



VIGILANCIA EPIDEMIOLOGICA DEL VIRUS DE LA INFLUENZA
EN LA CIUDAD DE MONTERREY

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

PRESENTA :

HILARIO ORTEGA ORTA

MONTERREY, N.L., MARZO DE 1995

TM

RC150

.55

.M6

07

c. 1



1080071401

5027



BIBLIOTECA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA

TESIS QUE EN OPCIÓN AL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGÍA.

MÉDICA

PRESENTA

HILARIO ORTEGA ORTA

Monterrey, N.L., Marzo de 1995



TM
RC 150
S3
M6
H5



**VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DEL VIRUS DE LA INFLUENZA
EN LA CIUDAD DE MONTERREY**

Aceptado por la subdirección de investigación y Estudios de postgrado de la
facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León el
de _____

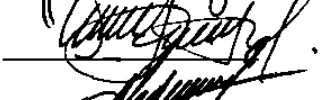
NOMBRE

FIRMA

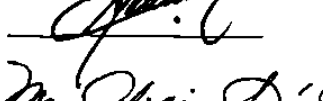
Dr. José Gerardo Velazco Castañón



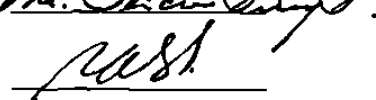
Dr. Manuel A. Rodríguez Quintanilla



Dr. Carlos E. Medina de la Garza



Q.F.B. M.C. Alicia Suárez Semour



Q.C.B. M.C. Irma A. Salinas González



DEDICATORIA

A Ti, que me das todo aunque nada merezco; a Ti que eres el todo de mi ser, luz en mi camino y abrigo en la tempestad. Si, a Ti mi Dios.

A mi niña



BIBLIOTECA

AGRADECIMIENTOS

A Dios; por darme la vida y apoyo en los momentos difíciles en el transcurso de esta etapa de mi preparación.

Al Dr. José Gerardo Velazco Castañón, por su asesoría, paciencia y sabios consejos.

A las maestras Irma A. Salinas y Alicia Suarez, por su franqueza y ayuda. Por su amistad.

A los Doctores Manuel A. Rodríguez y Carlos E. Medina de la Garza por sus acertadas sugerencias.

A mi México, mi gente, mi pueblo; que me dio apoyo económico por medio de CONACYT.

A Perla Sorely, Estrada Berlanga y a mis hermanos Moisés e Irma Ortega Orta que siempre estuvieron dispuestos a colaborar conmigo.

Al personal de Departamento de Microbiología de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

ÍNDICE

	Página
I RESUMEN _____	1
II INTRODUCCIÓN	
a) Antecedentes, historia y cuadro clínico _____	2
b) El virus y sus características _____	6
c) Nomenclatura viral _____	9
d) Epidemiología _____	10
e) Objetivo general _____	17
f) Objetivos particulares _____	18
III MATERIAL Y MÉTODOS	
a) Toma de muestras _____	19
b) Cultivo en huevo embrionado _____	20
c) Cosecha de virus en huevo embrionado _____	21
d) Hemaglutinación _____	21
e) Inhibición de la hemaglutinación _____	24
IV RESULTADOS	
a) Muestras analizadas en el período 1991- 1992 _____	27
b) Muestras analizadas en el período 1992-	

1993 _____	27
c) Porcentaje por mes del total de muestras recolectadas en los períodos de 1991-1992 y 1992-1993 _____	
1992-1993 _____	29
d) Tipificación de las cepas aisladas en el período 1991-1992 _____	
1991-1992 _____	29
e) Tipificación de las cepas aisladas en el período 1992-1993 _____	
1992-1993 _____	34
f) Recopilación final de los datos obtenidos en este estudio durante los períodos de 1991-1992 y 1992-1993 _____	
1991-1992 y 1992-1993 _____	34
g) Reporte general del tipo de cepas tipificadas en EE. UU. en los períodos de 1991-1992 y 1992-1993 _____	
1991-1992 y 1992-1993 _____	38
h) Incidencia de enfermedad respiratoria aguda (I.E.R.A.) en la Clínica # 37 del IMSS durante los períodos de 1991-1992 y 1992-1993 _____	
1991-1992 y 1992-1993 _____	38
i) Incidencia de enfermedad respiratoria aguda en los diferentes grupos de población por edades _____	
por edades _____	40

V DISCUSIÓN	44
VI CONCLUSIÓN	48
VII REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA	50
VII APÉNDICE A: PREPARACIÓN DE REACTIVOS	
a) <i>Materiales biológicos</i>	54
b) Preparación de 4 UHA (unidades hemaglutinantes) en 25 ul	54
c) Preparación de RDE (enzima destructora de receptores inespecíficos)	56
d) PBS pH de 7.2	57
e) Alsevers pH	57
f) Solución salina de calcio pH 7.2	57
g) Solución de citrato de sodio al %	58
h) Suspensión de glóbulos rojos al 0.5%	58
i) Medio de transporte	58
j) Solución penicilina y estreptomina	59

I) RESUMEN

Se realizó un estudio epidemiológico, en el cual se compararon los tipos antigénicos del virus de la influenza que se aíslan en la Ciudad de Monterrey, Nuevo León México, con los que se encuentran en Estados Unidos de Norte América durante los mismos períodos. La casuística comprendió muestras de exudado faringeo y/o nasal durante los meses de noviembre a marzo de las temporadas de 1991-1992 y 1992-1993. En Monterrey se colectaron 182 muestras de la Clínica # 37 del Instituto Mexicano del Seguro Social. Las muestras se inocularon en huevo embrionado de diez días y se determinó la presencia del virus de la influenza mediante la prueba de hemaglutinación. La tipificación de los virus se efectuó mediante la técnica de inhibición de la hemaglutinación. De las muestras procesadas, 30 resultaron con actividad viral hemaglutinante, tipificando 6 de ellas. Estas se compararon con las aisladas en Estados Unidos. La comparación mostró que hay similitud. En Estados Unidos se encontró mayor diversidad de cepas aisladas en el período de 1991-1992, reportando cepas muy similares a las encontradas en Monterrey en el segundo período de 1992- 1993.

II) INTRODUCCIÓN

a) Antecedentes, historia y cuadro clínico

La influenza es una enfermedad infecciosa causada por el virus del mismo nombre y se caracteriza por daño a las células del epitelio de las vías respiratorias.

La influenza, del italiano influentia o influentia di freddo; se refiere a la creencia que la enfermedad resulta de la influencia del movimiento planetario y del agua (2,10).

El virus se aisló por primera vez en el año de 1933 por Smith y colaboradores (7).

El término influenza según supone Baum (2), fue acuñado específicamente a esta enfermedad en el año de 1749 cuando la epidemia de influenza atacaba a Europa.

Dentro de la población general la incidencia de la enfermedad es más alta en los individuos que por su edad pertenecen a los extremos de la vida; tales son los niños y los ancianos, agregándose a ellos las personas que sufren enfermedades

debilitantes, mujeres embarazadas, los fumadores y quienes ingieren bebidas alcohólicas con frecuencia.

Según Glezen, una condición pivote para la diseminación del virus en la población susceptible está dada por la asistencia de los niños a las escuelas de nivel *preprimario* y *primario*, donde es común que haya una estrecha relación entre niños, acción que favorece el contagio entre ellos y la diseminación del virus a cada hogar (6). El mismo autor propone que este mecanismo es así mismo el responsable de la diseminación de la enfermedad en períodos interpandémicos, ejemplificado con la aparición de la epidemia de 1957; cuando esta dio inicio hasta después que iniciaron las actividades escolares

El virus de la influenza se encuentra libre en la naturaleza suspendido en partículas de polvo o bien en reservorios animales, lo cual incluye al hombre mismo. Estos reservorios son: cerdos, caballos, patos, y otras aves domésticas; que por su relación con el hombre permiten su diseminación (8).

El virus de la influenza se adquiere por la vía respiratoria al inhalar partículas de polvo y/o aerosoles suspendidos en el medio, que se producen al toser o estornudar. Al ser inhaladas por un hospedero algunas partículas se depositan en el tracto respiratorio superior en tanto que algunas más pequeñas van

directamente a los pulmones llegando en ocasiones hasta los alvéolos. Las partículas que tienen en promedio 2 nm. de diámetro contienen de una a dos TCID₅₀ (dosis infecciosa 50 para cultivo de tejidos), mismas que se depositan en las vías aéreas superiores iniciando de esta forma la infección. La HID₅₀ (dosis infectiva 50 para humanos es de 127 a 320 TCID₅₀ (5,20).

La enfermedad tiene un período de incubación de 1 a 3 días, dependiendo de la cantidad de inoculo y del estado de inmunidad del huésped, 5% a 10% de las personas infectadas tienen afección respiratoria. Según Small, el epitelio del tracto respiratorio normal que es cilíndrico pseudo estratificado ciliado con células caliciformes, desaparece a los tres días de infección permaneciendo solo la capa basal (24). De esta forma se altera el aclaramiento traqueal por la pérdida de cilios del sistema respiratorio y la falta de mucina que ayuda al atrapamiento de bacterias y partículas de polvo; mismas que serán llevados a la faringe posterior para ser deglutidos. Esto facilita así mismo las infecciones bacterianas secundarias. El epitelio basal, que según Meitin; carece de receptores para el virus de la influenza, permaneciendo después que desaparece el epitelio seroso y ciliar (18).

Los síntomas que comúnmente se presentan en la influenza son: rinorrea, mialgias, neuralgias, fiebre, calofríos, malestar general y tos no productiva entre otros; se establece un retraso en el aclaramiento pulmonar. Según estudios hechos

por Laurezie y colaboradores, comenta que el retraso en el aclaramiento pulmonar inducido por la infección con el virus de la influenza es mimetizado por los hábitos de fumar e ingerir bebidas alcohólicas (19).

Hay por lo menos cinco formas de manifestación clínica de los cuadros de influenza, y éstos son: a) Cuando se presentan sólo signos pulmonares transitorios; b) cuando a los signos pulmonares se les añade neumonía bacteriana, c) donde se presentan además de los signos pulmonares neumonía viral caracterizada por un elevado índice de mortalidad, d) la influenza concomitante unido a neumonía bacteriana y e) cuando hay complicaciones extrapulmonares como el síndrome de Reye (2). Las bacterias comúnmente agregadas a las infecciones por influenza son: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae*, algunos otros estreptococos, Rickettsias y Chlamidias (2, 5).

En la epidemia asiática de 1957 la complicación de neumonía por *Staphylococcus* jugó un papel importante en la mortalidad total (19). Según Heilman se han descrito complicaciones como miopatía crural transitoria aguda y mioglobinuria con disfunción renal en la población infantil (7).

b) El virus y sus características

El virus de la influenza es una partícula pleomórfica, que adopta la forma de esfera y tiene un diámetro de 110 nm. Es un virus con cubierta, como genoma tiene RNA segmentado de sentido negativo; está ubicado en la clase cinco del esquema de Baltimore (11). Pertenece a la familia de los ortomixovirus y tiene tres tipos antigénicos importantes: A, B y C, aunque se ha descrito un cuarto tipo: D, que no se ha encontrado en humanos (7). El genoma de los ortomixovirus tiene 8 segmentos, siendo la excepción el tipo C, donde se encuentran solo 7.

La nucleoproteína constituye la estructura fundamental del complejo helicoidal interno, y tiene fracciones proteicas PB₂, PB₁, PA y NP, que son codificadas por los segmentos de RNA 1, 2, 3, y 5 respectivamente, las proteínas NS₁ y NS₂ (no estructurales) son codificadas por el segmento ocho en los virus tipo A y B. Por el segmento siete en el virus tipo C. En los virus tipo A y B, las proteínas de matriz (M₁ y M₂), estrechamente relacionadas con la membrana bilipídica que cubre a la partícula viral es codificada por el segmento siete. Por último, la hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) son codificadas por el segmento cuatro y seis respectivamente. Siendo de principal importancia en la virulencia. Se encuentran distribuidas a lo largo de la superficie viral enclavadas en la envoltura lipídica a manera de espículas con una longitud aproximada de 10nm.

La HA constituye el 25% de las proteínas virales, está enclavada a la envoltura lipídica mediante 25 a 32 aminoácidos de carácter hidrofóbico en la porción Carboxilo terminal (COOH). Gracias a ello, resulta lo suficientemente firme y estable (5). La estructura primaria de los polipéptidos de la HA se compone de dos subunidades, HA₁ y HA₂, tienen una porción carboxilo terminal (COOH) y amino terminal (NH) unidas por puentes disulfuro; manteniendo de esta forma unidas las fracciones HA₁ y HA₂, mismas que deberán ser separadas por la acción de proteasas para que la partícula viral sea infectiva (5,8). La disposición tridimensional que adopta la molécula de HA en la superficie del virus o de una célula infectada es la de tres estructuras primarias entrelazadas formando un trimero enrollado en alfa hélice con una extensión de 70 Å. En el dominio globular se encuentran localizados los determinantes antigénicos A,B,C,D y E; el sitio de unión al receptor celular se encuentra en la parte distal externa. Es conocido que por parte de la célula huésped, el ácido neuramínico se acopla a la HA. En la superficie de los eritrocitos se encuentra ácido neuramínico 2,3 y 2,6- galactosa, por lo tanto pueden fijar al virus en su superficie.

La NA consta de una porción COOH terminal proximal y una porción NH terminal distal, difiere de la HA en que ésta no necesita ser fraccionada para ser activa. La NA puede ser cortada por enzimas proteolíticas que actúan a nivel de la

región NH terminal, separando una estructura semiesférica de la columna principal. Al igual que la HA, la NA está enclavada en la superficie del virión por la porción COOH terminal y tiene en su conformación una secuencia de aminoácidos hidrofóbicos que le sirven para anclarse en la membrana viral. La NA se puede describir como una espícula que sale de la membrana del virus con una morfología a manera de champiñón, donde la cabeza corresponde a la región NH terminal. La proteína no está distribuida uniformemente como la HA, se encuentra a manera de agregados en la superficie viral. En la porción distal de la proteína hay una homología moderada en las secuencias nucleotídicas en los tipos de virus A y B donde 17 a 18 aminoácidos localizados en este lugar comprenden el sitio activo de la glucoproteína. La función de la proteína es la de destruir los residuos de ácido siálico presente en la superficie celular y se cree que tiene una particular importancia en la salida de nuevas partículas virales de la célula infectada (7).

Una característica notable del virus, es la propiedad de cambiar frecuentemente la naturaleza antigénica de la HA y NA; teniendo las variantes antigénicas una ventaja selectiva sobre la cepa original (5). Las alteraciones son de dos tipos: a) desviaciones antigénicas o alteraciones antigénicas menores ("drift") y b) cambios antigénicos, denominados alteraciones antigénicas mayores ("shift"). Las desviaciones antigénicas surgen de mutaciones puntuales a nivel del gen que

codifica para las proteínas, alterando de esta manera el marco de lectura original. Esto ocasiona frecuentemente la inserción a la proteína de un aminoácido diferente del original. Se pueden incorporar varios cambios en la secuencia de aminoácidos de una proteína, sin afectar de manera importante su antigenicidad ni su capacidad para reconocer su sustrato celular. Sin embargo, llega un momento en que las alteraciones acumuladas cambian por completo la antigenicidad de la proteína, dando como resultado la modificación de la reactividad de los anticuerpos contra las proteínas virales y la inducción de una nueva identidad antigénica, renovando así la susceptibilidad de los hospederos potenciales (22).

c) Nomenclatura de las cepas

Los parámetros que se toman en cuenta para la nomenclatura de los virus de la influenza son: a) tipo de virus, b) el lugar de aislamiento (origen geográfico), c) el número secuencial de aislamiento, d) el año, e) las propiedades antigénicas de la hemaglutinina y f) de la neuraminidasa. Vease un ejemplo en la siguiente figura (figura 1).

NOMENCLATURA PARA DESIGNAR LOS VIRUS DE LA INFLUENZA

A/ TAIWAN /1/ 86 / (H1 N1)	
a) Tipo de virus aislado _____	= A
b) Lugar de aislamiento _____	= Taiwán
c) Número de serie _____	= 1
d) Año de aislamiento _____	= 86
e) Subtipo de Hemaglutinina _____	= H1
f) Subtipo de Neuraminidasa _____	= N1

Fig. 1. Parámetros usados para la nomenclatura de las cepas de la influenza.

d) Epidemiología

Desde épocas inmemoriales la influenza ha estado presente en la población humana como brotes esporádicos, hasta pandemias y epidemias.

A partir de 1953 la Organización Mundial de la Salud adoptó la diferenciación de tres tipos de virus de la influenza inmunológicamente diferentes: A, B y C; los tipos A y B son los mayormente asociados a epidemias por su

características de inestabilidad antigénica; el tipo B es comparativamente al A más estable, en tanto que el C es antigénicamente estable (5). El tipo A está clasificado en base a los dos tipos de proteínas: hemaglutinina y neuraminidasa (NA y NA respectivamente). Se conocen 13 subtipos de HA y nueve de NA (10). Solamente tres subtipos de HA (H₁, H₂, y H₃) y dos de N (N₁ y N₂) afectan al hombre.

Por las características tan cambiantes del virus es frecuente la tendencia de las infecciones y la incapacidad laboral relacionada con la influenza; por ello, presenta un problema de salud pública; económico y social desde hace tiempo. Haciendo una recopilación de los datos que existen al respecto, hay reportes de la pandemia de 1918 - 1919 causada por el virus A H₁N₁ ("influenza Española"), donde murieron más de 20 millones de personas por la enfermedad o bien por complicaciones de la misma (10). Fields menciona que las muertes en todo el mundo oscilaron entre 20 y 40 millones (5). En nuestro país, específicamente en Monterrey, Nuevo León hay informes de la misma fecha que presentan datos donde las muertes por influenza y neumonía asociadas con influenza superaron en número a la mortalidad total acaecida en los meses de octubre- noviembre del mismo año (fig.2).

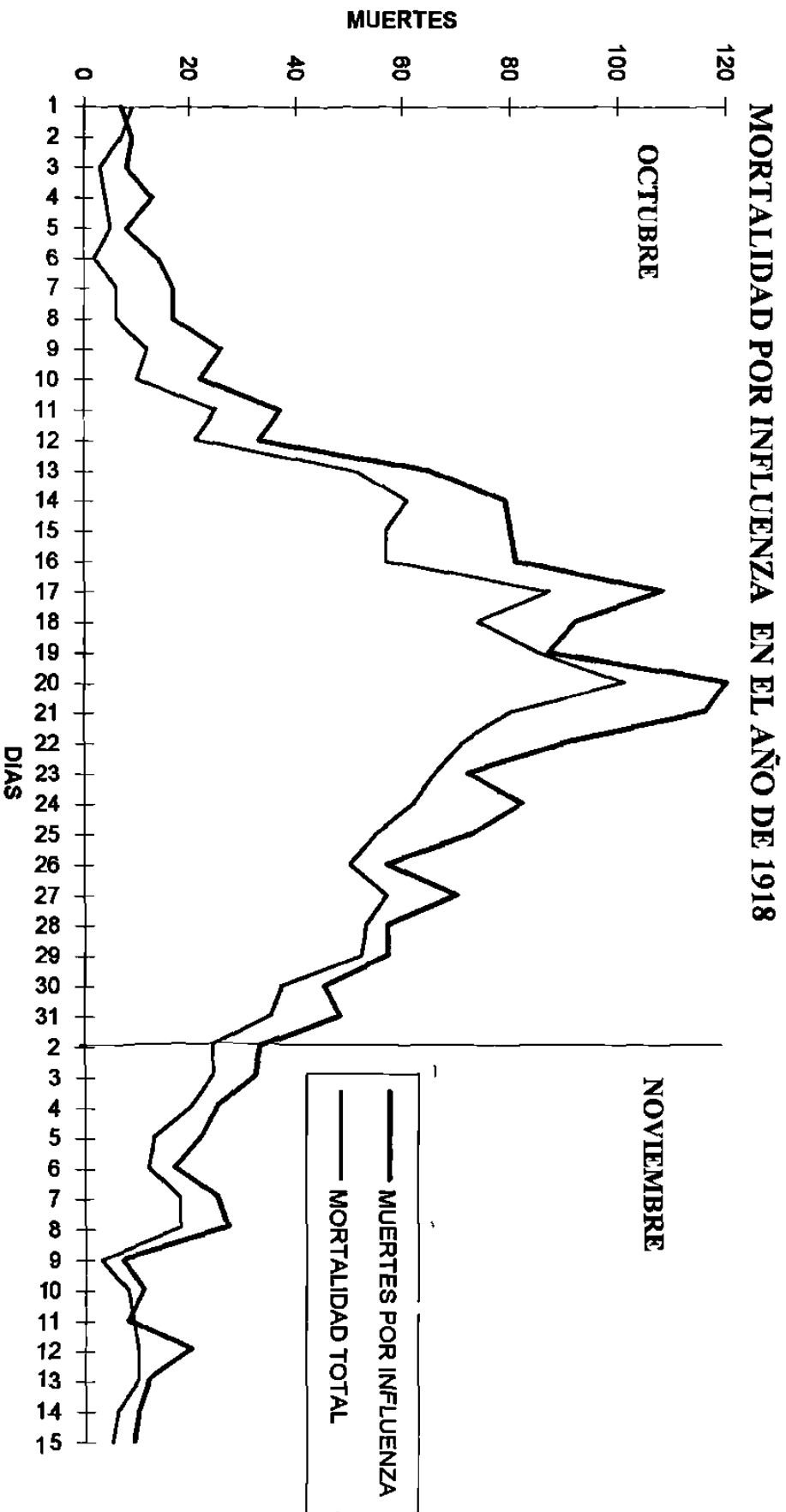


Fig. 2 Mortalidad registrada en los juzgados 1ro, 2do y 3ro del Estado Civil del 1ro de octubre al 15 de noviembre del año de 1918

Después que hubo desaparecido la pandemia de 1918, posteriormente en el año de 1957-1958 se presentó nuevamente con una identidad diferente: "Influenza Asiática", con fórmula antigénica A/Aichi/57 (H₂N₂); otras pandemias de gran importancia que denotan también los cambios antigénicos mayores son la "influenza de Hong Kong" ocurrida en 1968-1969 con fórmula antigénica A/Hong Kong/68 (H₃N₂) y la "influenza Rusa" aparecida en 1977-1978 con fórmula antigénica A/USSR/77 (H₁N₁); con esto se muestra que los cambios antigénicos pueden presentar una cierta periodicidad (5). Desde entonces a la fecha no se han presentado más pandemias; aunque se ha seguido presentando epidemias en diferentes partes del mundo (fig. 3), durante éstas, se incrementa la tasa de mortalidad por neumonía y complicaciones pulmonares, presentándose este fenómeno con mayor frecuencia en los países en vías de desarrollo donde las cifras de mortalidad por esta causa llegan a ser hasta de 50 veces más altas que en los países desarrollados (1). Las tasas de letalidad llega a ser entre 5% y 10% en los hospitales de áreas urbanas y mayor de 10% en algunas áreas rurales (1,12).

AÑO	EPIDEMIAS POR VIRUS:
1987-1988	A (H1N1) y B
1988-1989	A (H3N2) y B
1989-1990	A (H3N2), A (H1N1) y B

Fig. 3. Epidemias por influenza desde el año de 1987 a 1990 y los tipos antigénicos causantes de las mismas (13).

Es evidente que el virus de la influenza juega un papel importante en la epidemiología de las enfermedades de las vías respiratorias, por ende, es importante la vigilancia sistemática a nivel mundial, de cada país y cada población.

En Estados Unidos y otros países desarrollados, continuamente se lleva a cabo un programa de vigilancia, en donde ubicados en sitios estratégicos se cuenta con centros de recolección de muestras para aislamiento de virus de la influenza; estos, envían sus reportes al Centro de Control de Enfermedades (C.D.C.) en Atlanta, logrando de esta manera conocer el tipo de virus que se encuentra presente en una determinada zona en un tiempo dado. De esta manera se puede tener una idea del tipo de virus que circulará en los años siguientes tomando en cuenta además los posibles cambios antigénicos; se anticipa con esto, la fabricación

1991-1992 y 1992-1993, buscando los tipos de virus de la influenza que puedan encontrarse en los tiempos de aparición máxima de estos virus (períodos de invierno).

Datos como los anteriores y paradójicamente la falta y limitaciones de algunos de ellos, nos revela la importancia que tiene, en el caso de la influenza, el contar con estudios que evidencien la relación existente entre los virus aislados en nuestra población con otros lugares (Estados Unidos). Es por ello que se hace la siguiente propuesta:

e) Objetivo general

Comprobar si los virus de la influenza que se encuentran presentes en la ciudad de Monterrey, son antigenicamente similares a los que se reportan en Estados Unidos durante el mismo período.

f) Objetivos particulares

- 1.- Recuperación de las cepas de virus de la influenza de la población estudiada**
- 2.- Tipificación antigénica de las cepas recuperadas.**
- 3.- Comparación de las cepas de virus de influenza tipificadas en este estudio, con las encontradas en Estados Unidos durante el mismo periodo.**
- 4.- Notificación al CDC de las posibles cepas con diferencias antigénicas importantes comparadas con las ya conocidas.**

III) MATERIAL Y MÉTODOS

Para realizar este trabajo se recolectaron exudados nasales y/o faringeos de pacientes que cumplieran con los requerimientos previamente establecidos, se inocularon en huevos embrionados de diez días. Se identificaron los especímenes con actividad hemaglutinante mediante la prueba de hemaglutinación; una vez identificados, se tipifican usando la técnica de inhibición de la hemaglutinación, usando antisueros y antígenos de referencia como control.

a) Toma de muestras

Por motivos geográficos y logísticos se eligieron cuatro sitios para la recolección de las muestras, a saber: Hospital Universitario, Hospital Dr. Eleuterio González, Hospital Mugerza, Hospital San José y la Clínica # 37 del IMSS. Para determinar el tamaño de muestra no se estableció un tope, ya que entre más muestras se recolecten, aumentará la probabilidad de encontrar distintos tipos de virus. e toman hisopados faringeos y/o nasales, con un hisopo de acrílico, cuidando que este bien impregnado de la secreción, se colocan en tubos para su transporte que contienen 1.8 ml. de caldo tripticasa soya con gelatina nutritiva al

0.2%, se añade 0.2ml. de solución de antibióticos que contiene 400 µg./ml de estreptomomicina y 800 U/ml de penicilina; que al mezclarse con el caldo nutritivo dará una concentración de 40 µl/ml y 80 U/ml respectivamente.

Si el espécimen se procesa en las siguientes 24 hrs., se conservará a 4 °C; se cultiva después de uno o mas días, se mantiene a -70 °C, descongelandose y llevandose a 4 C antes de inocularlo.

b) Cultivo en huevo embrionado

Para el cultivo en huevo embrionado, las muestras se llevaron a una temperatura de 4 °C y luego se procedio a la inoculación. Para iniciar el procedimiento, se observaron los embriones a través del ovoscopio con el fin de ubicar la cámara de aire hacia arriba, se limpio la superficie del huevo con alcohol al 70%, se hace un pequeño orificio en la parte posterior de la cámara de aire; de tal manera que pueda penetrar la aguja al momento de la inoculación. Se escogen de 2 a 3 huevos embrionados por espécimen a procesar. Para realizar la inoculación, primeramente se colocan los especímenes en baño de hielo a 4 °C, se transfieren a una jeringa de 1.0 ml; con aguja de calibre 23; posteriormente se localiza el embrión viendolo a través de un ovoscopio. Se gira el huevo con el fin de localizar la cabeza del embrión; una vez localizada, se inicia la inoculación inyectando 0.2 ml. del espécimen en la cavidad amniótica, se saca un poco la aguja hasta localizar

la cavidad alantoidea, inoculando la misma cantidad de muestra. Se saca la aguja y se sella posteriormente el orificio con esmalte para uñas o resistol. Después, se incuban durante 2 a 3 días a 33 °C, posterior a ello se someten a refrigeración a 4 °C durante 12 hrs. previas a la extracción de los líquidos amniótico y alantoideo (12).

c) Cosecha de virus en huevo embrionado

Para la cosecha de virus es necesario contar con un gabinete biológico tipo dos. La técnica se realizó según el U.S. Department Health, Education, and Welfare Public Health Service (17). Se limpia la superficie del huevo con alcohol al 70%, después de esto se golpea suavemente el cascarón por encima del saco de aire para descubrir la membrana corioalantoidea, misma que se despliega, facilitando con esto la extracción del líquido alantoideo y posteriormente el amniótico con una pipeta pasteur o con jeringa usando una aguja de calibre 22. Se colocan en tubos previamente etiquetados y mantenidos en baño de hielo.

d) Hemaglutinación

La prueba de hemaglutinación se hizo conforme a la metodología usada por Couch (13,14), donde para realizar esta prueba, es necesario contar primeramente con los reactivos y materiales siguientes:

- a) Eritrocitos de pollo de menos de una semana al 0.5%.
- b) PBS con un pH de 7.2
- c) Solución de Alsever's con un pH de 6.1
- d) Placas de microtitulación en "U" (fondo redondo).
- e) Dilutores de 50 μ l.
- f) Goteros de 50 μ l.
- g) Líquidos de cavidad amniótica o alantoidea.

Desarrollo de la técnica :

- 1.- Agregando 50 μ l. de PBS a los pocillos de la placa de microtitulación partiendo del pozo número dos al pozo número doce de cada hilera.
- 2.- Se agrega 100 μ l. de las muestras problema en el primer pocillo que se dejó libre en el paso uno, trabajando por duplicado cada muestra (fig. 4).

- 3.- Con los dilutores de 50 μ l., se hacen diluciones partiendo del pozo número uno al número doce de cada hilera horizontal, quedando las diluciones 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 1:32 etc.
- 4.- Se agrega 50 μ l. de glóbulos rojos al 0.5% (G.R. al 0.5%) a todos los pozos con dilución.
- 5.- Mezclar, reposar durante 30 a 45 minutos a una temperatura de 25 °C; se tapa la placa de microtitulación evitando así la evaporación.*
- 6.- Después de la incubación, se observa el patrón de hemaglutinación.

Nota: Hay que hacer controles con solo PBS y G.R. al 0.5% en cada placa.

Los resultados se tomarán como positivos, cuando se observe una hemaglutinación, evidenciada por una turbidez rojiza en cada pozo de la placa de microtitulación. Los resultados se tomarán como negativos, cuando se observe un sedimentado de glóbulos rojos en el fondo del pocillo de la placa de microtitulación y que al momento de voltear la placa verticalmente ruede con un desplazamiento por la pared de los pocillos de la placa.

e) Inhibición de la hemaglutinación

Para realizar esta técnica, es necesario contar con los siguientes reactivos:

- a) Solución que contenga 4 unidades hemaglutinantes (UHA) de antígeno a probar.
- b) Placas de microtitulación con fondo en " V ". c) Dilutores de 50 μ l. y 25 μ l.
- d) Antisueros de los virus que circulan más reciente mente tratados con RDE. (enzima destructora de receptores inespecíficos)
- e) Glóbulos rojos al 0.5% (G. R. al 5%)
- f) PBS con pH 7.2

Teniendo todo lo requerido se inicia la técnica de IH.

- 1.- 25 μ l. de PBS de la misma manera como se hizo en la prueba de hemaglutinación, dejando el primer pozo libre (*fig. 5*).
- 2.- Al pozo número uno de cada una de las hileras, se le agrega 50 μ l. de antisueros específicos previamente tratados con RDE.
- 3.- Se hacen diluciones con los dilutores de 25 μ l. partiendo del pozo número uno.
- 4.- Añadir a todos los pocillos 25 μ l. del virus problema que contiene 4 UHA.
- 5.- Mezclar y dejar reposar a temperatura de 25 °C durante 30 minutos.

6.- Agregar 50 µl. de G.R. al 0.5% a todos los pocillos, mezclar y dejar reposar durante 30 minutos.

7.- Ver la inhibición de la hemaglutinación microscópicamente evidenciada por la presencia de un sedimentado de eritrocitos en el fondo de los pozos.

La presencia de un sedimento de glóbulos rojos en el fondo de los pocillos, se considera como inhibición de la hemaglutinación positivo.

La presencia de hemaglutinación evidenciado por una turbidez en los pocillos, indica que la inhibición de la hemaglutinación es negativa.

Después de efectuar este procedimiento se procede a la designación y caracterización viral, tomando como base los antisueros de referencia utilizados

(8). Los antisueros de referencia usados son:

A/BEIJING/353/89

B/VICTORIA/02/87

WASHINGTON/15/91

B/YAMAGATA/16/88

A/BEIJING/32/92

B/PANAMA/45/90

A/HONG KONG/23/92

B/QUINGAND/102/91

A/GEORGIAA/03/93

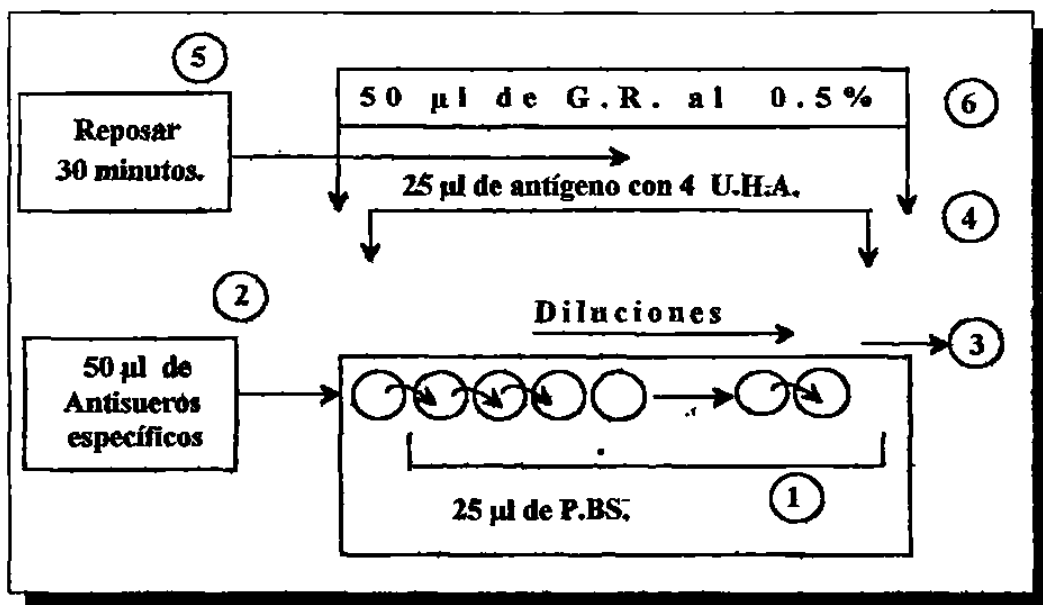


Fig. 5 Pasos a seguir en la prueba de inhibición de la hemaglutinación. Después del paso 4 y 6 se reposa 30 minutos antes de la lectura.

IV) RESULTADOS

Como se describió en la introducción; originalmente se planeó hacer este estudio con las instituciones previamente mencionadas. Por razones fuera de nuestro control, no fue posible contar con muestras de tres de las cuatro instituciones seleccionadas; por tal motivo los resultados presentados en este trabajo sólo se referirán a la Clínica #37 del IMSS.

a) Muestras analizadas en el período de 1991-1992

El muestreo se dividió en dos periodos, el primero inició el 11 de noviembre de 1991 al 31 de marzo de 1992, se recolectaron un total de 110 muestras; de las cuales 21 tuvieron actividad hemaglutinante y sólo 4 fueron tipificadas (Fig. 6).

b) Muestras analizadas en el período de 1992-1993

El segundo período se inició el 11 de noviembre de 1992 al 31 de marzo de 1993, donde se recolectaron un total de 72 muestras; resultando 9 con actividad hemaglutinante y tipificadas 2 de ellas. Haciendo una recopilación de los dos

MUESTRAS RECOLECTADAS EN BUSCA DEL VIRUS DE LA INFLUENZA
EN LA CLINICA #37 DEL SEGURO SOCIAL, EN EL PERIODO

1991-1992

MES	# DE MUESTRAS RECOLECTADAS	VIRUS CON ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE	VIRUS DE LA INFLUENZA TIPIFICADOS
NOVIEMBRE	75	18	4
DICIEMBRE	10	3	0
ENERO	18	0	0
FEBRERO	5	0	0
MARZO	2	0	0
	110	21	4

Fig. 6 En esta gráfica se presenta el número de muestras recolectadas durante cada mes comprendido en el periodo. Se incluyen los especímenes que resultaron con actividad hemaglutinante y los virus que finalmente se tipificaron.

periodos mencionados, se tiene que se recolectaron un total de 182 muestras, 30 con actividad hemaglutinante; de las cuales 6 fueron tipificadas (Fig. 7).

**c) Porcentaje por mes del total de muestras recolectadas
en los periodos de 1991-1992 y 1992-1993**

Es interesante que en ambos periodos hubo un incremento con respecto al número de muestras para el análisis en los meses de noviembre y diciembre disminuyendo respectivamente en enero, febrero y marzo (Fig. 8). Estos mismos resultados que se presentaron en forma general, se pueden ver más detalladamente separando cada uno de los periodos e incluyendo el porcentaje de muestreo en cada mes (Fig. 9).

**d) Tipificación de las cepas aisladas durante el periodo
1991-1992**

De los virus con actividad hemaglutinante en el primer periodo, se tipificaron un 19.04% (4 cepas de virus). dos de las cuatro se clasifican como cepas similares a virus tipo A/Beijing/353/89- H₃ N₂, las restantes se clasificaron como virus similares a A/Washington/15/91-H₃ N₂ (Tabla 1).

MUESTRAS RECOLECTADAS EN BUSCA DEL VIRUS DE LA INFLUENZA
EN LA CLINICA # 37 DEL SEGURO SOCIAL, EN EL PERIODO:

1992-1993

MES	# DE MUESTRAS RECOLECTADAS	VIRUS CON ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE	VIRUS DE LA INFLUENZA TIPIFICADOS
NOVIEMBRE	30	8	1
DICIEMBRE	28	0	0
ENERO	11	1	1
FEBRERO	3	0	0
MARZO	0	0	0
	72	9	2
TOTAL DE LOS PERIODOS 91-92, 92-93	182	30	6

Fig 7 Datos del segundo periodo, se incluye los especimenes recolectados cada mes, virus con actividad hemaglutinante y los virus típicados. Se añade además el total de los dos periodos estudiados.

PORCENTAJE POR MES DEL TOTAL DE MUESTRAS RECOLECTADAS
EN LOS PERIODOS DE 1991-1992 Y 1992-1993.

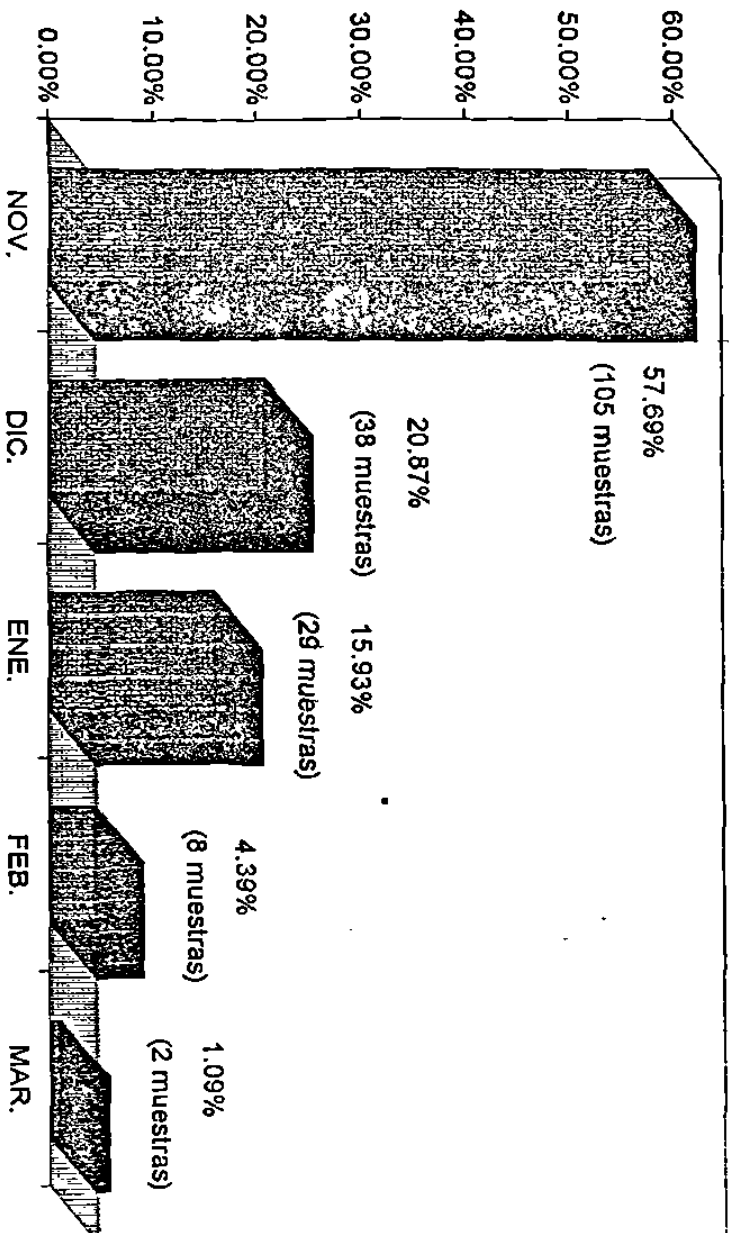


Fig. 8 Del total de muestras recolectadas en ambos periodos, en el mes de noviembre se tuvo un mayor número de especímenes recolectados (57.89%), disminuyendo en los meses de diciembre a marzo.

REPRESENTACIÓN GRÁFICA DEL NUMERO DE MUESTRAS RECOLECTADAS EN LOS PERIODOS EN NOVIEMBRE -MARZO DE LOS ANOS 1991-1992 Y 1992-1993

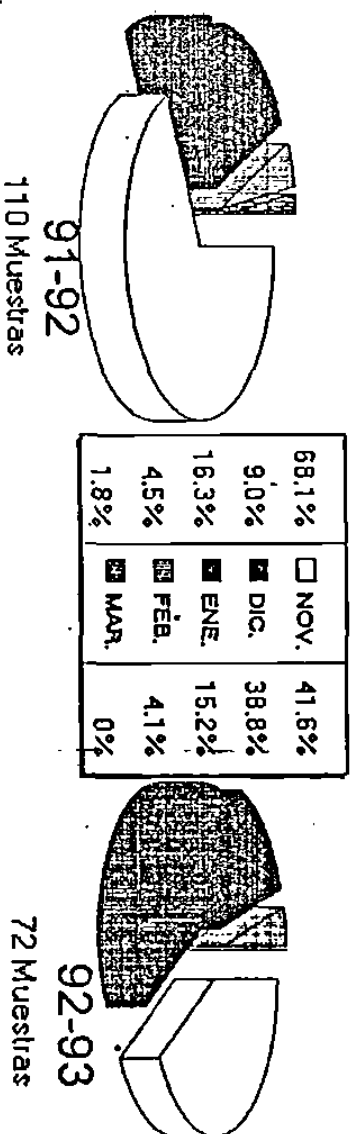


Fig.9 Gráfica mostrando el porcentaje de muestras recolectadas de cada mes de los periodos 1991-1992 y 1992-1993.

TABLA 1. TIPIFICACION DE LOS VIRUS RECOLECTADOS EN EL PERIODO 1991-1992 CON ANTISUEROS DE REFERENCIA (CEPAS H₃N₂) MEDIANTE LA PRUEBA DE INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION.

AG DE REFERENCIA	ANTISUEROS DE REFERENCIA				
	A/BEI/353	A/W/A/15	A/BEI/32	A/HK/23	A/GEA/03
A/BEI/353/89	<u>320</u>	320	40	10	10
A/W/A/15/91	40	<u>320</u>	20	10	10
A/BEI/32/92	40	40	<u>320</u>	80	80
A/HK/23/92	20	40	320	<u>640</u>	640
A/GEA/03/93	80	160	160	160	<u>80</u>

CEPAS PROBLEMA DE LA CIUDAD DE MONTERREY

CEPA 47	<u>160</u>	640	40	20	20
CEPA 53	<u>320</u>	640	40	10	10
CEPA 38	80	<u>640</u>	20	10	5
CEPA 70	80	<u>640</u>	40	10	10

Tipificación hecha mediante la prueba de inhibición de la hemaglutinación de los virus aislados en el periodo 1991-1992. De las 4 cepas aisladas la 47 y 53 pertenecen a los virus similares a A/Beijing/353/89-H₃N₂; correspondiendo a los virus similares a A/Washington/15/91-H₃N₂ las cepas 38 y 70.

e) Tipificación de las cepas aisladas durante el período

1992-1993

En este período se tipificó el 25% de los virus con actividad hemaglutinante (2 cepas tipificadas); siendo clasificada una como virus similar a A/Beijing/353/89- H₃ N₂ y la otra como B/Panamá/45/90 (Tabla 2). En la (tabla 3), se ofrece una recopilación de los datos obtenidos en ambos períodos.

f) Recopilación final de los datos obtenidos en el estudio

durante los períodos de 1991-1992 y 1992-1993

El resumen final del estudio, comprende el porcentaje de virus con actividad hemaglutinante, virus finalmente tipificados expresado en porcentaje del total de los virus con actividad hemaglutinante (Figura 10).

TABLA 2. TIFICACION DE LOS VIRUS RECOLECTADOS EN EL PERIODO 1992-1993 CON ANTISUEROS DE REFERENCIA MEDIANTE LA PRUEBA DE INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION.

Ag DE REFERENCIA	ANTISUEROS DE REFERENCIA				
	B/VIC/02	B/YAM/16	B/PN/45	B/QINQ/102	
B/VIC/02/87	1280	5	5	40	
B/YAM/16/88	80	1280	160	320	
B/PN/45/90	20	80	160	80	
B/QINQ/102/91	80	160	160	320	
* CEPA 85	80	160	80	160	
VIRUS A /H3N2					
	A/BEI/353	A/WA/15	A/BEI/32	A/HK/23	A/GA/03
A/BEI/353/89	320	320	40	10	10
A/WA/15/91	40	320	20	10	20
A/BEI/32/91	40	40	320	80	80
A/HK/23/92	20	40	320	640	640
A/GEA/03/93	80	160	160	160	80
* CEPA 100	320	1280	80	20	20

Tipificación por medio de la prueba de inhibición de la hemaglutinación de los virus aislados en el periodo 1992-1993. La cepa problema 100 corresponde a los virus similares a A/Beijing/353/89 - H3N2, la cepa problema 85 es similar a los virus B/Panamá/45/90.

* = Cepas problema.

TABLA 3. CEPAS DE VIRUS AISLADOS EN LA CLINICA # 37 DEL SEGURO SOCIAL EN LA CIUDAD DE MONTERREY, N.L. MEXICO DURANTE LOS PERIODOS 1991-1992 Y 1992-1993.

PERIODO	# CEPAS AISLADAS	CEPAS DE VIRUS
91-92	2	Virus similar a: A/WASHINGTON/15/91 - (H ₃ N ₂)
	2	Virus similar a: A/BEIJING/353/89 - (H ₃ N ₂)
92-93	1	Virus similar a: A/BEIJING/353/89 - (H ₃ N ₂)
	1	Virus similar a: B/PANAMA/45/90

Virus aislados en la clinica # 37 del IMSS. En el primer periodo se tipificaron 4 cepas del mismo tipo y subtipo; aunque la homología no es total. En el segundo periodo se tipificaron dos cepas correspondiendo una a virus tipo A y otra a virus tipo B.

PORCENTAJE DE VIRUS CON ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE Y VIRUS
 TÍPICADOS DURANTE LOS PERIODOS NOVIEMBRE-MARZO DE LOS
 AÑOS DE 1991-1992 Y 1992-1993.

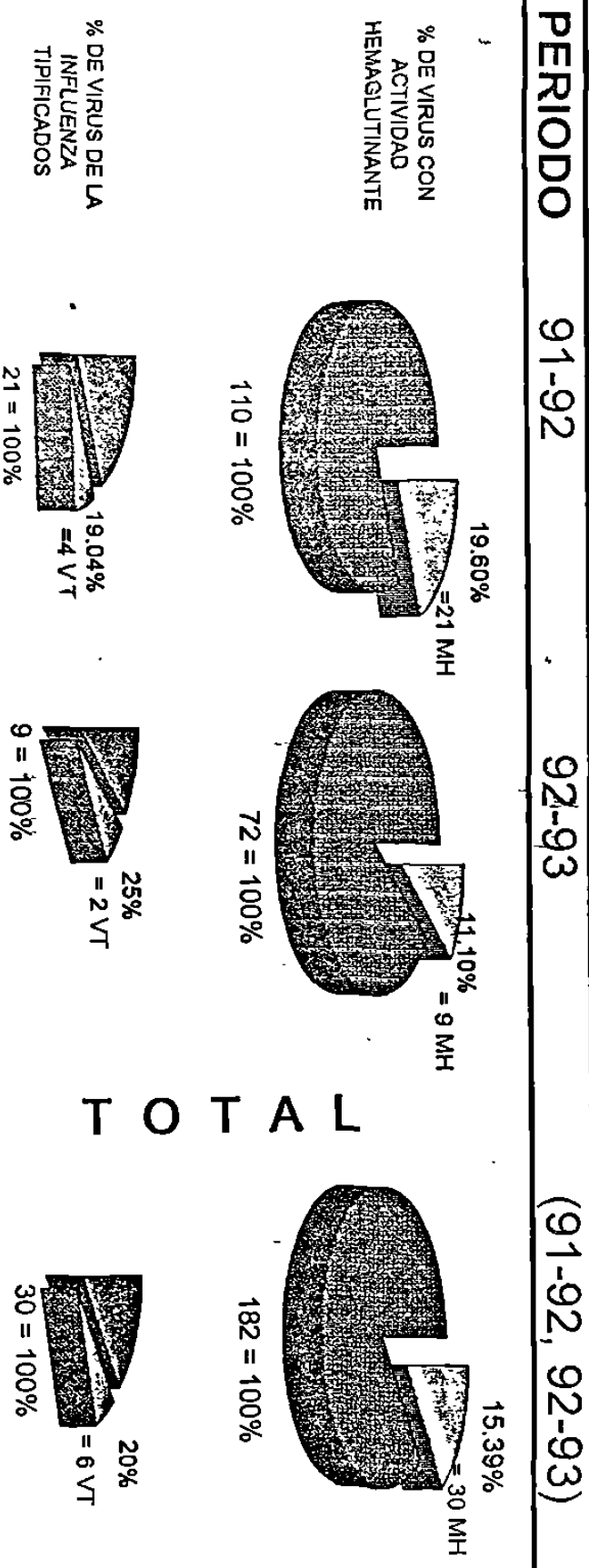


Fig. 10 Condensación de los parámetros estudiados en los periodos de 1991-1992 y 1992-1993.
 MH = Muestras con actividad hemaglutinante
 VT = Virus típicados.

**g) Reporte general del tipo de cepas tipificadas en Estados Unidos
en los períodos de 1991-1992 y 1992-1993**

Los datos reportados por Estados Unidos; son el resultado de 9 zonas epidemiológicas y 59 laboratorios, colaboradores con la Organización Mundial de la Salud; como se mencionará mas adelante en la discusión. Durante el primer período 91-92 en Estados Unidos, se recolectó aproximadamente 38,834 especímenes, de estos 15.4% resultaron con actividad hemaglutinante correspondiendo a un total de 5,964; de los cuales 5,914 (más del 99%) fueron tipificados como virus del tipo A, de estos el 82% (3,357 cepas) fueron del tipo de A/Beijing/353/89 - (H₃ N₂); el 18% (753 cepas) se tipificaron como A/ Taiwán/1/86 -(H₁ N₁); recuperando un porcentaje de 0.01% de virus tipo B (9,17,21). Se encontraron desviaciones antigénicas del tipo H₁ N₁; éstas son: virus similares a: A/Sichuán/4/88 -(H₁ N₁) y A/Texas/36/91 - (H₁ N₁) (Tabla 4).

En el segundo período 92-93 la mayoría de los aislamientos fueron del tipo B; encontrando algunas cepas del tipo A, no caracterizados definitivamente (16).

**h) Incidencia de enfermedad respiratoria aguda (I.E.R.A) en la
Clínica # 37 del IMSS durante los períodos de 1991-1992 y 1992-1993**

TABLA 4. CEPAS DE VIRUS AISLADOS EN LOS ESTADOS UNIDOS DURANTE LOS PERIODOS DE 1991-1992 Y 1992-1993.

PERIODO	CEPAS DE VIRUS
91-92	Virus similar a: A/BEIJING/353/89 - (H ₃ N ₂) Virus similar a: A/TAIWAN/1/86 - (H ₁ N ₁) Virus similar a: A/SICHUAN/4/88 - (H ₁ N ₁) Virus similar a: A/TEXAS/36/91 - (H ₁ N ₁)
92-93	Virus similar a: B/PANAMA/45/90 Virus A no caracterizado

Virus tipificados en el primero y segundo periodos, en el primer período se encontró virus del tipo A subtipos (H₃N₂) y (H₁N₁); en el segundo se tipificaron virus tipo B/Panamá/45/90 y A no caracterizado aún

Durante el transcurso de éste estudio, se recopilaron datos de las semanas epidemiológicas comprendidas en los períodos estudiados; los datos que se recopilaron están nominados bajo el apartado de (I.E.R.A.); dentro del cual se incluyen los diagnósticos de faringitis, faringoamigdalitis, laringitis, farigotraqueobronquitis, e influenza . La I.E.R.A. y su relación con las semanas epidemiológicas de los períodos estudiados, están representados en las gráficas de barras correspondientes; incluyendo en el primer período las semanas 13 y 14 carentes de datos en los archivos (Fig. 11,12.)

i) Incidencia de enfermedad respiratoria aguda en los diferentes grupos de población dividido por edades.

Los datos de I.E.R.A. en relación con las edades de los pacientes que acudieron a consulta en la Clínica # 37 del IMSS. Estos se dividieron; dividieron por su edad en diferentes grupos, incluyendo incluso a los de edad desconocida. Con estos datos, es factible comparar la I.E.R.A. en los diferentes grupos de edades (figura 13)

RELACIÓN DE CASOS DE ENFERMEDAD RESPIRATORIA AGUDA Y SEMANAS EPIDEMIOLOGICAS EN EL PERIODO DE 1991-1992

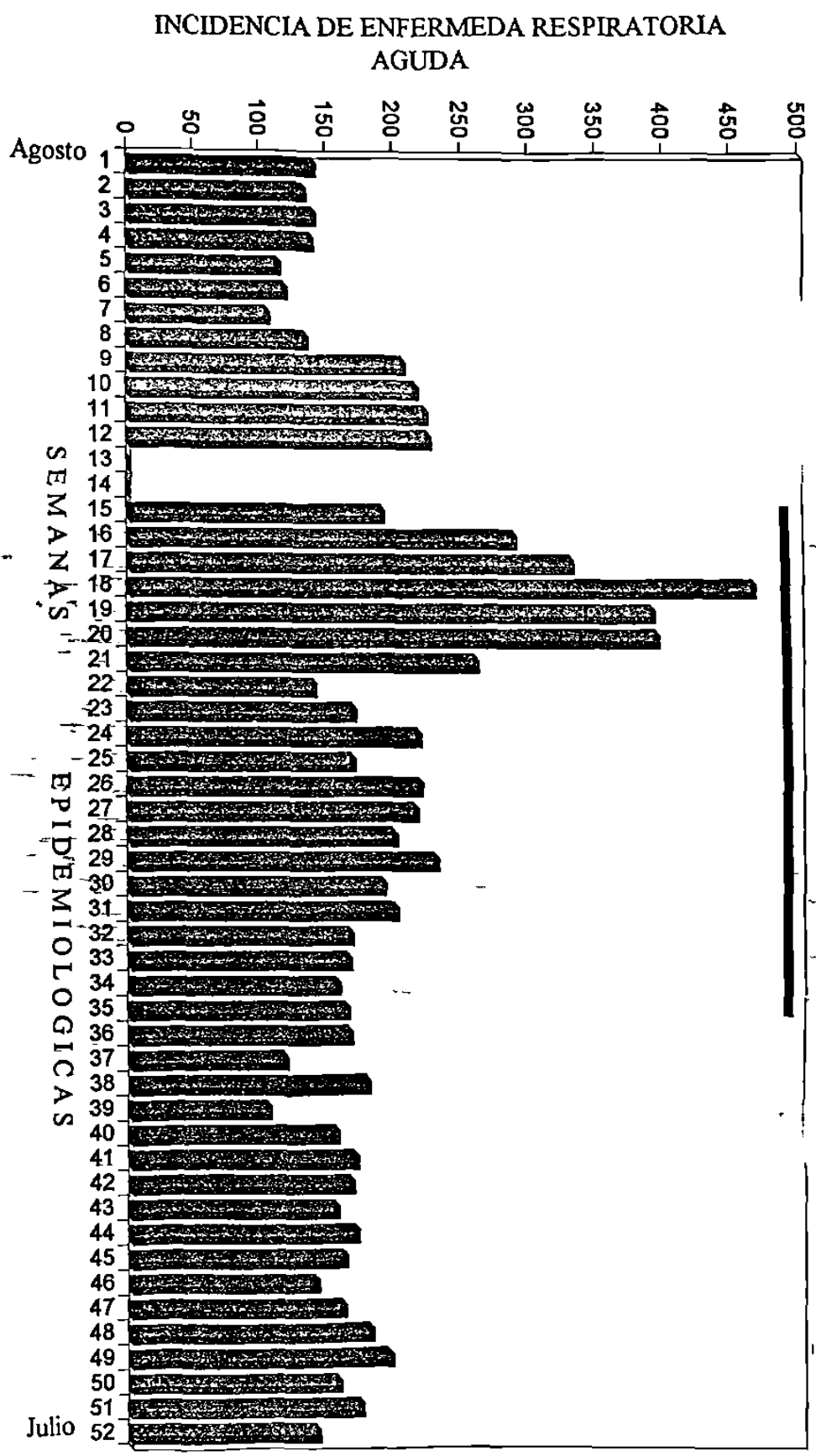


Fig. 11 Incidencia de enfermedad respiratoria aguda y su relación con las semanas epidemiológicas incluidas en los meses de agosto y julio. La línea en la parte superior de las barras indica el periodo estudiado.

RELACIÓN DE CASOS DE ENFERMEDAD RESPIRATORIA AGUDA Y SEMANAS EPIDEMIOLÓGICAS EN EL PERIODO DE 1992-1993

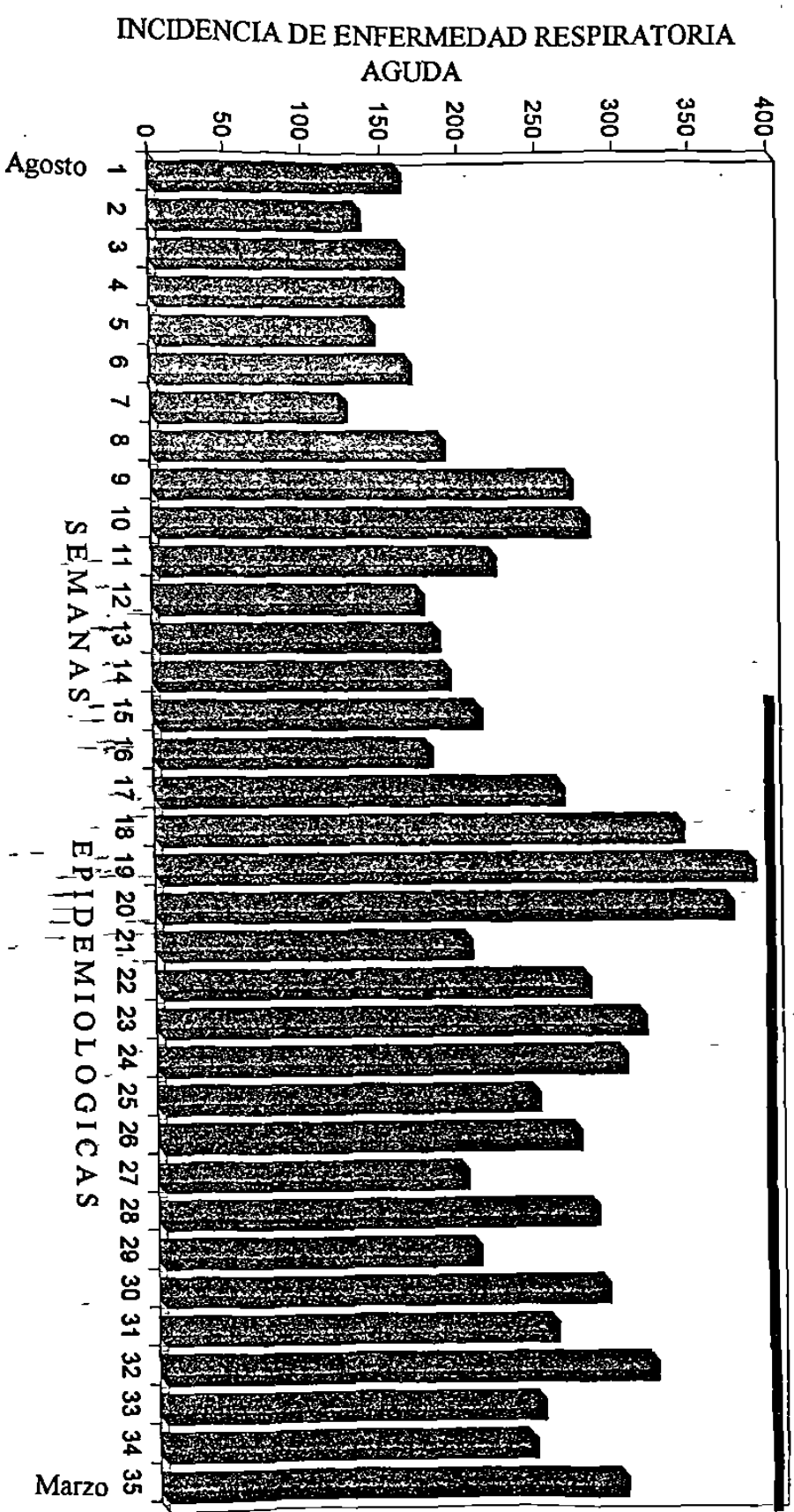


Fig. 12 Incidencia de enfermedad respiratoria aguda y su relación con las semanas epidemiológicas incluidas en los meses de agosto a marzo. La línea en la parte superior de las barras indica el periodo estudiado.

INCIDENCIA DE ENFERMEDAD RESPIRATORIA
AGUDA EN EL TRANSURSO DE LOS PERIODOS
1991-1992 Y 1992-1993

INCIDENCIA DE ENFERMEDAD RESPIRATORIA AGUDA RELACIONADA
CON LA EDAD.

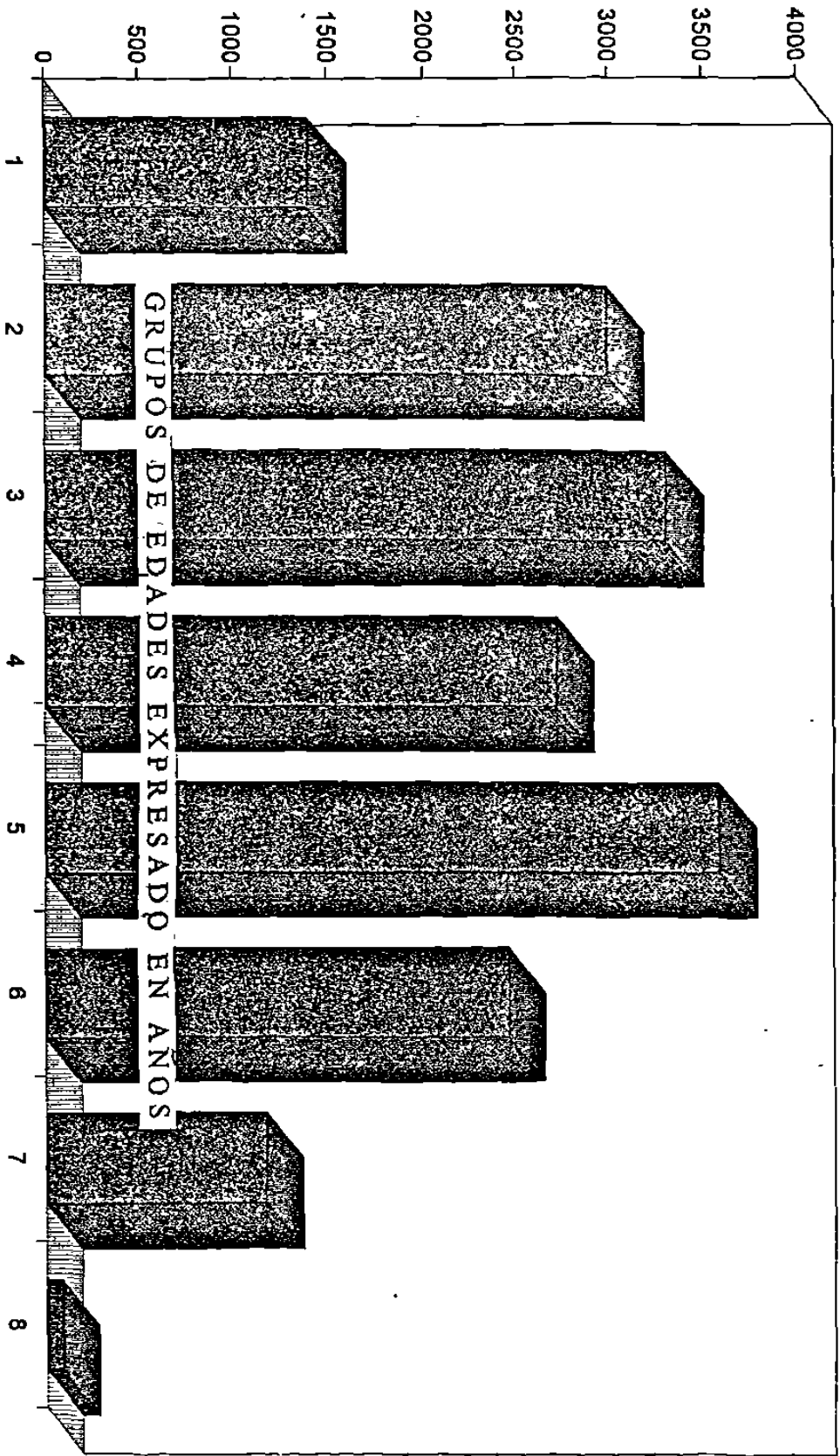


Fig.13 Incidencia de enfermedad respiratoria aguda con los diferentes grupos de edades.
 1= Menos de 1 año 2= 1-4 años 3= 5-14 años 4= 15-24 años 5= 25-44 años
 6= 45-64 años 7= 65 y más años 8= Edad ignorada.

V) DISCUSIÓN

Las muestras para este estudio se obtuvieron de la Clínica # 37 del Seguro Social en la Ciudad de Monterrey Nuevo León, México. Por motivos fuera de nuestro alcance, no fue posible contar con el apoyo de los diferentes sitios mencionados en la introducción; Sin embargo se obtuvieron datos que dan una idea del tipo de virus que en un momento dado se encuentran presentes en una determinada área geográfica. El reporte del tipo de virus obtenido en este lugar, cumplió con el objetivo: que es el de compararlo con los virus que se encuentran presentes en la población estadounidense durante el mismo período. Los virus que se aislaron en la Clínica # 37, son similares a los reportadas en Estados Unidos durante el período de (1991 a 1993). Es obvio que haya diferencia en cuanto al número de muestras y sitios de recolección en ambas casuística; así como en la diversidad de cepas de virus recuperadas en cada estudio. En México los datos reportados provienen de una sola fuente (Clínica # 37 del IMSS), en tanto que los datos reportados por Estados Unidos son el resultado de 59 laboratorios que colaboran con la Organización Mundial de la Salud distribuidos a lo largo del país. Datos similares a los reportados por estos laboratorios, se reportaron también en 9 zonas de vigilancia para la influenza adicionales (9).

En los datos presentados en las tablas 3 y 4 se muestran las cepas de virus aisladas en la Clínica # 37 del IMSS y en Estados Unidos (9,15,16,17). Es claro que las cepas aisladas en Monterrey (Clínica # 37), son similares a algunas reportadas por Estados Unidos, ya que son reportadas con el mismo nombre. Se puede ver también que aquí en Monterrey no se asiló la diversidad de subtipos de virus tipo "A" que se recuperó en Estados Unidos; ni las cepas tipo "B" que aunque escasas (0.01%) sí se reportan el período 1991-1992.

En Estados Unidos durante el primer período de estudio (1991-1992) se evidenciaron desviaciones antigénicas en el virus similar a: A/ Taiwán/1/86/- (H₁ N₁) (9). Según el Centro de Control de Enfermedades (CDC) las variantes de este virus son las cepas similares a A/Sichuán/4/88 -(H₁ N₁) y A/Texas/36/91 -(H₁ N₁) (9). Otro hecho es el aislamiento de la cepa A/Washington/15/91 - (H₃ N₂) aislada en la Clínica # 37 que no se reportó en Estados Unidos. Con estos resultados es factible pensar que tal vez si hubiera habido un mayor número de muestras recolectadas en la Clínica # 37, se podría haber recuperado probablemente alguna de las cepas H₁ N₁ recuperadas en Estados Unidos o quizá virus tipo B. En cuanto a la cepa Washington aislada en la Clínica # 37, no reportada en Estados Unidos; podría deberse a que realmente en ese país no estuvo presente en ese período, o que de alguna manera no se logró aislar estando presente.

En el segundo período 92-93 la situación fue algo parecida, con la diferencia que la mayoría de las cepas virales aisladas en Estados Unidos fueron virus del tipo B (B/Panamá/45/90) y algunos virus tipo A que no fueron caracterizados; éstos, comparados con las datos obtenidos en la Clínica # 37 no difieren mucho, ya que también se aislaron virus tipo B (similares a B/ Panamá/ 45-90) encontrando nuevamente virus similares a A/Beijing/353/89 -(H₃ N₂) donde aunque no se obtuvieron virus A no tipificados como en el caso de Estados Unidos, podemos inferir que los virus aislados en la Clínica # 37 son antigénicamente similares a los virus del mismo tipo aislados en los Estados Unidos. El hallazgo de virus con alguna diferencia antigénica en el subtipo, puede deberse al surgimiento de mutaciones independientes y múltiples o bien en un gran número de variantes que se hallan en circulación constante, llevados de un lugar a otro por el tráfico humano y quizá también de animales.

Por lo discutido anteriormente, proponemos que aunque no es el universo óptimo; un número pequeño de muestras puede dar información relevante sobre las variantes antigénicas que circulan en la comunidad, siendo importante aumentar el número de sitios y comunidades (urbanas y rurales) donde se realice el muestreo. Es interesante el hecho de la aparición de enfermedad respiratoria aguda en los meses de noviembre- diciembre en ambos períodos. Correspondiendo también al mayor número de muestras recolectadas en este estudio. En cuanto a la

I.E.R.A; se observo una mayor incidencia en los grupos de edades de 5-14 y 25-44 años de edad.

Los virus identificados en Monterrey, son similares a los que se encuentran en el periodo (1991 - 1993) en la ciudad de Monterrey.

La diversidad de subtipos de virus en Monterrey, es similar a la que se encuentra en la ciudad de Monterrey.

La diversidad de subtipos de virus en Monterrey, es similar a la que se encuentra en la ciudad de Monterrey.

La diversidad de subtipos de virus en Monterrey, es similar a la que se encuentra en la ciudad de Monterrey.

La diversidad de subtipos de virus en Monterrey, es similar a la que se encuentra en la ciudad de Monterrey.

La diversidad de subtipos de virus en Monterrey, es similar a la que se encuentra en la ciudad de Monterrey.

La diversidad de subtipos de virus en Monterrey, es similar a la que se encuentra en la ciudad de Monterrey.

La diversidad de subtipos de virus en Monterrey, es similar a la que se encuentra en la ciudad de Monterrey.

La diversidad de subtipos de virus en Monterrey, es similar a la que se encuentra en la ciudad de Monterrey.

La diversidad de subtipos de virus en Monterrey, es similar a la que se encuentra en la ciudad de Monterrey.

La diversidad de subtipos de virus en Monterrey, es similar a la que se encuentra en la ciudad de Monterrey.

La diversidad de subtipos de virus en Monterrey, es similar a la que se encuentra en la ciudad de Monterrey.

La diversidad de subtipos de virus en Monterrey, es similar a la que se encuentra en la ciudad de Monterrey.

La diversidad de subtipos de virus en Monterrey, es similar a la que se encuentra en la ciudad de Monterrey.

La diversidad de subtipos de virus en Monterrey, es similar a la que se encuentra en la ciudad de Monterrey.

VI) CONCLUSIONES:

Los virus aislados en la Clínica # 37 del Seguro Social en la Ciudad de Monterrey, son similares a los aislados en los Estados Unidos durante el mismo período (1991 - 1993), teniendo en cuenta que en Estados Unidos se aislaron más diversidad de subtipos virales del tipo A y virus tipo B por la mayor cantidad de especímenes procesados supuestos.

Es factible aislar un determinado tipo de virus en una determinada zona geográfica; cuando en otras regiones se aíslan virus con leves diferencias antigénicas.

El número de sitios para la obtención de muestras y la cantidad de muestras recolectadas, no siempre están en proporción directa a la diversidad de los tipos de virus encontrados.

El muestreo llevado a cabo, aunque pequeño: 128 muestras obtenidas en la Clínica # 37 del Seguro Social; rindió resultados que permiten, aunque de una manera relativa, compararlos con los datos obtenidos en el muestreo llevado a cabo en Estados Unidos en 121 Ciudades de las 9 zonas geográficas, donde se

obtuvieron aproximadamente 77,668 muestras en el período estudiado (1991 a 1993).

VII)REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.- A program for controlling acute respiratory infections in children:
 memorandum from a WHO Meeting. Bulletin World Health Organization
 62 (1): 47-58, 1984.
- 2.- Baum S.G. M.D. A serious epidemic disease that can be prevented. Mount
 Sinai Jour 57 (4): 225-35 1990.
- 3.- Briantseva, E.A; Bichurina, M.A; Fridman, E.A; Tumova, B. The antigenic
 characteristic of influenza A viral strains circulating synchronously in 2
 separated areas (the CzSFR--Saint Petersburg) Vopr Virusol 36 (6): 467-9
 1991.
- 4.- Couch R. B; Baxter B. Virologic and serologic methods for respiratory virus
 surveillance. Baylor College of Medicine. Houston Texas. July of 1985.
- 5.- Deshmukh D.R. Animal Models of Reye's Syndrome. J. Infec. Dis. 7 (1):
 31-40, 1985. 6.- Donatelli, I; Campitelli, L; Ruggieri, A;
 Castrucci, M.R; Calzoletti, L; Oxford, J.S. Concurrent antigenic analysis of
 recent epidemic influenza A and B viruses and quantitation of antibodies in
 population serosurveys in Italy. Eur J Epidemiol 9 (3): 241-50, 1993.
- 7.- Donatelli, I; Takhonova, A.M; Klimov, A.I; Ghendon, Y.Z; Oxford, J.S.
 Genome and antigenic analysis of influenza A (H3N2) viruses isolated from
 an epidemic in a closed community of Carmelite nuns. J Med Virol 31 (2):
 112-9, 1990.

- 8.- Fields B.N; Knipe D.M. Virology. 2ed. edition Editorial Revens Press.
New. York 1990.
- 9.- Glezen, W.P; M.D. and Couch, R.B; M.D. et al.
Intrapanidemic influenza in the Houston area. N Engl J Med 298: 587-592,
1978. 10.- Heilman, C; John, R; La Montagne, J.R. Influenza: Status and
prospects for its prevention, therapy, and Control. Pediatric Clinics of
North America 37 (3): 669- 88, 1990.
- 11.- Jawetz, Melnick y Adelberg. Microbiología Médica, 14a. edición. Editorial
El Manual Medico S. A. de C.V. México D.F. 1992. 12.- Kumate, R.J;
Sepulveda, A.J; Wolpert, B.E; Juan, L.
M; Fonseca, A.G; Tapia, C.R. Manual para la vigilancia epidemiológica de
la influenza 1991- 1992. Secretaria de Salud. 1990.
- 13.- Lennete, E. H. Manual of Clinical Microbiology. 3ra dition. American
Society for microbiology. Washington D.C. 1980.
- 14.- Meyer, W.J; Wood, J.M; Major, D; Robertson, J.S;
Webster, R.G; Katz, J.M. Influenza of host cell mediate variation
on the international surveillance of influenza A (H3N2) viruses. Virology
196 (1): 130-7, 1993.
- 15.- Morbidity and Mortality Weekly Report, Center od Diseases Control. 40
(49): 841-844, 1991.
- 16.- MMWR 40 (14): 231-40, 1991.

- 17.- MMWR 41 (16): 315-19, 1992.
- 18.- MMWR 41 (9): 153-55, 1992.
- 19.- MMWR 41 (50): 939- 45, 1992.
- 20.- MMWR 42 (4): 63-65, 1992.
- 21.- MMWR 41 (SS-5): 35-43, 1992.
- 22.- Reizin, F.N; Chumakov, M.P; Martianova, L.I.
Heterogeneity of influenza B virus strains isolated in a local area of the disease during an influenza outbreak. *Acta Virol (Praha)* 34 (2): 178-83, 1990.
- 23.- Seidel, W; Kunkel, F; Geisler, B; Garten, H; Herrmann, B; Dohner, L; Klenk, H.D. Intraepidemic variants of influenza virus H3 hemagglutinin differing in the number of carbohydrate side chains. *Arch Virol* 120 (3-4): 89-96, 1991.
- 24.- Small, P.A; Gripe Jr. Patogenia y defensas del huésped. *Hospital Practice (ed. esp.)* 6 (4): 49-57, 1991.
- 25.- Stuart-Harris Ch. H. The influenza Viruses and the human respiratory tract. *J Infec Dis* 1 (4): 592-99, 1979.
- 26.- Sweet, C. and Smith, H. Pathogenicity of influenza virus. *Microbiol Rev* 44: 303-30, 1980.
- 27.- U.S. Department Health, Education, and Welfare Public Health Service.
Advanced laboratory techniques for influenza diagnosis. January 1975.

28.- Velazco, C.J; Couch, R.B.. Observaciones seroepidemiológicas sobre la infección por virus de la influenza en el Estado de Nuevo, León. Rev Lat amer Microbiol 24: 255-260, 1982.

VIII. APÉNDICE A. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

a) Materiales biológicos

Se trabajó con especímenes obtenidos mediante hisopados nasales y/o faríngeos; además se utilizaron huevos embrionados de diez días y algunos otros mencionados a continuación;

b) Preparación de 4 UHA en 25 μ l.

El establecer las 4 UHA para cada espécimen es de importancia, ya que no todas las muestras procesadas tienen la misma concentración de virus.

Primeramente se hace una prueba de hemaglutinación para cada muestra a estudiar; el último pozo de hemaglutinación equivale a 1 UHA (Dilución máxima del espécimen que permite evidenciar la hemaglutinación macroscópica en el pocillo de la placa de microtitulación). Inmediatamente la dilución que le antecede a la final tendrán 2 UHA y el que sigue en orden descendente tendrán 4 UHA y así sucesivamente hacia atrás se encontrarán 8, 16 etc. UHA.

En este caso se requieren 4 UHA en 25 μ l; luego entonces se hacen los siguientes pasos para cada espécimen para establecer las UHA requeridas.

- 1.- Se hace una prueba de hemaglutinación normal al espécimen a estudiar, se toma la última dilución que da actividad hemaglutinante.
- 2.- Se verifica haciendo otro procedimiento para hemaglutinación.
- 3.- Se buscan las 4 UHA partiendo de 1 UHA vease la siguiente figura.

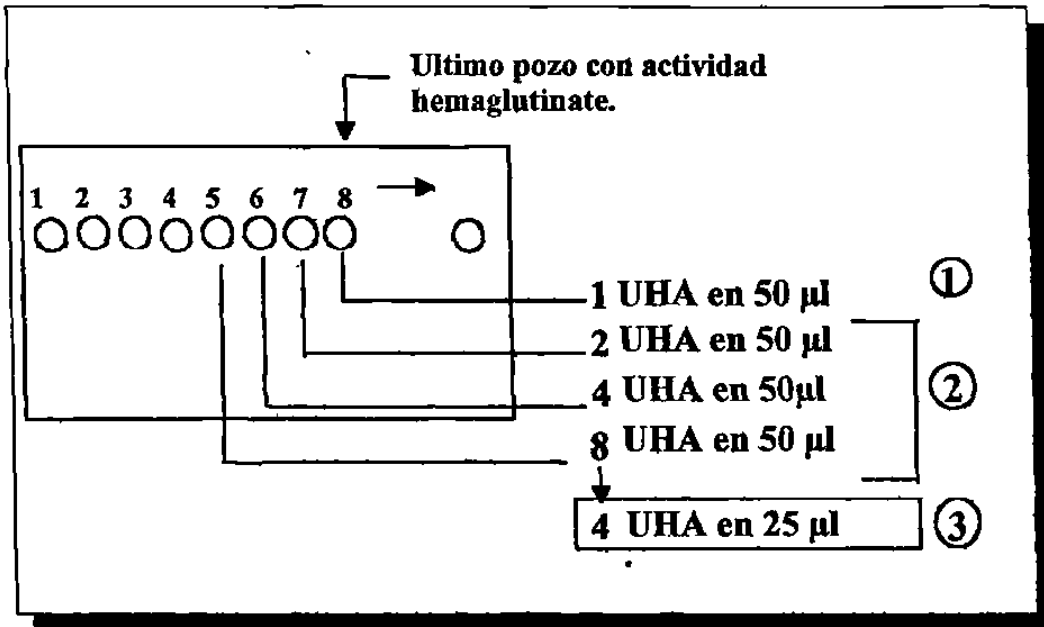


Fig. 6 Obtención de 4 UHA en 25 µl. El último pozo con actividad hemaglutinante tendrá 1 UHA. (cantidad mínima de virus en la dilución necesaria para evidenciar hemaglutinación); partiendo de este punto hacia atrás se encontrará a 2,4,8 UHA respectivamente. 8 UHA en 50 µl equilibran a 4 UHA en 25 µl.

En este ejemplo se puede ver que una dilución de 1:16 da 8 UHA en 50 µl;
o bien 4 UHA en 25 µl.

Una vez establecidas las 4 UHA se verifica su existencia. Tomando en cuenta el ejemplo de la figura 6, se ve que las 4 UHA están dadas por la dilución 1:16; con este dato, se procede a realizar una hemaglutinación normal con la dilución 1:16, donde se deberá encontrar hemaglutinación sólo en los primeros 4 pocillos.

c) Preparación de RDE (Enzima destructora de receptores inespecíficos)

Primeramente se prepara solución salina de calcio con un pH 7.2, para esto se añade 0.9 g. de cloruro de sodio 0.1 g. de cloruro de calcio, 0.12 g de ácido bórico , 0.005 g. de bórax, aforando a 100 ml. con agua destilada; luego se prepara una solución de citrato de sodio al 1.5%; teniendo los reactivos, se hace una solución 1:20 de enzima RDE con solución salina de calcio. En un tubo se añade 100 µl. de antisueros específico para cualquier tipo de virus, añadiendo 400 µl. de la dilución de 1:20 preparada. Se incuba durante 16-18 hrs. a 37 °C, posterior a este tratamiento se agrega 500 µl. de citrato de sodio al 1.5%, incubándose a 56 °C por 30 min. Con este tratamiento los antisueros quedarán listos para usar en el mismo día.

d) PBS con pH de 7.2

Pesar 1.096 g. de fosfato disódico ($\text{Na}_2 \text{HPO}_4$) más 0.315 g. de fosfato monosódico ($\text{NaH}_2 \text{PO}_4 \cdot \text{H}_2 \text{O}$) más 8.5 g. de Cloruro de sodio (Na Cl). Aforar a un litro con agua bidestilada. Esterilizar a 115 lbs. de presión durante 15 minutos y guardar en refrigeración hasta su uso.

e) Alsever's pH 6.1

Pesar 20.50 g. de glucosa (dextrosa), más 8.00 g. de citrato de sodio dihidratado ($\text{Na}_3 \text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$), más 0.55 g. de ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$), más 4.20 g. de Cloruro de sodio (Na Cl). Aforar a un litro con agua bidestilada y esterilizar a 115 lbs. de presión por 15 minutos o con filtro de membrana.

f) Solución salina de calcio con pH de 7.2

Pesar 0.9 g. de cloruro de sodio (Na Cl), más 0.1 g. de cloruro de calcio (CaCl_2), más 0.12 g. de ácido bórico, más 0.005 g. de Bórax. Aforar a 100 ml con agua bidestilada. Esterilizar y guardar en refrigeración hasta su uso.

g) Solución de citrato de sodio al 1.5%

Pesar 1.5 g. de Citrato de sodio, vertirlo en un matraz aforado de 100 ml. y aforarlo con agua bidestilada.

h) Solución de glóbulos rojos al 0.5%

Se obtienen 2.0 ml. de sangre de un pollo con una jeringa que contiene 3.0 ml de solución de Alsever's, centrifuga por 15 minutos a 1,500 r/m por 4 veces. Se preparar la suspensión al 0.5% con el paquete globular. Guardar en refrigeración por un período no más de tres días.

i) Medio de transporte

Se prepara caldo de soya tripticasa con 0.2% de gelatina nutritiva, se gelatina nutritiva, se distribuye en alícuotas de 1.8 ml. en viales de 5 ml. con tapón de rosca.

j) Solución de penicilina y estreptomicina

A 250 ml. de agua bidestilada se añade un gramo de sulfato de estreptomicina, dando una concentración de estreptomicina de 4000 $\mu\text{g/ml}$. A 100 ml. de ésta solución se añade 1 vial de penicilina G de 800,000 U/ml, dando una concentración de penicilina de 8000 U/ml. Se hace una dilución 1:10 con PBS, dando una concentración de 400 $\mu\text{g/ml}$ y 800 U/ml. de los antibióticos correspondientes; se guarda a 20 °C en alícuotas de 5.0 ml., manteniendo en refrigeración sólo el vial que se está usando en ese momento. Se añade 0.2 ml de esta solución a cada espécimen contenido en el medio de transporte; quedando diluido 1:10 con el medio y dando una concentración final de 40 $\mu\text{g/ml}$ y 80 U/ml de los antibióticos respectivamente.

Fig . 2 Mortalidad registrada en los juzgados 1ro , 2do y 3ro del Estado Civil del 1ro de octubre al 15 de noviembre del presente año. Las líneas interrumpidas muestra las muertes causada por la epidemia reinante y la línea continua indica la mortalidad total.



BIBLIOTECA

