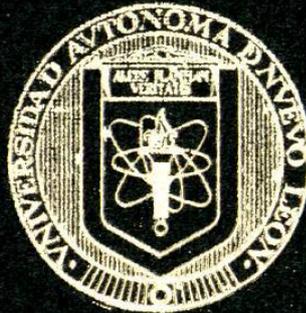


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA
SUBDIRECCION DE INVESTIGACION Y DE
ESTUDIOS DE POSTGRADO



VIGILANCIA EPIDEMIOLOGICA DE INFLUENZA
DURANTE EL PERIODO DE 1983 A 1986

TESIS

QUE EN OPCION AL GRADO DE MAESTRO EN
CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
MICROBIOLOGIA MEDICA

PRESENTA

MARIA DE LOURDES MARTINEZ MACOUZET

MONTERREY, N. L.

MARZO DE 1988

TM

RC15

M3

c.1



1080071396





BIBLIOTECA

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA

SUBDIRECCION DE INVESTIGACION Y DE

ESTUDIOS DE POSTGRADO



VIGILANCIA EPIDEMIOLOGICA DE INFLUENZA

DURANTE EL PERIODO DE 1983 A 1986

TESIS

QUE EN OPCION AL GRADO DE MAESTRO EN

CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN

MICROBIOLOGIA MEDICA

PRESENTA

MARIA DE LOURDES MARTINEZ MACOUZET



BIBLIOTECA

MONTERREY, N. L.

MARZO DE 1988

TM
C150
M3



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA

SUBDIRECCION DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

VIGILANCIA EPIDEMIOLOGICA DE INFLUENZA
DURANTE EL PERIODO DE 1983 A 1986

TESIS QUE EN OPCION AL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON
ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA MEDICA PRESENTA

MARIA DE LOURDES MARTINEZ MACOUZET

MONTERREY, N. L.

MARZO DE 1988

A todos los míos con cariño

**A mis maestros, amigos
y compañeros**

**A mi asesor
Dr. Gerardo Velazco C.
con agradecimiento**

El presente trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina, U. A. N. L. bajo la dirección de:

Dr. José Gerardo Velazco Castañón

INDICE

	<u>Página</u>
1. Introducción	1
2. Material y Métodos	9
3. Resultados	13
4. Discusión y Conclusiones	27
5. Resumen	31
6. Bibliografía	32

INTRODUCCION

La Influenza es una enfermedad aguda de las vías respiratorias, cuyos agentes etiológicos son los virus del género Influenza, de la familia Orthomyxoviridae. Su distribución es mundial, afecta tanto a la población infantil como a la adulta y predomina durante la temporada invernal, con mayor frecuencia en los meses de diciembre a abril (28, 42). Esta enfermedad ha representado siempre un gran peligro para la salud humana y aún cuando se ha desarrollado una vacuna desde hace aproximadamente 43 años, la protección proporcionada por ésta es de corta duración y sólo recientemente se han podido utilizar las drogas antivirales para su tratamiento (33, 51, 56). También causa un gran impacto en la economía por afectar a un gran segmento de la población en edad productiva y por su alta morbilidad ocasiona ausentismo laboral y escolar (40).

Los virus de la Influenza son partículas esféricas de 80 a 120 nanómetros de diámetro, aunque se han descrito formas filamentosas (10, 42). La nucleocápside posee simetría helicoidal y se encuentra recubierta por una envoltura lípida de la cual se proyectan hacia el exterior aproximadamente 700 a 900 espículas superficiales de dos tipos, la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA) en proporciones de 5 a 1 respectivamente. La HA constituye el 25% de las proteínas del virión, es un trímero en forma de bastón constituido por los polipéptidos HA1 y HA2, unidos por enlaces disulfuro; es responsable de la especificidad antigénica, de la adherencia de los virus a la célula huésped y de la aglutinación de eritrocitos de pollo, de cobayo y humanos tipo O (34). La NA es un tetrámero compuesto por una cadena polipeptídica, orientada en forma opuesta a la HA y cuya función consiste en hidrolizar el enlace galactosa-ácido N-acetilneuramínico de las glucoproteínas de la célula huésped, permitiendo de esta forma la liberación de las partículas virales y por lo tanto la diseminación de la infección (41, 42, 43, 44, 55).

El genoma del virus está constituido por 8 segmentos distintos

de RNA de tira única y polaridad negativa (10). Estos contienen la información para la codificación de las siguientes proteínas: Polimerasas P1, P2 y P3, de alto peso molecular, constituyentes menores de la nucleocápside y que participan en la transcripción y replicación del RNA; la nucleoproteína, componente principal de la nucleocápside; la proteína M o de la matriz; la HA y la NA, glucoproteínas que forman las espículas superficiales y las proteínas no estructurales NS1 y NS2, cuya función se desconoce (26, 42, 53).

En base a la nucleoproteína específica los virus de la Influenza se han clasificado en tres tipos diferentes: A, B y C (26). Desde el punto de vista genético, el tipo A es inestable y responsable de todas las pandemias; el B se asocia con brotes epidémicos al igual que el tipo C, el cual quizá pertenezca a otro género ya que solamente presenta 7 segmentos de RNA y un sólo tipo de espícula superficial (20, 29, 40).

La replicación de los virus de la Influenza se inicia cuando se adhieren a las glucoproteínas receptoras de la membrana de la célula huésped, en especial a las que contienen ácido N-acetilneuramínico con enlaces alfa-2,3 o alfa-2,6 mediante el extremo distal de la HA (24). Posteriormente penetran por fusión, una vez que la HA ha sufrido una escisión proteolítica, requisito indispensable para la infectividad viral (3, 8). A continuación el virus es transportado hacia el citoplasma dentro de una vesícula pinocítica y los lisosomas se unen para formar el fagolisosoma, lo cual conduce a la reducción del pH, factor esencial para la liberación de la nucleocápside (35, 39).

Por un mecanismo desconocido, el RNA viral (vRNA) es transportado al núcleo, en donde las polimerasas transcriben selectivamente filamentos positivos de mRNA y promueven la síntesis regulada del vRNA. Una vez sintetizados el RNA y la proteínas virales, el ensamble se efectúa en el citoplasma e incluye la selección de los 8 segmentos de RNA. La envoltura y las glucoproteínas superficiales se obtienen por

un proceso de gemación a nivel de la membrana de la célula huésped. En esta etapa la NA cataliza la escisión del enlace alfa-cetosídico entre el ácido siálico terminal y el residuo de azúcar adyacente. Es ta reacción hace posible el transporte del virus a través de la mucina y destruye el receptor para la HA, permitiendo así la elución de la progenie viral de las células infectadas y previene la autoagregación de los virus (3, 8, 24, 35, 39, 47).

Los virus de la Influenza presentan la característica de sufrir variaciones antigénicas debido al cambio en la secuencia de los genes virales (53). Se han descrito dos tipos de variaciones: la menor que resulta de la acumulación gradual de cambios en una base y se presenta en las moléculas de HA y de NA y la mayor, que involucra el reemplazo de los genes que codifican la HA y/o la NA, probablemente por rearreglo genético, similar al proceso de formación de híbridos en los organismos superiores (54). Por medio de anticuerpos monoclonales, también se ha detectado la variación menor en la nucleoproteína y en dos de los tres epítopes de la proteína de la matriz en un número limitado de cepas (39). Es probable que esta variación corresponda a un dimorfismo genético más que al acúmulo de mutaciones de punto (52, 53).

La HA es altamente inmunogénica e induce la producción de anticuerpos que inhiben la hemaglutinación y la infectividad de los virus. Sin embargo, debido a la variación antigénica, los anticuerpos inducidos por una infección o vacunación con una cepa particular, no son capaces de neutralizar a las variantes, de tal forma que la población es susceptible al nuevo virus y puede iniciarse una epidemia cuya magnitud es proporcional al grado de cambio antigénico (11, 13).

En el virus de la Influenza A se han demostrado los dos tipos de variaciones, mientras que en el B sólo se ha observado la menor (26, 28). Hasta la fecha se han identificado tres tipos de HA en los virus de la Influenza humana: H1, H2 y H3 y dos de NA: N1 y N2. La variación antigénica mayor se ha presentado a intervalos regulares des

de que se aisló el primer tipo en 1933 y en 1957 ocurrió en los dos antígenos superficiales (26, 28).

En 1889-1890 ocurrió una epidemia de influenza causada por virus con H2, los cuales fueron reemplazados por la H3 alrededor de 1900. En 1918 apareció la H1 responsable de las pandemias de 1918-1919 y 1946. El antígeno H2 reapareció en 1957 y fue suplantado por el H3 en 1968. Después del retorno abortivo del H1 en 1976, reapareció en China en 1977. Actualmente circulan simultáneamente los virus con H1 y H3 (28, 30, 31).

La aparición de un nuevo subtipo había conducido a la desaparición del anterior, sin embargo a partir de 1977 dos eventos han caracterizado la epidemiología de la influenza: (1) ese año reapareció el subtipo viral A (H1N1) después de 20 años de ausencia y se diseminó por todo el mundo y (2) esta reaparición no suprimió los virus H3N2, excepto por pocos meses en algunos países (49). Además dentro de una misma familia de virus A, la última variante una vez establecida, no ha eliminado a los otros miembros. También se ha reportado la infección de un mismo individuo con dos subtipos en la misma estación; este es un nuevo fenómeno que puede afectar la epidemiología futura de la influenza A así como las medidas de prevención (18, 19, 48).

Por otra parte, los resultados de estudios epidemiológicos para el control de influenza han demostrado que durante 11 años han ocurrido epidemias anuales en Houston, Tx., lo cual ha sugerido que éste es un rasgo epidemiológico de la enfermedad; de tal forma que el comportamiento propuesto previamente respecto a la existencia de períodos interepidémicos no refleja los acontecimientos actuales (13, 21).

En cada una de estas epidemias se ha recuperado un virus predominante y variantes heterogéneas, de las cuales la mayoría no se vuelven a presentar, de tal forma que no se puede predecir el virus causal y la severidad de la epidemia o el impacto en la comunidad en el

caso actual de cocirculación de dos subtipos del virus de la Influenza A (18, 48).

Por otra parte, la diseminación de los virus de la Influenza A de un reservorio animal a otro constituye una parte importante del estudio epidemiológico de esta enfermedad (7, 42). Se ha sugerido que una nueva cepa se origina por recombinación después de una doble infección en un huésped por un virus de la influenza humana y otro de origen animal (30, 50). Por medio de anticuerpos monoclonales ha sido posible caracterizar los antígenos virales y determinar la transferencia de cepas entre distintos reservorios. También por medio de este tipo de anticuerpos se ha podido correlacionar la secuencia de aminoácidos de la HA en los diferentes antígenos de los virus del subtipo H1 N1 (1, 13, 14, 41).

Actualmente la vigilancia epidemiológica de la Influenza se mantiene por medio de 108 Centros Nacionales de Influenza en 76 países, establecidos por la Organización Mundial de la Salud. En estos laboratorios existe un sistema para detectar las nuevas variantes antigénicas, para registrar los patrones de diseminación y documentar los cambios antigénicos subsecuentes (40).

Los virus de la Influenza se transmiten principalmente por vía aérea ya que las fuentes de infección son los aerosoles que provienen de personas enfermas y que son diseminados al toser, estornudar o hablar. Los virus se depositan en la mucosa del árbol traqueobronquial y por la acción de la NA ocurre la licuefacción del moco, promoviéndose el acceso al epitelio columnar, células en donde se replican, las cuales mueren y se descaman con el consecuente edema e infiltración de células mononucleares (38).

Los síntomas más notables que se presentan en forma súbita son: fiebre, dolor de cabeza, mialgias, labilidad, tos no productiva, dolor de garganta y flujo nasal (26). En la mayoría de los casos la enfermedad persiste de 2 a 5 días y desaparece sin dejar secuelas. Las

complicaciones más importantes son la neumonía primaria que ocurre principalmente en infantes, personas mayores de 65 años o en aquéllos con enfermedades crónicas o debilitantes, particularmente cardíacas o pulmonares, en este grupo existe un alto riesgo de que las complicaciones amenacen la vida del paciente; la neumonía bacteriana secundaria y en algunos casos la fibrosis del parénquima pulmonar mediada probablemente por factores liberados por los macrófagos (12, 25). Sin embargo se debe enfatizar que el curso de la enfermedad depende tanto de la cepa viral como de los factores del huésped incluyendo la respuesta de anticuerpos específicos locales (IgA), séricos (IgG) y los efectos debidos a la respuesta inmune mediada por células (11). Como prueba de esto último se ha demostrado la inducción de células efectoras, citotóxicas y la actividad de células asesinas naturales que es máxima dos días después de la infección (23, 27).

El cultivo de los virus de la Influenza a partir de especímenes clínicos y la detección temprana de los cambios antigénicos han permitido conocer su comportamiento en la comunidad, ya que el diagnóstico clínico es insuficiente debido a la existencia de numerosos virus respiratorios capaces de producir una enfermedad similar (6). Por lo anterior se han propuesto indicadores estadísticos para la influenza clínica. Ejemplos de éstos son la morbilidad, la mortalidad y el concepto de exceso de mortalidad, ya que ninguna otra enfermedad ocasiona un incremento tan marcado en el número de muertes durante el invierno (4). Esto demuestra uno de los enigmas de la influenza, la recirculación de los virus cada invierno después de haber desaparecido durante el verano (4, 49).

El diagnóstico definitivo de la Influenza se establece al inocular especímenes faríngeos, lavados nasales e incluso esputo en las cavidades amniótica y alantoidea de embriones de pollo de un período de desarrollo de 9 a 10 días, en cultivos de líneas celulares MDCK (Madin-Darby canine kidney), en cultivos primarios de riñón de mono o en cultivos de órganos (5, 12, 16, 17). Después del período de incuba-

ción apropiado en las condiciones establecidas, los virus se detectan por medio de la aglutinación de eritrocitos de pollo y se identifican por el método de inhibición de la hemaglutinación, utilizando antisueros de referencia (15, 26, 40, 42).

El diagnóstico serológico se establece al demostrar un incremento al cuádruple en el título de anticuerpos, una vez que se comparan los sueros sanguíneos obtenidos al inicio y durante la convalecencia de la enfermedad (31). Entre los métodos más utilizados se encuentran la fijación del complemento o la inhibición de la hemaglutinación (15). Además como pruebas rápidas de diagnóstico se han descrito las técnicas de radioinmunoensayo y de ensayo inmunoenzimático, sin embargo la eficiencia reportada para el caso de los virus de la Influenza tipo A ha sido de 50% y de 53% respectivamente (22).

Como medidas del control de la influenza se recomiendan las vacunas constituidas por las cepas virales A y B seleccionadas en base a los datos epidemiológicos y de laboratorio más recientes. Por ejemplo, el ACIP (Advisory Committee on Immunization Practices) anticipó que la vacuna para el período invernal de 1984-1985 debería contener los virus A/Filipinas/2/82 (H3N2), A/Chile/1/83 (H1N1) y B/URSS/100/83 que fueron las cepas prevalentes (9). Estas vacunas se administran primordialmente a las personas que pertenecen a un grupo de alto riesgo, es decir quienes sufren de enfermedades cardiopulmonares, renales o con cáncer (12, 13). La amantadina, un agente quimioterapéutico que es efectivo para la prevención de la influenza tipo A, también puede utilizarse para el tratamiento de esta enfermedad. Otra medida de control que se debe considerar en los casos de epidemia es el evitar viajes y exposiciones en lugares muy concurridos y cerrados, ya que debido a la facilidad de transmisión de los virus puede ocurrir una rápida diseminación (2, 12, 13).

Actualmente, en la ciudad de Monterrey se notifican aproximadamente 500 000 casos anuales de enfermedades respiratorias agudas (7) y en el país 10 millones, de las cuales la mayoría son producidas por

agentes virales y no se cuenta con la tecnología apropiada para investigar el agente etiológico, de tal forma que sólo se aislan en los laboratorios de referencia (7, 46).

En base a lo anterior y a la excesiva frecuencia y severidad de la Influenza, el objetivo establecido para este trabajo fue llevar a cabo el aislamiento y la identificación de los virus de la Influenza que circularon en la ciudad de Monterrey durante los períodos invernales de 1983 a 1986, con el fin de contribuir en esta forma al diagnóstico etiológico y a la vigilancia epidemiológica de esta enfermedad.

MATERIAL Y METODOS

Para aislar e identificar los virus de la Influenza que circularon en la ciudad de Monterrey, se obtuvieron 862 especímenes faríngeos, correspondiendo 311 al período invernal de 1983-1984; 215 al de 1984-1985 y 336 al de 1985-1986. Estos se recolectaron de pacientes que acudieron a la Clínica para los Trabajadores de la Universidad Autónoma de Nuevo León y que presentaban síntomas de enfermedad respiratoria aguda.

Cada espécimen se inoculó por duplicado en las cavidades amniótica y alantoidea de embriones de pollo de un período de desarrollo de 9 a 10 días con el objeto de aislar virus de Influenza. Los virus se detectaron por medio de la técnica de Hemaglutinación, utilizando eritrocitos de pollo y se identificaron por el método de Inhibición de la Hemaglutinación con antisueros específicos de referencia que contenían anticuerpos en contra de los subtipos virales circulantes en cada período (15).

I. Obtención de los especímenes:

Los especímenes se obtuvieron frotando la orofaringe con un hisopo estéril, el cual se colocó en un vial que contenía 1.5 ml de caldo de tripticaseína y soya con 0.5% de gelatina, 800 microgramos de estreptomycin/ml y 400 UI de penicilina/ml. Los especímenes se transportaron al laboratorio de virología a 4°C (en hielo) y se inocularon de inmediato o se congelaron a -20°C hasta su ensayo.

II. Aislamiento de los virus en huevos embrionados:

Se verificó la presencia y viabilidad del embrión en huevos fértiles de gallina de un período de incubación de 9 a 10 días, utilizando un ovoscopio. Se marcó la cámara de aire, se desinfectó con tintura de yodo al 2% y en el centro del cascarón se hizo un orificio. Con aguja y jeringa estériles se inocularon por duplicado 0.1

ml de cada espécimen en las cavidades amniótica y alantoidea del embrión, respectivamente. Se selló el orificio y los huevos se incubaron en posición vertical a 34°C durante 72 horas y a 4°C por 14 horas.

Después del período de incubación se removieron asépticamente el cascarón y la membrana corioalantoidea para recolectar con pipeta estéril el líquido alantoideo y con aguja y jeringa estériles el líquido amniótico, los cuales se mantuvieron a 4°C.

III. Detección de los virus por el método de Hemaglutinación:

Los virus de la Influenza se detectaron en los líquidos amniótico y alantoideo recolectados, colocando 0.1 ml de cada uno en el primer orificio de placas de microtitulación en "U", usando como diluyente una solución amortiguadora salina de fosfatos (PBS), pH 7.2 y haciendo diluciones seriadas al doble con dilutores de 0.05 ml. A cada cavidad de la placa se le agregaron 0.05 ml de una suspensión de eritrocitos de pollo al 0.5% y se incubaron durante 45 a 60 minutos a temperatura ambiente.

Se prepararon controles positivos utilizando una cepa viral de referencia y controles para los eritrocitos. La hemaglutinación se determinó cuando los eritrocitos de las cavidades de control formaron botones compactos. Se consideró una unidad hemaglutinante a la más alta dilución de los virus que presentó hemaglutinación.

Si la hemaglutinación fue positiva se procedió a la identificación de los virus; si fue negativa se realizó un segundo pasaje en embriones nuevos.

IV. Identificación de los virus por el método de Inhibición de la Hemaglutinación:

A) Retrotitulación del antígeno:

Se prepararon diluciones de trabajo de cada antígeno a probar, que contenía 4 unidades hemaglutinantes por 0.025 ml y se colocaron 0.1 ml de cada una en el primer orificio de placas de microtitulación en "U". Se colocaron 0.05 ml de PBS, pH 7.2 en las cavidades de la B a la H y con dilutores de 0.05 ml se hicieron diluciones seriadas al doble de cada antígeno. A cada cavidad se le agregaron 0.05 ml de una suspensión de eritrocitos de pollo al 0.5% y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 45 a 60 minutos.

Se prepararon controles positivos con diluciones de una cepa viral de referencia que se ajustó a 4 unidades hemaglutinantes y controles para los eritrocitos. Se leyó la hemaglutinación cuando los eritrocitos de las cavidades de control formaron botones compactos.

Si la dilución del antígeno era la adecuada se presentó hemaglutinación en los primeros cuatro orificios de la hilera correspondiente a cada antígeno en las placas de microtitulación. En el caso contrario se ajustó la dilución del antígeno y se repitió la re-trotitulación.

B. Tratamiento de los antisueros de referencia para eliminar los inhibidores inespecíficos:

A 0.1 ml de cada antisuero de referencia se le agregaron 0.4 ml de una solución de trabajo de enzima destructora de receptores (EDR) que contenía 100 unidades por ml y se incubaron a 37°C durante 16 horas. Posteriormente se añadieron 0.3 ml de una solución de citrato de sodio al 2.5%, se incubó en baño de agua a 56°C durante 30 minutos y se agregaron 0.2 ml de PBS, pH 7.2 (dilución 1:10).

C. Inhibición de la Hemaglutinación:

Se colocaron 0.025 ml de PBS, pH 7.2 en las cavidades de la A a la G de placas de microtitulación en "V" y 0.025 ml de cada antisue-

ro de referencia tratado con EDR en la cavidad H, haciendo diluciones seriadas al doble con dilutores de 0.025 ml. Se agregaron 0.025 ml de las diluciones estandarizadas del antígeno que contenía 4 unidades hemaglutinantes a cada cavidad y después de mezclar, las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente se agregaron 0.05 ml de una suspensión de eritrocitos de pollo al 0.5% a cada cavidad, se mezcló, se sellaron las placas y se incubaron a temperatura ambiente durante 45 a 60 minutos.

Se prepararon controles positivos utilizando los antisueros A/Filipinas/2/82 (H3N2), A/Chile/1/83 (H1N1), B/URSS/100/83 y B/Hong Kong/5/72 con las cepas virales homólogas y controles para los eritrocitos.

Se determinó la inhibición de la hemaglutinación cuando los eritrocitos de las cavidades de control formaron botones compactos. Se realizó la identificación de los virus aislados en base al título obtenido; éste se estableció como la más alta dilución de los virus que inhibieron la aglutinación de los eritrocitos de pollo.

RESULTADOS

De los 311 especímenes faríngeos procesados durante el período de 1983-1984, se aisló una cepa viral correspondiente al tipo B/Hong Kong/5/72; de los 215 del período 1984-1985 se recuperó el subtipo A/Filipinas/2/82 (H3N2) y de los 336 del período 1985-1986, se obtuvieron 13 aislamientos, 11 del tipo B/URSS/100/83 y 2 del subtipo A/Filipinas/2/82 (H3N2). Estos datos se presentan en la Tabla No. 1.

En la Tabla No. 2 se muestran los aislamientos de los agentes que presentaron actividad hemaglutinante y que no fueron identificados, en relación al número de pasaje en embriones de pollo en el cual los resultados de la hemaglutinación fueron positivos.

La identificación de los virus por medio de la técnica de Inhibición de la Hemaglutinación (IHA), se llevó a cabo determinando los títulos de los virus aislados con los antisueros de referencia y comparándolos con los títulos de los virus controles con sus respectivos antisueros. En la Tabla No. 3 se muestran los títulos obtenidos en la inhibición de la hemaglutinación de cada uno de los virus aislados.

La identificación de la cepa viral A/Filipinas/2/82 (H3N2) aislada durante el período 1983-1984 fue corroborada en el Laboratorio del Centro de Investigación de Influenza de Baylor College of Medicine en Houston, Tx., utilizando antisueros de hurón y anticuerpos monoclonales. En la Tabla No. 4 se presentan los datos de la IHA.

En las Tablas Nos. 5 y 6 se presentan respectivamente las distribuciones de los aislamientos virales y de los agentes hemaglutinantes aislados, en relación a la fecha de recolección de los especímenes clínicos. Se puede observar que durante el período de 1985-1986, se recuperaron tanto el subtipo A/Filipinas/2/82 (H3N2) que había circulado en el invierno anterior como el tipo B/URSS/100/83 durante los meses de enero a marzo.

TABLA NO. 1

AISLAMIENTOS Y SUBTIPOS DE VIRUS DE LA
INFLUENZA EN RELACION A LOS ESPECIMENES
EXAMINADOS

PERIODO	NUMERO DE ESPECIMENES	NUMERO DE AISLAMIENTOS	SUBTIPO VIRAL
1983-1984	311	1	B/Hong Kong/5/72
1984-1985	215	1	A/Filipinas/2/82 (H3N2)
1985-1986	336	2	A/Filipinas/2/82 (H3N2)
		11	B/URSS/100/83
TOTALES	862	15	

TABLA NO. 2

AISLAMIENTOS DE AGENTES CON ACTIVIDAD
HEMAGLUTINANTE NO IDENTIFICADOS

PERIODO	NUMERO DE PASAJE			TOTALES
	1	2	3	
1983-1984	6	2	1	9
1984-1985	7	2	0	9
TOTALES	13	4	1	18

TABLA NO. 3

INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION DE LOS VIRUS AISLADOS

VIRUS	ANTISUEROS			
	B/HongKong/5/72	A/Chile/1/83	A/Filipinas/2/82	B/URSS/100/83
B/HongKong/5/72	320*	0	0	0
A/Filipinas/2/82 (1)**	0	0	80	0
(2)	0	0	320	0
B/URSS/100/83 (2)	0	0	0	40
(3)	0	0	0	80
(4)	0	0	0	160
(2)	0	0	0	320

* Recíproco de la dilución

** Entre paréntesis número de aislamientos

TABLA NO. 4

IDENTIFICACION DEL SUBTIPO A/FILIPINAS/2/82 (H3N2) AISLADO EN EL PERIODO DE
1984-1985

ESPECIMEN	ANTISUEROS DE HURON							ANTICUERPOS MONOCLONALES (H3N2)				
	A/CAEN	A/BAN	A/FIL	A/TEX1	A/TEX2	A/BAN2	A/PAN	77-3	29-1	10-1	59-2	185-2
363-A*	320**	80	320	40	40	40	80	<200	800	1600	<200	<200
A/Filipinas	160	80	320	40	80	80	40	<200	800	3200	<200	<200
A/Panamá	1280	40	160	80	80	80	320	<200	800	3200	800	1600

* Virus aislado

** Recíproco de la dilución

TABLA NO. 5

DISTRIBUCION DE LOS AISLAMIENTOS VIRALES EN RELACION A
LA FECHA DE OBTENCION DE LOS ESPECIMENES CLINICOS

PERIODO	FECHA DE OBTENCION	NO. DE AISLAMIENTOS	SUBTIPO VIRAL
1983-1984	Febrero 13	1	B/Hong Kong/5/72
1984-1985	Enero 24	1	A/Filipinas/2/82 (H3N2)
1985-1986	Enero 9	1	A/Filipinas/2/82 (H3N2)
	Enero 15	1	A/Filipinas/2/82
		1	B/URSS/100/83
	Febrero 6	1	B/URSS/100/83
	Febrero 7	2	B/URSS/100/83
	Febrero 10	1	B/URSS/100/83
	Marzo 7	6	B/URSS/100/83
TOTAL		15	

TABLA NO. 6

DISTRIBUCION DE LOS AISLAMIENTOS DE AGENTES
 CON ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE EN RELACION A
 LA FECHA DE OBTENCION DE LOS ESPECIMENES CLINICOS

PERIODO	FECHA DE OBTENCION	NO. DE AISLAMIENTOS
1983-1984	Enero 15 - 31	1
	Febrero 1° - 15	2
	Febrero 16 - 29	6
1984-1985	Febrero 1° - 15	5
	Febrero 16 - 28	1
	Marzo 15 - 31	3
TOTAL		18

La relación entre el número de especímenes recolectados y la frecuencia de enfermedades respiratorias altas agudas (ERAA) notificadas por período en el municipio de Monterrey se puede observar en las Tablas Nos. 7, 8 y 9; las frecuencias de ERAA por período, así como la tendencia que siguen los datos calculada por el método del promedio móvil se puede apreciar en las Gráficas Nos. 1, 2 y 3 y en la Gráficas Nos. 4, 5, 6 y 7 se muestra el número de casos de Influenza reportados por semana para cada uno de los períodos estudiados; la tendencia de estos datos se calculó por el método anterior (46).

TABLA NO. 7

DISTRIBUCION DE LOS ESPECIMENES RECOLECTADOS
RESPECTO A LA FECHA DE OBTENCION Y EN RELACION
AL NUMERO DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS
AGUDAS ALTAS

PERIODO	FECHA DE OBTENCION	NO. DE ESPECIMENES	AI SLAMIEN- TOS VIRALES	ERAA
1983-1984	Enero 16-31	102	0	19 180
	Febrero 1°-15	109	1	24 033
	Febrero 16-29	77	0	30 411
	Marzo 1°-15	20	0	43 657
	Marzo 16-31	3	0	17 869
TOTALES		311	1	135 150

TABLA NO. 8

DISTRIBUCION DE LOS ESPECIMENES RECOLECTADOS RESPECTO
A LA FECHA DE OBTENCION Y EN RELACION AL NUMERO DE EN
FERMEDADES RESPIRATORIAS AGUDAS ALTAS

PERIODO	FECHA DE OBTENCION	NO. DE ES- PECIMENES	AISLAMIEN- TOS VIRALES	ERAA
1984	Noviembre 15-30	18	0	33 012
	Diciembre 1°-15	21	0	ND*
	Diciembre 16-31	2	0	ND
1985	Enero 1°-15	0	0	18 903
	Enero 16-31	47	1	30 740
	Febrero 1°-15	64	0	26 605
	Febrero 16-28	41	0	40 730
	Marzo 1°-15	22	0	43 618
TOTALES		215	1	193 608

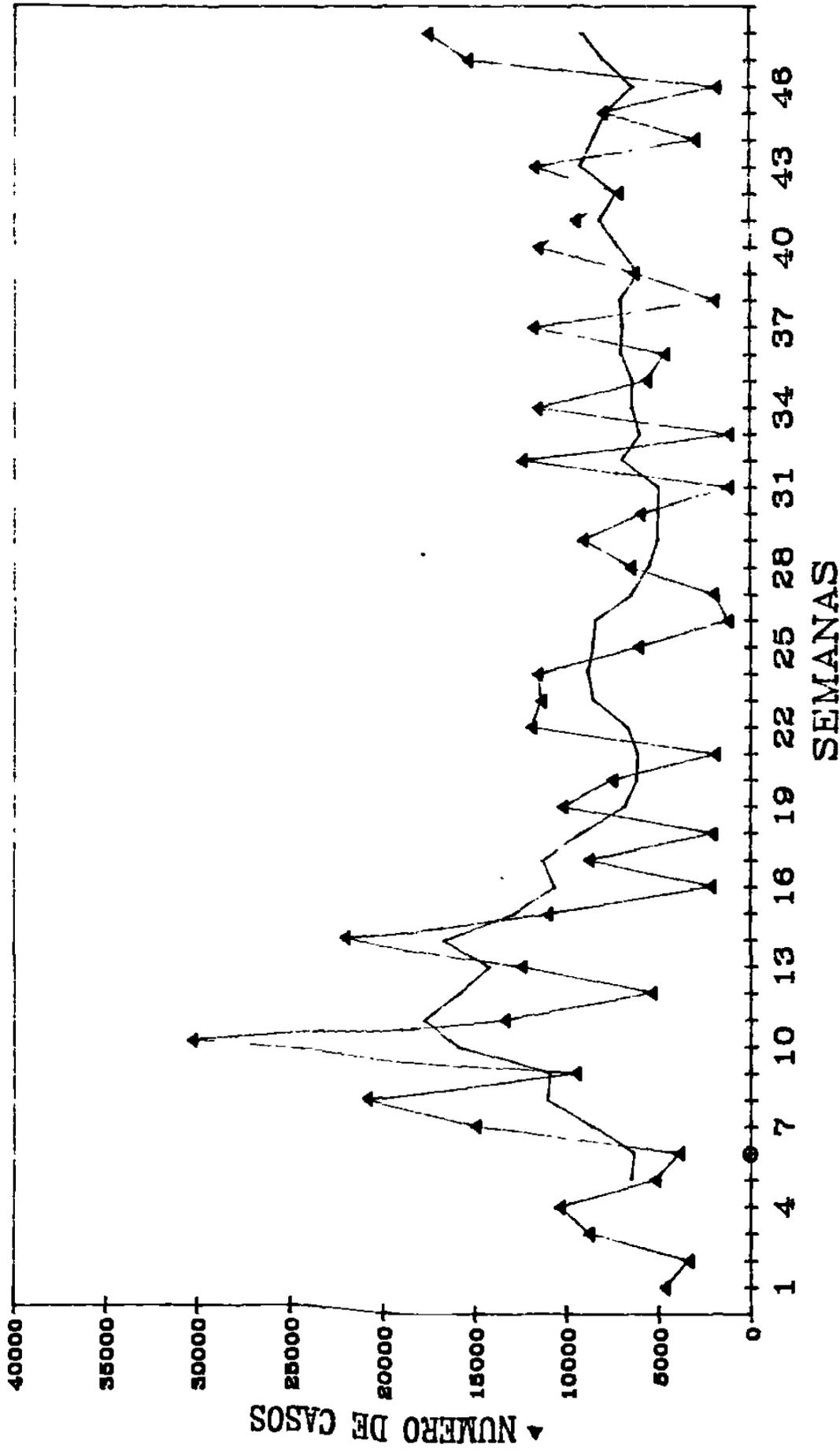
*ND = Datos no disponibles

TABLA NO. 9

DISTRIBUCION DE LOS ESPECIMENES RECOLECTADOS RESPECTO
A LA FECHA DE OBTENCION Y EN RELACION AL NUMERO DE EN
FERMEDADES RESPIRATORIAS AGUDAS ALTAS

PERIODO	FECHA DE OBTENCION	NO. DE ES PECIMENES	AISLAMIEN- TOS VIRALES	ERAA
1986	Enero 1°-15	10	3	27 907
	Enero 16-31	109	0	32 444
	Febrero 1°-15	47	4	36 699
	Febrero 16-28	61	0	39 633
	Marzo 1°-15	89	6	38 696
	Marzo 16-31	12	0	24 065
	Abril 1°-15	8	0	22 750
TOTALES		336	13	222 194

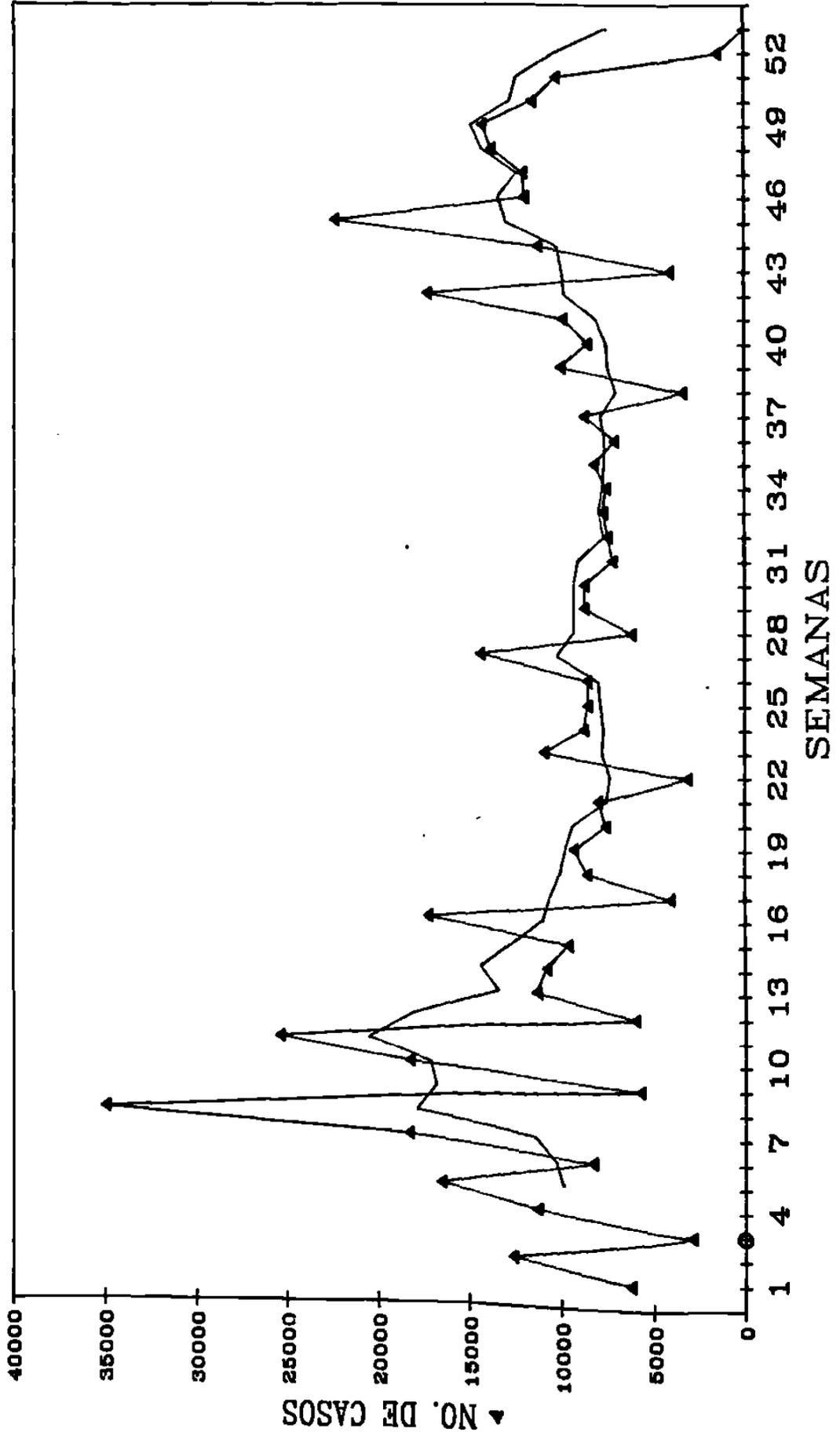
GRAFICA NO. 1
 NO. DE CASOS DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS
 ALTAS AGUDAS REPOROTADOS POR SEMANA
 EN LA CD. DE MONTERREY EN 1984



O = AISLAMIENTO VIRAL

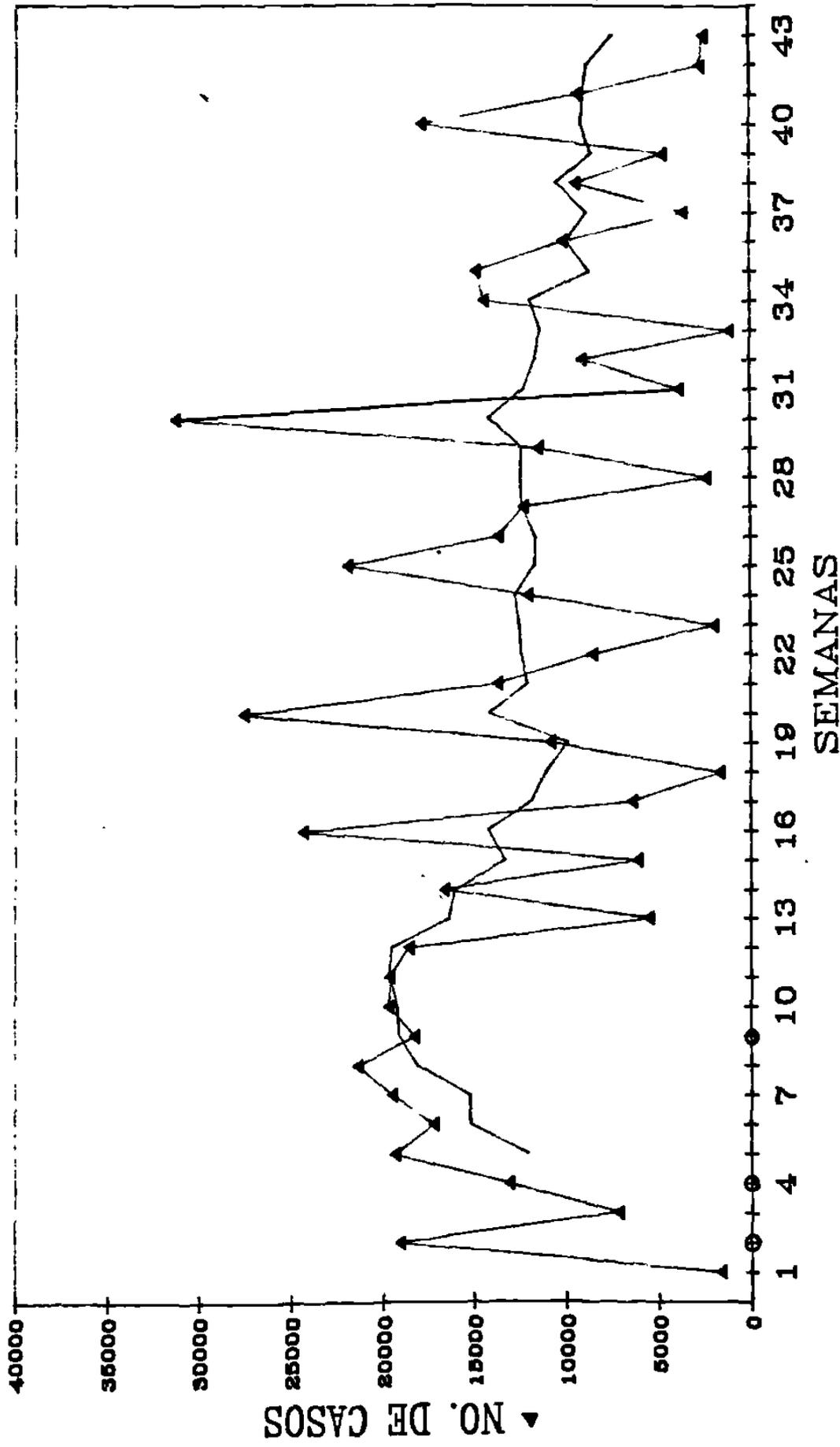
GRAFICA NO. 2

NO. DE CASOS DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS
ALTAS AGUDAS REPORTADAS POR SEMANA
EN LA CD. DE MONTERREY EN 1985



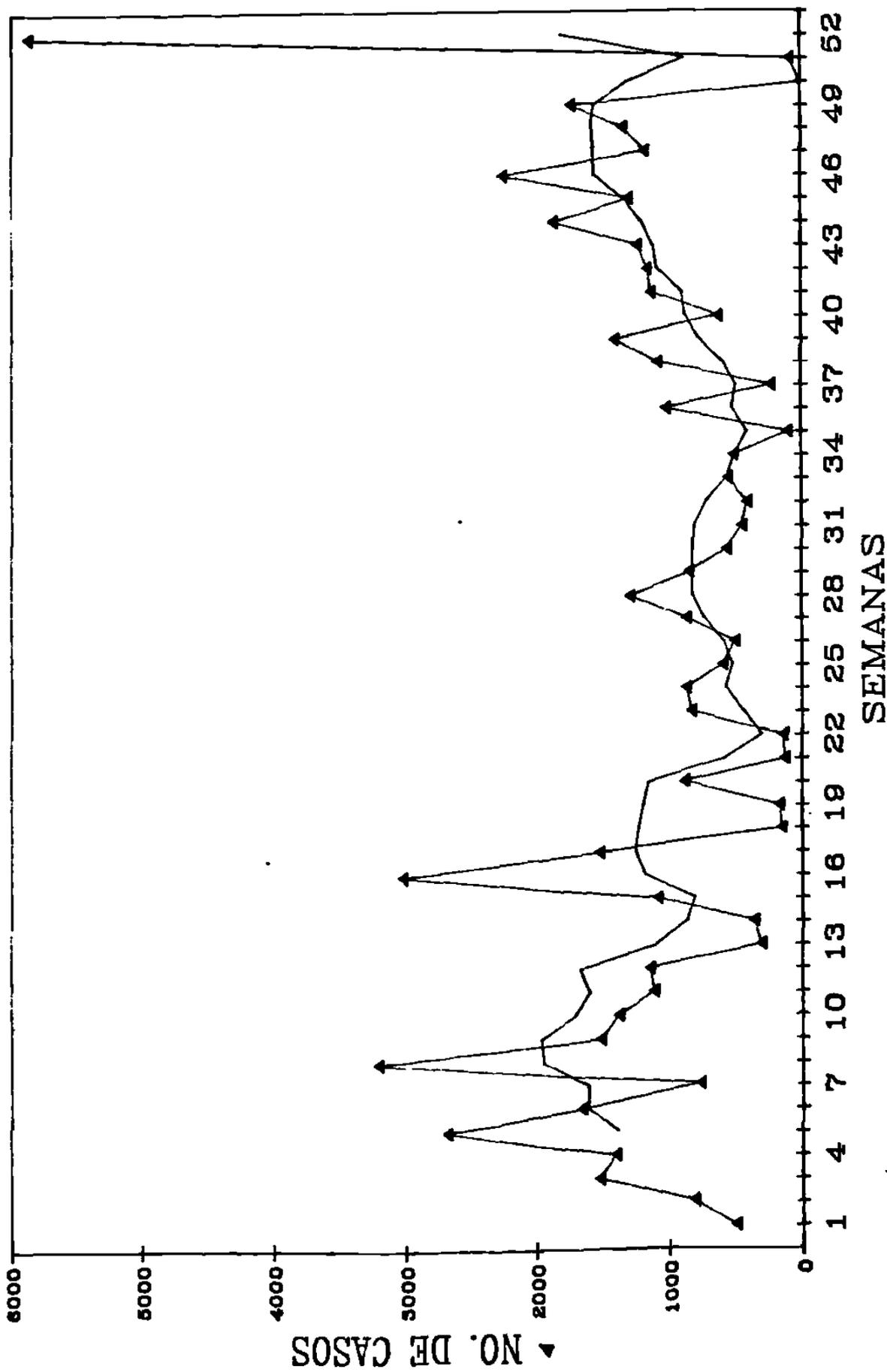
GRAFICA NO. 3

NO. DE CASOS DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS
ALTAS AGUDAS REPORTEADOS POR SEMANA
EN LA CD. DE MONTERREY EN 1986



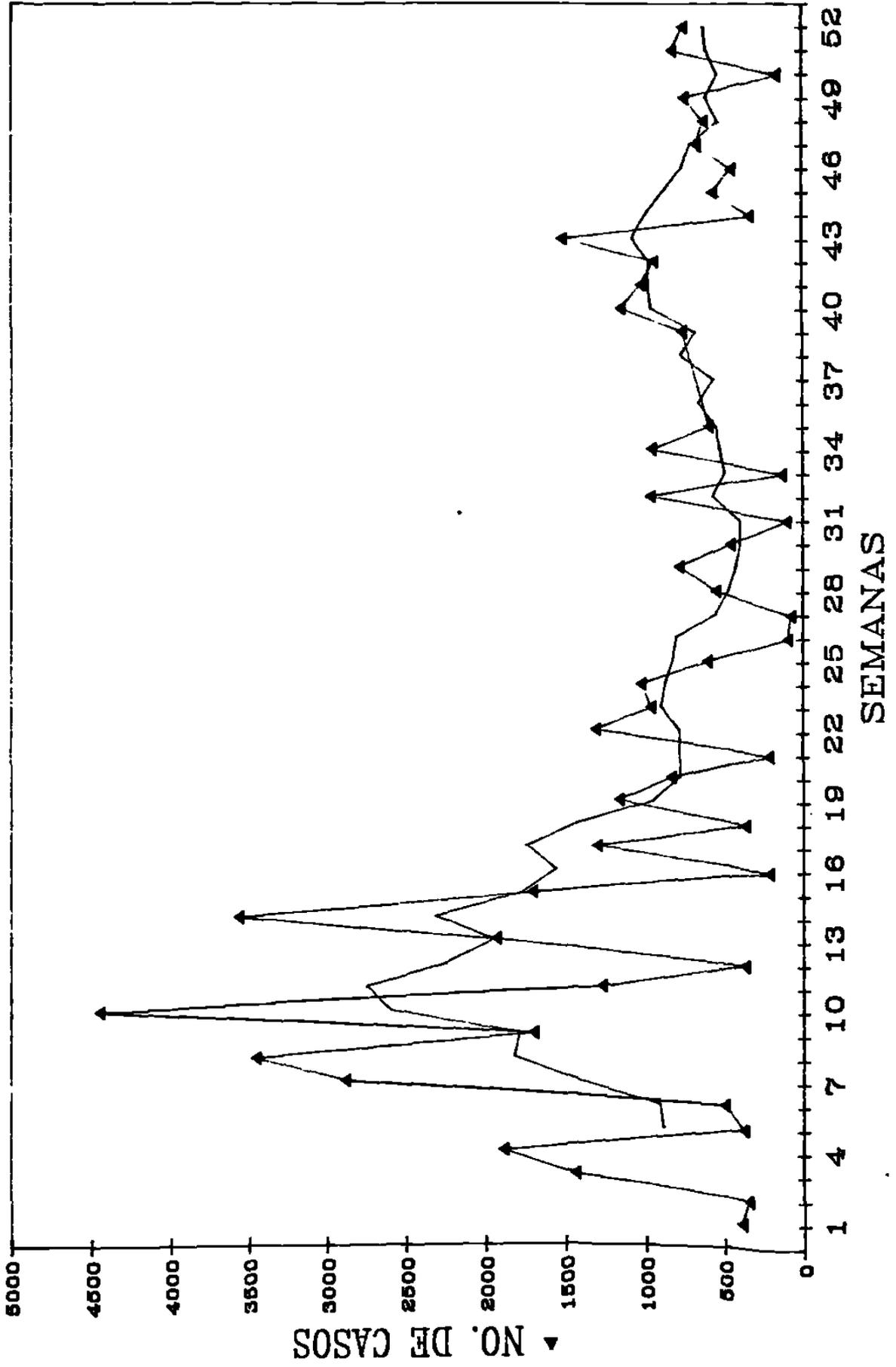
O = AISLAMIENTO VIRAL

GRAFICA NO. 4
 NUMERO DE CASOS DE INFLUENZA REPORTADOS POR
 SEMANA EN LA CD. DE MONTERREY EN 1983

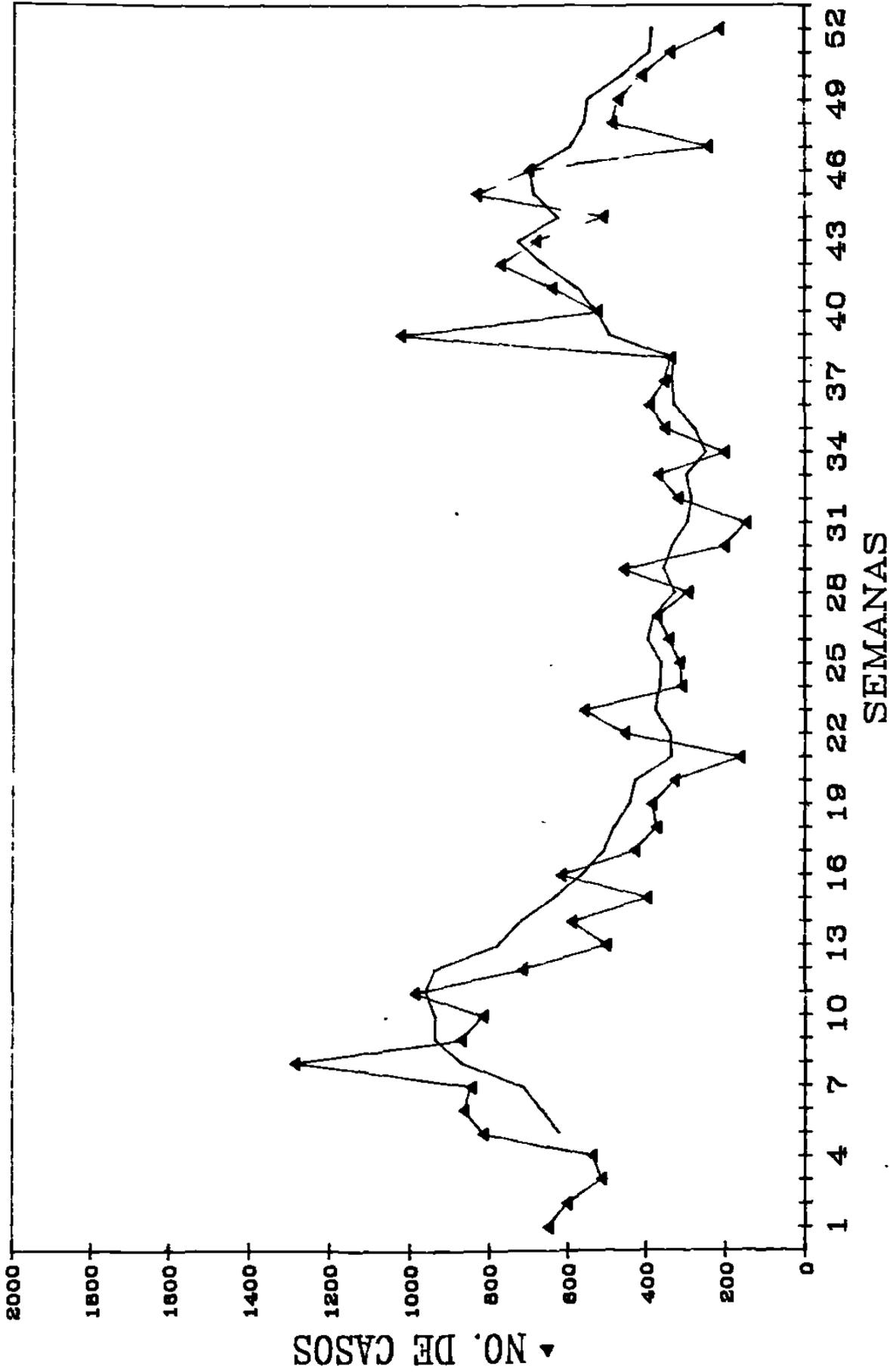


GRAFICA NO. 5

NO. DE CASOS DE INFLUENZA REPORTADOS POR SEMANA EN LA CD. DE MONTERREY EN 1984

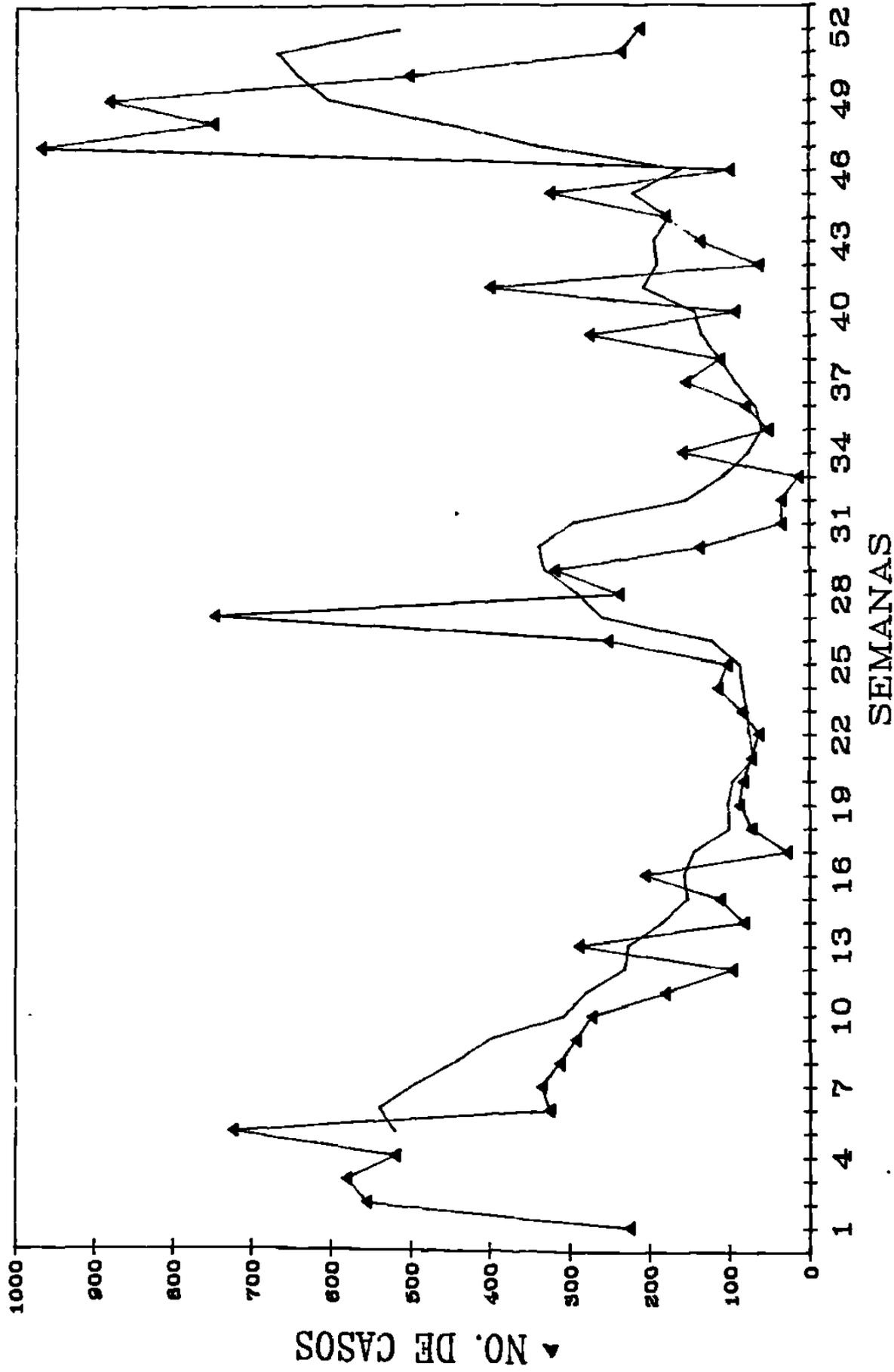


GRAFICA NO. 6
 NUMERO DE CASOS DE INFLUENZA REPORADOS POR
 SEMANA EN LA CD. DE MONTERREY EN 1985



GRAFICA NO. 7

NUMERO DE CASOS DE INFLUENZA REPORTADOS POR SEMANA EN LA CD. DE MONTERREY EN 1986



DISCUSION Y CONCLUSIONES

La alta frecuencia de enfermedades respiratorias agudas altas que se notifica en el municipio de Monterrey y que solamente se diagnostican en base clínica, determinaron la necesidad de efectuar el aislamiento y la identificación de los virus de la Influenza que circularon durante los períodos invernales de 1983 a 1986 (46).

En base a lo anterior, se seleccionaron especímenes faríngeos en lugar de lavados nasales por la facilidad de obtención y se recolectaron durante los meses de enero a abril por ser el período que coincide con la mayor frecuencia de aislamientos de los virus de la Influenza. Sin embargo, se debe mencionar que hay que considerar varios factores para que se pueda efectuar la recuperación de los virus. Uno de éstos es la etapa de la enfermedad en la cual se obtienen los especímenes clínicos, ya que una vez desaparecidos los síntomas de la fase aguda disminuye considerablemente la probabilidad de aislamiento. Además se deben estudiar solamente aquellos pacientes que presenten fiebre y enfermedad respiratoria, ya que es uno de los síntomas característicos de la Influenza (13, 40).

De acuerdo a lo reportado en la literatura, se sabe que la óptima detección de los virus de la Influenza tipos A y B se lleva a cabo utilizando cultivos primarios de tejidos de riñón de perro de la línea celular continua MDCK y que los huevos embrionados de gallina son una alternativa solamente para los virus tipo A. Los 862 especímenes faríngeos se inocularon por duplicado en embriones de pollo debido a la falta de disponibilidad de cultivos celulares, de tal forma que se esperaba aislar únicamente los virus de este tipo. Sin embargo, al analizar los resultados se puede observar que el mayor número de aislamientos correspondió al tipo B/URSS/100/83 durante el período de 1985-1986, probablemente porque fue una de las cepas que circuló con mayor frecuencia durante este período invernal y debido a que los huevos embrionados pudieron actuar como huéspedes sensibles para la replicación viral (17, 36).

Por otra parte, uno de los factores que quizá influyó en el bajo número de aislamientos obtenidos fue el contar solamente con huevos embrionados como sistema para la replicación viral ya que además de la menor sensibilidad en relación a las células MDCK, probablemente las cepas virales presentaron una falta de adaptación a los embriones utilizados.

En relación al transporte de los especímenes clínicos se debe enfatizar que es indispensable la refrigeración rápida ya que los virus son muy sensibles a los cambios de temperatura y se pierden con facilidad. Por otro lado, durante el tiempo que transcurre entre la obtención y el procesamiento de los especímenes, éstos se deben conservar a -70°C para evitar en gran medida la pérdida de la infectividad de los virus, ya que se sabe que es mínima a esta temperatura o a 4°C cuando el tiempo entre ambos eventos es de 5 días. En nuestro caso, la mayoría de los especímenes se conservaron a -20°C , lo cual se reflejó en el bajo número de aislamientos obtenido. Además se comprobó que almacenando los especímenes a 4°C y procesándolos dentro de 5 días se pueden recuperar los virus con facilidad ya que la mayoría de los aislamientos se lograron bajo estas condiciones (15).

Además, para incrementar la frecuencia de aislamientos se recomienda que los antibióticos utilizados se renueven semanalmente y se incluya un antimicótico para disminuir los microorganismos contaminantes. En este caso solamente se utilizaron penicilina y estreptomina, debido a esto se incrementó el número de especímenes contaminados y probablemente este factor influyó en obtener una baja proporción de aislamientos virales (15).

La detección e identificación de agentes virales directamente en los especímenes clínicos ha surgido como un método alternativo para el diagnóstico de las enfermedades de etiología viral. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, la eficiencia reportada para el caso de los virus de la Influenza tipo A mediante ensayos inmuno-

enzimáticos es de 53%, por lo tanto, mientras no se incremente la sensibilidad, el aislamiento de los virus continuará siendo el método de elección para establecer el diagnóstico específico de la Influenza (22).

Los aislamientos obtenidos en Houston, Tx. durante el año epidémico de 1983-1984 correspondieron a los subtipos A (H3N2) en una proporción del 1.2%, al A (H1N1) en un 50.9% y en un 47.9% al tipo B. Durante el período de 1984-1985 se aislaron 98.5% del subtipo A (H3N2), 0.7% del A (H1N1) y 0.8% del tipo B y durante el invierno de 1985-1986 los brotes se debieron al subtipo A (H3N2) y al tipo B. Esta distribución concuerda con nuestros resultados ya que como se puede observar en la Tabla No. 1, durante el período de 1983-1984 se aisló el tipo B, en el de 1984-1985 el subtipo A (H3N2) y durante el de 1985-1986, se obtuvieron 2 aislamientos del subtipo A (H3N2) y 11 del tipo B (13, 37).

Debido a que hay factores que conducen a la variación de los resultados en la Inhibición de la Hemaglutinación, como son la diferente sensibilidad de los eritrocitos utilizados y la avidez de los virus por los anticuerpos, se requiere un control de calidad muy estricto, que incluyé el utilizar controles positivos y negativos, por medio de los cuales se pueda apreciar cualquier interferencia ya sea debida a los reactivos o al equipo utilizado. Por otro lado, tanto la técnica de Hemaglutinación como de Inhibición de la Hemaglutinación son fáciles de realizar e interpretar, sensibles y reproducibles y se pueden adaptar a cualquier laboratorio de diagnóstico (15).

En general se reporta que la eficiencia de aislamientos virales durante el período invernal a partir de personas con síntomas de enfermedad respiratoria aguda es de aproximadamente 30%, pero se debe tomar en cuenta que además de los virus de la Influenza, existen otros patógenos involucrados en este tipo de enfermedad, como los virus de la Parainfluenza y Virus Sincitial Respiratorio, entre otros, que también circulan durante el invierno (13).

Respecto al número de especímenes analizados se puede mencionar que no constituye una muestra representativa de la población afectada con enfermedad respiratoria aguda, de tal manera que se recomienda incrementar el número de pacientes estudiados y efectuar un muestreo aleatorio de los mismos para determinar la morbilidad de la Influenza.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos, es importante resaltar que este tipo de estudio se puede llevar a cabo en las condiciones operativas de nuestro medio, sin embargo se debe enfatizar que la recolección y condiciones de almacenamiento de los especímenes clínicos, así como la fidelidad de los métodos y el establecimiento de un sistema de control de calidad, son los factores indispensables para obtener resultados confiables.

Debido a que en nuestro medio se presentan epidemias anuales de Influenza, a la alta frecuencia y variabilidad en el patrón de las enfermedades respiratorias agudas, es esencial continuar con la vigilancia epidemiológica para identificar los tipos virales que circulan en cada período invernal y determinar su comportamiento en la población con el propósito de contribuir con las instituciones de salud en aplicar las medidas de control necesarias para el beneficio de la comunidad.

RESUMEN

Se recolectaron 862 especímenes faríngeos de personas que presentaron síntomas de enfermedad respiratoria aguda con el objeto de aislar e identificar los virus de la Influenza. Los especímenes se inocularon en embriones de pollo de un período de desarrollo de 9 a 10 días y los virus se detectaron e identificaron por medio de los métodos de la Hemaglutinación e Inhibición de la Hemaglutinación, respectivamente.

Se obtuvieron un total de 15 aislamientos, una cepa viral correspondiente al tipo B/Hong Kong/5/72 durante el período de 1983-1984; el subtipo A/Filipinas/2/82 (H3N2) en el período 1984-1985; 11 del tipo B/URSS/100/83 y 2 del subtipo A/Filipinas/2/82 (H3N2) durante 1985-1986.

BIBLIOGRAFIA

1. Aymard, M., Douglas, A. R., et al. Antigenic characterization of Influenza A (H1N1) viruses recently isolated from pigs and turkeys in France. Bull. W. H. O. 63: 537-542, 1985.
2. Bailowitz, A. and Kaslow, R. A. Use of Amantadine in the United States, 1977-1982. J. Inf. Dis. 151: 372-373, 1985.
3. Barbey-Morel, Ch., Oeltmann, T., et al. Role of respiratory tract proteases in infectivity of Influenza A virus. J. Inf. Dis. 155: 667-672, 1987.
4. Barker, W. H. and Mullooly, J. Underestimation of the role of pneumonia and influenza in causing excess mortality. AJPH. 71: 643-645, 1981.
5. Baumgarten, A. Viral immunodiagnosis. Yale J. Biol. Med. 53: 71-83, 1980.
6. Berman, S. and McIntosh, K. Selective primary health care: Strategies for control of disease in the development world. XXI. Acute respiratory infections. Rev. Inf. Dis. 7: 674-691, 1985.
7. Boletín Mensual de Epidemiología, México. 1: 45-60, 1986.
8. Bosch, F. X. The overall evolution of the H7 Influenza virus haemagglutinin is different from the evolution of the proteolytic cleavage site. J. Gen. Virol. 61: 101-104, 1982.
9. Campaña de inmunización contra la Influenza en 1984-1985. Am. Pharm. 24: 15-16, 1984.

10. Conacyt. La Gripe. Inf. Cient. Tec. 11: 5-9, 1980.
11. Couch, R. B. The effects of influenza on host defenses. J. Inf. Dis. 144: 284-291, 1981.
12. Couch, R. B. Viral Respiratory Diseases. In: Virology. Upjohn. pp. 66-71, 1982.
13. Couch, R. B., Kasel, J. A., et al. Influenza: Its control in persons and populations. J. Inf. Dis. 153: 431-440, 1986.
14. Daniels, R. S., Douglas, A. R., et al. Antigenic and amino acid sequence analysis of Influenza viruses of the H1N1 subtype isolated between 1982 and 1984. Bull. W. H. O. 63: 273-277, 1985.
15. Department of Health, Education and Welfare Public Health Service. IHA. Advanced Laboratory Techniques for Influenza Diagnosis. U. S. A., 1975.
16. Edwards, K. M., Snyder, P. N., et al. Human adenoid organ culture: A model to study the interaction of Influenza A with human nasopharyngeal mucosa. J. Inf. Dis. 153: 41-47, 1986.
17. Frank, A. L., Couch, R. B., et al. Comparison of different tissue culture for isolation and quantitation of Influenza and Parainfluenza viruses. J. Clin. Microbiol. 10: 32-36, 1979.
18. Frank, A. L., Taber, L. H., et al. Individuals infected with two subtypes of Influenza A virus in the same season. J. Inf. Dis. 147: 120-124, 1983.
19. Frank, A. L., Taber, L. H., and Wells, J. M. Comparison of infection rates and severity of illness for Influenza A subtypes (H1N1) and (H3N2). J. Inf. Dis. 151: 73-79, 1985.

20. Glezen, P. Influenza C virus infection. *Arch. Intern. Med.* 140: 1278, 1980.
21. Glezen, P., and Couch, R. B. Interpandemic influenza in the Houston area, 1974-1976. *N. Eng. J. Med.* 298: 587-592, 1978.
22. Harmon, M. W., and Pawlik, K. Enzyme immunoassay for direct detection of Influenza type A and Adenovirus antigens in clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 15: 1-11, 1982.
23. Hashimoto, G. et al. Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity against Influenza virus infected cells. *J. Inf. Dis.* 148: 785-794, 1981.
24. Huang, R. T. C. et al. Influenza viruses cause hemolysis and fusion of cells. *Virology* 110: 243-247, 1981.
25. Jennings, T. S. et al. Influenza virus infection of human alveolar and peripheral blood-derived macrophages. *Am. Rev. Respir. Dis.* 130: 98-101, 1984.
26. Joklik, W. K. et al. *Zinsser Microbiology*. 17th ed. Appleton Century Crofts, New York, 1980.
27. Justewics, D. M. et al. Blocking of Influenza virus-induced cell-mediated cytotoxicity by haemagglutinin-specific monoclonal antibodies. *J. Inf. Dis.* 150: 348-357, 1984.
28. Kaplan, M., and Webster, R. G. The epidemiology of Influenza. *Sci. Am.* 237: 88-106, 1977.
29. Katagiri, S. et al. An outbreak of type C Influenza in a children's home. *J. Inf. Dis.* 148: 51-56, 1983.

30. Kendal, A. P., Noble, G. R., et al. Antigenic similarity of Influenza A (H1N1) viruses from epidemics in 1977-1978 to "Scandinavian" strains isolated in epidemics of 1950-1951. *Virology* 89: 632-636, 1978.
31. Kilbourne, E. D. Influenza 1979. *Am. J. Med.* 66: 371-372, 1979.
32. Kimball, A. M., Foy, H. M., et al. Isolation of Respiratory Syncytial and Influenza viruses from the sputum of patients hospitalized with pneumonia. *J. Inf. Dis.* 147: 181-184, 1983.
33. Knight, V. et al. Ribavirin small particle aerosol treatment of Influenza. *Lancet* 31: 945, 1981.
34. Laver, W. G., Air, G. M., and Webster, R. G. Antigenicity of Influenza virus hemagglutinin following chemical modification. *Virology* 111: 538-548, 1981.
35. Lenard, J., and Miller, D. K. pH-Dependent hemolysis by Influenza, Semliki Forest virus and Sendai virus. *Virology* 110: 479-482, 1981.
36. *MMWR.* 34: 442-443, 1985.
37. *MMWR.* 35: 434-435, 1986.
38. Pereira, M. S. Global surveillance of Influenza. *Br. Med. Bull.* 35: 9-14, 1979.
39. Pereira, M. S., Chakravety, P., et al. The use of monoclonal antibodies for the antigenic analysis of Influenza A virus. *Bull. W. H. O.* 63: 265-271, 1985.
40. Pizarro, E., Medina, G. y col. Vigilancia epidemiológica de la Influenza. Brote epidémico ocurrido en México, D. F., en febrero de 1976. *Sal. Púb. Mex.* XIX: 681-684, 1977.

41. Pons, V. G. y Dolin, R. Influenza. Tribuna Médica XXXVIII: 1-7, 1980.
42. Pumarola, A. Gripe. Medicine 27: 51-61, 1983.
43. Robert, J. R., and Horan, P. K. Expression of viral antigen after infection of human lymphocytes, monocytes and macrophages with Influenza virus. J. Inf. Dis. 151: 308-313, 1985.
44. Ruigrok, W. R. et al. Characterization of three highly purified Influenza virus strains by electron microscopy. J. Gen. Virol. 65: 799-802, 1984.
45. Scholtissek, C., Rhode, W., et al. On the origin of the human Influenza virus subtypes H2N2 and H3N2. Virology 87: 13-20, 1978.
46. Secretaría de Salud. Departamento de Informática y Estadística. Reportes anuales de enfermedades respiratorias agudas, 1984-1986.
47. Smith, L. G. and Hay, A. J. Replication of the Influenza virus genome. Virology 118: 96-108, 1982.
48. Sonoguchi, T., Sakoh, M., et al. Reinfection with Influenza A (H2N2, H3N2, and H1N1) viruses in soldiers and students in Japan. J. Inf. Dis. 153: 33-40, 1986.
49. Stuart-Harris, Ch. Epidemiology of Influenza in man. Br. Med. Bull. 35: 3-8, 1979.
50. Stuart-Harris, Ch. and Potter, C. W. (eds.). The Molecular Virology and Epidemiology of Influenza. Academic Press, New York. 305 pp., 1984.

51. Van Voris, I. P. et al. Successful treatment of naturally occurring Influenza A/URSS/77. *JAMA*. 245: 1128, 1981.
52. Van Wike, K. L., Yedwell, J. W., et al. Antigenic characterization of Influenza A virus matrix protein with monoclonal antibodies. *J. Gen. Virol.* 49: 248-252, 1984.
53. Webster, R. G., Laver, W. G., et al. Molecular mechanisms of variation in Influenza virus. *Nature* 296: 115-121, 1982.
54. Yamazi, Y., Suzuki, H., et al. Analysis by monoclonal antibodies of H3N2 subtype Influenza A viruses in Japan and South east Asia prior to 1983. *J. Inf. Dis.* 148: 1126, 1983.
55. Yedwell, J. W., Frank, E., and Gerhard, W. Expression of Influenza A virus internal antigens on the surface infected P815 cells. *J. Immunol.* 126: 1814-1819, 1981.
56. Younkin, S. W. et al. Reduction in fever and symptoms in young adults with aspirin or amantadine. *Antimicrobiol. Ag. Chemot.* 23: 577, 1983.

