.

Por el contrario, el recién nacido está expuesto a desarollar infecciones clínicas por *E.C.E.*, ya que muy a menudo se encuentra desprovisto de las globulinas específicas.

De esta manera se comprende que la poliomielitis sea más frecuente después de los 6 meses de edad y que, por el contrario, las diarreas por *E.C.E.* sean una característica del recién nacido.

VI. RESUMEN

1. Se describe un estudio del nivel de anticuerpos neutralizantes de poliovirus 1, y de la presencia de lisinas anti-*Escherichia coli* 055:B5 y 0111:B4 en el suero de 100 madres residentes en la capital y que dieron a luz en el Centro Materno Infantil del IGSS. Esta investigación incluyó el examen de los sueros del cordón umbilical de sus respectivos recién nacidos.
2. Se logró comprobar anticuerpos neutralizantes anti-poliovirus 1 en un título igual o mayor de 1:8 en el 100 por ciento de los sueros maternos analizados, constatándose transferencia de dichos anticuerpos a los hijos en el 96 por ciento de los casos. Los títulos de madres e hijos fueron, con algunas excepciones, estadísticamente comparables.
3. Se demostró que el 44 por ciento de los sueros maternos presentaban lisinas específicas anti-*Escherichia coli* 0111:B4 y que sólo en la mitad de los casos hubo transmisión de los anticuerpos. Al someter a prueba los sueros por bacteriolisinas específicas para el serotipo 055:B5, se observó que sólo una de las madres y su recién nacido, presentaban esos anticuerpos.
4. El título de anticuerpos neutralizantes de poliovirus 1 no mostró ninguna tendencia significativa de asociación al grupo etario de la madre. Por el contrario, en el caso de las bacteriolisinas, la tasa de éstas sí guardó relación directa con la edad materna.

5. Este trabajo permitió establecer la metodología virológica necesaria de aplicar en la investigación de anticuerpos neutralizantes de poliovirus y de otros grupos de enterovirus. Se logró asimismo, el desarrollo de dos métodos (cualitativo y cuantitativo) para la investigación de bacteriolisinas específicas de *Escherichia coli*.

VII. RECONOCIMIENTO

La autora desea dejar constancia de su agradecimiento al Dr. Moisés Béhar, Director del Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP), y a esa Institución, por haberle otorgado la beca que le permitió la oportunidad de recibir adiestramiento en los laboratorios del Servicio de Microbiología y realizar la investigación que culminó en la preparación de este trabajo de tesis.

Deseo, asimismo, dejar constancia de que el presente estudio no habría sido posible sin la desinteresada colaboración del Dr. Salvador Valenzuela, Jefe del Departamento de Nutrición del Centro Materno-Infantil del Instituto Guatemalteco de Seguridad Social (IGSS), quien facilitó la consecución de las muestras de suero analizados. Los riñones y las placentas destinadas a la preparación de los cultivos, fueron, asimismo, proporcionados por los Dres. Manuel Ramírez y Rigoberto Santos, profesionales de los Departamentos de Patología y Maternidad del Hospital Roosevelt, respectivamente.

Agradece a la vez, al Dr. José Méndez de la Vega en ese entonces Director de Enseñanza del INCAP, y a la Sra. Nelly Bethancourt, Secretaria de esa dependencia en la época en que se realizó este trabajo, por su estímulo y amistad; a todos los miembros del Servicio de Microbiología del INCAP, por su colaboración en el desarrollo de este trabajo; a las secretarias que se encargaron de la preparación del manuscrito final, Srtas. Sonia Meléndez y Amalia Leonora Ramírez, por su esmero y dedicación, y a los Sres. Carlos Lorenzana y Carlos Castro por la preparación de las gráficas y fotografías que ilustran esta tesis.

Finalmente, y en forma muy especial, desea destacar la ayuda, el estímulo y la orientación con que en todo momento tuvo a bien distinguirla el Dr. Leonardo J. Mata, Asesor de este trabajo y Jefe de la Sección de Microbiología del INCAP.

VIII. BIBLIOGRAFIA

1. Abad-Gómez, H.; Piedrahita, F.; Solórzano, R.; and Martínes da Silva, M. Community wide vaccination program with attenuated poliovirus in Andes Colombia. *J. A. M. A. 170:* 906-913, 1959.
2. Adamson, C. A.; Lofgren, S.; and Malmnas, C. Antibodies in mothers and newborn infants. Scandinav. *J. Clin. & Lab. Invest. 3:* 52, 1951.
3. Aguilera, M. A. y Rivera, F. Informe preliminar sobre vacunación antipoliomielítica en Guatemala. *Rev. Col. Méd. Guatemala 11:* 243-244, 1960.
4. Angela, G. C.; Giuliani, G.; Grillone, W.; and Nebiolo, A. Natural immunity to poliomyelitis in pregnant women and their newborn. *Minerva Med.* (Torino) *49:* 1585-1587, 1958.
5. Ashihara, R. K.; Kawakani, K.; Matsumiya, T.; Hirayama, M.; Kubota, H.; and Tatsumi, M. Studies on poliomyelitis in Japan. I. Isolation of poliovirus and the age distribution of neutralizing antibodies in urban populations. *Am. J. Hyg. 67:* 135-151, 1958.
6. Autret, M. and Béhar, M. Síndrome Policarencial Infantil (Kwashiorkor) y su prevención en la América Central. Washington, D. C., Oficina Sanitaria Panamericana, marzo, 1955. Publicaciones Científicas Nº 17.
7. Aycock, W. L.; and Kramer, S. D. Immunity to poliomyelitis in mothers and newborn as shown by neutralization test. *J. Exp. Med. 52:* 457-464, 1930.
8. Beavan, T. E. D. Infantile gastro-enteritis. *Lancet 1:* 568, 1944.
9. Beck, M. D.; Muñoz, J. A.; and Scrimshaw, N. S. Studies on diarrheal diseases in Central America. I.

Preliminary findings on cultural surveys of normal population groups in Guatemala. *Am. J. Trop. Med. & Hyg. 6:* 62-71, 1957.

10. Bernkopf, H.; Medalie, J.; and Yeputiel, M. Antibodies to poliomyelitis virus and socioeconomic factors influencing their frequency in children in Israel. *Am. J. Trop. Med. & Hyg. 6:* 697-703, 1957.
11. Borgoño, J. M. Análisis de las características epidemiológicas de la poliomielitis en Chile, en el período octubre 1955-mayo 1956. *Rev. Serv. Nac. Salud* (Chile) *1:* 207-221, 1956.
12. Bray, J. Isolation of antigenically homogenous strains of *Bact. coli* neapolitanum from summer diarrhea of infants. *J. Pathol. Bacteriol. 47:* 239-247, 1945.
13. Bray, J.; and Beavan, T. E. D. Slide agglutination of bacterium coli var. neapolitanum in summer diarrhea. *J. Pathol. Bacteriol. 60:* 395-401, 1948.
14. Brown, G. C., and Carrol, C. J. Antibody response of pregnant woman to poliomyelitis vaccine and passive transfer to infants. *J. Immunol. 81:* 389-395, 1958.
15. Brown, G. C.; and Kendruck, P. L. Serologic response of infants to multiple vaccine for simultaneous immunization against diphtheria, pertussis, tetanus, and poliomyelitis, in relation to presence of specific maternal antibody. *Am. J. Pub. Health 50:* 1529-1538, 1960.
16. Buttiaux, R. Les maladies diarrhéiques transmisibles du nourrison et de l'enfant. *Bull. World Health Organ. 21:* 386-390, 1959.
17. Chin, T. D. Y.; Marine, W. M.; Hall, E. C.; Gravelle, C.; and Speers, J. F. Poliomyelitis in des Moines, Iowa, 1959, the influence of Salk vaccination on the epidemic pattern and the spread of virus in the community. *Am. J. Hyg. 74:* 67-94, 1961.
18. Cooley, W. T.; and Schliessman, D. J. Prevalence of four enteropathogenetic *E. coli* groups in preschool children. *Pub. Health Rep. 72:* 1001-1004, 1957.

19. Dobrowolska, H. Przeglad serologiczny wybranych grup ludnosci w Polsce w kierunku zakazenia wirusem poliomyelitis. *Postepy. Hig. Med. Dosw. 14:* 373-404, 1960.
20. Dulbecco, R.; and Vogt, M. Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. *J. Exp. Med. 99:* 167-182, 1954.
21. Edwards, P. R.; and Ewing, W. H. Identification of enterobacteriaceae. Burges Publishing Co. (ed.), Minn., Minn., 1962. 1 x, 258 pp.
22. Enders, J. F.; Weller, T. H.; and Robbins, F. C. Cultivation of the Lansing strain of poliomyelitis virus in cultures of various human embryonic tissues. *Science 190:* 85-87, 1949.
23. Ewing, W. H.; Tauner, K. E.; and Tatum, H. W. A new serotype of *Escherichia coli* associated with infantile diarrhea. *Pub. Health Rep. 70:* 107-114, 1955.
24. Ferguson, W. W. Experimental diarrheal disease of human volunteers due to *Escherichia coli. Ann. N. Y. Acad. Sci. 66:* 71-77, 1956.
25. Ferguson, W. S.; and June, R. C. Experiments on feeding adults volunteers with *Escherichia coli* 111, B4, a coliform organism associated with infant diarrhea. *Am. J. Hyg. 55:* 155-169, 1962.
26. Fournelle, H. J.; Wallace, I. L. and Rader, V. A bacteriological and parasitological survey of enteric infections in an Alaskan Eskimo area. *Am. J. Pub. Health 48:* 1489-1497, 1958.
27. Gelfand, H. M.; Fox, J. P.; and Montoya, J. A. Survey for seroimmunity to poliomyelitis in Peru and Colombia. *J. Trop. Pediat. 3:* 51-61, 1957.
28. Gibbels, E.; Scheid, W.; and Ackermann, R. Über die diaplazentare Ubertragung neutralisierender antikörper gegen die poliomyelitisviren. *Köl-Arch. Ges. Virusforsch. 10:* 167-182, 1960.
29. Giles, C.; Sangster, G.; and Smith, J. Epidemic gas-

troenteritis in infants in Aberdeen during 1947. *Arch. Dis. Child. 24:* 45-53, 1949.

30. Gitlin, D.; Rosen, F. S., and Michael, J. G. Transient 19S gamma$_1$ globulin deficiency in the newborn infant, and its significance. *Pediatrics 31:* 197-208, 1963.
31. Gordon, J. E.; Ascoli, W.; Pierce, V.; Guzmán, M.; and Mata, L. Studies of acute diarrheal disease in Central America. VI. An epidemic of diarrhea in a Guatemalan Highland village, with a component due to *Shigella dysenteriae, Type 1. Am. J. Trop. Med. & Hyg. 14:* 404-411, 1965.
32. Gordon, J. E.; Chitkara, I. D.; and Wyon, J. B. Weanling diarrhea. *Ann. J. Med. Sci.* 245: 345-377, 1963.
33. Graber, C. D.; Dunlap, S. G. Incidence of serologic types of *Escherichia coli* associated with infantile diarrhea among pediatrics patients in the Denuer area. *J. Lab. Clin. Med. 44:* 416-421, 1954.
34. Hanks, J. H.; and Wallace, R. E. Relation of oxygen and temperature in the preservation of tissues by refrigeration. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 71:* 196-200, 1949.
35. Hodes, H. L. The etiology of infantile diarrhea. *Advan, Pediat. 8:* 13-52, 1956.
36. Horstmann, D. M.; Saenz, A. C.; and Opton, E. M. Immunity to poliomyelitis in Guatemala. *Bull. World Health Organ. 22:* 255-262, 1960.
37. Informe del Director del MARU, 28 de noviembre de 1962. Datos inéditos. (Estudio MARU INCAP).
38. Joe, L. K.; Sahab, K.; and Hin, P. S. *Escherichia coli* type 0111:B4 in Djakarta, Indonesia (Epidemiological aspects). *J. Trop. Pediat. 4:* 20-27, 1958.
39. Joe, L. K.; Sahab, K.; Yauw, G. S.; and Makaliwy, C. Diarrhea among infants and children in Djakarta, Indonesia, with special reference to pathogenic *Escherichia coli. Am. J. Trop. Med. & Hyg. 9:* 626-632, 1960.

40. June, R. C.; Ferguson, W. W., and Worfel, M. T. Experiments in feeding adult volunteers with *E. coli* 55:B5, a coliform organism associated with infant diarrhea. *Am. J. Hyg. 57:* 222, 1953.
41. Kessner, D. M.; Shaughnessy, H. J.; Googins, J.; Rasmussen, C. M; Rose, N. J.; Marshall, A. L.; Andelman, S. L.; Hall J. B.; and Rosenbloom, P. J. An extensive community outbreak of diarrhea due to enteropathogenic *Escherichia coli* 0111:B4. I. Epidemiologic studies. *Am. J. Hyg. 76:* 27-43, 1962.
42. Kirby, A. C.; Hall, E. G.; and Coackley, W. Neonatal diarrhea and vomiting. Outbreaks in the same maternity unit. *Lancet 259:* 201-207, 1950.
43. Lipton, M. M.; and Steigman, A. J. Neonatal immunity. I. Disparity in maternal-infant poliovirus antibody. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 96:* 348-352, 1957.
44. Magoffin, R. L.; and Lennette, E. H. Nonpolioviruses and paralytic disease. *Calif. Med. 97:* 1-7, 1962.
45. Magoffin, R. L.; Lennette, E. H.; Hollister, A. C.; and Schmidt, N. J. An etiologic study of clinical paralytic poliomyelitis. *J. A. M. A. 175:* 269-278, 1961.
46. Marine, W. M.; Chin, T.; and Gravelle, C. R. Limitation of fecal and pharyngeal poliovirus excretion in Salk-vaccinated children. A family study during a type 1 poliomyelitis epidemic. *Am. J. Hyg. 76:* 173-195, 1962.
47. Martins da Silva, M.; *and others.* Response of pregnant women and their infants to poliomyelitis vaccine: Distribution of poliovirus antibody in pregnant women before and after vaccination of infants. *J. A. M. A. 168:* 1-3, 1958.
48. Mata, L. J. Agentes causales de las diarreas. *Rev. Col. Med. Guatemala 15:* 64-71, 1964.
49. Mata, L. J.; Albertazzi, C.; Negreros, A.; and Fernández, R. Prevalence of *Shigella, Salmonella* and enteropathogenic *Escherichia coli in* six Mayan vil-

lages of Guatemalan highlands. *Am. J. Pub. Health 55:* 1396, 1965.

50. Mata, L. J. Métodos de trabajo y técnicas microbiológicas de los laboratorios de Microbiología del Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP).
51. Mata, L.; Lüttmann, R.; y Sánchez, L. Microorganismos enteropatógenos en niños con diarrea severa. *Rev. Col. Med. Guatemala, 15:* 176-184, 1964.
52. Melnick, J. L. Tissue culture methods for the cultivation of poliomyelitis and other viruses. *En:* Diagnostic Procedures for Virus and Rickettsial Diseases, 2ª ed., Nueva York, American Public Health Association (ed.), 1956, pp. 97-151.
53. Melnick, J. L.; Rennick, V.; and Molina Lozano, M. Serologic epidemiology of poliomyelitis in Surinam. *Ach. Environ. Health. 4:* 202-214, 1962.
54. Monsón Malice, C. Consideraciones sobre el tema de poliomielitis, e informe sobre los casos observados durante el año de 1949. *Rev. Col. Med. Guatemala 2:* 5-7, 1951.
55. Moore, H. A.; Cruz, E. de la; y Pérez, F. I. Prevalencia de bacterias enteropatógenas en Costa Rica. Trabajo presentado en el "Symposium on Acute Infantile Diarrhea", San Juan, Puerto Rico, 1963.
56. Muschel, L. H. Bactericidal activity of normal serum againts bacterial cultures. II. Activity against *Escherichia coli* strains. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 103:* 632-636, 1960.
57. Neter, E.; Westphal, O.; Lúderitz, O.; Gino, R. M.; and Gorzynski, E. A. Demostration of antibodies against enteropathogenic *Escherichia coli* in sera of children of various ages. *Pediatrics 16:* 801-807, 1955.
58. Nieto, D.; y Villasana, A. Estado actual del problema de la poliomielitis. Sinopsis. *Bol. Med. Hosp. Inf.* (México) *1:* 3-8, 1950.

59. Olarte, J.; y Joachin, A. La presencia de *Salmonella, S. typhi, Shigella* y *Escherichia coli* 0111:B4, 055:B5 y 026:B6, en 13,545 muestras de materias fecales examinadas en el Hospital Infantil de la ciudad de México. *Bol. Med. Hosp. Inf.* (México), *14:* 249-255, 1957.
60. Olarte, J.; Ramos Alvarez, M.; and Galindo, E. Isolation of *Shigella, Salmonella* and enteropathogenic *E. coli* from the rectal swabs of 802 sporadic cases of diarrhea. *Bol. Med. Hosp. Inf.* (México) *14:* 263-268, 1957.
61. Ordóñez, J. V. Presencia de *Shigella, Salmonella* y *Escherichia coli* enteropatógena y su posible relación con el estado nutricional en un grupo de niños de la Ciudad de Guatemala. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad de San Carlos de Guatemala, 1959, 37 p. (Tesis de Médico y Cirujano).
62. Orskov, F. On the occurrence of *E. coli* belonging to O-group 26 in cases of infantile diarrhoea and white scours. *Acta Pathol. Microbiol. Scandinav. 29:* 373-378, 1951.
63. Paul, J. R. Endemic trends of poliomyelitis in Central and South America. *Bull. World Health Organ. 19:* 747-758, 1958.
64. Paul, J. R. Epidemiología de la poliomielitis. *Bol. Ofic. Sanit. Panam. 40:* 521-536, 1956.
65. Paul, J. R. *Yale J. Biol. Med. 101,* 1956. (cf. Aspectos históricos y geográficos de la epidemiología. Actualidades Médicas. *Bol. Ofic. Sanit. Panam. 38:* 688, 1955).
66. Peña, A.; Vargas, M. O.; Perera, A.; y Montoya, J. A. Poliomielitis en Costa Rica. *Bol. Ofic. Sanit. Panam. 51:* 303-321, 1961.
67. Pierce, V.; Ascoli, W.; León R. de; and Gordon, J. E. Studies of diarrheal disease in Central America. III. Specific etiology of endemic diarrhea and dysentery in Guatemalan children. *Am. J. Trop. Med. & Hyg. 11:* 395-400, 1962.

68. Ramos Alvarez, A.; Mares, O.; y Bustamante, L. Cultivo de riñón humano post-mortem y su susceptibilidad a los enterovirus. *Bol. Med. Hosp. Inf.* (México) *17:* 695-704, 1960.
69. Ravisse, P. Contribution a l'étude des enterobactéries du Moyen-Congo. *Bull. Soc. Pathol. Exot. 51:* 443-449, 1958.
70. Reed, L. J.; and Muench, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg. 27:* 493-497, 1938.
71. Reinhard, K. R., Gerloff, R. K.; and Philip, R. V. Immunity towards poliovirus among Alaskan natives. III. A study of naturally and artificially acquired antibodies against poliovirus among residents of two Bering sea communities. *Am. J. Hyg. 72:* 308-320, 1960.
72. Rodríguez-Leiva, M. *Escherichia coli studies.* VII. Incidence of enteropathogenic *Escherichia coli* in the acute diarrhea of infants in Santiago Chile. *Am. J. Hyg. 72:* 162-168, 1960.
73. Rodríguez Rouanet, E. Epidemia a enterovirus en una institución cerrada en Guatemala. *Rev. Col. Med. Guatemala 12:* 102-108, 1961.
74. Sabin, B. A. Poliomyelitis in Brazil, Uruguay, Argentina and Chile. *Yale J. Biol. Med. 34:* 399-420, 1961.
75. Sabin, A. B. Inmunidad en la poliomielitis, con especial relación a la vacunación. *Bol. Ofic. Sanit. Panam. 38:* 577-605, 1955.
76. Sabin, A. B.; and Olitsky, R. K. Cultivation of poliomyelitis virus in vitro. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 34:* 357, 1936.
77. Sabin, A. B. Present status of attenuated live-virus poliomyelitis vaccine. *J. A. M. A. 162:* 1589-1596, 1956.
78. Sahab, K.; and Joe, L. K. The occurrence of *Escherichia coli* type 0111:B4 and type 055:B5 in Djakarta, Indonesia. *J. Trop. Pediat. 4:* 28-33, 1958.

79. Salas, M.; Angulo, O.; y Villegas, J. Patología de la poliomielitis en los niños. *Bol. Med. Hosp. Inf.* (Mexico) *15:* 223-239, 1958.
80. Sánchez Reyes, R. *Echerichia coli* en diarreas infantiles (estudio bacteriológico de 112 casos). Facultad de Ciencias Médicas, Universidad de San Carlos de Guatemala, 1958, 64 pp. (Tesis de Médico y Cirujano).
81. Scrimshaw, N. S.; Bruch, H. A.; Ascoli, W. y Gordon, J. E. Studies of diarrheal disease in Central America. VI. Demographic distribution of acute diarrheal disease in two rural populations of the Guatemalan highlands. *Am. J. Trop. Med. & Hyg. 11:* 401-409, 1962.
82. Sellers, I. M.; Rasmussen, A. F.; Scrimshaw, N. S. Poliovirus infection in Guatemala. *Am. J. Trop. Med. & Hyg. 2:* 304-307, 1960.
83. Smith, D. T.; Martin, D.; Conant, N. F.; Beard, J. W.; Taylor, G.; Kolin, H.; Poston, M. Desarrollo de las becterias. *En:* Bacteriología de Zinsser. Traducción al castellano de la 9ª ed. en inglés Uteha, México, 1951, pp. 53-59.
84. Stulberg, C. S.; Zuelzer, W. W.; and Nolke, A. C. An epidemic of diarrhea of the newborn caused by *Escherichia coli* 0-111, B4. *Pediatrics 14:* 133-142, 1954.
85. Stulberg, C. S.; and Zuelzer, W. W. Infantile diarrhea due to *Escherichia coli. In:* Epidemic and endemic diarrheal diseases of the infant. *Ann. N. Y. Acad. Sci. 66:* 90-99, 1956.
86. Stura, C. A. Los anticuerpos citolíticos y citotóxicos. *En:* Tratado de Inmunología y Serología. Buenos Aires, Editorial Alfa, 1952, v. 3, pp. 443-515.
87. Taylor, J.; and Charter, R. E. The isolation of serological types of *Bac. coli* in two residential nurseries and their relationship to infantile gastroenteritis. *J. Pathol. Bacteriol. 64:* 715-728, 1952.

88. Taylor, J.; Powell, B. W.; and Wright, J. Infantile diarrhoea and vomiting. A clinical and bacteriological investigation. *Brit. Med. J. 2:* 117-141, 1949.

89. Toolan, H. W. Transplantable human neoplasms maintained in cortisone. Treated laboratory animals: H. S. Nº 1; H. Ep. Nº 1; H. Ep. Nº 2; H. Ep. Nº 3 and H. Emb. Rh. Nº 1. *Cancer Research 14:* 660-666, 1954.

90. Young, V. M.; Warren, J.; and Lindberg, R. B. Absence of intestinal viral flora in infants during epidemic of *Escherichia coli* gastroenteritis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 100:* 579-581, 1959.