

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO INTRATÍPICA DE CÉPAS DE POLIOVIRUS ASSOCIADAS COM A ADMINISTRAÇÃO DE VACINA SABIN ⁽¹⁾

José Alberto Neves CANDEIAS

CANDEIAS, J. A. N. — Isolamento e identificação intratípica de cépas de poliovírus associadas com a administração de vacina Sabin. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 3(2):183-201, dez. 1969.

RESUMO — Estudou-se a taxa de excreção de enterovírus em dois grupos de crianças de 1 a 4 anos de idade, que receberam várias doses de vacina Sabin. No primeiro grupo a colheita de fezes foi feita 60 dias após a administração da última dose de vacina e no segundo grupo, passados somente 15 dias. No primeiro grupo as porcentagens de isolamento de poliovírus e outros enterovírus foram, respectivamente, de 12,12% e 13,63%. Já no segundo, estas porcentagens foram de 37,61% e 9,17%. Em ambos os grupos foram isolados os três tipos sorológicos de poliovírus. As taxas de isolamentos de poliovírus e outros enterovírus não se mostraram estatisticamente diferentes, em ambos os grupos, quando relacionadas com o número de doses de vacina recebidas — duas ou menos doses e três ou mais doses. A identificação intratípica das cépas de poliovírus isoladas foi feita pelos “marcadores” RCT₄₀ e ds. Das 8 cépas isoladas do primeiro grupo, 6 foram identificadas como intermediárias e 2 como cépas naturais. Estas 2 cépas foram isoladas das duas únicas crianças que não tinham sido vacinadas contra a poliomielite. Das 41 cépas isoladas do segundo grupo, 8 foram caracterizadas como intermediárias e 33 como cépas tipicamente vacinais.

INTRODUÇÃO

Os trabalhos de ARMSTRONG¹ (1939), sobre a transmissão experimental da poliomielite a roedores, abriram caminho para KOPROWSKI et al.³¹ (1952) isolarem uma cépa atenuada de vírus de poliomielite do tipo II e para a possibilidade de utilização da mesma, numa tentativa de imunização, por via oral, de um grupo de crianças não protegidas contra a poliomielite.

Com a descoberta de ENDERS et al.¹⁵ (1949) sobre a possibilidade de multiplicação do vírus da poliomielite em culturas celulares, KOPROWSKI et al.³⁰ (1954) viram facilitada sua tarefa de obter uma cépa atenuada de vírus de poliomielite do tipo I, experimentando-a também na imunização oral de crianças não imunizadas e demonstrando, mais uma vez, sua inocuidade e capacidade de desencadear a

Recebido para publicação em 1-9-1969.

- (1) Resumo da Tese de docência-livre apresentada à Faculdade de Higiene e Saúde Pública da USP, em 1969. Da Cadeira de Microbiologia e Imunologia Aplicadas da Faculdade de Higiene e Saúde Pública da USP, São Paulo — Brasil.

formação de anticorpos protetores. Simultaneamente, investigadores como ROCA-GARCIA et al.⁴⁵ (1952), ROCA-GARCIA & JERVIS⁴⁴ (1955), ROCA-GARCIA et al.⁴⁶ (1956); PLOTKIN et al.³⁹ (1959); LI & SCHAEFER³² (1954); SABIN⁴⁸ (1955) e CABASSO et al.⁵ (1960) chegaram a idênticos resultados, evidenciando o desenvolvimento da infecção intestinal capaz de levar à formação de anticorpos séricos.

Também os trabalhos de DULBECCO & VOGT¹⁴ (1954) e de HSIUNG & MELNICK²⁸ (1955) contribuíram de maneira saliente para facilitar o estudo de cêpas atenuadas de poliovirus, tanto em termos de purificação, como de seleção. Mas, alguns problemas continuaram exigindo estudos cuidadosos, dentre os quais se salientavam os relacionados com o fenômeno da interferência^{4, 39, 42} e com a instabilidade genética das cêpas atenuadas do tipo III, com tendência à reversão no sentido das cêpas naturais virulentas, após passagem pelo intestino^{3, 36, 40, 56}. Foram êstes últimos que começaram a conceder aos "marcadores" genéticos uma importância particular.

De acôrdo com um critério estabelecido por PLOTKIN⁴¹ (1962) é possível distribuir os "marcadores" genéticos em três grandes grupos, conforme o mecanismo implicado na sua identificação: no primeiro estão agrupados os "marcadores" evidenciáveis por mecanismos ligados à relação vírus-célula; no segundo grupo os "marcadores" identificáveis pela presença de determinada substância no meio nutritivo; finalmente, no terceiro grupo encontram-se os "marcadores" que podem evidenciar-se em consequência de certas propriedades físicas peculiares da partícula viral.

Pertencem ao primeiro grupo os "marcadores" representados pelas siglas "S" (plaque size), "RCT" (reproductive capacity temperature), "MS" (designação de uma linhagem de culturas de células de rim de macaco), "H" (human) e "O" (oxygenation); ao segundo grupo os "marcadores" representados pelas siglas "m"

(minute), "cr" (cystine response), "d" (delayed), "G" (Guanidine), "HBB" (hydroxybenzyl-benzimidazole), "Ho" (horse), "Bo" (bovine), "IST" (intra-typic sorodifferentiation test) e "ds" (dextrane sulfate inhibition); no terceiro grupo de Plotkin encontram-se os "marcadores" T (thermo-resistance), E (elution), Al (oH)₃, Aa (adsorption to aluminum precipitates) e A (aluminum chloride).

Os "marcadores" genéticos dos poliovirus, pelo menos alguns dêles ("d", "RCT₁₀", "IST" e "A") estão definitivamente implantados no arsenal a que é necessário recorrer, não só durante o processo de produção da vacina atenuada, mas também no processo de avaliação de sua inocuidade e nos estudos da estabilidade das cêpas excretadas por indivíduos vacinados.

Em relação ao primeiro e segundo aspectos, estão aqueles "marcadores" longe de corresponder às exigências práticas, uma vez que sua correlação com a neurovirulência nem sempre é das melhores^{33, 59}.

Já nos trabalhos sôbre a estabilidade genética das cêpas vacinais dos tipos I, II e III^{20, 38, 58}, excretadas pelos indivíduos vacinados e seus contatos e nas tentativas de esclarecimento da etiologia dos quadros de poliomielite em crianças vacinadas, alguns "marcadores" genéticos têm-se mostrado de certa utilidade.

Nosso objetivo é conhecer, no grupo de crianças estudado, as variações ocorridas nas taxas de eliminação de poliovirus e "outros enterovirus" e suas relações com os períodos de vacinação; é igualmente objetivo conhecer o grau de estabilidade genética dos poliovirus isolados, através dos "marcadores" RCT e ds.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem — Em junho de 1968 foi feito um levantamento do fichário indivi-

dual do Serviço Especial de Saúde de Araraquara (SESA), no sentido de verificar, do total de crianças inscritas, as que, naquela data, tinham idades compreendidas entre 1 e 4 anos, inclusive. Dêste total foi sorteada, casualmente, uma amostra, cujo tamanho, por grupo etário, figura na Tabela 1. Sempre que eram sorteados um ou mais irmãos de uma criança já escolhida, aqueles eram eliminados, decisão tomada deliberadamente, para não se criarem condições que obrigassem à análise de uma situação particular que diz respeito à disseminação intra-familiar de poliovírus excretados por crianças vacinadas.

ministrada em princípios de dezembro do mesmo ano. No ano de 1968, a campanha de vacinação processou-se nos meses de abril, setembro e dezembro. Formamos assim dois grupos de crianças, que designamos por grupo A, com 66 indivíduos e grupo B, com 109 indivíduos, com as características referidas e cuja distribuição, por grupo etário, figura na Tabela 2. A escolha das crianças que deveriam pertencer ao grupo A foi feita por sorteio; as crianças não sorteadas ficaram pertencendo ao grupo B.

Na Tabela 3 foi feita a distribuição das crianças sorteadas de acordo com o número de doses de vacina recebidas.

T A B E L A 1

Distribuição das crianças inscritas no SESA e das crianças sorteadas em junho de 1968, segundo a idade

Idade em anos	Crianças inscritas		Crianças sorteadas	
	N.º	%	N.º	%
1	201	21,18	39	22,28
2	313	32,98	51	29,15
3	208	21,92	42	24,00
4	227	23,92	43	24,57
Total	949	100,00	175	100,00

Do total de 175 crianças sorteadas foram colhidas amostras de fezes em dois momentos: de 66 crianças, depois de decorridos, aproximadamente, 60 dias, após a última dose de vacina, que tinha sido administrada em setembro de 1968 e antes da vacinação de dezembro; de 109, depois de decorridos cerca de 15 dias após a última dose de vacina, que tinha sido ad-

Preparação das amostras de fezes — As amostras de fezes, colhidas em pequenas latas esterilizadas, foram remetidas de Araraquara para São Paulo e, uma vez chegadas ao laboratório, congeladas a -20°C para ulterior exame. De cada criança foi colhida uma só amostra de fezes. Depois de descongeladas à temperatura ambiente, foram preparadas de mo-

T A B E L A 2

Distribuição das crianças sorteadas e repartidas pelos grupos A e B, segundo a idade

Idade em anos	Número total de crianças sorteadas	Crianças sorteadas			
		Grupo A		Grupo B	
		N.º	%	N.º	%
1	39	13	19,69	26	23,85
2	51	17	25,76	34	31,19
3	42	16	24,25	26	23,85
4	43	20	30,30	23	21,11
Total	175	66	100,00	109	100,00

T A B E L A 3

Distribuição das crianças examinadas e repartidas pelos grupos A e B, segundo o número de doses de vacina Sabin administradas

Grupos	Número de crianças examinadas	Número de crianças que receberam:		
		≤ 2 doses	3 doses	≥ 4 doses
A	66	17 *	20	29
B	109	23	36	50
Total	175	40	56	79

* Dêste total de 17 crianças, 15 receberam duas doses de vacina e 2 não foram vacinadas.

do a obter-se uma suspensão a 20%, em solução salina de Hanks contendo 2.000 unidades de penicilina sódica e 2 mg de estreptomicina, por ml, 0,01 ml de uma solução de fungizona e 0,01 ml de uma solução de polimixina. Esta suspensão foi

centrifugada a 3.000 r.p.m., em ambiente refrigerado durante 10 minutos; o sobrenadante foi submetido, novamente, a uma centrifugação a 3.000 r.p.m., em ambiente refrigerado, durante 20 minutos.

Isolamento de vírus — Fêz-se o isolamento das cêpas de poliovirus e outros enterovirus, inoculando 0,2 ml de cada suspensão de fezes em cada um de 2 tubos de culturas primárias de células de rim de macaco rhesus, de culturas primárias de âmnio humano e de células HeLa⁵⁴. Estas culturas foram incubadas em quarto estufa, cuja temperatura variava entre 36°C e 37°C, durante 15 dias. Os tubos inoculados foram observados cada dois dias e o conteúdo daqueles em que se notava efeito citopático, para cada suspensão de fezes, era misturado e congelado a -20°C, para futuras passagens, a fim de se obterem títulos suficientemente elevados. Só foram identificadas as amostras de poliovirus; outros enterovirus isolados, não neutralizados pelos sôros anti-poliovirus, foram agrupados sob a designação de "outros enterovirus".

A inoculação das suspensões de fezes nos três tipos de células referidos permite ter uma orientação, quanto à identidade da cêpa de vírus isolada. Na Tabela 4 apresentamos os resultados possíveis.

Identificação de vírus — A tipagem das cêpas de poliovirus isoladas foi feita por reações de neutralização segundo técnica referida por HAMBLING et al.²⁴ (1963).

Os sôros padrões utilizados foram fornecidos pelo Virus Reference Laboratory, Central Public Health Laboratory, Colindale, Londres, com os seguintes títulos: sôro anti-poliovirus do tipo I, 1.280; sôro anti-poliovirus do tipo II, 10.000; sôro anti-poliovirus do tipo III, 2.560. Para uso, os sôros eram diluídos em solução salina de Earle, de modo a que em 0,1 ml da mistura dos três sôros, existissem 50 unidades de cada um deles. Esta mistura mantém-se a -20°C sem alteração do título, durante longos períodos de tempo. Depois de descongelada e conservada a 4°C o título não sofre alteração até 3 meses.

Caracterização do "marcador" RCT₄₀ — Esta técnica permite avaliar a capacidade das cêpas de poliovirus se multiplicarem a temperaturas acima da chamada tempe-

T A B E L A 4

Efeito citopático em diferentes culturas de células e possível relação com a identidade do vírus

Virus	ECP em culturas de		
	âmnio humano	rim de macaco	HeLa
Poliovirus	+	+	+
Virus Coxsackie B	+	+	+
Virus ECHO	+	+	-
Virus Coxsackie A7 e A9	+	+	-
Virus Coe (Coxsackie A21)	-	-	+
Poliovirus (Sabin)	-	+	+

ratura normal de 37,0°C. As temperaturas acima do normal, devem ser para os tipos I e II, 39,8°C e 39,2°C, porque existem algumas cêpas naturais virulentas que não crescem à temperatura convencional de 39,8°C, mas fazem-no a 39,2°C; para o tipo III usa-se a temperatura 40,3°C. A estas temperaturas a multiplicação das cêpas naturais virulentas não é afetada, ao passo que as cêpas vacinais são quase totalmente inibidas.

Para a incubação das culturas inoculadas a temperaturas elevadas usamos um banho-maria aquecido com a unidade "Techne-tempunit", com uma sensibilidade de $\pm 0,05^\circ\text{C}$. Os tubos de cultura eram simplesmente mergulhados no referido banho, depois de colocados em estantes de metal e arrolhados convenientemente.

Para a execução da prova usamos as cêpas protótipos fornecidas pelo Central Public Health Laboratory, Colindale, Londres.

Cada suspensão de vírus foi diluída em meio 199 desde 10^{-1} até 10^{-8} , inoculando-se dois tubos de culturas de células de rim de macaco rhesus, por diluição. Ao fim de quatro dias foi feita a leitura, determinando-se a queda do título. Nem sempre é de fácil observação o efeito citopático a temperaturas elevadas, mas de um modo geral, êste aparece sob a forma de células arredondadas, refringentes, com uma distribuição não focal.

A interpretação dos resultados pode ser aceita quando a redução do título do protótipo natural é inferior a $10^2\text{TCD}_{50}/0,1$ ml e a redução do título da cêpa protótipo vacinal é superior a $10^5\text{TCD}_{50}/0,1$ ml. As leituras podem dar os seguintes resultados: redução do título à temperatura elevada ($\log_{10} < 2$): cêpa natural; redução do título à temperatura elevada ($\log_{10} 2\text{-}\log_{10} 5$): cêpa "intermediária"; redução do título à temperatura elevada ($\log_{10} > 5$): cêpa vacinal.

Caracterização do "marcador" ds — O sulfato de dextrano inibe o crescimento

das cêpas vacinais de poliovirus do tipo I, enquanto a cêpa Mahoney não é afetada, chegando, algumas vezes, a ser estimulada discretamente. Os tipos II e III comportam-se de modo irregular, não permitindo a utilização desta técnica na sua identificação intratípica⁹. Para a execução da prova comparam-se os títulos a 37,0°C, em culturas primárias de células de rim de macaco rhesus mantidas em meio 199, com os títulos, à mesma temperatura, em iguais culturas mantidas em meio 199 adicionado de 0,05% de sulfato de dextrano⁽¹⁾ ($\text{P.M. } 2 \times 10^6$).

Preparamos a solução de sulfato de dextrano pesando quantidades de 0,5 g, que distribuímos em pequenos frascos estéreis. Êste composto mantém-se sem alteração à temperatura ambiente e não necessita ser esterilizado. Sempre que era necessário dissolvíamos aquela quantidade em 10 ml de meio 199, a 37,0°C, de que usávamos 1 ml para cada 100 ml de meio 199 contendo 3,5 ml de solução de bicarbonato de sódio a 4,4%. Êste era o meio de dextrano que, um dia antes da execução da prova, substituiria o meio 199 em que eram mantidas as culturas.

Para a execução da prova, incluíamos os protótipos Sabin I e Mahoney, de que, juntamente com as amostras a testar, se faziam diluições de 10^{-1} a 10^{-8} em meio 199. Um volume de 0,1 ml de cada amostra era inoculado em dois tubos de cultura de células de rim de macaco rhesus, mantidas em meio 199 e meio de dextrano a 37,0°C, durante 4 dias. O resultado da prova é aceitável quando a cêpa Mahoney apresenta, no meio de dextrano, um título de $\pm 10^{0,5}\text{TCD}_{50}/0,1$ ml em relação ao título no meio 199; a cêpa Sabin I deve ter o título reduzido de $10^{1,5}\text{TCD}_{50}/0,1$ ml ou mais.

RESULTADOS

Eliminação de poliovirus e "outros enterovirus" — Na Tabela 5 apresentamos

(1) Adquirido de Pharmacia, Upsala, Suécia.

T A B E L A 5

Distribuição dos enterovirus isolados de crianças inscritas no SESA, segundo a idade

Idade em anos	Total de crianças examinadas (Grupo A)	Total de exames positivos	Total de virus isolados	
			Poliovirus	"outros enterovirus"
1	13	3	2	1
2	17	3	2	1
3	16	6	2	4
4	20	5	2	3
Total	66	17	8	9

T A B E L A 6

Distribuição das cêpas de poliovirus isoladas de crianças inscritas no SESA, segundo a idade

Idade em anos	Total de crianças examinadas (Grupo A)	Total de exames positivos	Total de cêpas de poliovirus isoladas		
			I	II	III
1	13	2	1	1	0
2	17	2	1	0	1
3	16	2	1	0	1
4	20	2	1	0	1
Total	66	8	4	1	3

a distribuição dos enterovirus isolados das crianças examinadas e agrupadas no Grupo A, segundo a idade. Pode verificar-se que 17 amostras de fezes de 66 indivíduos deram resultado positivo para enterovirus em geral, o que corresponde a

uma taxa de 25,75%; 12,12% corresponde a poliovirus e 13,63% a "outros enterovirus". As porcentagens de isolamento de poliovirus foram, respectivamente, de 15,39%; 11,76%; 12,50% e 10,00%, nos grupos de 1, 2, 3 e 4 anos.

Para "outros enterovirus" as taxas de isolamento foram, respectivamente, 7,69%; 5,88%; 25,00% e 15,00%. Aplicando o teste de Goodman, ao nível de 5%, não são significativas as diferenças entre as porcentagens de isolamento de poliovirus e "outros enterovirus", em cada grupo etário.

Na Tabela 6 passamos a especificar a distribuição das cêpas de poliovirus isoladas das crianças do chamado Grupo A, segundo os tipos sorológicos e as idades. De um total de 8 cêpas isoladas, 4 pertenciam ao tipo I, uma ao tipo II e 3 ao tipo III.

Uma análise semelhante à apresentada anteriormente figura, para as crianças de Grupo B, nas Tabelas 7 e 8. Pela Tabela 7 pode ter-se uma idéia da distribuição dos enterovirus isolados e da taxa de isolamento, que é da ordem de 46,78% e das taxas de 37,61% para poliovirus e 9,17% para "outros enterovirus". A distribuição pelos grupos de 1, 2, 3 e 4 anos no caso dos poliovirus, corresponde res-

pectivamente às taxas de 42,31%, 32,35%, 30,76% e 47,82%; no caso de "outros enterovirus" as porcentagens respectivas são de 7,69%, 2,94%, 11,54% e 17,39%. O teste de Goodman mostra não serem significativas estas diferenças, por grupo etário, ao nível de 5%, tanto para poliovirus como para outros enterovirus.

Na Tabela 8 apresentamos a distribuição das cêpas de poliovirus, por tipos sorológicos e por grupo etário. De um total de 109 crianças, com 41 exames positivos, isolaram-se 7 cêpas de poliovirus do tipo I, 10 do tipo II e 24 do tipo III o que corresponde às seguintes taxas de isolamento: 6,42%, 9,17% e 22,02%.

Reportando-nos aos dados da Tabela 3 e considerando como "não vacinadas" as crianças que receberam duas doses ou menos de vacina, comparamos os resultados dos isolamentos de enterovirus nos grupos A e B, em crianças "não vacinadas" e vacinadas, sendo estas últimas as que receberam três ou mais doses (Tabela 9).

T A B E L A 7

Distribuição dos enterovirus isolados de crianças inscritas no SESA, segundo a idade

Idade em anos	Total de crianças examinadas (Grupo B)	Total de exames positivos	Total de virus isolados	
			Poliovirus	"outros enterovirus"
1	26	13	11	2
2	34	12	11	1
3	26	11	8	3
4	23	15	11	4
Total	109	51	41	10

T A B E L A 8

Distribuição das cêpas de poliovirus isoladas de crianças inscritas no SESA, segundo a idade

Idade em anos	Total de crianças examinadas (Grupo B)	Total de exames positivos	Total de cêpas de poliovirus isoladas		
			I	II	III
1	26	11	2	3	6
2	34	11	2	2	7
3	26	8	2	1	5
4	23	1	1	4	6
Total	109	41	7	10	24

T A B E L A 9

Distribuição dos enterovirus isolados nos Grupos A e B, segundo o esquema de vacinação

Grupos	Esquema de vacinação	Número de crianças vacinadas	Total de exames positivos	Total de virus isolados	
				Poliovirus	"outros enterovirus"
A	≤ 2 doses	17	6	4	2
	≥ 3 doses	49	11	4	7
	Sub-total	66	17	8	9
B	≤ 2 doses	23	12	8	4
	≥ 3 doses	86	39	33	6
	Sub-total	109	51	41	10
Total		175	68	49	19

No Grupo A, das 17 crianças, consideradas como “não vacinadas” isolaram-se poliovirus em 23,52% de casos e “outros enterovirus” em 11,76% daquele total; já nas 49 crianças vacinadas, isto é, que receberam três ou mais doses de vacina Sabin, aquelas taxas foram, respectivamente, 8,16% e 14,28%. Comparando as porcentagens de isolamento de poliovirus e “outros enterovirus” nas chamadas crianças “não vacinadas” e nas crianças vacinadas, não foram encontradas diferenças significativas.

No Grupo A, das 8 cêpas de poliovirus isoladas, 2 apresentavam-se com características de cêpas naturais e as 6 restantes com características próprias das chamadas cêpas “intermediárias”; não se isolaram cêpas vacinais.

Já no Grupo B, considerando que o número total de cêpas de poliovirus é mais elevado, tem sentido calcular as taxas de caracterização que são, respectivamente, de 19,51% para as cêpas “intermediárias” e 80,49% para as cêpas vacinais; não se isolaram cêpas naturais.

T A B E L A 1 0

Diferenciação intratípica das cêpas de poliovirus isoladas de crianças inscritas no SESA, pelos “marcadores” RCT₄₀ e ds.

Grupos	Total de exames positivos	Total de cêpas de poliovirus isoladas								
		Tipo I			Tipo II			Tipo III		
		+	±	-	+	±	-	+	±	-
A	8	1	3	0	0	1	0	1	2	0
B	41	0	3	4	0	2	8	0	3	21
Total	49	1	6	4	0	3	8	1	5	21

No Grupo B, as referidas porcentagens foram, nas chamadas “não vacinadas”, 34,78% e 17,39% e nas vacinadas, 38,37% e 6,97%, taxas estas, cujas diferenças não são significativas.

Diferenciação intratípica — Na Tabela 10 englobamos os resultados obtidos com o emprêgo dos “marcadores” RCT₄₀ e ds. Como já dissemos, os sinais convencionais de caracterização das cêpas de poliovirus são (+) para as cêpas naturais virulentas, (-) para as cêpas vacinais e (±) para as cêpas chamadas de “intermediárias”.

D I S C U S S Ã O

Eliminação de enterovirus — Os resultados apresentados nas Tabelas 5 e 7 dão uma idéia da distribuição dos poliovirus e “outros enterovirus” isolados, no conjunto de crianças examinadas, tanto por grupo etário, como em relação ao momento em que foi administrada a última dose de vacina. Em termos globais, enquanto no Grupo A a taxa de todos os enterovirus foi de 25,75%, no Grupo B foi de 46,78%, diferenças que são estatisticamente significativas. Uma vez que as crianças do Grupo B receberam a última

dose de vacina 15 dias antes da colheita de fezes e que, para o Grupo A, este lapso de tempo foi da ordem de 60 dias, natural seria esperar esta diferença, para a qual contribuem as cêpas de poliovírus vacinais que estão, neste período, sendo eliminadas^{19, 50}.

Desde já dois fatos prendem a nossa atenção, o primeiro dos quais diz respeito à circunstância de, em nenhuma amostra de fezes, ter sido possível identificar mais do que uma cêpa de vírus: poliovírus ou "outros enterovírus". Frente à infecção simultânea do tubo digestivo por duas ou mais amostras de vírus, ou ocorre a dupla infecção, ou, por interferência, uma das amostras exclui as outras. Seria assim de esperar que dentre algumas amostras de fezes analisadas se levantasse o problema da dupla infecção, o que não ocorreu, como dissemos. Trata-se de um problema de difícil solução, principalmente, se uma das amostras de vírus não tem particular afinidade para a cultura de células onde é feito o isolamento, ou se possui a capacidade de desencadear um efeito citopático rápido e precoce, impedindo o crescimento da outra amostra. Não obstante sempre nos foi possível neutralizar o efeito citopático, das cêpas de poliovírus isoladas; em relação a "outros enterovírus", uma vez que não foi feita a tipagem não nos é possível garantir que não estivessem presentes dois ou mais agentes: o que podemos afirmar é que nenhuma cêpa de poliovírus estava misturada com "outros enterovírus". A técnica de inoculação simultânea de cultura de células HeLa, células de rim de macaco rhesus e células amnióticas humanas permite, como já dissemos, dar uma orientação a tipagem do vírus isolado (Tabela 4).

Parece, então, natural pensarmos no encontro do fenômeno da interferência, cuja ocorrência depende, em parte, da intensidade de circulação de enterovírus na comunidade considerada⁴³. Os resultados da presente investigação evidenciam uma elevada taxa de isolamento de enterovírus, em geral, bem como de poliovírus e "outros

enterovírus". Se considerarmos as crianças do Grupo A como representando uma amostra da população infantil não sujeita às variáveis resultantes de vacinação recente, vamos encontrar além da taxa geral de isolamento de enterovírus de 25,75%, uma porcentagem de isolamento de poliovírus de 12,12% e de "outros enterovírus" de 13,63%, cuja análise constitui o segundo fato para o qual foi chamada nossa atenção. As porcentagens de isolamento de poliovírus de 15,39%, 11,76%, 12,50% e 10,00%, bem como as de "outros enterovírus", da ordem de 7,69%, 5,88%, 25,00% e 15,00%, encontradas, respectivamente, em crianças de 1, 2, 3 e 4 anos não diferem estatisticamente entre si. Se nos reportarmos aos resultados do Grupo B (Tabela 7), em que a colheita de fezes foi feita 15 dias após receberem a última dose de vacina, repetimos, vamos encontrar uma taxa de isolamento de poliovírus mais elevada, da ordem de 37,61% mas também e este fato assume, em nosso entender, certa importância, uma taxa de isolamento de "outros enterovírus" de 9,17% que não difere da encontrada nas crianças do Grupo A. No Grupo B, as taxas de isolamento, por grupo etário, de poliovírus da ordem de 42,31%, 32,35%, 30,76% e 47,82%, do mesmo modo que de "outros enterovírus", da ordem de 7,69%, 2,94%, 11,54% e 17,39% não diferem entre si. A diminuição do número de excretores de poliovírus no Grupo A, apesar de não ser significativa a diferença, pode refletir a existência de um certo grau de imunidade intestinal: verifica-se que, enquanto nas 17 crianças que receberam duas ou menos doses de vacina a taxa de isolamento de poliovírus é de 23,52%, nas 49 crianças que receberam três ou mais doses esta taxa baixou para 8,16% (Tabela 9). MELNICK³⁷ (1960) e SABIN⁵⁰ (1956) referem-se a observações desta natureza.

Estamos, assim, frente a dois grupos de crianças com características diferentes, em termos do processo vacinal, nas quais, por este fato, se evidenciam diferentes ta-

xas de isolamento de poliovirus, mas que, em relação a "outros enterovirus" parecem comportar-se de modo semelhante: ambos patenteiam uma elevada taxa de circulação de "outros enterovirus" na comunidade a que pertencem. No que respeita aos poliovirus não poderia esperar-se diferente resultado, em virtude dos momentos em que foi administrada a última dose de vacina e feita a colheita de fezes, mas a constatação da taxa de isolamento elevada de "outros enterovirus", em ambos os grupos obriga-nos, repetimos, a levantar a suspeita de que semelhante situação poderá interferir com o processo da vacinação. Os resultados apresentados na Tabela 9, que configuram a experiência feita no sentido de elucidar se o número de doses de vacina poderia, de algum modo, alterar as taxas de isolamento de poliovirus e "outros enterovirus", amparam tais considerações. No Grupo A não são estatisticamente diferentes, como dissemos, as porcentagens de isolamento de poliovirus em crianças que receberam duas doses de vacina, ou menos e três ou mais doses, o mesmo ocorrendo para "outros enterovirus". No Grupo B não se poderiam esperar diferenças, pelas razões expostas anteriormente, nos isolamentos de poliovirus, mas no caso de "outros enterovirus", também não se observam diferenças.

As pesquisas quantitativas de eliminação de enterovirus só podem ser solidamente discutidas, quando se processam estudos sorológicos para a determinação do nível de anticorpos neutralizantes e estudos sobre o isolamento de enterovirus, o que não nos foi possível respeitar, por dificuldades de ordem técnica. Assim é que sempre poderá argumentar-se que as semelhantes porcentagens de isolamento de poliovirus encontradas, no Grupo A, se devem a um estado geral de imunização deficiente de tôdas as crianças, quer tenham recebido menos de duas doses, duas doses ou três ou mais doses, o que poderia evidenciar-se frente à determinação dos níveis de anticorpos^{25, 35}. Mesmo as-

sim, surge a questão de saber quais as razões que levaram àquele estado de imunização deficiente e, dentre a multiplicidade das mesmas, voltam a salientar-se as ligadas ao fenómeno da interferência. Não devemos esquecer as observações de HALE et al.²² (1959), sobre a utilização de uma vacina atenuada monovalente do tipo II, que, em certa medida pôde controlar uma epidemia do tipo I. Como devem estar presentes as observações de SABIN⁴⁹ (1955), segundo as quais a atenuação da neurovirulência diminui a capacidade de invasão do aparelho digestivo, com o que se criam, em comunidades de amplas circulações de enterovirus, condições que dificultam a fixação das cêpas vacinais.

Numerosos enterovirus são capazes de participar no fenómeno da interferência^{2, 4, 12, 18, 23, 26, 43} e é lícito supor que sua capacidade de ocasionar infecções no homem é variável entre os tipos e cêpas. A individualidade das várias espécies de enterovirus com diferentes capacidades de multiplicação, mais ou menos intensa e duradoura, no tubo digestivo^{11, 12, 13, 16, 27, 29} deve ter papel importante na seqüência da infecção. O trabalho de GELFAND et al.²¹ (1960) fornece alguns dados experimentais a respeito daquela característica intrínseca. HENRY et al.²⁵ (1966) sugerem que também deve ser importante o título do vírus nas fezes, sendo natural imaginar que uma elevada dose infectante tenha mais facilidade em vencer uma situação de interferência^{42, 51}.

As Tabelas 6 e 8 mostram a distribuição das cêpas de poliovirus isoladas de crianças dos Grupos A e B, segundo a idade. Nas 66 crianças do primeiro grupo (Tabela 6) isolaram-se 8 cêpas de poliovirus, 4 das quais foram tipadas como pertencentes ao tipo I, uma ao tipo II e 3 ao tipo III: nota-se um predomínio dos tipos I e III, situação já observada por outros autores^{6, 52, 53}. Em trabalho realizado anteriormente, CARVALHO⁷ (1966) encontrou uma distribuição diferente, com predomínio dos tipos I e II. Ao tratar-

mos, na discussão dos resultados obtidos com a diferenciação intratípica, de caracterização das cêpas de poliovírus isoladas no Grupo A, teremos oportunidade de voltar ao assunto. No grupo B (Tabela 8) de 109 crianças isolaram-se 41 cêpas de poliovírus, das quais 7 do tipo I, 10 do tipo II e 24 do tipo III, o que corresponde às porcentagens, já referidas de 6,42%, 9,17% e 22,02%.

A análise destes resultados evidencia, em qualquer momento da colheita, 60 ou 15 dias após a última dose de vacina, a persistência dos três tipos de poliovírus, sempre com uma predominância do tipo III. Poderíamos dizer, de acordo com a presente observação, que no grupo infantil examinado, não houve modificação na difusão das cêpas de poliovírus, nos períodos intervaccinal e de vacinação, muito embora, nas crianças do Grupo A, tenha havido diferenças nas porcentagens de isolamento de poliovírus encontradas nas chamadas “crianças não vacinadas” e “crianças vacinadas”, o que, como já dissemos, poderá indicar uma certa imunidade tissular local.

Diferenciação intratípica — As 11 cêpas de poliovírus do tipo I, comparadas com os controles Mahoney e Sabin I, às temperaturas de 39,8°C e 39,2°C (Tabela 10) mostraram-se predominantemente, com características vacinais e “intermediárias” e, somente, uma cêpa veio a ser caracterizada a 39,2°C, cêpa natural. Esta tinha-se mostrado, a 39,8°C, com características “intermediárias”, o que demonstra a necessidade de executar a prova do “marcador” RCT₄₀ às duas temperaturas referidas, uma vez que algumas cêpas naturais dos tipos I e II não se multiplicaram à temperatura convencional de 39,8°C, fazendo-o a 39,2°C¹⁰: a cêpa 012-68 sofreu a 39,8°C uma redução no título (log₁₀) de 2,5, enquanto a 39,2°C deu um título (log₁₀) de 5,5, do que resultou uma redução (log₁₀) de, somente, 0,5.

O “marcador” ds confirmou o caráter natural da referida cêpa e os caracteres vacinais ou “intermediários” das demais cêpas isoladas, com exceção da cêpa 152-68, que foi caracterizada como “intermediária” com o “marcador” RCT₄₀ e vacinal com o “marcador” ds. COSSART⁸ (1967), em trabalhos sobre a caracterização intratípica de cêpas de poliovírus, refere-se à necessidade de utilização de múltiplos “marcadores” que permitam evidenciar o maior número possível de propriedades da partícula viral, com o que será possível uma melhor caracterização. Os resultados obtidos com a cêpa 152-68 parecem exemplificar esta necessidade. Em relação às chamadas cêpas “intermediárias”, não existe, até o momento, nenhum teste que permita definir a sua origem, isto é, se se trata de cêpas provenientes da atenuação de cêpas naturais ou da reativação de cêpas vacinais. Em virtude da boa correlação que obtivemos entre os resultados conseguidos com os “marcadores” RCT₄₀ e ds, poderíamos suspeitar, então, frente ao resultado com o “marcador” RCT₄₀, que se tratava de uma cêpa “intermediária” de origem vacinal.

As onze cêpas de poliovírus do tipo II evidenciaram, somente, características de cêpas vacinais e “intermediárias”; a incubação à temperatura de 39,2°C não alterou o resultado, no sentido da evidênciação de cêpas naturais, muito embora tenha conferido a um grande número de cêpas com características vacinais a 39,8°C, a característica “intermediária”: das 8 cêpas vacinais, somente 2 se mantiveram como tal a 39,2°C. Não existem elementos para supor que esta observação possa indicar que as cêpas de caráter “intermediário” sejam cêpas vacinais em transformação no sentido natural.

Finalmente a caracterização das 27 cêpas de poliovírus do tipo III, mediante a utilização do “marcador” RCT₄₀ a 40,3°C revelou uma grande maioria de cêpas vacinais, algumas cêpas “intermediárias” e uma só cêpa natural.

A caracterização de tôdas as cêpas de poliovirus dos tipos I, II e III, englobada na Tabela 10, em relação aos Grupos A e B, fornece informações que nos parece interessante ressaltar. Em primeiro lugar, as 2 cêpas naturais identificadas como dos tipos I e III, só foram isoladas no Grupo A, isto é, no grupo de crianças, cujas fezes foram colhidas durante o período intervaccinal e, dentre estas, das duas únicas que não tinham sido vacinadas (Tabela 3). Em segundo lugar, neste mesmo grupo, não se isolaram cêpas com caráter vacinal e puderam caracterizar-se 6 cêpas "intermediárias", de um total de 8 cêpas. Evidenciou-se, assim, no grupo que corresponde a um período intervaccinal, a circulação de poliovirus naturais de dois tipos antigênicos e de cêpas "intermediárias", não sendo possível detectar a persistência de cêpas vacinais. A identificação de poliovirus naturais dos tipos I e III autoriza-nos a considerar que as campanhas de vacinação a que estiveram sujeitas as crianças do Grupo A, só parcialmente, conseguiram modificar certas condições ecológicas que deveriam dificultar a circulação de cêpas naturais. ROMANO & ALBANESE⁴⁷ (1966) referem-se a situação semelhante.

Considerações da mesma ordem, extensivas ao Grupo B, mostram um panorama diferente, com uma predominância nítida de cêpas vacinais, 33 cêpas, num total de 41 exames positivos e, somente, 8 cêpas com características "intermediárias". Nestas condições as cêpas naturais parecem ter sido excluídas por interferência das cêpas vacinais ou "intermediárias"^{17, 19}.

Note-se, por outro lado, a diferença acentuada na taxa de isolamento de cêpas "intermediárias" no Grupo A, da ordem de 75,00% e no Grupo B, da ordem de 19,51%, o que poderia levantar suspeitas, se levamos em consideração o momento da colheita das amostras de fezes, sobre uma possível reversão das cêpas vacinais³⁶. É, efetivamente, uma mera suspeita, uma vez que não dispomos de elementos capazes de distinguir uma cêpa vacinal que

tenha sofrido alterações, após multiplicação na mucosa do intestino, de uma cêpa natural virulenta. Como, do mesmo modo, não é possível saber, em que medida, uma cêpa com características "intermediárias", seja qual fôr a sua origem, manter-se-á estável, uma vez que desconhecemos quais os fatores ecológicos que intervêm nas modificações da virulência dos poliovirus.

O problema da reversão tem, realmente, um interesse mais de caráter teórico, do que prático, quando se considera a utilização da vacina atenuada em campanhas de âmbito não restrito, visto que o estabelecimento da imunidade se processa mais rapidamente do que as possíveis alterações sofridas pelas cêpas vacinais⁶¹. Por sua vez a imunidade humoral e a resistência local desenvolvida ao nível das mucosas intestinal e faríngea, conduzem à restrição da circulação das cêpas de poliovirus. O grau desta restrição vai depender da natureza e intensidade do contato, processando-se de modo diferente, no ambiente familiar e extra-familiar^{19, 34, 60}. Nossos resultados não permitem estabelecer a ocorrência do fenômeno da reversão nas cêpas isoladas, no grupo de crianças estudado, como, igualmente, não permitem avaliar a natureza e intensidade do contato, mas a elevada porcentagem de cêpas "intermediárias" e o isolamento de duas cêpas de poliovirus naturais, dos tipos I e III, levam a pensar na necessidade de consideração de determinado aspecto de vacinação. Trata-se da administração, simultânea, da vacina a todos os membros, não imunes, da família, independentemente, da idade, com a finalidade de protegê-los do contágio por cêpas vacinais ou sua progênie^{34, 55}.

Mais importante do que a reversão das propriedades patogênicas das cêpas vacinais é o fenômeno da interferência entre as cêpas naturais de poliovirus e as cêpas vacinais ou entre estas e outros enterovirus, assim como entre os três tipos de poliovirus^{57, 58}. Após a administração da vacina trivalente, podem isolar-se, passados

poucos dias, um ou dois tipos sorológicos de poliovirus; o terceiro tipo costuma aparecer passadas algumas semanas, o que pode corresponder a uma situação de latência ou a um processo infeccioso de mínima intensidade, ou, simplesmente, a uma situação de interferência. Nossos resultados são exemplo desta situação, pois de cada criança examinada, tanto no Grupo A, como no Grupo B, só foi possível isolar um tipo de poliovirus. Em relação ao Grupo A, êste fato poderia ser explicado com a simples aceitação de que, em cada uma das crianças do grupo, só um dos três tipos sorológicos de poliovirus que circulavam na comunidade teve oportunidade de colonizar as células de seu tubo digestivo. Já em relação ao Grupo B, dado que as crianças tinham sido recentemente vacinadas, não são de fácil explicação nossas observações sobre o isolamento de um ou outro dos três tipos de vírus existentes na vacina tríplice. Poderá tratar-se, como dissemos, de latência, infecção em nível mínimo ou interferência o que não nos parece possível esclarecer, dado que nossos resultados se baseiam no exame de material proveniente do intestino. Não podemos afirmar que, se tivéssemos colhido material da orofaringe das crianças examinadas, não fôssemos encontrar um ou mais tipos sorológicos diferentes do isolado¹². Mesmo assim, a persistência de taxas elevadas de "outros enterovirus", que observamos em ambos os grupos, apesar das campanhas de vacinação a que estiveram sujeitas as crianças estudadas, contrariamente ao descrito por SABIN et al.⁵¹ (1960), obriga-nos a considerar que alguns de nossos resultados podem ser uma demonstração do interesse prático que o fenômeno da interferência pode ter na vacinação com poliovirus atenuados.

CONCLUSÕES

Em face da discussão dos resultados obtidos, afigura-se-nos, como conclusão básica de nosso trabalho, a observação

segundo a qual, os dois grupos de crianças estudados só se comportaram de modo diferente, quando comparados em termos das taxas de isolamento de poliovirus e sua caracterização intratípica, como cêpas naturais. Mais especificamente:

1. A taxa de isolamento de poliovirus, no grupo de crianças cujas fezes foram colhidas no período intervaccinal (12,12%), é estatisticamente diferente da observada no grupo de crianças cujas fezes foram colhidas 15 dias após a administração da última dose de vacina (37,61%).

2. A taxa de isolamento de "outros enterovirus", no grupo de crianças cujas fezes foram colhidas no período intervaccinal (13,63%), não difere estatisticamente da observada no grupo de crianças cujas fezes foram colhidas 15 dias após a administração da última dose de vacina (9,17%).

3. As taxas de isolamento de poliovirus, no grupo de crianças cujas fezes foram colhidas no período intervaccinal, não diferem estatisticamente, quando comparados os resultados obtidos com as chamadas "crianças não vacinadas" (8,16%) e as crianças vacinadas (23,52%).

4. As taxas de isolamento de "outros enterovirus", no grupo de crianças cujas fezes foram colhidas no período intervaccinal, não diferem estatisticamente, quando comparados os resultados obtidos com as chamadas "crianças não vacinadas" (11,76%) e as crianças vacinadas (14,28%).

5. As taxas de isolamento de poliovirus, no grupo de crianças cujas fezes foram colhidas 15 dias após a administração da última dose de vacina, não diferem estatisticamente, quando comparados os resultados obtidos com as chamadas "crianças não vacinadas" (34,78%) e as crianças vacinadas (38,37%).

6. As taxas de isolamento de "outros enterovírus", no grupo de crianças cujas fezes colhidas 15 dias após a administração da última dose de vacina, não diferem estatisticamente, quando comparados os resultados obtidos com as chamadas "crianças não vacinadas" (17,39%) e as crianças vacinadas (6,97%).

7. Isolaram-se os três tipos sorológicos de poliovírus em qualquer dos grupos estudados.

8. Do total de cêpas de poliovírus isoladas, somente duas foram caracterizadas intratipicamente, como cêpas naturais; seu isolamento foi feito a partir das fezes das duas únicas crianças que não receberam dose alguma de vacina atenuada.

CANDEIAS, J. A. N. — Isolation and intratypical identification on poliovirus strains following the administration of Sabin vaccine. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 3(2):183-201, dez. 1969.

SUMMARY — The author studied the incidence of enterovirus excretion in 2 groups of children aged between 1 and 4 years, who had been given varying doses of Sabin polio vaccine. In the first group faeces were collected 60 days and in the second group 15 days after the last dose of vaccine had been given. In the first group 12,12% yielded poliovirus and 13,63% yielded "other enteroviruses"; in the second group the percentages were 37,61% and 9,17%. In both groups all three serological types of poliovirus were isolated. The previous vaccination status of the children in both groups, whether vaccinated with two or less or three or more doses, did not have a statistically significant effect on the subsequent virus isolations. The strains of poliovirus isolated were examined by the RTC₄₀ and dextran markers. Of the 8 strains isolated from the first group 6 were identified as

intermediate strains and 2 as wild strains. These 2 were isolated from the only 2 children who had received no vaccine at all. Of the 41 strains isolated from the second group 8 were intermediate and the rest were typical vaccine strains.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARMSTRONG, C. — The experimental transmission of poliomyelitis to the eastern cotton rat, *Sigmond hispidus hispidus*. *Publ. Hlth Rep.*, 54:1719-1721, Sept. 1939.
2. ARUMANAYAGAM, P. — Mass immunization against poliomyelitis in Ceylon in 1962, using Sabin oral vaccine. *J. trop. Med. Hyg.*, 68:105-109, May 1965.
3. BARON, S. et al. — Laboratory investigations of the attenuated poliovirus vaccine strains. II. Tissue culture characteristics before and after gastro-intestinal passage. In: INTERNATIONAL Conference on Live Poliovirus Vaccines. 2nd, Washington, D.C., 1960. Washington, D.C., PAHO, 1960. p. 124-131.
4. BENYESH-MELNICK, M. et al. — Poliomyelitis infection rate among Mexican children fed attenuated poliovirus vaccine. In: INTERNATIONAL Conference on Live Vaccines. 1st, Washington, D.C., 1959. Washington, D.C., PAHO, 1959. p. 272-285.
5. CABASSO, V. J. et al. — Cumulative testing experience with consecutive lots of oral poliomyelitis vaccine. *Brit. Med. J.*, 1:373-387, Feb. 1960.
6. CANDEIAS, J. A. N. et al. — Pesquisa de enterobactérias e enterovírus em crianças normais e com quadros diarreicos agudos. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 2:194-206, dez. 1968.
7. CARVALHO, R. P. S. — Contribuição para o estudo dos enterovírus. *Folia clin. biol.*, S. Paulo, 35:1-47, jan./jun. 1966.
8. COSSART, Y. E. — Genetic marker studies of poliovirus. I. Natural variation. II. Strains isolated from cases of poliomyelitis associated with the administration of live attenuated vaccine. *J. Hyg.*, Cambridge, 65:67-76, 77-84, Mar. 1967.

9. COSSART, Y. E. — Marker studies of poliovirus. *Nature*, 211:1432, Sept. 1966.
10. COSSART, Y. E. — Genetic marker studies of poliovirus type I strains from the Blackburn poliomyelitis outbreak in 1965. *J. Hyg.*, Cambridge, 66:513-518, Dec. 1968.
11. CRAIG, D. E. & BROWN, G. C. — The relationship between poliomyelitis antibody and virus excretion from the pharynx and anus of orally infected monkeys. *Amer. J. Hyg.*, 96:1-2, Jan. 1959.
12. DARDONI, L. et al. — Somministrazione di virus polio I attenuato LSC di Sabin a bambini viventi in comunità con alta frequenza di infezioni enterovirali. *Riv. Ist. sieroter. ital.*, 35:425-429, feb. 1960.
13. DOMOK, I. et al. — Virus excretion after mass vaccination with attenuated polioviruses in Hungary. *Brit. Med. J.*, 1: 1410-1417, May 1961.
14. DULBECCO, R. & VOGT, M. — Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. *J. exp. Med.*, 99:167-182, Jan. 1954.
15. ENDERS, J. F. et al. — Cultivation of the Lansing strain of poliomyelitis virus in cultures of various embryonic tissues. *Science*, 109:85-87, Jan. 1949.
16. EVANS, C. A. — Factors influencing the occurrence of illness during naturally acquired poliomyelitis virus infections. *Bact. Rev.*, 24:341-352, Dec. 1960.
17. FOX, J. P. — Epidemiology of poliomyelitis in populations before and after vaccination with inactivated viruses. In: INTERNATIONAL Poliomyelitis Conference. 4th, Geneva, 1957. Philadelphia, Lippincott, 1958. p. 136.
18. FOX, J. P. — Epidemiological aspects of Coxsackie and ECHO virus infections in tropical areas. *Amer. J. publ. Hlth*, 54:1134-1142, July 1964.
19. FOX, J. P. et al. — The spread of vaccine strains of poliovirus in the household and in the community in Southern Louisiana. In: INTERNATIONAL Poliomyelitis Conference. 5th, Copenhagen, 1960. Philadelphia, Lippincott, 1961. p. 368-383.
20. FROESCHLE, J. E. et al. — A continuing surveillance of enterovirus infection in healthy children in six United States cities. II. Surveillance enterovirus isolates 1960-1963 and comparison with enterovirus isolates from cases of acute central nervous system disease. *Amer. J. Epidem.*, 83:455-469, May 1966.
21. GELFAND, H. M. et al. — The susceptibility of infants to infection with natural ("wild") and attenuated (vaccine) strains of polioviruses. In: INTERNATIONAL Poliomyelitis Conference. 5th, Copenhagen, 1960. Philadelphia, Lippincott, 1961. p. 285-289.
22. HALE, J. H. et al. — Large-scale use of Sabin type I attenuated poliovirus vaccine in Singapore during a type I poliomyelitis epidemic. *Brit. Med. J.*, 1: 1541-1549, June 1959.
23. HALE, J. H. et al. — A study of interference among enteroviruses during a mass immunization campaign with attenuated poliovirus type 2. In: INTERNATIONAL Poliomyelitis Conference. 5th, Copenhagen, 1960. Philadelphia, Lippincott, 1961. p. 336-341.
24. HAMBLING, M. H. et al. — The typing of enteroviruses in tissue culture by neutralization with composite antiserum pools. *J. Hyg.*, Cambridge, 61:479-484, July 1963.
25. HENRY, J. L. et al. — A study of poliovaccination in infancy: excretion following challenge with live virus by children given killed or living poliovaccine. *Ibidem*, 64:105-120, Mar. 1966.
26. HINUMA, Y. et al. — Two outbreaks of ECHO 14 infection: a possible interference with oral poliovirus vaccine and a probable association with aseptic meningitis. *Ibidem*, 63:277-284, June 1965.
27. HOWE, H. A. & BODIAN, D. — Isolation of poliomyelitis virus from the throats of symptomless children. *Amer. J. Hyg.*, 45:219-222, Mar. 1947.
28. HSIUNG, G. D. & MELNICK, J. L. — Plaque formation with poliomyelitis, Coxsackie and Orphan (ECHO) viruses in bottle cultures of monkey epithelial cells. *Virology*, 1:533-535, Dec. 1955.
29. KOGON, A. et al. — The virus watch program: a continuing surveillance of viral infections in Metropolitan New York families. VII. Observations on viral

- excretion, seroimmunity, intrafamilial spread and illness association in Coxsackie and ECHO infections. *Amer. J. Epidem.*, 89:51-61, Jan. 1969.
30. KOPROWSKI, H. et al. — Administration of an attenuated type I poliomyelitis virus to human subjects. *Proc. Soc. exp. Biol.*, New York, 86:244-250, June 1954.
31. KOPROWSKI, H. et al. — Immune response in human volunteers upon oral administration of a rodent adapted strain of poliomyelitis virus. *Amer. J. Hyg.*, 55:108-126, Jan. 1952.
32. LI, C. P. & SCHAEFFER, M. — Isolation of a non-neurotropic variant of type I poliomyelitis virus. *Proc. Soc. exp. Biol.*, New York, 87:148-153, Oct. 1954.
33. LWOFF, A. — Mutations affecting neurovirulence. In: INTERNATIONAL Poliomyelitis Conference. 5th, Copenhagen, 1960. Philadelphia, Lippincott, 1961. p. 13-20.
34. MACDONALD, D. & DEIBEL, R. — Serodifferentiation of type 3 poliovirus strains isolated 1960-1965 from patients and healthy vaccines. *Amer. J. Epidem.*, 87:396-410, Mar. 1968.
35. MARINE, W. M. et al. — Limitation of fecal and pharyngeal poliovirus excretion in Salk-vaccinated children. A family study during a type I poliomyelitis epidemic. *Amer. J. Hyg.*, 76:173-195, Nov. 1962.
36. MELNICK, J. L. & BENYESH-MELNICK, M. — Problems associated with live poliovirus vaccine and its progeny after multiplication in man. In: INTERNATIONAL Conference on Live Poliovirus Vaccines. 2nd, Washington, D.C., 1960. Washington, D.C., PAHO, 1960. p. 12-27.
37. MELNICK, J. L. — Problems associated with the use of live poliovirus vaccine. *Amer. J. publ. Hlth.*, 50:1013-1031, July 1960.
38. MELNICK, J. L. — Attenuated poliovirus vaccine: virus stability. In: INTERNATIONAL Poliomyelitis Conference. 5th, Copenhagen, 1960. Philadelphia, Lippincott, 1961. p. 384-402.
39. PLOTKIN, S. A. et al. — Clinical trials in infants orally administered attenuated poliomyelitis viruses. *Pediatrics*, 23:1041-1062, June 1959.
40. PLOTKIN, S. A. et al. — A type III attenuated poliovirus genetically stable after human intestinal passage. *Proc. Soc. exp. Biol.*, New York, 107:829-834, May/Sept. 1961.
41. PLOTKIN, S. A. et al. — The polioviruses of man. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 101:357-389, Nov. 1962.
42. RAMOS ALVAREZ, M. et al. — Viral and serological studies in children immunized with live poliovirus vaccine. Preliminary report of a large trial conducted in Mexico. In: INTERNATIONAL Conference on Live Poliovirus Vaccines. 1st, Washington, D.C., 1959. Washington, D.C., PAHO, 1959. p. 483-496.
43. RAMOS ALVAREZ, M. & SANTOS, F. G. — Influence of interfering enteroviruses. Laboratory and field studies in Mexico with Sabin's live poliovirus vaccine. In: INTERNATIONAL Poliomyelitis Conference. 5th, Copenhagen, 1960. Philadelphia, Lippincott, 1961. p. 322-335.
44. ROCA-GARCIA, M. & JERVIS, G. A. — Experimentally produced poliomyelitis variant in chick embryo. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 61:911-922, Sept. 1955.
45. ROCA-GARCIA, M. et al. — Poliomyelitis. II. Propagation of MEF₁ strain of poliomyelitis virus in developing chick embryo by yolk sac inoculation. *Proc. Soc. exp. Biol.*, New York, 81:519-525, Nov. 1952.
46. ROCA-GARCIA, M. et al. — Immunization of humans with a chick embryo adapted strain of MEF₁ poliomyelitis virus. *J. Immunol.*, 77:123-131, Aug. 1956.
47. ROMANO, N. & ALBANESE, M. — Sull'isolamento di poliovirus selvaggi in popolazioni estesamente vaccinate. *G. Mal. infett.*, 18:575-578, set. 1966.
48. SABIN, A. B. — Characteristics of genetic potentialities of experimentally produced and naturally occurring variants of poliomyelitis virus. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 61:924-939, Sept. 1955.
49. SABIN, A. B. — Immunization of chimpanzees and human beings with avirulent strains of poliomyelitis virus. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 61:1050-1056, Sept. 1955.

50. SABIN, A. B. — Present status of attenuated live virus poliomyelitis vaccine. *J.A.M.A.*, 162:1539-1596, Dec. 1956.
51. SABIN, A. B. et al. — Live orally given poliovirus vaccine. Effects of rapid mass immunization on population under conditions of massive enteric infection with other viruses. *J.A.M.A.*, 173:1521-1526, Aug. 1960.
52. SCHATZMAYR, H. G. & COSTA, L. T. — Isolamento do vírus da poliomielite a partir de material de garganta em uma comunidade rural. *Bol. Inst. Puer. Univ. Brasil*, 22:135-138, ago./dez. 1965.
53. SCHATZMAYR, H. G. & COSTA, L. T. Poliomielite. I. Aspectos virológicos de uma população infantil. *Bol. Inst. Puer. Univ. Brasil*, 23:35-42, abr. 1966.
54. SHERER, W. F. et al. — Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. V. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J. exp. Med.*, 97:695-710, May 1953.
55. SMORODINTSEV, A. A. et al. — Material on the immunological and epidemiological effectiveness of live poliomyelitis vaccine. In: INTERNATIONAL Conference on Live Poliovirus Vaccines. 2nd, Washington, D.C., 1960. Washington, D.C., PAHO, 1960. p. 482-501.
56. VERLINDE, J. D. & WILTERDINCK, J. B. — Epidemiological and virological survey following oral administration of live poliovirus vaccine. In: INTERNATIONAL Conference on Live Poliovirus Vaccines. 2nd ed., Washington, D.C., 1960. Washington, D.C., PAHO, 1960. p. 134-142.
57. VOROSHILOVA, M. K. et al. — Virologic and serologic investigations of children immunized with trivalent live vaccine from A. B. Sabin's strains. In: INTERNATIONAL Conference on Live Poliovirus Vaccines. 2nd, Washington, D.C., 1960. Washington, D.C., PAHO, 1960. p. 240-269.
58. VONKA, V. et al. — A new type III attenuated poliovirus for possible use in oral poliovirus vaccine. *Progr. med. Virol.*, 9:204-255, 1967.
59. WALLIS, C. et al. — Differentiation and separation of attenuated and virulent polioviruses by adsorption to aluminium salts. *Amer. J. Hyg.*, 77:250-257, May 1963.
60. ZADEK, K. et al. — Mass oral (Sabin) poliomyelitis vaccination. Virological and serological surveillance in Czechoslovakia 1958-1959 and 1960. *Brit. Med. J.*, 1:1091-1098, Apr. 1962.
61. ZHDANOV, V. M. et al. — Large-scale practical trials and use of live poliovirus vaccine in the USSR. In: INTERNATIONAL Conference on Live Poliovirus Vaccines. 2nd, Washington, D.C., 1960. Washington, D.C., PAHO, 1960. p. 576-588.