



**ESTUDIO DE LA SEROEPIDEMIOLOGIA  
DEL VIRUS INFLUENZA TIPO C**

**TESIS**

**QUE EN OPCION AL GRADO DE**

**DOCTOR EN CIENCIAS  
CON ESPECIALIDAD EN  
MICROBIOLOGÍA MEDICA**

**PRESENTA**

**MCP GERARDO VELAZCO CASTAÑÓN**

**MONTERREY, N. L. JULIO 1992**

D.C. GERARDO VELAZCO CASTAÑON VII - 92

TD  
RC150  
.V4  
1992  
c.1



1080125980



**ESTUDIO DE LA SEROEPIDEMIOLOGIA  
DEL VIRUS INFLUENZA TIPO C**

**TESIS**

**QUE EN OPCION AL GRADO DE**

**DOCTOR EN CIENCIAS  
CON ESPECIALIDAD EN  
MICROBIOLOGIA MEDICA**

**PRESENTA**

**MCP JOSE GERARDO VELAZCO CASTANON**

**MONTERREY, N.L. JULIO 1992**





ESTUDIO DE LA SEROEPIDEMIOLOGIA  
DEL VIRUS INFLUENZA TIPO C

POR

MCP JOSE GERARDO VELAZCO CASTAÑON

APROBADA:

DR. MANUEL A. RODRIGUEZ

  
DR. ROBERT B. COUCH

DRA. HERMINIA MARTINEZ RODRIGUEZ

DRA. MARIA DEL SOCORRO FLORES DE C.

  
DRA. ALMA YOLANDA ARCE M.

**ESTUDIO DE LA SEROEPIDEMIOLOGIA  
DEL VIRUS INFLUENZA TIPO C**

**POR**

**MCP JOSE GERARDO VELAZCO CASTAÑON**

**El presente trabajo se llevó a cabo en el  
Centro de Investigación de Influenza  
Departamento de Microbiología  
Baylor College of Medicine  
Houston, Texas**

**Bajo la asesoría del Dr. ROBERT B. COUCH  
Coasesores: DR. MANUEL A. RODRIGUEZ  
DRA. HERMINIA MARTINEZ RODRIGUEZ**

# **AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA**

## **A DIOS**

**A María del Roble      María Auxilio  
Carlos Perlita y Susy  
Porque son la esencia de mi vida**

**Al Dr. Manuel A. Rodríguez**

**A mis compañeros del Departamento de Microbiología  
De la Facultad de Medicina  
Y de la Universidad Autónoma  
De Nuevo Leon**

**Con particular afecto a todos mis alumnos  
Por compartir conmigo la labor de universalidad**

**With special gratitude to Dr. Robert B. Couch  
And my colleagues at  
THE INFLUENZA RESEARCH  
CENTER**

**For sharing with me the endeavour of universality  
with friendship they have made  
The City of Houston, my Home**



## INDICE

### INTRODUCCION

	PAG
<b>HISTORIA</b>	
Reconocimiento del Virus . . . . .	1
Características Inicialmente Determinadas . . . . .	2
Clasificación . . . . .	3
<b>CARACTERÍSTICAS DEL VIRUS</b>	
Tamaño y Forma de las Partículas Virales . . . . .	4
Acido Nucleico del Virus . . . . .	4
Proteínas Virales . . . . .	5
Actividad Hemaglutinante . . . . .	9
Actividades Enzimáticas . . . . .	11
Variación en el virus . . . . .	13
<b>Infección de Animales de Experimentación y Cultivos</b>	
Celulares . . . . .	15
Ciclo de Replicación . . . . .	17
<b>ENFERMEDAD HUMANA</b>	
Inoculación Experimental de Voluntarios Adultos . . . . .	18
Enfermedad Adquirida en Forma Natural . . . . .	19
<b>EPIDEMIOLOGÍA</b>	
Edad . . . . .	21
Niños . . . . .	21
Adultos . . . . .	22
Hospederos Animales . . . . .	23
Hipótesis y objetivos . . . . .	26
 <b><u>MATERIAL Y METODOS</u></b>	
Cultivo de virus para referencia . . . . .	27
Purificación del virus . . . . .	27
Inmunización de animales . . . . .	27
Programa de vigilancia . . . . .	28
Estudio de familias . . . . .	29
<b>CULTIVO DE VIRUS</b>	
Obtención de especímenes . . . . .	29
Cultivo de virus a partir de especímenes	

Líneas celulares . . . . .	30
Huevo embrionado . . . . .	31
Búsqueda retrospectiva del virus influenza C por cultivo	
Estudio de familias . . . . .	32
Programa de vigilancia de influenza . . . . .	32
<b>EVIDENCIA SEROLOGICA DE INFECCION POR EL VIRUS INFLUENZA C</b>	
ELISA . . . . .	32
Tratamiento de los sueros para inhibidores inespecíficos .	33
Reacción de inhibición de la hemaglutinación . . . . .	34
Microneutralización . . . . .	34
<b><u>RESULTADOS</u></b>	
Estandarización del cultivo de Virus . . . . .	36
Búsqueda del Virus por Cultivo	
Estudio prospectivo . . . . .	37
Estudio retrospectivo . . . . .	41
Elisa para Detección de Antígeno . . . . .	41
Detección del virus por actividad de esterasa . . . . .	41
Estandarización de las Técnicas Serológicas . . . . .	44
Inhibición de la Hemaglutinación . . . . .	44
ELISA . . . . .	47
Microneutralización . . . . .	50
Comparación de las Técnicas Serológicas . . . . .	53
Seroepidemiología . . . . .	56
Enfermedad Clínica . . . . .	69
<b><u>DISCUSION</u></b>	
Aislamiento de Virus . . . . .	71
Identificación del Virus	
Ensayo Inmunoenzimático . . . . .	73
Esterasa . . . . .	73
Encuesta Serológica . . . . .	75
<b><u>CONCLUSIONES</u></b> . . . . .	86
<b><u>BIBLIOGRAFIA</u></b> . . . . .	87

## INDICE DE FIGURAS

	PAG
1.- Estructura del Virus influenza tipo C . . . . .	5
2.- Viabilidad del virus tipo C a 4° C . . . . .	38
3.- Titulación del virus tipo C en células MDCK . . . . .	39
4.- Distribución de los especímenes tomados en el período 1988 - 1990 . . . . .	40
5.- ELISA para detectar virus tipo C . . . . .	42
6.- Ensayo de esterasa para detectar virus tipo C . . . . .	43
7.- Ensayo de esterasa, comparación de los virus A, B, y C .	45
8.- Estandarización del antígeno (ELISA) . . . . .	48
9.- Estandarización de tiempos (ELISA) . . . . .	49
10.- Adsorción de IgG con proteína A de <i>S. aureus</i> . . . . .	51
11.- Incidencia anual de la influenza tipo C en niños. . . .	60
12.- Frecuencia de infección por edades, influenza tipo C . .	63
13.- Frecuencia acumulada de primoinfecciones en niños . . .	65
14.- Persistencia de anticuerpos maternos durante el primer año de vida . . . . .	66
15.- Persistencia de anticuerpos después de la primera infección . . . . .	67
16.- Relación entre infección y enfermedad . . . . .	70

**ABREVIATURAS**

ACF . . . . .	Adyuvante Completo de Freund
Col. (s) . . . . .	Colaborador (es)
DBA . . . . .	Lectina de <u>Dolichos biflorus</u>
DDN . . . . .	Acido 2, 3-Dehidro-2-deoxi Neuramínico
DFP . . . . .	Di-isopropil Fluorofosfato
DICT <sub>50</sub> . . . . .	Dosis Infecciosa de Cultivo de Tejidos 50%
DIH <sub>50</sub> . . . . .	Dosis Infecciosa de Huevo 50%
DO . . . . .	Densidad óptica
DSS . . . . .	Dodecil-Sulfato de Sodio
EDR . . . . .	Enzima Destructora de Receptores
EGPA . . . . .	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida
ELISA . . . . .	Ensayo Inmuno-absorbente Ligado a Enzima
ERA . . . . .	Enfermedad respiratoria aguda
FC . . . . .	Reacción de Fijación de Complemento
h . . . . .	horas
HA . . . . .	Hemaglutinina
Had . . . . .	Hemadsorción
HE . . . . .	Hemaglutinina-Esterasa
HEF . . . . .	Hemaglutinina-Esterasa-Fusión
HMV-II . . . . .	Línea celular de melanoma humano
IH . . . . .	Reacción de Inhibición de la Hemaglutinación
IISR . . . . .	Inhibidor Inespecífico de Suero de Rata
Kd . . . . .	kilo daltons
LLC - MK <sub>2</sub> . . . . .	Línea Celular de Riñón de Mono Rhesus
MDCK . . . . .	Línea Celular Canina "Madin-Darby"
MDBK . . . . .	Línea Celular Bovina "Madin-Darby"
ml . . . . .	mililitro
mm . . . . .	milímetro
MSB . . . . .	Mucina Submandibular Bovina
NA . . . . .	Neuraminidasa
Neu 5 Ac . . . . .	Acido N-acetil Neuramínico
Neu 5, 9, Ac <sub>2</sub> . . . . .	Acido 9-O-Acetil, N-acetil Neuramínico
Neu Gc . . . . .	Acido N-Glicolil Neuramínico

Nt . . . . .	Reacción de Neutralización
ODN . . . . .	Oligo deoxi-nucleótidos
PBS . . . . .	Solución Salina con Amortiguador de Fosfatos
RCAII . . . . .	Lectina de <u>Ricinus comunis</u>
RIP . . . . .	Radio Inmuno Precipitación
rpm . . . . .	Revoluciones por minuto
SBA . . . . .	Lectina de <u>Glycine max</u> (Frijol de Soya)
SBF . . . . .	Suero Bovino Fetal
VAII . . . . .	Lectina de <u>Vicia album</u>
VSV . . . . .	Virus de la Estomatitis Vesicular
WFA . . . . .	Lectina de <u>Wistaria floribunda</u>
WGA . . . . .	Lectina de <u>Triticum vulgare</u>

## RESUMEN

El virus influenza tipo C no pudo ser aislado a partir de especímenes tomados de personas con síntomas de enfermedad respiratoria aguda en el período de 1987 a 1989. El virus permanece viable por lo menos 5 días en caldo de infusión de ternera usado para el transporte de especímenes. El ensayo de la esterasa (proteína HEF) usando p-nitro fenil acetato es útil en la diferenciación entre el virus tipo C y los tipos A y B.

Se implementaron técnicas serológicas de Microneutralización IH, y ELISA para el estudio de esta infección mediante serología, se uso la técnica de microneutralización para estudiar 311 niños incluidos en el estudio prospectivo de familias en la ciudad de Houston, Texas. Se tomaron muestras de suero de cada niño por lo menos dos veces al año, el rango de participación fue de 1 a 14 años (media: 6.45, mediana: 6) para un total de 2006 años-niño. Se registraron 159 casos de seroconversión (infección primaria) y 82 casos en que hubo incremento en el título existente de anticuerpos (reinfección).

Los datos se desglosaron por períodos correspondientes al año epidemiológico del 1º de Julio al 30 de Junio del año siguiente, desde 1975/76 hasta 1988/89. Hubo casos tanto de primoinfección como de reinfección en cada uno de los períodos estudiados. El rango de casos por año es de 2 a 32 primoinfecciones y de 1 a 9 reinfecciones.

La primera infección por virus influenza C ocurre en edad temprana, en la distribución por edades se observó mayor cantidad de casos en los niños de 1 a 4 años, aumentando el número de seropositivos conforme aumenta la edad.

La infección se presentó en todas las estaciones del año, pero hubo mayor predominancia en el otoño.

Se midió la desaparición de los anticuerpos adquiridos por vía transplacentaria, 50% de los niños estudiados se volvieron seronegativos a los 7 meses de edad, y a los 10 meses todos los niños carecían de anticuerpos. Después de la primera infección los anticuerpos circulantes pueden persistir por mas de 10 años.

Las reinfecciones son frecuentes y en este estudio ocurrieron con un intervalo de 1 a 8 años. Es mas probable que la reinfección sea asintomática

## INTRODUCCION

### I.- HISTORIA

#### A.- RECONOCIMIENTO DEL VIRUS

El virus influenza tipo C fué aislado por R. M. Taylor en Marzo de 1947 de un paciente con un episodio de cefalea, dolor de espalda y coriza con duración de 24 horas. El virus era distinto de las cepas prototipo A y B, y se denominó C/Taylor/1233/47<sup>(1)</sup>.

En 1951, Taylor reportó ensayos de Inhibición de la Hemaglutinación (IH), hechos en 185 sueros obtenidos de adultos, en los que había 3 individuos con incremento del cuádruplo o mayor en el título de anticuerpos contra la cepa C/Taylor/1233. Estos pacientes tenían "enfermedad respiratoria aguda (de etiología) no diagnosticada"<sup>(2)</sup>.

Una segunda cepa denominada JJ fué aislada en Marzo de 1950, en Ann Arbor, Michigan<sup>(3)</sup>, de un paciente con un caso leve de influenza. Pruebas serológicas hechas por Inhibición de la Hemaglutinación (IH), Fijación de Complemento (FC) y Neutralización (Nt) mostraron un aumento en el título de anticuerpos contra esta cepa, sin respuesta de anticuerpos contra los virus influenza A o B. 52 pares de sueros tomados de estudiantes universitarios entre 1947 y 1950 mostraron que la mayoría de ellos tenían títulos IH moderadamente altos, sugiriendo que había existido una infección previa. Sueros pareados de niños de 1 - 5 años, tomados entre el otoño de 1946 y la primavera de 1947 indicaron actividad de virus JJ en este período. Los sueros de hurones inoculados con la cepa JJ reaccionaron igualmente bien con la cepa 1233, sin reactividad contra los tipos A o B, lo que llevó a Francis a nombrar estas dos cepas como virus Influenza C. Minuse y cols.<sup>(4)</sup> consideraron el

virus C como causante de enfermedad leve del aparato respiratorio superior.

#### B.-CARACTERISTICAS INICIALMENTE DETERMINADAS

Taylor y cols.<sup>(2)</sup> reportaron que el virus C, cepa 1233, aglutina eritrocitos de gallina, describen este fenómeno como "errático" en los primeros pases, y solo obtuvieron una cepa con actividad hemaglutinante estable y títulos HA consistentemente altos hasta el pase No. 50 en cavidad amniótica. A 25°C el virus tipo C se eluye rápidamente de los eritrocitos y es necesario mantener la reacción a 4°C para conservar el patrón de hemaglutinación. Durante los primeros pases, también aglutina eritrocitos de cobayo, pero con menor título que los de gallina. Minuse y cols.<sup>(4)</sup> en cambio reportan que las cepas JJ y 1233 aglutinan eritrocitos de gallina, humanos tipo O, hámster o ratón, pero no los de cobayo mono, hurón o carnero.

Styk y cols.<sup>(7)</sup> reportaron un inhibidor inespecífico de la HA presente en el suero de rata (IISR), altamente selectivo para el virus C y resistente al tratamiento con la neuraminidasa de *Vibrio cholerae*, llamada Enzima Destructor de Receptores (EDR)  $\text{CO}_2$ ,  $\text{KIO}_4$  y Calor (56°C por 30 min), pero parcialmente sensible a la tripsina al 0.5%, lo que indica que es diferente de los inhibidores similares que actúan sobre los virus A y B.

En 1950 Hirst<sup>(9)</sup> comunicó que los receptores celulares para el virus tipo C son diferentes a los receptores para los virus influenza A y B, Newcastle o Parotiditis, porque C/Taylor/1233 no destruye los receptores de eritrocitos para dichos virus.



### C.- CLASIFICACION

La taxonomía de los virus ha sido difícil de estructurar en forma sistemática, y la clasificación de los virus influenza tipo C ha sido discutida en varias ocasiones. Debido a los síntomas de la enfermedad con la que fue asociado cuando fué descubierto, el virus tipo C fué clasificado en el grupo llamado entonces MNI (Mumps, Newcastle, Influenza). Hirst,<sup>(9)</sup> en 1950, propuso que este virus debería reclasificarse en otro grupo, porque la cepa C/Taylor/1233 no destruye los receptores para los virus tipo A o B presentes en los eritrocitos.

White<sup>(10)</sup> estableció que el receptor celular para estos virus contiene ácido n-acetil neuramínico, ya que la EDR inhibe la aglutinación de eritrocitos por los virus A, B o C.

En 1953 durante la Conferencia Internacional de Microbiología, el Sub-comité de Virus del Comité Internacional de Nomenclatura, tomó la iniciativa para sistematizar la Taxonomía de los virus; en 1955 Andrewes, Bang y Burnet<sup>(6)</sup> propusieron la creación del grupo Myxovirus (del griego Myxo: moco, para indicar la afinidad de estos virus por la mucina de las secreciones respiratorias), que incluía los virus influenza tipo A, B, y C, así como los virus de la Parotiditis, Newcastle y Peste Aviar. En 1959, Andrewes y cols<sup>(6)</sup> separaron los tipos A, B, y C, llamados "virus de Influenza verdaderos" de los virus parainfluenza 1, 2, 3, Parotiditis y Newcastle, porque los primeros tienen menor tamaño, presentan partículas filamentosas y carecen de actividad hemolítica a pH 7. En 1962 Waterson<sup>(11)</sup> midió en 12 nm el diámetro de la ribonucleoproteína (RNP) o componente interno, y capacidad de

**recombinación** genética de los virus influenza. Henle, en 1964, y Melnick en 1977<sup>(12)</sup> postularon que el virus tipo C debería estar taxonómicamente separado de los otros virus influenza. En 1975, Kendal<sup>(19)</sup> propuso para el virus tipo C el nombre "Pseudo Influenza" para indicar que hay algún parecido con los virus A y B, pero tienen grandes diferencias morfológicas y bioquímicas. En 1987<sup>(13)</sup> el Comité Internacional para la Taxonomía de los Virus estableció un género separado, todavía sin nombre, en la familia Orthomyxoviridae para los virus de la influenza tipo C.

## II.- CARACTERISTICAS DEL VIRUS.

### A.- TAMAÑO Y FORMA DE LAS PARTICULAS VIRALES

La morfología y tamaño de los viriones tipo C son similares a los de los tipos A y B. La cepa C/Taylor/1233 tiene el mismo tamaño que el virus tipo A (80-100 nm), así mismo se observan partículas esferoidales y formas filamentosas<sup>(2)</sup>. Waterson y cols.<sup>(14)</sup> describieron proyecciones en la superficie de la partícula viral y una estructura reticular hexagonal; también hicieron comparaciones de tamaño entre los tipos A, B y C, reportando cifras de 100 a 150 nm de diámetro en las partículas esferoidales de los tres tipos. Compans<sup>(16)</sup> comunicó un tamaño de 75 a 100 nm tomado por microscopio electrónico; la capa de proyecciones superficiales mide ~10 nm, (en la figura 1 se muestra un diagrama de la estructura de un virión).

### B.- ACIDO NUCLEICO DEL VIRUS

En 1976 Ritchey<sup>(15)</sup> reportó que el genoma del virus de la influenza tipo C consiste en RNA de cadena sencilla, y encontró una relación de Guanina-Citosina/Adenina-Uracilo de 1.38 que es diferente a la cifra de los influenzavirus A y B (1.23 y 1.25). El

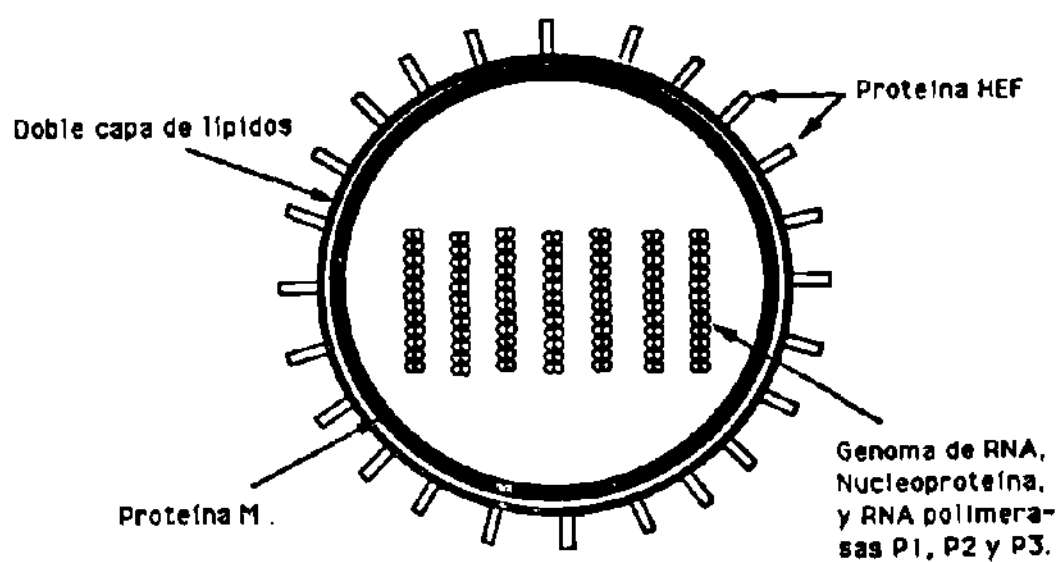


Figura 1.- ESTRUCTURA DEL VIRUS INFLUENZA TIPO C

genoma viral tiene 7 segmentos<sup>(19,108)</sup>.

C.- PROTEINAS VIRALES

No existe una proteína con función de neuraminidasa (EDR), lo que se refleja en la ausencia del segmento correspondiente de RNA. Compans y cols.<sup>(16)</sup> reportaron 3 proteínas de 88, 66 y 26 kd, solo la primera está glucosilada; la ribonucleoproteína (RNP) del virus tipo C tiene forma de cordón, mide 12-15 nm de diámetro por 30-100 nm de largo, es similar a la RNP del virus tipo A, y en ella se localiza la proteína de 66 kd. La proteína M corresponde al componente de 26 kd.

Herrler y cols.<sup>(21,22)</sup> obtuvieron en 1979 el precursor de la proteína de superficie (~105 kd), lo denominaron gpI y mostraron que una proteasa lo transforma en un componente llamado gpII, de 2 fragmentos de 65 y 30 kd respectivamente, unidos por enlaces disulfuro; gpI y gpII tienen idéntico patrón de péptidos tras digestión triptica; gpII exhibe actividad hemaglutinante. Las proteínas gpI y gp65 (pero no gp30) tienen el extremo amino terminal modificado; gpII y gp88 son la misma proteína localizada en la superficie de la partícula viral, y en la actualidad se denomina HEF; En 1981 se describieron<sup>(23)</sup> tres polipéptidos (P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> y P<sub>3</sub>), similares a las proteínas PA, PB<sub>1</sub> y PB<sub>2</sub> de los virus tipo A, y dos proteínas no estructurales: NS<sub>1</sub> y NS<sub>2</sub> de 24 y 14 kd respectivamente.

La glucoproteína de superficie (HEF) tiene 655 aminoácidos, y PM de 72,063 d<sup>(31)</sup>, sin incluir la porción de carbohidrato. Existen similitudes con las moléculas de Hemaglutinina de los virus tipo A y B: Una secuencia líder hidrofóbica, una molécula de arginina y

una secuencia hidrofóbica en el sitio de rompimiento, otra secuencia hidrofóbica cerca del extremo carboxilo terminal que probablemente sirve de ancla en la membrana, y varios residuos de cisteína conservados; la región de las posiciones 230-380 carece de homología con la HA de los virus A y B; no se hallaron similitudes entre gp88 (HEF) y la NA de los virus A y B. La fracción principal de la proteína HEF es aproximadamente 100 aminoácidos mayor que las subunidades HA<sub>1</sub> de los virus A y B, posiblemente porque la actividad de EDR reside también en esta proteína en el virus tipo C, probablemente en la mencionada región de las posiciones 230-280, que tiene cisteínas no conservadas. La similitud de los aminoácidos en total es menor entre los virus C - A que entre los virus B - A, lo que sugiere una relación evolutiva mas distante. Hay 96% de similitud entre las cepas C/JHB/1/66 y C/Cal/78 en el segmento 5 de RNA<sup>(32)</sup>.

La antigenicidad de la molécula de carbohidrato en la proteína de superficie se estudió por bloqueo con tunicamicina<sup>(39)</sup> resultando una proteína de 76 kd. Se probaron las proteínas gp88 y T76 (con y sin carbohidrato) con 7 anticuerpos monoclonales preparados contra gp88, uno de ellos (Q-5) precipitó gp88 y no T76<sup>(40)</sup>. Bajo condiciones no reductoras T76 forma multímeros unidos por enlaces disulfuro, mientras que gp88 se comporta como un monómero, lo que sugiere que la fracción de carbohidrato se requiere para que se mantenga la reactividad inmunogénica y antigénica de gp88 y que posiblemente participe en el "doblaje" tridimensional. Se desconoce hasta ahora la estructura química de la fracción de carbohidrato. La reactividad con anticuerpos monoclonales delimita

dos regiones antigénicas en la proteína gp88 (HEF): A y B con dos sitios cada una: A-1 y A-2, B-1 y B-2<sup>(48)</sup>. Los anticuerpos monoclonales que reconocen B-1 y B-2 reaccionan igual con la proteína gp88 y con su forma no-glucosilada (T76). Los anticuerpos contra A-1 y A-2 no precipitan la proteína T76. La proteína gp88 desnaturalizada reacciona con los anticuerpos contra los sitios B-1 y B-2 pero no con los anticuerpos contra los sitios A-1 y A-2. Esto sugiere que los sitios A-1 y A-2 son epítopos dependientes de la conformación espacial de la proteína y que la glucosilación contribuye directamente a la integridad de estos sitios antigénicos.

Vlasak y cols.<sup>(43)</sup> demostraron varias funciones de gp88, expresando cDNA de esta proteína con un vector (virus SV40) en células CV-1. El producto de este gen reaccionó con anticuerpos monoclonales contra la proteína HEF y las células infectadas con el virus recombinante adsorbieron eritrocitos y adquirieron actividad de esterasa.

Herrler y cols.<sup>(45)</sup> establecieron que esta proteína tiene tres actividades diferentes: Hemaglutinina, Esterasa y Factor de Fusión, estos autores sugirieron el nombre HEF, aplicando los siguientes términos: HEF<sub>0</sub>, es la glucoproteína no fragmentada HEF<sub>1</sub>, es el producto mayor de la fragmentación, HEF<sub>2</sub>, es el producto menor y HEF<sub>1,2</sub> corresponde a los dos componentes conectados por enlaces disulfuro.

El tratamiento de viriones con bromelina libera proteína HEF con coeficiente de sedimentación de 10 S, lo que indica un PM de 206 Kd, congruente con una estructura trimérica<sup>(49)</sup>; esta proteína ha

perdido un péptido del extremo C-terminal de 3 a 4.5 Kd, que debe haber quedado en la membrana viral, tiene actividad de EDR pero no acción hemolítica ni hemaglutinante. Hay evidencia de que la proteína HEF contiene ácido esteárico en enlace tioéster, que podría aumentar la hidrofobicidad de la molécula, y facilitaría la interacción con otras proteínas (por ejemplo para formar el retículo hexagonal en la superficie del virión)<sup>(103)</sup>.

#### **D.- ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE**

Este fenómeno se ha comparado con la aglutinación de eritrocitos de los tipos A y B. Los eritrocitos de rata son aglutinables por el virus tipo C, pero no sedimentan bien sin la adición de suero<sup>(24)</sup>. El ácido N-acetil neuramínico (Neu 5 Ac) es parte del receptor para el virus C en los eritrocitos, porque a pH 6.5 la neuraminidasa de *V. cholerae* (EDR) y de *C. perfringens* impiden la aglutinación de eritrocitos y destruyen el IISR<sup>(33)</sup>.

La  $\alpha_1$  macro-globulina y murinoglobulina del suero de rata inhiben la hemaglutinación. A 37°C el virus C inactiva estas proteínas sin perder la infecciosidad<sup>(34,35,38)</sup>. La mucina submandibular bovina también inhibe la hemaglutinación del virus C<sup>(37)</sup>.

Se comparó la capacidad de tres ácidos siálicos: ácido N-acetil neuramínico (Neu 5 Ac) ácido N-glicolil neuramínico (Neu Gc) y Neu 5-9 Ac<sub>2</sub> como receptores de influenza virus A, B y C en los eritrocitos humanos, ovinos, equinos, de gallina, de rata y ratón<sup>(41)</sup>; Se removieron los ácidos siálicos nativos de cada especie, y se incorporó artificialmente uno de los tres ácidos siálicos en diferentes lotes de eritrocitos, el virus tipo C aglutinó

eritrocitos portadores de Neu 5-9 Ac<sub>2</sub> pero no a los portadores de Neu 5 Ac o Neu Gc, en tanto que los virus A y B tuvieron afinidad por Neu 5 Ac y no por Neu 5-9 Ac<sub>2</sub>. Esto implica que la unión con el receptor en los virus A y B es bloqueada por el grupo O-acetilo en posición 9. El tratamiento de eritrocitos portadores de Neu 5-9 Ac<sub>2</sub> con la enzima purificada del virus C (N-acetil neuraminato-O-acetil esterasa), acabó la aglutinabilidad de los eritrocitos con el virus C pero continuaron reaccionando con los virus A y B. Esto concuerda con la observación de que los virus C son capaces de liberar acetato de Neu 5,9 Ac<sub>2</sub> sin afectar los receptores de los virus A y B<sup>(9,19)</sup>. La especificidad de la acetil esterasa del virus C no incluye otros ácidos siálicos puesto que los eritrocitos de caballo contienen ácido Neu 4-5 Ac<sub>2</sub> y no son aglutinables por el virus C<sup>(37,41)</sup>.

Nishimura y cols.<sup>(46)</sup> investigaron el componente de la membrana de los eritrocitos humanos que interacciona con el virus; La interacción es disminuida por el tratamiento previo de los eritrocitos con neuraminidasa, acetil-esterasa o enzimas proteolíticas (ficina, bromelina o proteasa V-8) lo que sugiere que se trata de una glucoproteína. Los anticuerpos monoclonales contra los grupos sanguíneos M o N inhiben la aglutinación lo que indica que el sitio receptor reside en la glucoforina A.

N-acetil galactosamina también puede ser un receptor del virus C porque el virus impide la aglutinación de eritrocitos por lectinas con especificidad por este carbohidrato (SBA, DBA, WFA, VAA II, RCA II y WGA), pero no interfiere con lectinas que reaccionan con D-galactosamina<sup>(47)</sup>.



## **E.- ACTIVIDADES ENZIMATICAS**

Se han descrito dos: polimerasa asociada al ácido nucleico y esterasa, localizada en la superficie de la partícula viral. La primera actividad corresponde a RNA polimerasa dependiente de RNA, lo que sugiere que el genoma del virus C es de polaridad negativa, o sea que la secuencia de bases del RNA viral es complementaria a la secuencia de bases del RNA mensajero<sup>(25)</sup>.

La actividad de tipo esterasa participa en la unión de la partícula viral con el receptor celular, para iniciar el ciclo de replicación viral. Dicha actividad está localizada en la proteína de superficie, lo que propicia el fenómeno de aglutinación de eritrocitos y fusión de membranas.

Kendal<sup>(19)</sup> observó que si el virus C actúa sobre el ácido N-acetilneuramínico, ácido 4-O-acetil N-acetilneuramínico, 7-O-acetil N-acetilneuramínico y 8-O-acetil N-acetilneuramínico, no se libera ácido siálico y las neuraminidasas de los virus influenza A y B, o de V. cholerae si lo hacen, concluyendo que el virus tipo C carece de actividad de neuraminidasa. O'Callaghan y cols.<sup>(25)</sup> reportaron también diferencias entre los virus C y A-B en la actividad de neuraminidasa, y de IH, cuando usaron neuramina-lactosa, mucoside de Collocalia, fetuina y gluco-proteínas de la membrana de eritrocitos humanos o de mono rhesus, y observaron<sup>(26)</sup> que la interacción del virus C con el inhibidor del suero de rata (IISR), es estable por tiempo indefinido a 4°C, pero se disocian a los 20-90 minutos a 23 y a 37°C por acción enzimática (EDR). Después de la elución, el virus conserva sus propiedades biológicas, mas el IISR se inactiva. El antisuero específico bloquea la unión virus-IISR.

La hemólisis y fusión del virus C sobre eritrocitos de ratón, tiene un pH óptimo de 5.0<sup>(27)</sup>. Los virus cultivados en células MDCK tienen una infectividad muy baja y no muestran actividad hemolítica, pero el tratamiento con tripsina, activa la infectividad; esto es comparable con lo que ocurre con la HA del virus tipo A<sup>(30)</sup>. Kitame y cols.<sup>(28,29)</sup> hallaron que la tripsina y la elastasa son eficaces para restablecer la acción hemolítica, activar la infectividad y fragmentar gp88, la quimotripsina y la termolisina carecen de efecto.

La EDR del virus C tiene una temperatura óptima entre 45 y 53°C, la actividad de esterasa y la HA tienen una sensibilidad al calor paralela. El tratamiento con tripsina reduce al mismo tiempo la actividad de EDR y la cantidad de gp88<sup>(36)</sup>.

El tratamiento con neuraminidasa de C. perfringens, destruye el efecto inhibitor de la HA de la mucina submandibular bovina (MSB) lo que indica que el ácido Neu 5Ac es esencial para el efecto inhibitor<sup>(37)</sup>. El ácido neuramínico liberado de esta mucina después de la exposición al virus, es Neu 5Ac pero no Neu 5-9Ac<sub>2</sub>.

La actividad de la enzima sobre Neu 4-5Ac<sub>2</sub> es 30 veces menor, y el ácido Neu 5-7Ac<sub>2</sub> es resistente a la esterasa del virus C. La enzima se ha clasificado como Neuraminato-O-acetilesterasa [N-acil-9(4)-O-acetilneuraminato O-acetil hidrolasa (EC 3.1.1.53)]. La adsorción del virus a la superficie celular involucra la molécula Neu 5-9Ac<sub>2</sub>.

La esterasa de la proteína HEF muestra alta afinidad por el radical O-acetato en posición 9, es inhibida por Di-isopropil fluorofosfato (DFF), Dietil-4-nitrofenil fosfato, y parcialmente por iones de cobre y mercurio y por fisostigmina, y también por

derivados de la isocumarina; pero estos no impiden la unión con el receptor, ya que no disminuye el título de HA. El sitio activo incluye la serina 57<sup>(52)</sup>. La enzima es importante para la infección, porque el inhibidor DFF disminuye marcadamente la infecciosidad pero no altera las propiedades de hemaglutinación y fusión<sup>(42)</sup>. Las partículas virales tratadas con DFF se unen irreversiblemente a las células que expresan Neu 5-9Ac<sub>2</sub>. Este inhibidor actúa sobre esterasas y proteasas cuya secuencia de aminoácidos en el sitio activo es Gly-X-Ser-X-Gly y por esto son llamadas serina-esterasas.

El rango de pH para que ocurran la hemólisis y la fusión en liposomas portadores de la proteína HEF es de 5.6 - 6.1. En el virión hay una pérdida de la estructura reticular hexagonal al bajar el pH a 5.5, y la proteína viral HEF sufre un cambio conformacional demostrable por variación en la sensibilidad a la tripsina, este es un proceso bifásico, posiblemente por la participación de varias moléculas de la proteína<sup>(54)</sup>. Hay un retardo progresivo de la fusión cuando aumenta el pH, lo que no sucede con los virus A y B<sup>(55)</sup>. Esta característica de la proteína HEF puede permitir estudiar mas detenidamente el proceso de fusión de membranas.

#### **F.- VARIACION EN EL VIRUS**

La variabilidad antigénica en el virus tipo C se ha medido con técnicas serológicas y también midiendo la variación del RNA. Las técnicas IH y FC no detectan cambios antigénicos en las cepas C/JJ/50, C/GL/52, y C/GL/54<sup>(59,63,89,90)</sup>. Gerth y cols.<sup>(71)</sup> mencionan diferencias menores entre las cepas C/Johannesburgo/4/67 y C/Paris/1/67 similares a las observadas en el virus tipo B, pero en

encuestas serológicas esto no se refleja en los grupos etarios. Pfeifer y col.<sup>(32)</sup> hallaron una tasa de cambio de 4% por cada 10 años en los aminoácidos de la proteína HEF. La tasa de cambio para los influenza virus tipo A es 9.2% por cada 10 años, y tipo B 2% por cada 10 años. 5 cepas aisladas en el período 1947-1979 tienen menor variación en el genoma según los mapas de oligonucleótidos que la que existe entre las cepas de virus A/H<sub>3</sub>N<sub>2</sub> aisladas en el período 1968-1973<sup>(93)</sup>. La variación del virus en las proteínas estructurales HEF, NP y M puede no ser un evento cronológicamente secuencial<sup>(92)</sup>.

En las secuencias de bases de los genes HEF de 8 cepas de virus humano y 3 cepas de virus porcino, hay poca diferencia (0.1%) entre cepas aisladas con un intervalo de 31 años: C/Ann Arbor/50 y C/Yamagata/81 mientras que otras reflejan 4.5% de bases diferentes aun cuando se aislaron en un intervalo de 3 años: C/California/78, C/Mississippi/80, C/Yamagata/81, lo que sugiere que en un momento dado circulan al mismo tiempo en la población virus de estirpes diferentes, pero la proporción de cambio es mucho menor que en el virus tipo A, lo que permite reactividad cruzada con los anticuerpos heterólogos<sup>(91)</sup>. Los datos de los genes NS de las mismas 8 cepas sugieren algo similar<sup>(75)</sup>.

Hay diferencias marcadas en los árboles filogenéticos de las proteínas HEF y NS, lo que concuerda con la idea de que ocurre reacondo genético de los virus C en la naturaleza tal como ocurre con los virus A y B.

Kawamura y cols.<sup>(75)</sup> hallaron mayor variabilidad genética que otros autores<sup>(75,91,93)</sup> en 16 cepas aisladas entre 1964 y 1983, en el período 1981 - 1982 identificaron por lo menos 2 estirpes

diferentes circulando al mismo tiempo en Japón. La variabilidad antigénica de la proteína HEF en el mismo grupo de 16 cepas<sup>(94)</sup>, medida con siete anticuerpos monoclonales: 4 de ellos (grupo A) tienen actividad neutralizante e inhiben la hemólisis y la fusión, los otros 3 (grupo B) carecen de estas actividades; las regiones reconocidas por los anticuerpos del grupo A exhiben cambios considerables mientras que las regiones que reaccionan con el grupo B son muy conservadas entre las cepas.

Los mismos autores encontraron una similitud de 98% en la secuencia de nucleótidos del gen HEF de las tres cepas, aisladas en 1982-1983 en Japón, y el gen HEF de C/Mississippi/1/80, esta similitud también se comprobó por mapeo de oligonucleótidos de vRNA total, y por análisis antigénico usando una batería de 11 anticuerpos monoclonales<sup>(104)</sup>; en vista de que las cepas aisladas en Japón y en Mississippi pudieron diferenciarse por medio de sueros policlonales de las cepas identificadas previamente, es posible que una variante similar a las cepas de Japón pudo haberse diseminado rápidamente en 1982-1983. Yamashita y cols.<sup>(96)</sup> resumiendo los datos conocidos, compararon la variabilidad en los genes NS y HA - HEF de los tres tipos de influenza virus, postulando que genéticamente evoluciona más rápidamente el tipo A que el B y éste que el C. Los tipos B y C se presentan simultáneamente en varias estirpes en una comunidad.

#### G.-INFECCION DE ANIMALES DE EXPERIMENTACION Y CULTIVOS CELULARES

El virus tipo C no produce infección severa en animales de laboratorio, de los que el perro parece ser el más susceptible. Francis<sup>(3)</sup> inoculó hurones con virus JJ en los que hubo fiebre pero

poca evidencia de enfermedad. Taylor<sup>(2)</sup> inoculó hurones, hámsters y monos, que produjeron anticuerpos pero sin sufrir síntomas ni lesiones aparentes; tampoco pudo adaptar el virus en hámsters ni ratones. En cerdos, la infección experimental es asintomática en algunos casos y en otros solo hay secreción y obstrucción nasales<sup>(98)</sup>. En perros la inoculación experimental produce: flujo nasal, edema palpebral, sufusión conjuntival, lagrimeo y moco ocular. Estos animales se pueden re-infectar aun en presencia de anticuerpos circulantes en la sangre<sup>(100)</sup>. En ratas no hay síntomas, pero el virus se replica en el epitelio nasal por 1 - 5 días después de la inoculación y aparecen anticuerpos neutralizantes; las ratas inmunes resistieron un reto a los 7 días, pero tal inmunidad duró menos de un año.

En huevos embrionados de gallina la infección está limitada al epitelio de la membrana amniótica. El virus C crece en cultivo primario de riñón de mono Rhesus<sup>(76,79)</sup>. Chakraverty<sup>(24)</sup> obtuvo títulos de infectividad de  $10^2 - 10^4$  DICT<sub>50</sub> en las células de riñón humano embrionario y de  $10^6 - 10^7$  en células de riñón de mono; en el huevo embrionado de gallina los títulos fueron  $10^8 - 10^9$  DICT<sub>50</sub>; en la línea celular HeLa no hubo replicación viral.

El virus crece mejor en células MDCK que en anillos traqueales de pollo, fibroblastos de pulmón de embrión de pollo, células VERO, MDBK o Chang<sup>(25)</sup>. La tripsina en el medio mejora el crecimiento del virus<sup>(81)</sup>, y permite hacer placas en células de riñón embrionario de pollo<sup>(80,82)</sup>. Las células MDCK, se pueden infectar persistentemente y se vuelven resistentes a la infección por virus tipo C y virus de la estomatitis vesicular, pero son sensibles a virus influenza A y

B<sup>(83,84)</sup>. La línea celular HMV-II derivada de melanoma humano<sup>(87)</sup>, es permisiva para el virus C, es mas sensible que las líneas MDCK, Vero, y LLC-MK<sub>2</sub><sup>(86)</sup>. Se puede detectar virus en suspensión o en placas virales en monocapas celulares mediante  $\alpha$ -naftil acetato y  $\alpha$ -naftil propionato, que dan un producto coloreado por la acción de la esterasa<sup>(97)</sup>.

### CICLO DE REPLICACION

La producción de viriones comienza 20 horas después de la infección y la máxima concentración de virus extracelular ocurre a las 36 horas<sup>(25)</sup>, <25% del virus está asociado a las células. Petri<sup>(82)</sup> reportó el inicio de la liberación de virus a las 8 horas y un máximo de virus extra-celular a las 24 horas post infección.

La infecciosidad se activa cuando la proteína HEF se fracciona en dos<sup>(21,29)</sup>. También se activan la hemólisis y la fusión si hay un pH ácido<sup>(27)</sup>, lo que indica que el virión es llevado al interior de la célula por medio de fagocitosis, el fagosoma se fusiona luego con lisosomas primarios, y el contenido ácido de los lisosomas induce la fusión de las membranas viral y lisosómica, liberándose la nucleocápside en el citoplasma tal como está propuesto para el virus del bosque de Semliki<sup>(87)</sup> y virus influenza tipo A<sup>(88)</sup>.

La inhibición de la acetil esterasa del virus C con 3,4 dicloro isocumarina<sup>(52)</sup> o con DFF<sup>(42)</sup> inhibe la infecciosidad viral mas no la HA, así que la enzima debe participar tempranamente en el ciclo de replicación viral, posiblemente en la entrada del virión a la célula.

Neu 5-9Ac<sub>2</sub> es parte esencial en el receptor celular, puesto que su presencia en la membrana determina la sensibilidad al virus

tipo C en las células MDCK; las células CV-1, BHK, Vero, MDBK que son resistentes a la infección con virus C, se vuelven susceptibles tras la incubación con gangliósidos bovinos que contienen Neu 5-9Ac<sub>2</sub>. Los gangliósidos celulares que contienen Neu 5-9Ac<sub>2</sub> son receptores potenciales para el virus en los tejidos<sup>(44)</sup>.

La expresión del genoma viral incluye "splicing" en el segmento 6 de RNA, (que codifica la proteína M), entre las posiciones 753 y 981; el RNA resultante tiene capacidad para codificar una proteína de 26,970 daltons, lo que es congruente con el tamaño observado en la proteína M. El fenómeno de "splicing" no ocurre en la transcripción del segmento 6 de los virus A y B, y las homologías entre las proteínas M de los tres tipos de virus son pocas<sup>(51)</sup>, sin embargo el tamaño de estas proteínas es similar, lo que sugiere una relación evolutiva entre los tres tipos de virus.

Se ha descrito actividad antiviral en oligodeoxi-nucleótidos (ODN) antisentido unidos por enlace fosforo-tioato, de 20 bases de longitud, correspondientes al gen de la polimerasa P1 del virus C/JJ/50, complementarios a la secuencia de las primeras 40 bases del extremo 3' del RNA viral<sup>(105)</sup>.

### III.- ENFERMEDAD EN HUMANOS

#### A.- INOCULACION EXPERIMENTAL DE VOLUNTARIOS ADULTOS

En el primer intento por reproducir la enfermedad en 1954, se inocularon con virus C/JJ/50, 6 personas que tenían títulos bajos de anticuerpos para el virus C; 5 personas excretaron virus por periodos de 3 - 4 días, en 4 hubo aumento en el título de anticuerpos, en ningún caso hubo enfermedad. El investigador que efectuó la inoculación tuvo 7 días después un episodio de



irritación y flujo nasal con tos leve y estornudos, malestar y mialgias generalizadas, por 5 días. No hubo fiebre o escalofríos. El virus C/JJ/50 fue aislado de él al 3<sup>er</sup> día, y tuvo aumento en el título de anticuerpos<sup>(5)</sup>.

Joosting y cols.<sup>(64)</sup> estudiaron la historia natural de la enfermedad en 26 voluntarios adultos de ambos sexos, todos con anticuerpos séricos, a los que inocularon con la cepa C/Jhb/1/66, 9 de ellos (39%) contrajeron resfriado común, el período de incubación fue de 3 - 6 días, la enfermedad duró de 5 a 11 días, hubo excreción del virus en el moco nasal por 3 - 6 días después de la inoculación; los síntomas incluyeron: coriza (100%), dolor faríngeo (78%), malestar y cefalea (56%), fiebre (33%), 8 de los casos fueron catalogados como leves y 1 severo (requirió descanso en cama). No hubo escalofríos, secreción nasal mucopurulenta ni tos. Comparativamente con Rinovirus, el período de incubación fue mas largo y la enfermedad mas corta (1 - 5 días y 3 - 19 días respectivamente).

#### **B.- ENFERMEDAD ADQUIRIDA EN FORMA NATURAL**

Hay pocos datos de la enfermedad respiratoria en que se confirma por cultivo que la etiología es el virus de la influenza tipo C

1) **ADULTOS.**- Gerber y cols.<sup>(56)</sup> reportaron 14 casos en reclutas hospitalizados por enfermedad respiratoria, 9 con diagnóstico de influenza, 2 casos de faringitis aguda y 2 de neumonía de etiología no determinada. Woolridge<sup>(59)</sup> halló 1 caso de influenza entre 31 individuos asintomáticos infectados, comprobados por cultivo del virus. Andrews<sup>(57)</sup> reportó 6 adultos asintomáticos que tuvieron aumento en el título de anticuerpos. En los 68 casos reportados por

Fraser<sup>(61)</sup> menos de la mitad sufrió enfermedad clínica leve. Gerber y cols.<sup>(56)</sup> reportaron, 14 casos de enfermedad en la base naval de Grandes Lagos en reclutas hospitalizados, y 11 de 72 jóvenes tomados al azar mostraron un incremento en el título de anticuerpos (IH), sin enfermedad. Dykes y cols.<sup>(65)</sup> comunicaron tres casos con los siguientes síntomas: estornudos, cefalea, rinorrea, tos, conjuntivitis, dolor faríngeo y muscular.

2) NIÑOS.- Hornsleth<sup>(62)</sup> observó 3 casos de neumonitis y 2 de bronconeumonitis, (edades de 1 - 4 años). Andrews<sup>(57)</sup> halló 2 niños con resfriado común y 2 adultos con enfermedad similar a influenza.

Katagiri y cols.<sup>(69 77)</sup> hicieron en 1980 un estudio prospectivo en una guardería infantil de la ciudad de Yamagata, Japón en la que se alojaban 20 niños de 0 a 3 años al cuidado de 29 empleados adultos. En Marzo de 1981, ocurrió un brote epidémico en el que fueron afectados 17 de los niños de edades entre 8 meses a 3 años. Los 3 niños no afectados tenían 1, 2 y 3 meses, y se presume que todavía tenían anticuerpos maternos. No hubo casos asintomáticos, la enfermedad consistió en fiebre de 38 - 40°C por 2 - días y rinorrea de larga duración (media 3 semanas) con estornudos; en la mitad de los casos hubo tos leve. El virus fue aislado en 12 niños y un adulto desde 3 días antes hasta 9 días después de la iniciación de los síntomas. Los autores concluyeron que la reinfección es común puesto que un niño de 2 años y 2 adultos tenían títulos de anticuerpos (IH 1:64, 1:32, 1:16) y sufrieron la enfermedad; otros adultos con títulos semejantes no se infectaron. Este grupo de autores<sup>(77)</sup> hizo un estudio de seguimiento en la misma clínica por

dos años más y observaron dos brotes más, en los que enfermaron 8 y 10 niños; confirmaron que la enfermedad es leve y se manifiesta con fiebre hasta de 39°C de 2 a 5 días de duración, con tos leve en algunos casos y descarga nasal persistente (11 - 57 días), hubo reinfección en 5 niños, 2 de ellos sufrieron 2 reinfecciones. Estimaron un período de incubación de 5 días, y transmisibilidad hasta por 22 días.

#### **IV.- EPIDEMIOLOGIA**

La información disponible sobre la epidemiología es fragmentaria en vista de la escasez de aislamientos y la sintomatología leve que acompaña a la infección.

**A.- EDAD** 1).-NIÑOS Minuse y cols.<sup>(4)</sup> registraron 52 casos de seroconversión en 68 niños de edad no especificada observados entre agosto de 1946 y Mayo de 1947, incluyendo dos casos en que simultáneamente hubo seroconversión para virus A' y C; en uno de ellos se aislaron ambos virus del mismo lavado faríngeo. En 1952 se detectaron dos casos de enfermedad causada por el virus C durante la última semana de una epidemia causada por virus B, en un grupo de niños y jóvenes (7 - 25) años, y serológicamente se detectaron 4 casos. Hornsleth<sup>(62)</sup> observó 6 casos de elevación de anticuerpos (FC) entre 473 muestras pareadas de suero de niños de 6 - 9 años de edad hospitalizados por enfermedad respiratoria aguda entre Septiembre 1963 - Mayo 1965, sin evidencia de distribución estacional.

La noción de que esta infección ocurre con mucha frecuencia se deriva de múltiples estudios serológicos en los que los porcentajes máximos de individuos con anticuerpos se registran alrededor de

los 20 años (rango de 10 a 30 años de edad), como se describe a continuación.

- \* Andrews (E.U.)<sup>(57)</sup>: 61% en el grupo de 25 - 34 años.
- \* Jennings (Jamaica)<sup>(65)</sup>: 60 - 80% desde los 15 hasta >65 años.
- \* Gerth (Alemania)<sup>(71)</sup>: 47% 8 a 20 años.
- \* O'Callaghan (E.U.)<sup>(66)</sup>: 2- 5 años: 47%, 20 - 30 años: 96%.
- \* Homma (Japón)<sup>(68)</sup>: 90 % a los 10 años, reportó desaparición de los anticuerpos pasivos maternos a la edad de 6 meses.
- \* Tůmová (Alemania y Checoslovaquia)<sup>(70)</sup>: 90 - 100% en los grupos mayores de 20 años. Solo se aislaron 8 cepas de virus tipo C en los dos países en ese período.

El único estudio prospectivo es el de Katagiri y cols.<sup>(67)</sup> de tres brotes epidémicos en una misma guardería infantil en Marzo 1981, Abril 1982 y Octubre - Noviembre 1982, confirmados por aislamiento del virus y serología (IH); los autores postulan que los brotes son frecuentes y ocurren a intervalos irregulares, posiblemente mas de dos veces al año; se estima la tasa de ataque secundaria en 90 - 100%.

2).- ADULTOS.- La infección se ha documentado con muy escasa frecuencia en los adultos. Gerber<sup>(56)</sup> reportó aislamiento de virus tipo C en reclutas navales durante cada mes desde Dic. 1953 hasta Abril 1954, 31 cepas antigénicamente similares entre sí. En 29 casos se tomaron muestras pareadas de sangre y hubo aumento en el título de anticuerpos en 27.

Farkas<sup>(60)</sup> aisló en Esztergom, Hungría en una joven de 16 años, una cepa idéntica a C/Taylor/1233 con evidencia serológica de infección (IH) durante una epidemia de influenza B en Enero de

1953, además hubo un número no especificado de sueros con incremento en el título de anticuerpos entre 2,000 individuos. Grist y cols.<sup>(58)</sup> en Glasgow, Escocia comunicaron en 1954, 7 casos asintomáticos de elevación en el título de anticuerpos en 145 adultos y ningún caso en 93 niños. Fraser y cols.<sup>(61)</sup> hallaron 68 casos con incremento en el título de anticuerpos (FC) en 439 muchachos de 15 - 16 años en entrenamiento militar en Mayo 1958 - Enero 1959, la mayoría ocurrió en Mayo-Julio 1958. Dykes<sup>(65)</sup> en una encuesta serológica por edades en 334 sueros halló los siguientes porcentajes de seropositivos (IH) 0 - 5 años: 64%, 6 - 10 años: 96%, 11 - 15 años: 100%, 16 - 25 años: 98%. El-Rai y cols.<sup>(72)</sup> encontraron en Egipto una tasa de seropositividad de 50% en adultos (IH).

Troisi y Monto<sup>(67)</sup> en Michigan, analizaron muestras de suero (ELISA) de 193 individuos de ambos sexos, tomados cada 6 meses entre 1976 y 1978; 17 casos fueron detectados durante el semestre otoño 1976 - primavera 1977. Las tasas de infección por edades fue mas alta en el grupo de 5 - 9 años: 30%, 10 - 14 años: 7%, 15 - 24 años 3%.

La prevalencia de anticuerpos contra el virus C es alta aun en villas de la región montañosa de Filipinas<sup>(76)</sup> donde el contacto con otras comunidades es muy escaso (mas del 70% de los habitantes de 0 - 20 años no habían salido nunca de la aldea), pues el rango de seropositivos es de 90 - 100% en todos los grupos etarios, incluyendo la edad pre-escolar.

#### **B.- HOSPEDEROS ANIMALES**

Yuanji y cols.<sup>(98)</sup> aislaron 15 cepas del virus C en cerdos sanos en un matadero de Beijing en los meses de Enero - Mayo y Noviembre

de 1981 y encontraron porcentajes de sero positividad (IH) en los cerdos sacrificados en el mismo lugar de 1 - 8% en cada uno de los meses de ese mismo año.

Ohwada y cols.<sup>(99)</sup> estudiaron la distribución de anticuerpos contra el virus C en cerdos y perros en Yamagata, Japón usando las técnicas IH, Radio inmuno-precipitación (RIP) e Inmunoblot. Hallaron 58 cerdos entre 269 con títulos de anticuerpos (IH), pero ninguno de ellos resultó positivo por las técnicas de RIP o Inmunoblot, por lo que los autores concluyen que los resultados positivos en IH se deben a inhibidores en el suero de los cerdos; en cambio 5 de 112 sueros de perros callejeros exhibieron títulos de anticuerpos por la técnica RIP, 2 de estos también resultaron positivos por IH e Inmunoblot.

Los virus Influenza tipo C no han sido considerados como causa importante de enfermedad, pero los estudios serológicos hechos hasta ahora indican que la infección es muy común en la infancia, y a pesar de esto, el virus se aísla muy rara vez, por lo que existen muy escasos datos sobre la edad en que sufren los niños su primera infección, la frecuencia de reinfecciones, la variación estacional y se hace necesario incluir estos virus en la vigilancia epidemiológica que se lleva a cabo para los virus tipo A y B, pues solo se ha reportado un estudio prospectivo de menos de cuatro años en una población infantil de 20 niños en Japón<sup>(77)</sup>

En el presente estudio se investigó la frecuencia de infección por este virus en una población urbana de niños de 0 a 17 años de edad, en la ciudad de Houston, Texas, mediante diagnóstico serológico y por cultivo del virus en embrión de pollo y en

células. Se incluyeron muestras de suero tomadas en un periodo de 14 años, y muestras de exudado faríngeo de un lapso de tres años, para elucidar la frecuencia de enfermedad en esta población.

### HIPOTESIS

La infección causada por el virus influenza tipo C ocurre todos los años en los niños de una población urbana.

### OBJETIVOS

- 1) Estandarizar las técnicas de cultivo de virus y de diagnóstico serológico
- 2) Determinar la frecuencia de infección anual en una población infantil urbana.
- 3) Determinar la frecuencia de infección por edades en la misma población.
- 4) Determinar la frecuencia de reinfección por edades.
- 5) Determinar la persistencia de los niveles de anticuerpos después de la primoinfección.
- 6) Buscar un patrón estacional en los casos de infección.



## MATERIAL Y METODOS

### CULTIVO DE VIRUS PARA REFERENCIA.

Se inoculó una suspensión stock de virus C/Taylor/1233/47 en las cavidades corioalantoidea y amniótica de 5 lotes de huevos embrionados de gallina de 9 días de edad, cada lote constó de 6 docenas de huevos, que se incubaron a 34° C por 48 h. se cosecharon individualmente los fluidos de cada huevo y se seleccionaron aquellos que tuvieran un título de HA de 1:64 o mayores. Un lote de virus con infecciosidad de  $1 \times 10^{5.5}$  DICT<sub>50</sub>/ml se utilizó para los ensayos de microneutralización.

### PURIFICACIÓN DEL VIRUS

La suspensión de virus de uno de los lotes se centrifugó a baja velocidad (3,000 rpm por 30 min) para clarificarla, luego se centrifugó a 25,000 rpm por 2 h en un rotor Beckman tipo Ti 50.2 de ángulo fijo, se obtuvo un paquete viral que se suspendió en 2 ml de PBS, se colocó encima de un gradiente discontinuo de 10-20-40% de sacarosa y se centrifugó a 20,000 rpm por 40 min en un rotor Beckman tipo SW 41 de camisa oscilante; la banda viral se colectó y diluyó en 10 volúmenes de PBS, se centrifugó una vez mas a 25,000 rpm por 2 h en un rotor Beckman Ti 50.2 de ángulo fijo. Finalmente el paquete de virus se resuspendió en 8 ml de PBS, 0.02% azida de sodio. El título de hemaglutinación de esta suspensión fue de 1:640.

### INMUNIZACION DE ANIMALES

Se prepararon antisueros en animales adultos, hembras: 3 cobayos y 2 conejos; un volumen de 2 ml de la suspensión de virus

completo purificado se emulsionó con un volumen igual de adyuvante completo de Freund (ACF) y se inyectó 0.2 ml por vía intramuscular en cada muslo trasero de los animales, 2 semanas después se hizo un inóculo con virus emulsificado en adyuvante incompleto de Freund, 0.2 ml en el mismo sitio y 2 semanas después se inoculó el virus, 0.2 ml sin adyuvante. El sangrado final se hizo 2 semanas después, por punción cardíaca. El título de anticuerpos en estos sueros fue  $\geq 1:1280$  medido por IH; Las inmunoglobulinas de estos sueros fueron precipitadas con sulfato de amonio al 50%, el paquete de proteínas se resuspendió en un volumen de PBS equivalente al original, se dializó a 4° C, 18 h con 4 cambios de PBS y se almacenó a -20° C.

#### PROGRAMA DE VIGILANCIA DE INFLUENZA EN HOUSTON, TEXAS PARA LA OBTENCION DE LAS MUESTRAS

La vigilancia sistemática de la infección por el virus de la influenza se ha mantenido desde 1974-75 a la fecha a través de clínicas del Departamento de Salud de la Ciudad y médicos familiares o pediatras privados, en total 17 sitios distribuidos en el área metropolitana, en los que durante todo el año se obtienen especímenes de pacientes con enfermedades agudas del aparato respiratorio y se colectan datos clínicos y demográficos de dichas personas. Estos sitios de atención primaria dan servicio a poblaciones representativas de todas las edades y grupos socioeconómicos de la ciudad de Houston. El período anual corresponde al año epidemiológico del 1º de Julio al 30 de Junio de cada año. En algunos casos se agotó la muestra de suero, en tal caso los hallazgos serológicos fueron asignados al año

correspondiente a la siguiente muestra disponible; cuando faltaron dos o mas muestras consecutivas se excluyeron del análisis los datos correspondientes.

### ESTUDIO DE FAMILIAS

Se hizo un estudio de seguimiento desde 1975 hasta 1989 en un grupo de 298 familias que fueron reclutadas para ser incluidas en la investigación a partir del nacimiento de un hijo, momento en que se tomó sangre (suero) del cordón umbilical, dentro de las siguientes 24 horas también se obtuvo sangre (suero) de cada uno de los miembros de la familia que compartían el mismo hogar. Se hicieron tomas subsecuentes de muestras de suero en los bebés a los 4, 8 y 12 meses de edad, y posteriormente 2 veces al año en primavera y otoño. También se hicieron tomas de muestras de suero bianuales a cada persona de la familia, en la misma fecha. En el momento de ocurrir una enfermedad respiratoria aguda, se hicieron lavados nasales o muestreos de faringe con hisopo para cultivo de virus, y muestras de suero de toda la familia. Las muestras de suero fueron mantenidas congeladas a  $-20^{\circ}$  C.

### CULTIVO DEL VIRUS

#### OBTENCION DE ESPECIMENES

Lavado Nasal: Con la cabeza del paciente inclinada hacia atrás se instiló en cada narina un volumen de 5 - 10 ml de medio de transporte, y se recolectó el líquido en un recipiente estéril

Muestreo faríngeo con hisopo: Se hizo un raspado de la pared posterior de la faringe con un par de hisopos estériles, y se colocaron en un frasquito con medio de transporte estéril. Las

muestras así tomadas se conservaron a 4° C hasta que se hizo la inoculación, dentro de las 24 horas siguientes. Los especímenes para el aislamiento de virus (faríngeos o nasales) fueron procesados mediante las técnicas de rutina<sup>(105)</sup> y posteriormente fueron congeladas a -70° C.

## CULTIVO DE VIRUS A PARTIR DE ESPECIMENES NASALES O FARINGEOS

### A.- LINEAS CELULARES

Los especímenes se inocularon en monocapas confluentes de células MDCK y LLC-MK<sub>2</sub>, (Whittaker Bioproducts Inc.) cultivadas en Medio Mínimo Esencial, Earle con 10% SBF (MME de crecimiento) en tubos de ensayo de 16 x 150; para inocular los especímenes se cambió este medio por MME sin SBF, con 2 µg/ml de tripsina, (Worthington, tratada con TPCK) y antibióticos: Neomicina, 250 µg/ml; Penicilina, 100 U/ml; Gentamicina, 50 µg/ml y Anfotericina, 250 µg/ml (MME de mantenimiento). La tripsina es necesaria para la activación de la infecciosidad viral<sup>(16,27)</sup>. El crecimiento viral se determinó por hemadsorción (Had): se decantó el medio de mantenimiento y se agregó al tubo una suspensión de eritrocitos de cobayo o rata al 0.1% en solución salina, se mantuvo a 4° C por 30 min y se observó al microscopio, buscando eritrocitos adheridos a la monocapa celular, esto se hizo en los días 5, 10 y 14, descartándose entonces los tubos.

La línea celular HMV-II se deriva de un melanoma humano, fue establecida y generosamente donada por el Dr. Tsutomu Kasuga, Segundo Departamento de Patología, Escuela de Medicina, Universidad

Médica y Dental de Tokio, Japón por medio de los Dres. Kyoto Nakamura e Hidekazu Nishimura, Departamento de Bacteriología, Escuela de Medicina, Universidad de Yamagata, Japón, quienes encontraron que éstas células son permisivas para el virus tipo C<sup>(84)</sup>. Las células de melanoma crecen en medio RPMI 1640, con 10% SBF; para el cultivo de virus se prepararon cultivos celulares en placas de fondo plano de 24 pozos, cada pozo con 2 ml de capacidad, 11 mm de diámetro; en cada pozo se sembraron  $1.5 \times 10^5$  células en 1 ml de medio de cultivo, se incubó la placa a 37° C hasta la aparición de una monocapa confluyente (aproximadamente 7 días). Para inocular especímenes faríngeos se removió el medio de crecimiento y se colocó medio RPMI 1640 sin SBF, con 10 µg de tripsina por ml. y antibióticos a las concentraciones antes mencionadas. El crecimiento viral se detectó por hemaglutinación, tomando una alícuota de 50 µl del medio de cultivo, y se mezcló con un volumen igual de una suspensión de eritrocitos de pollo al 0.5%, a 4° C por 30 - 45 min. en los días 5 y 10 post-infección, adicionalmente se hizo hemadsorción con eritrocitos de rata los días 10 y 14.

#### B.- HUEVO EMBRIONADO

Se inculó cada espécimen en dos huevos embrionados de gallina de 9 días de edad, 0.1 ml en la cavidad amniótica y 0.1 ml en la cavidad corioalantoidea; se incubaron por 72 h a 34° C, se refrigeraron (4° C) por 16 h para minimizar la contaminación por eritrocitos durante la cosecha y se colectaron por separado los fluidos de cada cavidad; el crecimiento viral se determinó por hemaglutinación (ver anteriormente).

## BUSQUEDA DEL VIRUS INFLUENZA C POR CULTIVO

### A).- ESTUDIO DE FAMILIAS.

Los especímenes usados en esta parte se mantuvieron congelados a  $-70^{\circ}$  C por 1 - 3 años<sup>(107)</sup>, corresponden a 27 niños participantes en el estudio de familias, en los que se detectó incremento en el número de anticuerpos contra el virus tipo C en 1987 - 1989, en 13 casos había un espécimen disponible, que correspondió al período del incremento de anticuerpos; cada espécimen fue inoculado en un cultivo de células HMV-II y en 2 embriones de pollo de 9 días de edad.

### B.- PROGRAMA DE VIGILANCIA DE INFLUENZA.

Se usaron 730 especímenes tomados de niños de 1 - 3 años de edad en el período Sept. 1987 - Abril 1990. Aquellos especímenes colectados en el otoño de cada año (287) fueron descongelados e inoculados cada uno en un cultivo de células HMV-II y en dos embriones de 9 días; el resto (443) solamente se inocularon en un cultivo de células HMV-II.

## EVIDENCIA SEROLOGICA DE INFECCION POR EL VIRUS INFLUENZA C

ELISA.- Se usaron placas rígidas de poliestireno, de fondo plano, primeramente se cubrió la fase sólida con una dilución de antígeno consistente en 8 unidades hemaglutinantes de virus completo purificado, en solución amortiguadora de carbonato, pH 9, 100  $\mu$ l por pozo, se mantuvo a  $4^{\circ}$  C por 16 a 18 h; en los pasos subsecuentes la reacción se llevó a cabo a  $25^{\circ}$  C, y en cada etapa se hicieron 3 lavados con solución de PBS-Tween 20 al 0.05%; la placa fue cubierta con 200  $\mu$ l de solución de PBS-albúmina sérica

bovina al 1%, por 1 hora. 100µl por pozo del suero a probar se añadió en diluciones seriadas al cuádruplo, principiando con 1:64, hasta una dilución de 1:262,000, se incubó por 16 h, luego se añadieron 100 µl suero de cabra anti-gamma globulina humana, se incubó por 5 h. Finalmente se agregaron 100 µl, de suero de cerdo anti-gamma globulina de cabra conjugado con fosfatasa alcalina (Laboratorios Caltag), se incubó por 16 h; como sustrato se usaron 100 µl p-nitrofenil fosfato disuelto en amortiguador de dietanolamina, durante 15 min, la reacción se detuvo con 100 µl de NaOH 3M y se midió el cambio de color como densidad óptica a 410 nm en un fotómetro Dynatech MR600<sup>(67)</sup>.

#### TRATAMIENTO DE SUEROS PARA DESTRUIR INHIBIDORES INESPECIFICOS DE LA HEMAGLUTINACION

Se realizaron los siguientes métodos<sup>(110)</sup>

- A).- INACTIVACION POR CALOR.- 56° C por 30 minutos.
- B).- ENZIMA DESTRUCTORA DE RECEPTORES (EDR).- A un volumen (vol.) de suero se le agregaron 2 volúmenes de EDR, 200 U/ml en sol. salina-calcio, se incubó por 16 - 18 h. a 37° C y se agregó un volumen de citrato de sodio al 7%.
- C).- PERIODATO DE POTASIO.- A un vol. de suero se agregaron 2 vol. de solución de KIO<sub>4</sub> (0.02 M) recién preparada, se incubó a 25° C por 15 min y se agregó 1 vol. de glicerol al 1% en sol. salina.
- D).- ADSORCION CON CAOLIN.- A un vol. de suero se agregaron 4 vol. de suspensión de caolín al 25% en PBS, se incubó por 30 minutos a 25° C y se centrifugó a 3000 rpm en una centrifuga de mesa, y se recogió el sobrenadante.

E).- ADSORCION CON ERITROCITOS DE POLLO.- 0.1 vol de eritrocitos lavados en PBS se resuspendieron en un vol. de suero y se incubó a 4° C por 30 min., se centrifugaron a 1,500 rpm y se colectó el sobrenadante.

**REMOCION DE INMUNOGLOBULINA SERICA POR ADSORCION CON PROTEINA A.-**

Se usó una suspensión de S. aureus productor de proteína A tratado con formol (Bethesda Research Laboratories), resuspendiendo el paquete de bacterias en el suero a volúmenes iguales, se incubó a 25° C por una hora y se centrifugó a 3000 rpm, colectándose el sobrenadante.

**REACCION DE INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION.-** Se usaron placas de microtitulación rígidas de poliestireno de fondo cónico, 96 pozos, se hicieron diluciones de suero seriadas al doble en 25  $\mu$ l de PBS, la reacción se llevó a cabo a 4° C, el suero fue inactivado por calor y no fue necesario tratarlo para remover inhibidores inespecíficos (Ver: estandarización de las técnicas serológicas en la sección de resultados) la dilución inicial fue 1:4, a cada dilución se le agregó 25  $\mu$ l de una suspensión de 4 unidades hemaglutinantes (estándar del Centro de Control de Enfermedades, Atlanta, Ga.) de virus C/Taylor/ 1233/47, se incubó por una hora, se agregaron 50  $\mu$ l por pozo de una suspensión de eritrocitos de pollo al 0.5%, se dejaron sedimentar por 45 a 60 min; el título de anticuerpos séricos se tomó como la última dilución del suero que inhibió la hemaglutinación.

**MICRONEUTRALIZACIÓN.-** Se hizo una modificación de la técnica de Frank<sup>(106)</sup>, se cultivaron células MDCK de entre 70 y 80 pases, en



placas de microtitulación de 96 pozos, de fondo redondo, con una siembra de  $1 \times 10^5$  células por pozo en 0.1 ml de Medio Mínimo Esencial, Earle, 10% de SBF, se dejaron crecer por 48 horas hasta alcanzar confluencia en la monocapa, luego se cambió el medio de cultivo por medio de mantenimiento, 50  $\mu$ l MME sin SBF con antibióticos (ver anteriormente). Cada suero fue inactivado a 56° C por 30 min. Se usaron placas de transferencia (Dynatech) para preparar diluciones de suero seriadas al doble con medio de mantenimiento, en una placa de transferencia; la dilución inicial fue 1:2, en 25  $\mu$ l de MME. A cada dilución de suero se le agregó una suspensión de virus C/Taylor/1233/47 en MME con 2% de suero normal de hámster, la suspensión se ajustó a una concentración de 16 a 50  $\text{DICT}_{50}/25 \mu\text{l}$ ; la mezcla suero-virus se incubó por 1 hora a 25° C, y se hizo la inoculación sobreponiendo la placa de transferencia a la placa con las células, ésta se incubó a 34° C en una atmósfera de 5%  $\text{CO}_2$ , por 18 horas y se cambió el medio por MME sin SBF con tripsina, 4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y antibióticos, se incubó por 6 días en las mismas condiciones; la lectura de la prueba se hizo agregando a cada pozo 50  $\mu$ l de eritrocitos de pollo al 1%, se mantuvo la placa a 4° C por 45 min; el título de anticuerpos se tomó como la última dilución del suero que impidió el crecimiento viral, éste se determinó por aglutinación de eritrocitos.

## RESULTADOS

### ESTANDARIZACION DEL CULTIVO DE VIRUS.

Se hicieron titulaciones de dos lotes de virus, C<sub>2</sub> y C<sub>3</sub> en donde se comparó la sensibilidad del cultivo en huevo, en células de riñón de mono (primarias) y en líneas celulares MDCK y HMV-II. El cultivo en embrión de pollo resultó en títulos  $>1 \times 10^9$ , (lote C<sub>2</sub> y  $1 \times 10^9$ , (lote C<sub>3</sub>) comparado con títulos de  $1 \times 10^{6.3}$  y  $1 \times 10^{7.8}$  para los diversos cultivos celulares, los resultados se muestran a continuación.

**TABLA 1.- EFICIENCIA DE LOS DIFERENTES SISTEMAS DE ENSAYO PARA EL CULTIVO DE VIRUS INFLUENZA TIPO C**

VIRUS <sup>a</sup>	HUEVO	MDCK	RhMK	HMV-II
Lote C <sub>2</sub>	$\geq 10^9$	$10^{6.8}$	$10^{6.3}$	ND
	$\geq 10^9$	$10^{7.8}$	$10^{6.8}$	ND
Lote C <sub>3</sub>	$10^9$	$10^{6.5b}$	ND	$10^{6.8}$

a = Rendimiento del virus en unidades infecciosas por ml.

b = Título medio geométrico de 9 titulaciones.

Los eritrocitos de cobayo, se adsorben en las células infectadas por el virus tipo A y B pero no con virus tipo C; los eritrocitos de rata se adsorben con los tres tipos de virus, si bien, con el tipo C solo se alcanza a un máximo de 2+ que corresponde al 50% de la monocapa celular con eritrocitos adsorbidos (ver Tabla 2).

**TABLA 2.- COMPARACION DE LA HEMADSORCION DE ERITROCITOS DE DIFERENTES ESPECIES EN CELULAS INFECTADAS CON VIRUS INFLUENZA.**

TIPO DE VIRUS	HEMADSORCION MAXIMA <sup>a</sup>		
	Cobayo <sup>b</sup>	Rata <sup>b</sup>	Cobayo y Rata <sup>c</sup>
A/Taiwan/1/86/(H <sub>1</sub> N <sub>1</sub> )	4+	4+	4+
A/Mississippi/1/85/(H <sub>3</sub> N <sub>2</sub> )	3-4+	3-4+	3-4+
B/Victoria/2/87	4+	4+	4+
C/Taylor/1233/47	0	1-2+	1-2+

a = Rango de hemadsorción: 1+ = 25%, 2+ = 50% 3+ = 75%, 4+ = 100%

b = Suspensión al 0.01% en solución salina.

c = Mezcla de eritrocitos de las dos especies a partes iguales, concentración final: 0.02%.

Se buscó determinar la capacidad del virus de conservar la infecciosidad a 4° C por tiempo prolongado, considerando que una vez tomados los especímenes, en ocasiones no es posible inocularlos el mismo día, por lo que se tienen que almacenar en refrigeración. La curva de supervivencia del virus (Fig. 2) muestra un título de virus inesperadamente bajo en el día 0, de 1.6 log<sub>10</sub> /25 µl en el lote C<sub>3</sub> y 2.3 log<sub>10</sub>/25 µl en el lote C<sub>2</sub>; los títulos de virus permanecieron sin cambio hasta por cinco días. La curva de crecimiento del virus en placa de microtitulación (Fig. 3), muestran que se alcanzan títulos suficientes de virus, 5 y 6.5 log<sub>10</sub>, al 6º día, por lo que se escogió leer la prueba ese día.

#### BUSQUEDA DEL VIRUS POR CULTIVO

ESTUDIO PROSPECTIVO. Se buscó cultivar el virus influenza tipo C a partir de especímenes obtenidos dentro del programa de vigilancia de influenza en un período de dos años comprendido entre octubre de 1988 y octubre de 1990 (Fig. 4); en dicho período se procesaron 2,374 especímenes de exudado faríngeo tomados de

**FIG 2 VIABILIDAD DEL VIRUS TIPO C  
MANTENIDO A 4 C EN VIB**

▲—▲ Lote C3

●---● Lote C2

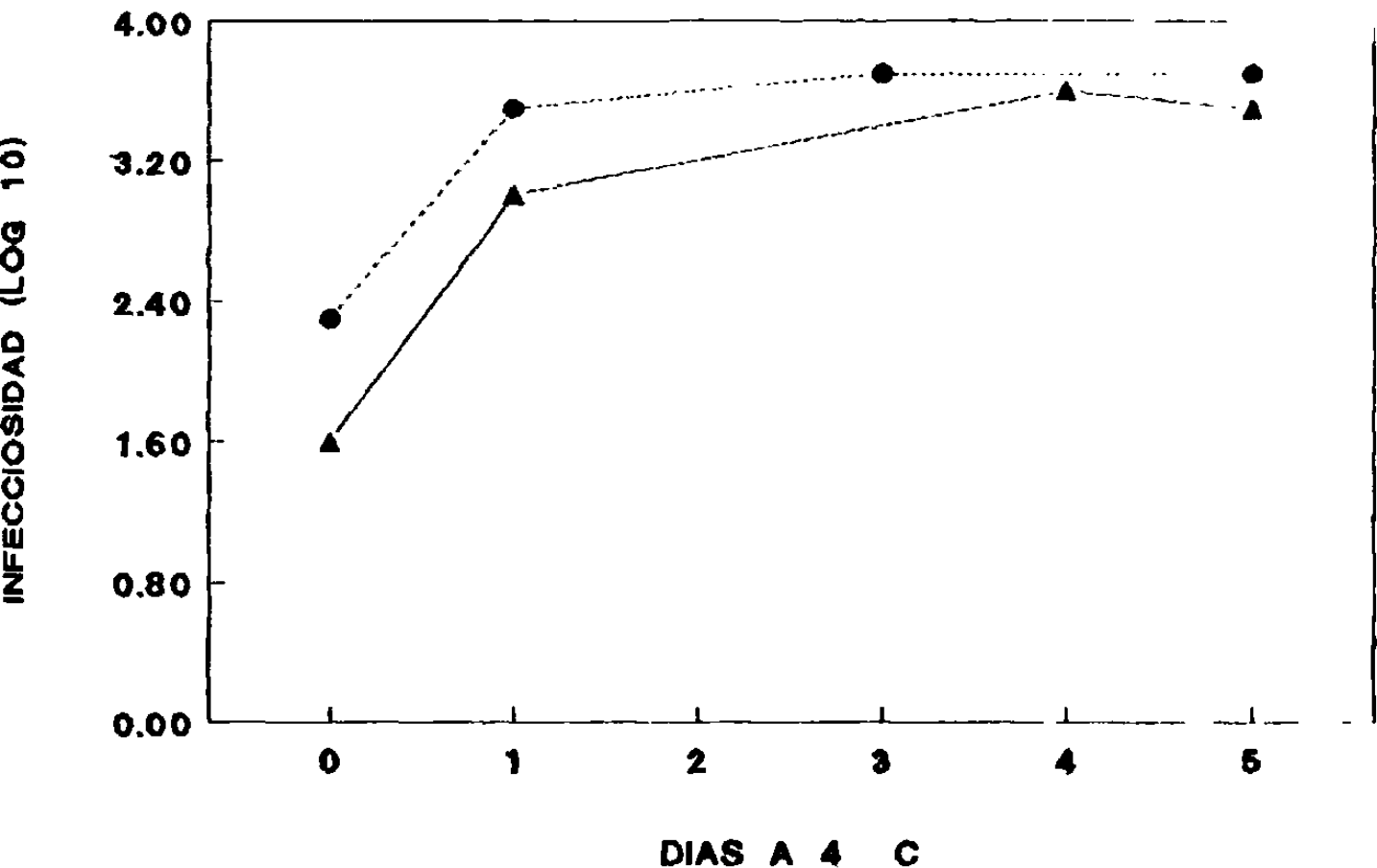


FIG. 2.- VIABILIDAD DEL VIRUS C/TAYLOR/1233/47 DURANTE EL ALMACENAMIENTO A 4°C EN MEDIO DE TRANSPORTE DE CALDO DE INFUSION DE TERNERA. LAS TITULACIONES SE HICIERON EN MICROPLACAS DE CÉLULAS MDCK, DETERMINACIÓN ÚNICA.

### FIG 3 MICRONEUTRALIZACION CRECIMIENTO DEL VIRUS TIPO C (LOTE C3)

▲—▲ MAXIMO      ■---■ MEDIO      ● ● MEDIA DE 3 PRUEBAS

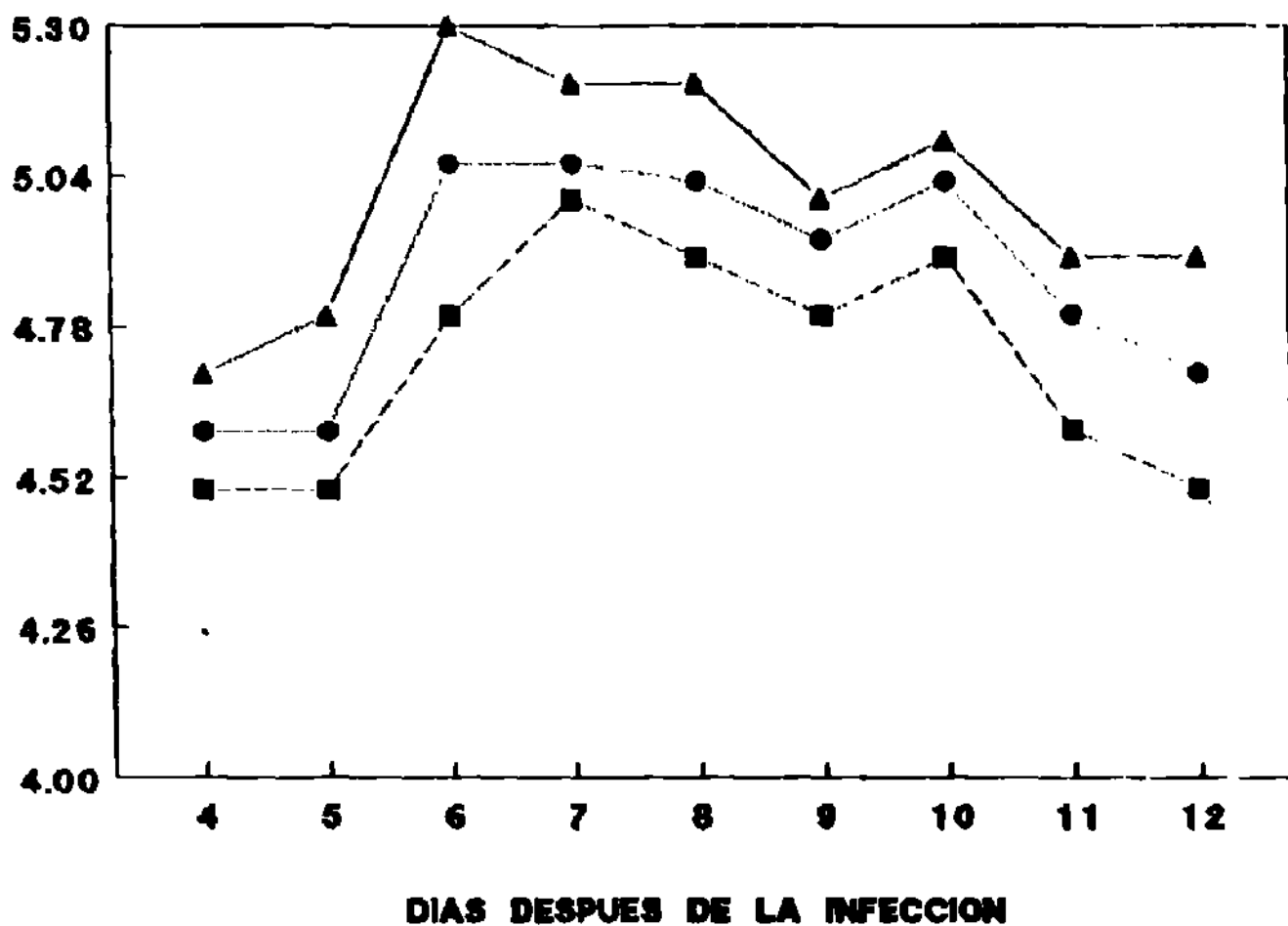


FIG. 3.- TITULACIÓN DEL VIRUS C/TAYLOR/1233/47 EN MICROPLACAS DE CÉLULAS MCDK PARA LA DETERMINACIÓN DEL TIEMPO ÓPTIMO DE LECTURA EN LA PRUEBA DE MICRONEUTRALIZACIÓN.

### FIG 4 ESPECIMENES PROCESADOS PARA CULTIVO DEL VIRUS TIPO C

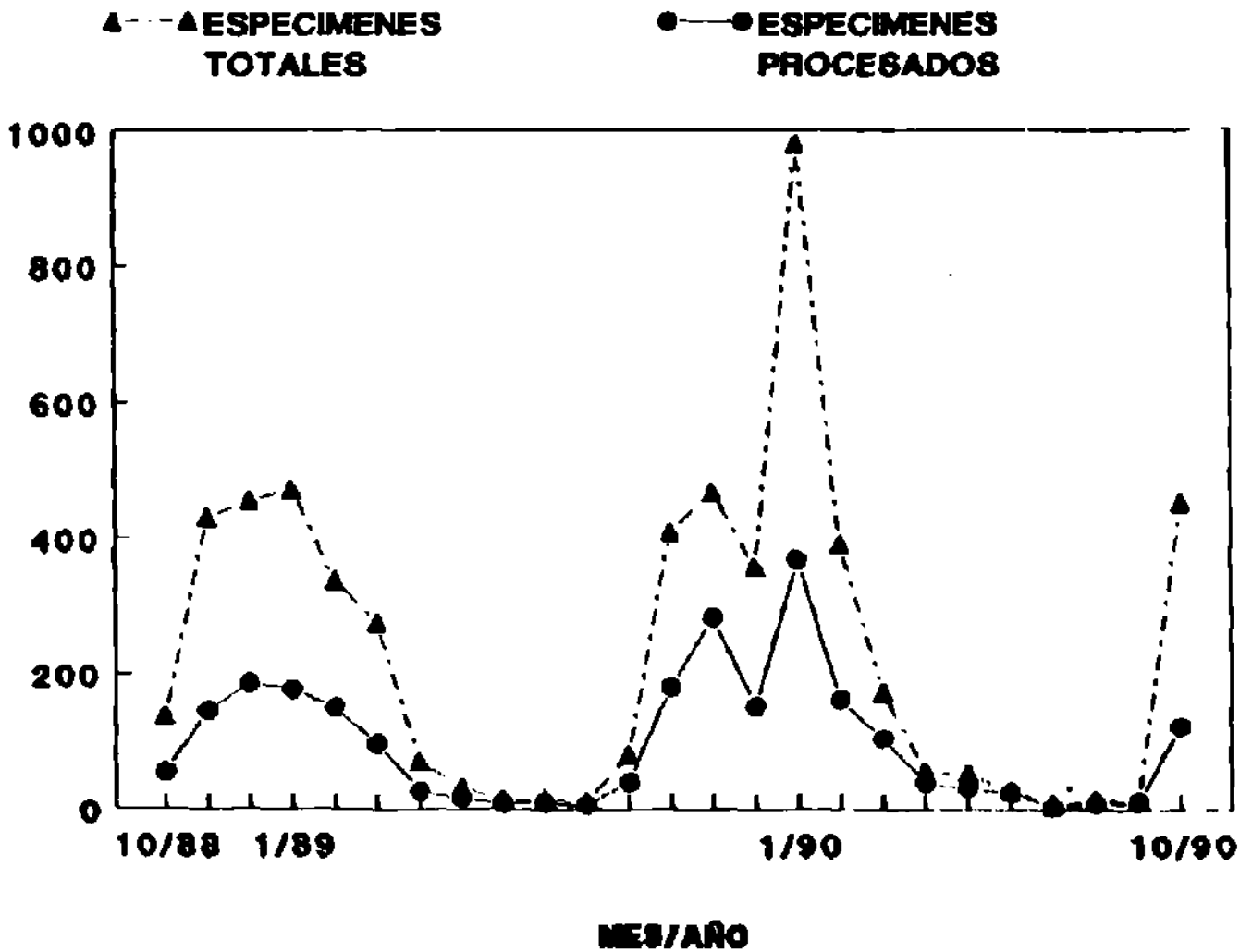


FIG. 4.- NÚMERO DE ESPECÍMENES TOMADOS DE PACIENTES CON ENFERMEDAD RESPIRATORIA AGUDA EN EL PROGRAMA DE VIGILANCIA DE INFLUENZA Y NÚMERO DE ESPECÍMENES PROBADOS POR CULTIVO BUSCANDO AISLAR EL VIRUS INFLUENZA TIPO C.

personas con síntomas de enfermedad respiratoria aguda; los cultivos de células MDCK fueron absorbidos con eritrocitos de rata. No se detectaron virus tipo C en este estudio.

**ESTUDIO RETROSPECTIVO.** Se usaron especímenes almacenados a  $-70^{\circ}$ , tomados de niños de 1 a 3 años en el programa de vigilancia de influenza. Se aislaron 6 virus identificados como Parainfluenza tipos 1 y 2. En 13 especímenes de niños con aumento en el título de anticuerpos contra el virus tipo C, no se hallaron virus, (Tabla 3)

**TABLA 3.- RESULTADOS DEL CULTIVO DE ESPECIMENES RESPIRATORIOS COLECTADOS DE NIÑOS DE 1 - 3 AÑOS DE EDAD, QUE SUFRÍAN ENFERMEDAD RESPIRATORIA AGUDA.**

Fuente de Especímenes	Tiempo de colección en 1987 -1989	Número	No. de aislamientos	
			Huevos	HMV-II <sup>a</sup>
Vigilancia en la Comunidad	Sept 1 - Dec 31	287	0	6 <sup>b</sup>
	Jan 1 - Aug 31	443	NE	0
Estudio de Familias	Nov 1 - Dic 31	13	0	0

a = Línea celular de Melanoma Humano.

b = Todas las cepas se identificaron como virus Parainfluenza.

NE= No Efectuado.

#### **ELISA PARA DETECCIÓN DE ANTIGENO.**

Mediante ésta técnica se permite la identificación de cepas de virus tipo C aislados en cultivos celulares o en embrión de pollo, (Fig. 5) se puede diferenciar claramente entre el tipo C y los tipos B, A/H<sub>1</sub>N<sub>1</sub> y A/H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>; el límite de sensibilidad de la prueba en términos de cantidad de antígeno viral es de 0.5 UHA, lo que corresponde a  $1 \times 10^{5.9}$  DIH<sub>50</sub>.

#### **DETECCION DEL VIRUS POR LA ACTIVIDAD DE ESTERASA**

El ensayo de esterasa (Fig 6) es otra técnica implementada

## FIG 5 ELISA PARA DETECTAR VIRUS INFLUENZA TIPO C

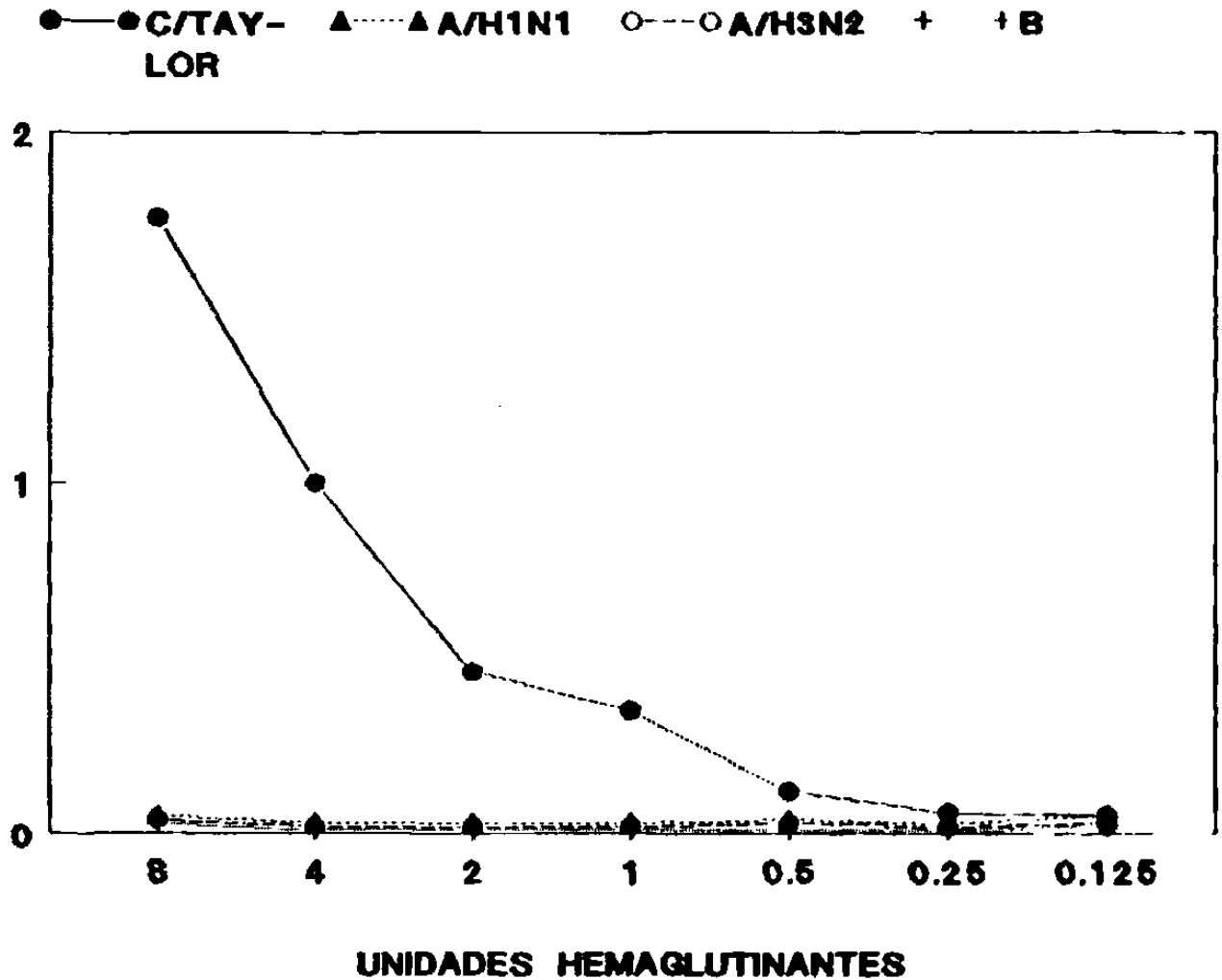


FIG. 5.- ELISA EFECTUADA CON UN ANTICUERPO DE COBAYO PARA LA CAPTURA DEL VIRUS INFLUENZA C/TAYLOR/1233/47; LA PRESENCIA DEL ANTIGENO FUE DEMOSTRADA CON ANTICUERPOS DE CONEJO ANTI-C/TAYLOR/Y CONJUGADO DE CABRA -- ANTI-GAMMAGLOBULINA DE CONEJO. SE COMPARÓ LA REACTIVIDAD CON LOS VIRUS A Y B.



### FIG 6 ENSAYO DE ESTERASA VIRUS C/TAYLOR/1233/47

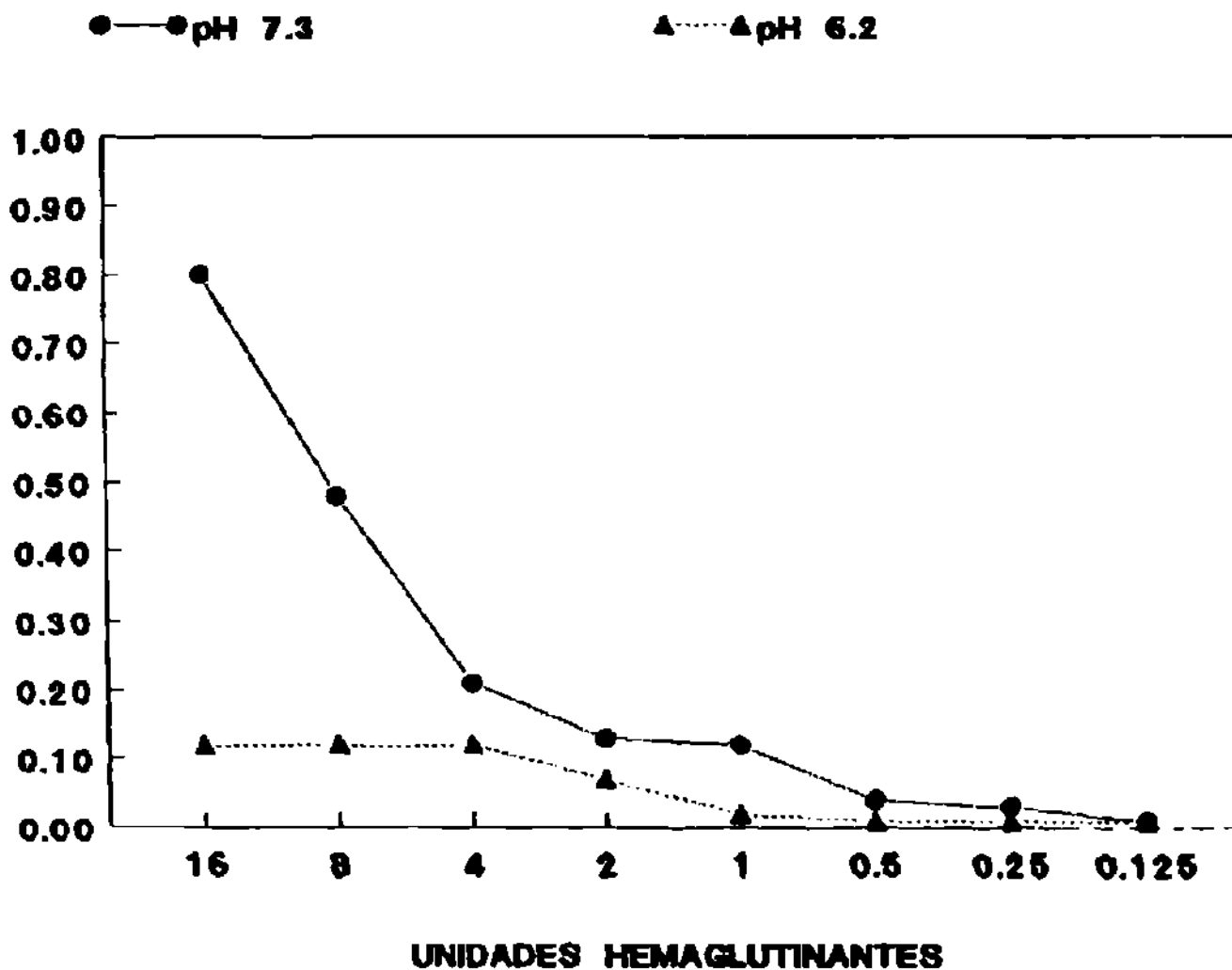


FIG. 6.- ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DE LA ESTERASA DEL VIRUS INFLUENZA TIPO C USANDO P-NITRO FENIL ACETATO (PNFA) COMO SUBSTRATO.

para la identificación de virus tipo C, la sensibilidad a pH de 7.3 es de 0.5-1 UHA, (similar a la técnica ELISA) a pH 6.2 la sensibilidad es de 1-2 UHA, en ambos casos el substrato es P-Nitrofenil-acetato (PNFA) 1 mM. Se probaron concentraciones de PNFA 1, 2, 4 y 8 mM, pH 7.3 para detectar la actividad de esterasa de virus tipo C; los valores absolutos de lectura como densidad óptica (DO) a 410 nm, aumentan en proporción directa con la concentración de substrato pero la sensibilidad de la técnica se incrementa solo en forma mínima: de 0.25 a 0.5 UHA, las concentraciones 4 y 8 mM presentaron problemas de solubilidad y aparición espontánea de color. En la Fig. 7 se ilustran los resultados de la especificidad de la prueba de esterasa, los virus influenza tipo A y B carecen de esta actividad enzimática, y es posible diferenciarlos del tipo C hasta una concentración de 0.5 UHA, (substrato PNFA, 1 mM pH7.3).

#### ESTANDARIZACION DE LAS TECNICAS SEROLOGICAS

Las técnicas serológicas para la medición de anticuerpos contra el virus influenza C disponibles a la fecha en que se realizó este estudio eran: Inhibición de la Hemaglutinación (IHA<sup>61</sup>) y ELISA<sup>(65)</sup>; para este trabajo se hizo una adaptación de la técnica de microtitulación<sup>(104)</sup> en células MDCK, usando el virus tipo C completo como antígeno para medir la respuesta de anticuerpos.

#### 1).- INHIBICIÓN DE LA HEMAGLUTINACIÓN

Se hicieron experimentos para confirmar que no es necesario tratar el suero para remover inhibidores no específicos<sup>(61,64)</sup> se comparó el título de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación en el suero antes y después de tratamiento con EDR, Caolín, KIO<sub>4</sub> y calor (56°

## FIG 7 PRUEBA DE ESTERASA COMPARACION DE TIPOS A B y C

■ A/TAIWAN  
H1 N1
 

 ▲ B/ANN  
ARBOR
 

 ● C/TAYLOR

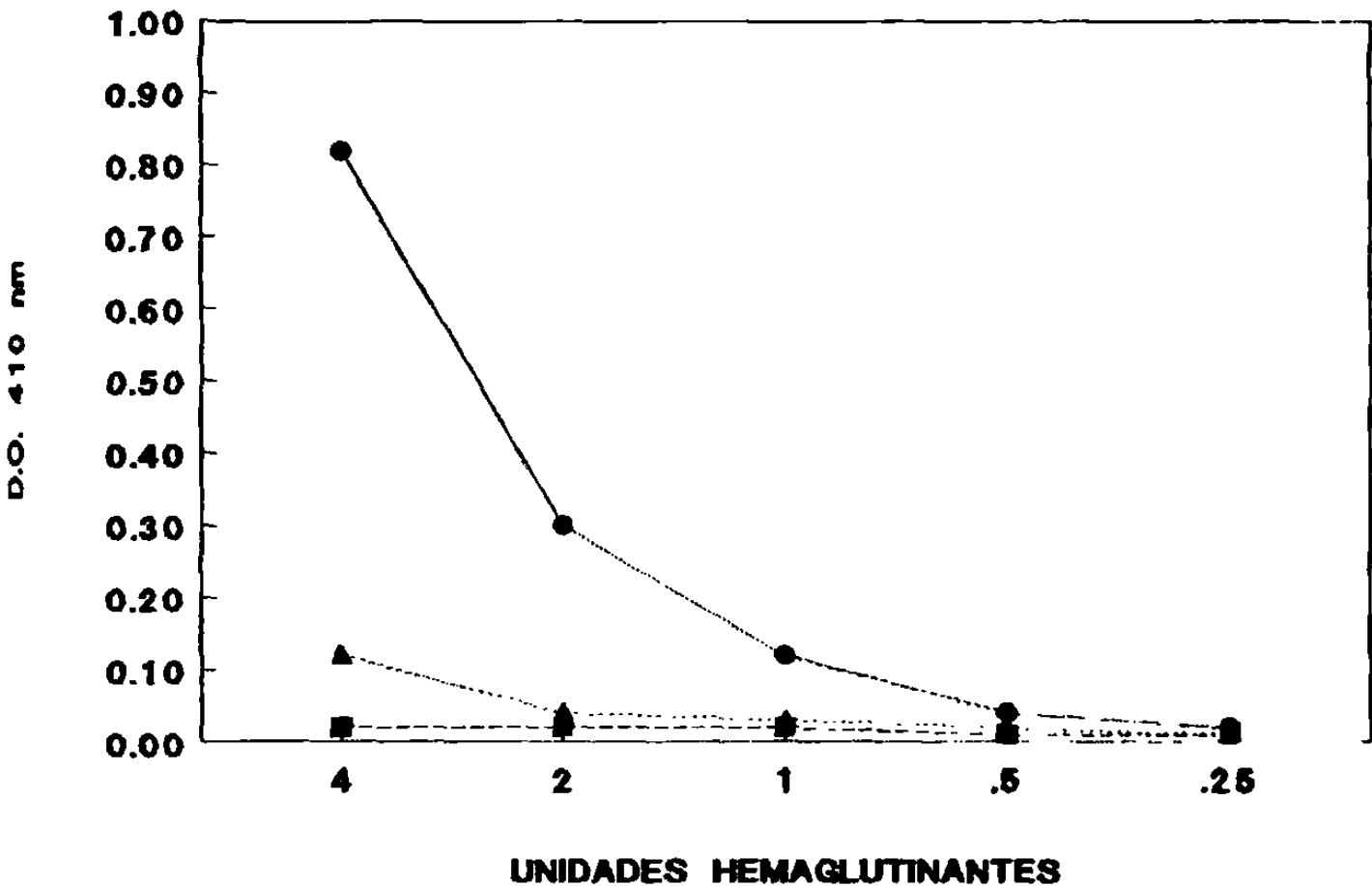


FIG. 7.- COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ESTERASA DE LOS VIRUS A/TAIWAN 1/86/(H,N,), B/ANN/ARBOR Y C/TAYLOR/1233/47. PNFA 1 UM PH 7.3

C, 30 min.). En ninguno de los tres sueros hubo diferencia mayor de un factor de dilución (1 tubo) con los métodos de  $KIO_4$  y calor, con caolín y EDR las diferencias observadas llegaron a 2 factores de dilución (2 tubos) como máximo (Tabla 4).

**TABLA 4.- COMPARACION DE TRATAMIENTOS PARA REMOVER LOS INHIBIDORES NO-ESPECIFICOS DEL SUERO HUMANO**

No. de Suero		P R O C E D I M I E N T O				
		Ninguno	EDR	Caolín	$KIO_4$	Calor <sup>a</sup>
86577	No Ads	16 <sup>b</sup>	16	4	8	8
	Ads <sup>c</sup>	16	8	4	8	16
86580	No Ads	16	8	8	8	8
	Ads	8	4	4	8	8
86582	No Ads	64	64	64	64	32
	Ads	64	64	32	32	32

a = 56 °C por 30 minutos.

b = Título expresado como la recíproca de la dilución.

c = Adsorbido con eritrocitos de pollo.

Otra forma de detectar inhibidores no específicos se hizo con la comparación de títulos de un mismo suero resultantes del tratamiento para remover inhibidores y adsorción con proteína A para ligar anticuerpos IgG, en este caso hubo un título de anticuerpos de 1:4 después de la adsorción con *S. aureus* productor de proteína A, fijado con formalina. Estos anticuerpos residuales no se pudieron adsorber aún después de repetir el procedimiento; los títulos obtenidos después de los diversos tratamientos para inhibidores no específicos son comparables, con una diferencia no

mayor de un factor de dilución (1 tubo).

La reproducibilidad de la técnica de IH midió comparando s títulos de dos alícuotas de cada uno de 53 sueros de pe adultas. Las diferencias fluctuaron con una diferencia de un t entre los dos títulos.

**2) ELISA.-** Se determinó la cantidad mínima de antígeno (vi s completo purificado) necesaria para cubrir la fase sólida poliestireno en cada pozo de la placa de microtitulación (fig. 8 la máxima lectura se obtuvo con una concentración equivalente a 64 UHA por ml, a una dilución de 1:32,000 la DO a 410 nm todavía f é más de 5 veces mayor que la lectura de DO 0.01 correspondiente al control negativo (pozo no cubierto con antígeno). La concentración más baja incluida en esta prueba fué 0.5 UHA y en este ca o curva de lecturas fué muy baja. Se escogió una concentración d UHA, para permitir el ahorro de antígeno, pero aún teniendo consistentemente lecturas de 4 veces o más la cifra del con r negativo. También se compararon los tiempos de incubación estándar usados en un ensayo similar para medir anticuerpos vs. los virus y B: 18 horas para el suero problema y 5 horas para el sue d cabra anti-humano con tiempos más cortos (Fig 9) 3 horas y 1 ra cada uno; el tiempo de 3 horas reveló una curva de lectu y título del suero similar a los tiempos estándar; las incubaci nes de una hora, tuvieron una lectura máxima de 25% de las anter or s pero las lecturas de fondo se redujeron en la misma proporci , pudiendose determinar el mismo título en el suero: 1:64 tomando la última dilución que dió una lectura mayor al dobl lectura correspondiente al control negativo. Un suero en 1

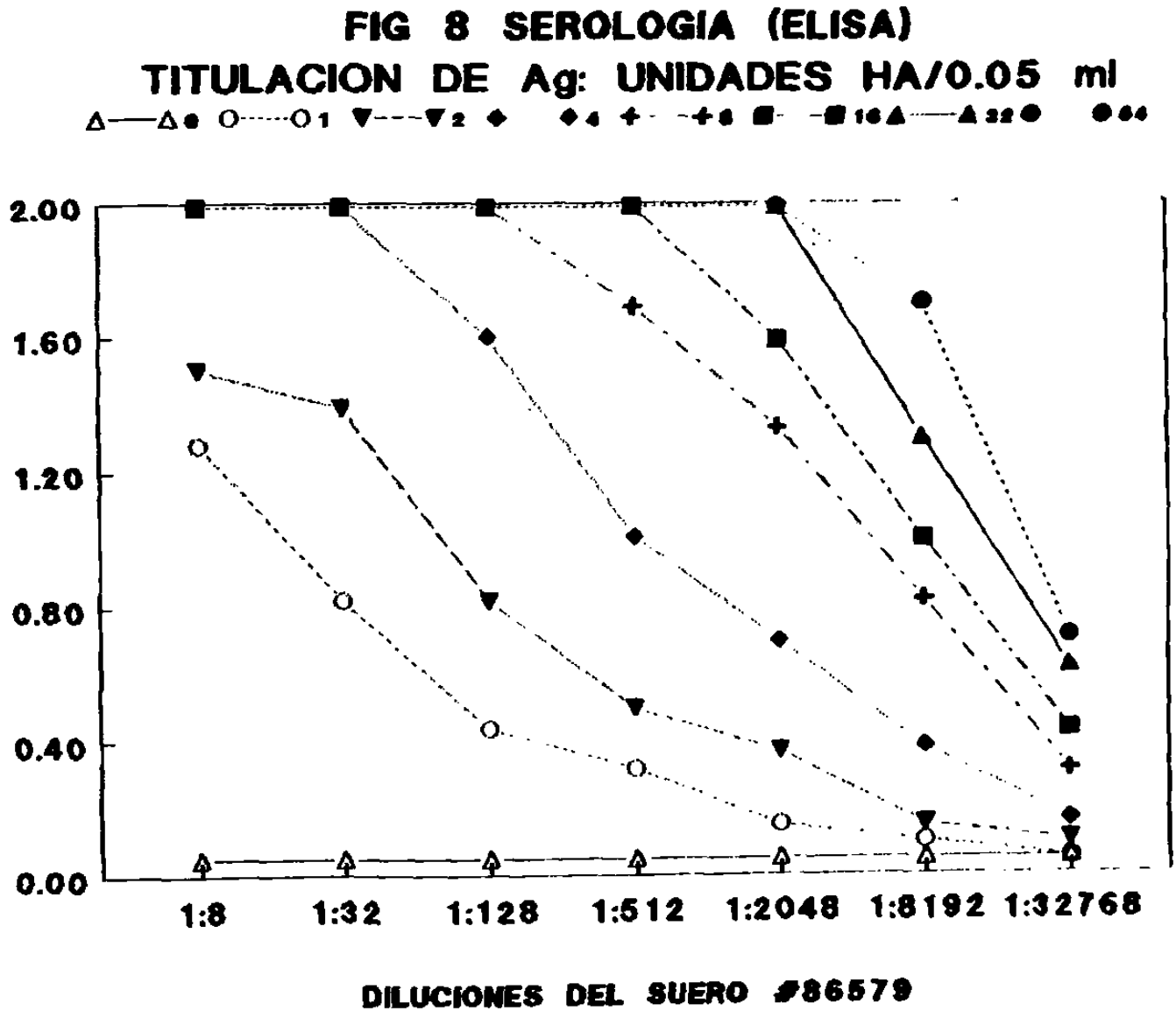


FIG. 8.- DIFERENTES CONCENTRACIONES DE VIRUS INFLUENZA C/TAYLOR/1233/47 PROBADAS CON LA TÉCNICA ELISA PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS HUMANOS CONTRA EL VIRUS.

## FIG 9 VARIACION DE TIEMPO (ELISA)

FONDO

SUERO POSITIVO

○ — 10 hrs    △ — 5 hrs    □ — 1 hr    ● — 10 hrs    ▲ — 5 hrs    ■ — 1 hr  
                   5 hrs                   3 hrs                   1hr                   5 hrs                   3hrs                   1 hr

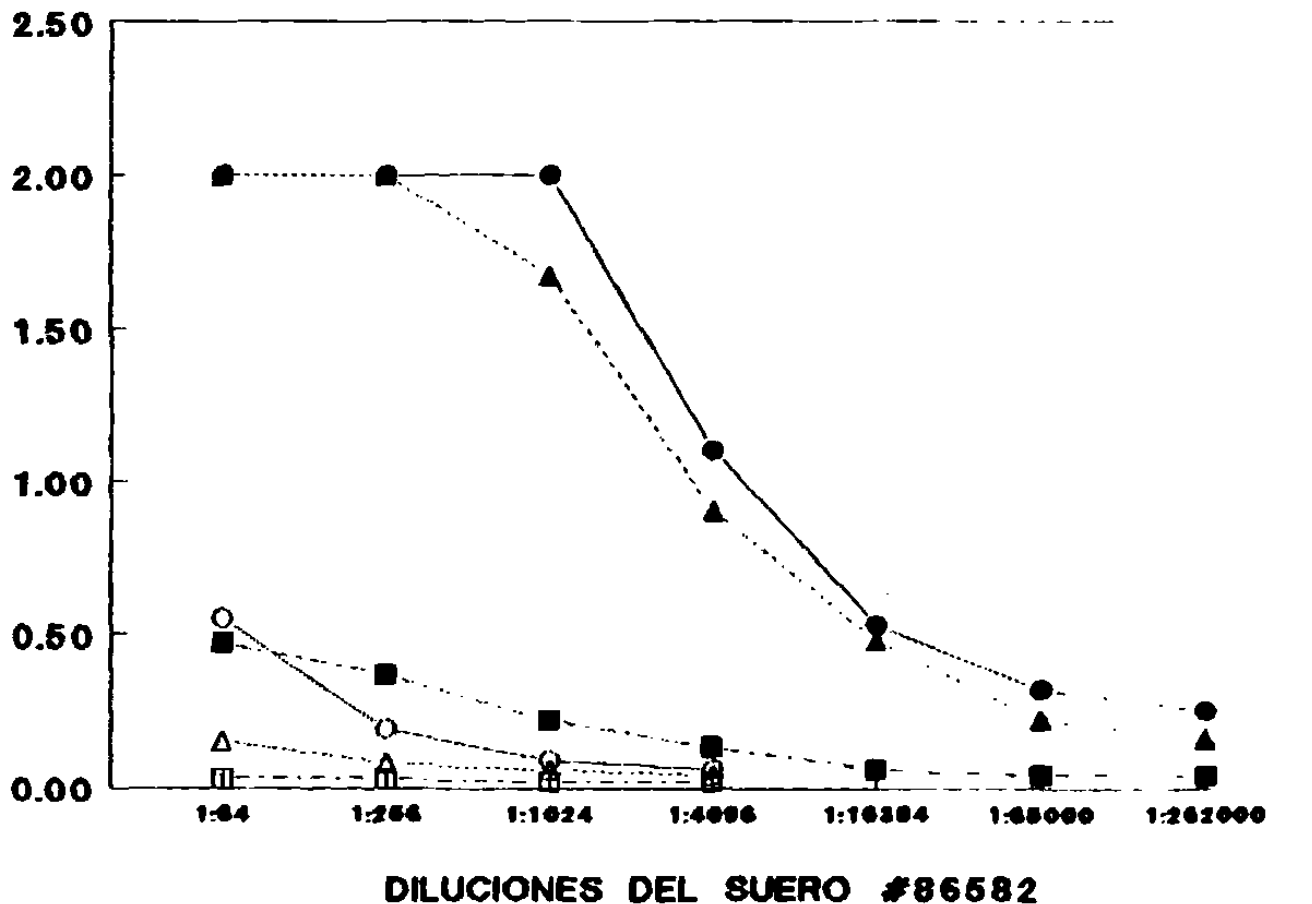


FIG. 9.- VARIACIÓN EN LOS TIEMPOS DE INCUBACIÓN PARA EL SUERO DE CABRA ANTIGAMMAGLOBULINA HUMANA (VALOR SUPERIOR) E IGG DE CERDO ANTIGAMMAGLOBULINA DE CABRA, CONJUGADA CON FOSFATASA ALKALINA (VALOR INFERIOR) EN ENSAYO ELISA PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS HUMANOS CONTRA EL VIRUS INFLUENZA TIPO C.

previamente se demostraron anticuerpos se adsorbió con proteína A de S. aureus y se comparó el título de anticuerpos antes y después de la adsorción para comprobar que la técnica ELISA mide anticuerpos IgG (Fig. 10), se emplearon tiempos de incubación de 1 hora para el suero humano y el 2o. anticuerpo (de cabra, anti-gamma globulina humana), la adsorción removió las IgG, resultando una curva de lectura semejante al control negativo.

En la reproducibilidad de ELISA hubo diferencias de -2 factores de dilución en 4 sueros (7%) y de +2 factores de dilución en 19 (36%); no hubo diferencia entre -4 y +4 factores de dilución, por lo que se aceptó este límite para determinar incrementos en el título de anticuerpos.

### 3) MICRONEUTRALIZACIÓN.

Primeramente se verificó la concentración de tripsina necesaria para el crecimiento viral. Se probaron concentraciones de tripsina de 1, 2 y 4  $\mu\text{g}$  /ml, por triplicado; no se usaron mayores concentraciones porque ocurre daño celular y la monocapa de células se desprende. Se observó un incremento de  $2.19 \log_{10}$  en el título de infecciosidad con el uso de tripsina ( $p = 0.01$ ), mientras que en la concentración de tripsina de 1 - 4  $\mu\text{g}$ /ml hubo una diferencia de  $0.03 \log_{10}$ , ( $p = .72$ ), se utilizó una concentración de 4  $\mu\text{g}$  para asegurar la actividad enzimática por mayor tiempo a la temperatura de incubación:  $34^{\circ}\text{C}$  (Tabla 5).



## FIG 10 ADSORCION DE SUERO CON PROTEINA A

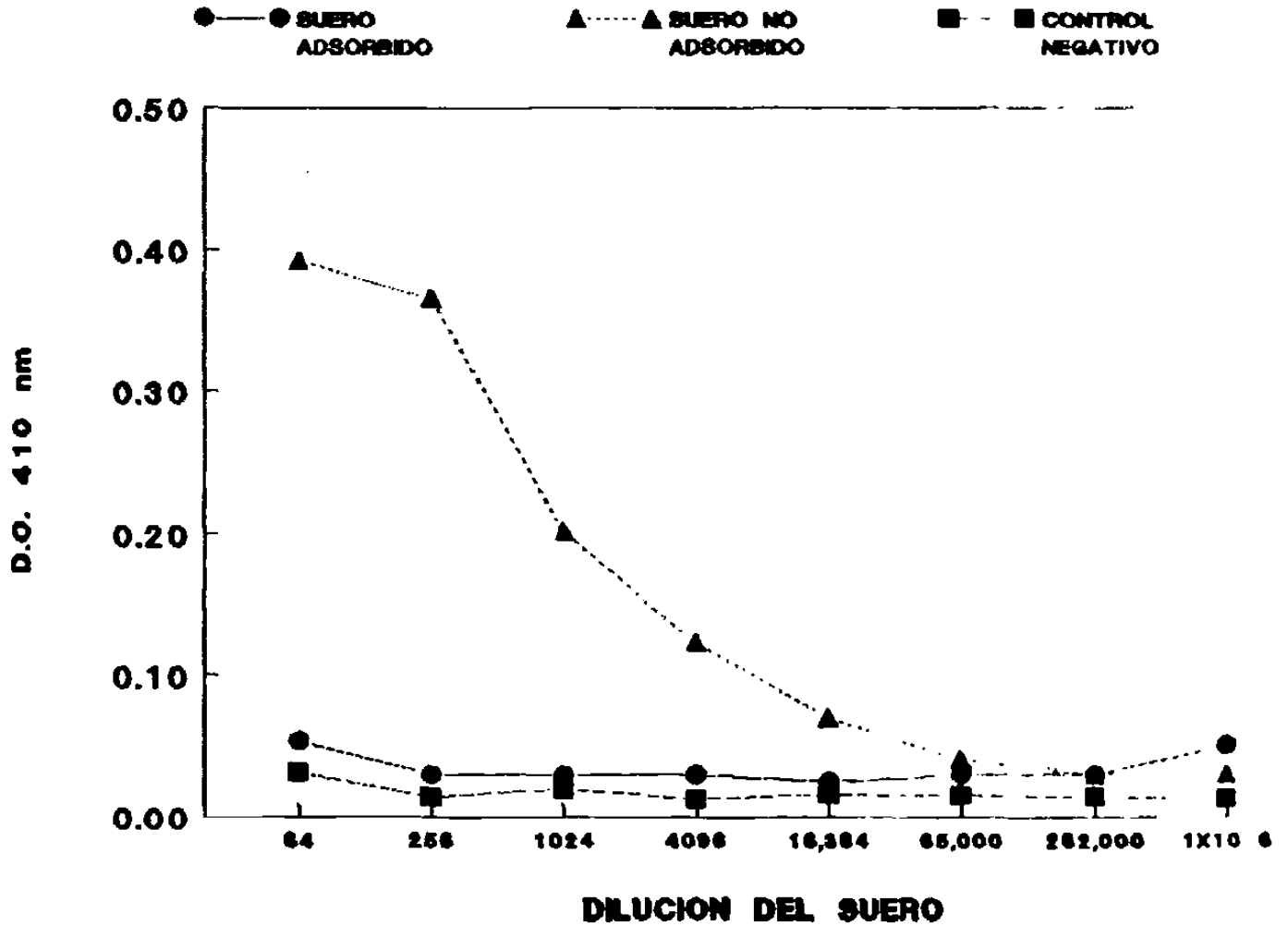


FIG. 10.- COMPARACIÓN DE LAS LECTURAS DE DENSIDAD ÓPTICA EN ELISA PARA DETECTAR ANTICUERPOS HUMANOS, DESPUÉS DE REMOVER IgG POR ADSORCIÓN CON PROTEÍNA A DE S. AUREUS,

**TABLA 5.- EFECTO DE LA CONCENTRACION DE TRIPSINA SOBRE EL CRECIMIENTO DEL VIRUS TIPO C**

	PLACA 1	PLACA 2	PLACA 3	T.M.G. <sup>o</sup>
4 $\mu\text{g/ml}^b$	4.83 <sup>c</sup>	4.41	4.83	4.69
2 $\mu\text{g/ml}$	4.66	4.58	4.75	4.66
1 $\mu\text{g/ml}$	4.83	4.58	4.75	4.72
0	2.50	2.50	2.50	2.50

a = Título Medio Geométrico.

b = concentración de Tripsina Worthington.

c =  $\log_{10}$  por 25  $\mu\text{l}$ .

En la curva de crecimiento viral (Fig. 3) se observan títulos elevados desde el 4o. día. El máximo título de infecciosidad se obtuvo al 6o. día, manteniéndose constante este título hasta el día 12, por lo que se decidió hacer la lectura de todas las pruebas al 6o. día. Se midió el título de infecciosidad como la última dilución de la suspensión viral que después de 6 días de incubación en las células MDCK indujo aparición de actividad hemaglutinante en el medio de cultivo, esta actividad se demostró agregando 50  $\mu\text{l}$  de una suspensión de eritrocitos de pollo al 1%, que se deja sedimentar por una hora. Se compararon los títulos de infecciosidad obtenidos con eritrocitos de pollo y de rata, observándose una diferencia máxima de 0.5  $\log_{10}$  entre los títulos obtenidos ( $p < 0.1$ ), también se compararon 3 temperaturas diferentes: 4, 25 y 37° C, resultando títulos idénticos a 37 y 4° C, y una diferencia de 0.4  $\log_{10}$  entre estos y 25° C para los eritrocitos de rata; con los eritrocitos de pollo los títulos a 4 y 37° C también son idénticos, pero hay una diferencia de 0.1  $\log_{10}$  entre estos y los títulos a 25° C. Las pequeñas diferencias encontradas observadas parecen indicar que los eritrocitos de rata son más sensibles que los de pollo,

pero se decidió usar esta última especie por ser mas fáciles de obtener, mas estables durante el lavado y sedimentar mas pronto. La lectura de la prueba se incubó a 4° C para retardar la elución de los virus y conservar el patrón de hemaglutinación.

**TABLA 6.- EFECTO DE LA TEMPERATURA Y ESPECIE DE ERITROCITOS EN EL TITULO DE HEMAGLUTINACION DEL VIRUS TIPO C**

Temperatura de incubación	Especie de Eritrocitos <sup>a</sup>	
	Rata	Pollo
4° C	5.5 <sub>b</sub>	5.0
25° C	5.1	5.1
37° C	5.5	5.0

a = suspension al 1%, 50  $\mu$ l por pozo, leído como HA después de 1 hora, el virus se dejó crecer por 6 días.

b =  $\log_{10}$  por 25  $\mu$ l.

Se midió la reproducibilidad de la técnica con 100 sueros divididos en pares de alícuotas cada alícuota se procesó por duplicado, asignando valores intermedios  $\pm 0.5$  y  $\pm 1.5$  cuando resultaron diferencias de una dilución entre los dos títulos de una misma alícuota, 96 sueros tuvieron una diferencia de  $\leq 1 \log_2$ , y en ningún caso la diferencia de los títulos alcanzó  $2 \log_2$ . Se estableció que una diferencia de 2 tubos o más (factor  $>2$ ) constituye un aumento significativo en el título de anticuerpos entre dos muestras de suero (fase aguda y fase convalesciente) tomadas con un intervalo mayor de dos semanas.

#### COMPARACION DE LAS TECNICAS SEROLOGICAS

Se usaron los sueros de 28 niños de 0 - 13 años que participaron por 1 a 2 años en el Estudio Longitudinal de Familias, a

continuación se resumen las características de este grupo.

**TABLA 7.- SUEROS DE INFANTES PROBADOS MEDIANTE LAS TECNICAS DE INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION, ELISA Y MICRONEUTRALIZACION.**

No. de Niños	28
Rango de Edades (Media)	<1 - 13 (1.7)
No. de Sueros	92
Rango de número de sueros por niño	2 - 6
Media del número de sueros por niño	3.5

Cada suero se probó por las tres técnicas: IH, ELISA y Microneutralización. No hay discrepancia entre las técnicas de IH y Microneutralización para detectar incrementos en el título de anticuerpos; en un caso la técnica de ELISA no detectó dicho aumento.

Se encontraron 4 incrementos en el título de anticuerpos detectados por las tres técnicas. Los títulos resultan ser mas altos por la técnica de ELISA, pero son proporcionalmente similares en las tres técnicas; además se dió el caso de un recién nacido en el que se halló un título de anticuerpos, adquiridos muy posiblemente por via transplacentaria, y en la siguiente muestra de suero obtenida a la edad de 1 año 10 meses, tenía un título similar; en este caso se consideró que había ocurrido infección con el virus influenza C en el tiempo transcurrido entre las dos muestras, puesto que 109 niños tenían un título de anticuerpos que desapareció entre los 6 y 12 meses.

**TABLA 8.- AUMENTOS EN EL TITULO DE ANTICUERPOS EN 5 NIÑOS MEDIDOS POR LAS TECNICAS DE IH, ELISA Y MICRONEUTRALIZACION.**

Niño No.	Edad	IH*	MICRONEUT.*	ELISA*
2	3a 6m	<4	<2	256
	4a	128	64	4096
9	6m	<4	3	64
	1a 7m	8	128	256
10	R. nacido	32	96	1024
	1a 10m	16	128	1024
13	6m	<4	6	64
	12m	16	64	1024
15	4a 3m	<4	<2	256
	4a 8m	64	64	1024

\* = Títulos expresados como la recíproca de la dilución.

El coeficiente de correlación ( $r$ ) entre las tres técnicas (tabla 9) resultó mas elevado entre IH y Microneutralización ( $r=0.88$ ) y menor entre Microneutralización y ELISA ( $r=0.76$ ). Las tres comparaciones son similares, ( $p < 0.01$ ), lo que indica una fuerte correlación positiva.

**TABLA 9.- CORRELACION ENTRE LAS TECNICAS SEROLOGICAS.**

TECNICA	$r$	$r^2$
IH-MICRONEUTRALIZACION	0.88 <sup>a</sup>	0.77
IH-ELISA	0.83 <sup>a</sup>	0.68
MICRONEUTRALIZACION-ELISA	0.76 <sup>a</sup>	0.59

a =  $p < 0.01$

**SEROEPIDEMIOLOGIA**

336 niños participaron en el estudio de familias, había muestras de suero disponibles de 311, sus edades eran de 0 a 14 años; 200 niños eran recién nacidos o menores de un año que tenían anticuerpos, los que se consideraron de origen materno; 38 niños mayores carecían de anticuerpos. 73 niños mayores de un año ingresaron al estudio teniendo anticuerpos. El tiempo de participación de estos niños en el estudio fue de 1 a 14 años, (media de 6.45 y mediana de 6 años). Este estudio constituye una observación de 2006 niños-año. Se usó la microneutralización para medir el título de anticuerpos contra el virus influenza C en cada muestra de suero disponible. En la tabla 10 se sumarizan las características de esta población.

**TABLA 10.- CARACTERISTICAS DE LA POBLACION EN ESTUDIO.**

Número de familias	298
Número de niños en las familias	336
Número de niños incluidos en el estudio	311
Edades de los niños al entrar en el estudio <1 - 16 años	
Recién nacidos con anticuerpos maternos	200
Niños mayores sin anticuerpos	38
TOTAL DE NIÑOS SUSCEPTIBLES	238
Niños mayores con anticuerpos	73
Número de años en el estudio (rango)	1 - 14
Media del número de años en el estudio	6.45
Mediana	6
Número total de años-niño en estudio	2006

Tanto los menores de un año que tenían anticuerpos como los niños mayores que carecían de anticuerpos se consideraron como completamente susceptibles; en total este grupo constituye un total de 607 niños-año; 159 de ellos tuvieron seroconversión documentada, o sea la aparición de anticuerpos contra el virus influenza tipo C. La evidencia serológica de infección en los niños del estudio se resume en la tabla 11.

**TABLA 11.- RESUMEN DE LA EVIDENCIA SEROLOGICA DE INFECCION POR VIRUS INFLUENZA TIPO C EN LOS NIÑOS OBSERVADOS LONGITUDINALMENTE**

Número de niños susceptibles <sup>a</sup>	238
No. de niños-año susceptibles en observación	607
No. of niños con seroconversión documentada	159
No. de niños que originalmente tenían anticuerpos	73
No. de niños-año seropositivos en observación <sup>b</sup>	1399
No. de niños con aumento en el título de anticuerpos	82

a = Recién nacidos y niños mayores sin anticuerpos séricos detectables

b = Los niños inicialmente susceptibles fueron incluidos después de la seroconversión.

c = Diferencia mayor del cuádruplo entre los títulos de dos muestras de suero.

Se consideraron como seropositivos los 73 niños que ya tenían anticuerpos al entrar al estudio, junto con los que tuvieron seroconversión (n= 232), este grupo constituye un período de 1399 niños-año de observación. En los niños seropositivos hubo 82 casos en que ocurrió un aumento cuádruple o mayor en el título de anticuerpos, estos casos se consideraron como episodios de reinfección.

Ocurrieron casos de infección en cada uno de los años del período de observación 1975-1989. La distribución de los 159 casos de seroconversión (primo-infección, Tabla 12 y Fig 11) abarcó cada uno de los años del período de estudio. Ocurrieron, un mínimo de 2 en 1975-76, 3 en 1977-78, la cifra máxima fue de 32 en 1978-79; la media fue de 11.3, la mediana de 11.5. Los episodios de reinfección también ocurrieron en cada uno de los años del estudio el número mínimo de casos fue 1 en 1979-80, 2 en 1977-78, las cifras mayores: 10 en 1976-77 y 9 en 1985-86; la media fue de 5.8, la mediana de 6.5. Las tasas mas bajas de infección (Tabla 13) fueron 0.05 en 1975-76 y 0.07 en 1977-78, las tasas mas altas: 0.43 en 1977-78 y 0.38 en 1984-85, la media es 0.247 y la mediana 0.265. Las tasas mas bajas de reinfección fueron 0.01 en 1979-80 y 0.02 en 1987-88, las mayores: 0.27 en 1976-77 y 0.26 en 1975-76, la media es de 0.08, mediana de 0.05.

En cuanto a la distribución de infección por grupos de edad (Tabla 14 y Fig 12) el número máximo de seroconversiones ocurrió entre los niños de 1 año: 48 casos (33%), y hubo progresivamente menor cantidad de casos conforme aumentó la edad, en el grupo de 8 años se registraron 4 episodios de primoinfección y no hubo seroconversiones en ninguno de los grupos mayores de 8 años; el número de susceptibles disminuyó en forma paralela de un máximo de 156 en el grupo menor de un año hasta 2 en los grupos mayores de 8 años. Al alcanzar la edad de 3 años 79% de los niños habían experimentado la infección. Por otro lado las reinfecciones fueron escasas antes de los 2 años, a partir de los 3 años se observaron entre 7 y 11 casos (máximo a los 8 años) en cada grupo etario,



**TABLA 12.- DISTRIBUCION POR AÑO EPIDEMIOLOGICO DE LA EVIDENCIA SEROLOGICA DE INFECCION POR EL VIRUS INFLUENZA TIPO C**

Año Epidemiológico <sup>a</sup>	'75	'76	'77	'78	'79	'80	'81	'82	'83	'84	'85	'86	'87	'88	'89	TOTAL
Niños Seronegativos Observados	40	34	39	73	42	53	62	55	53	36	36	33	22	29	29	607
Sero Conversiones	2	7	3	32	7	14	13	18	15	14	13	5	6	10	10	159
Niños Seropositivos Observados	19	37	58	50	100	107	105	118	131	137	120	135	142	140	140	1399
Incrementos de Anticuerpos <sup>b</sup>	5	10	2	6	1	7	4	8	7	5	9	7	3	8	8	82

a = Período de Julio 1 a Junio 30 del siguiente año.

b = Aumento del cuádruplo o mayor en el título de anticuerpos (microneutralización) en niños con títulos existentes.

## FIG 11 INFECCION POR VIRUS INFLUENZA C INCIDENCIA ANUAL EN NIÑOS

PRIMERA  
INFECCION

REINFECCION

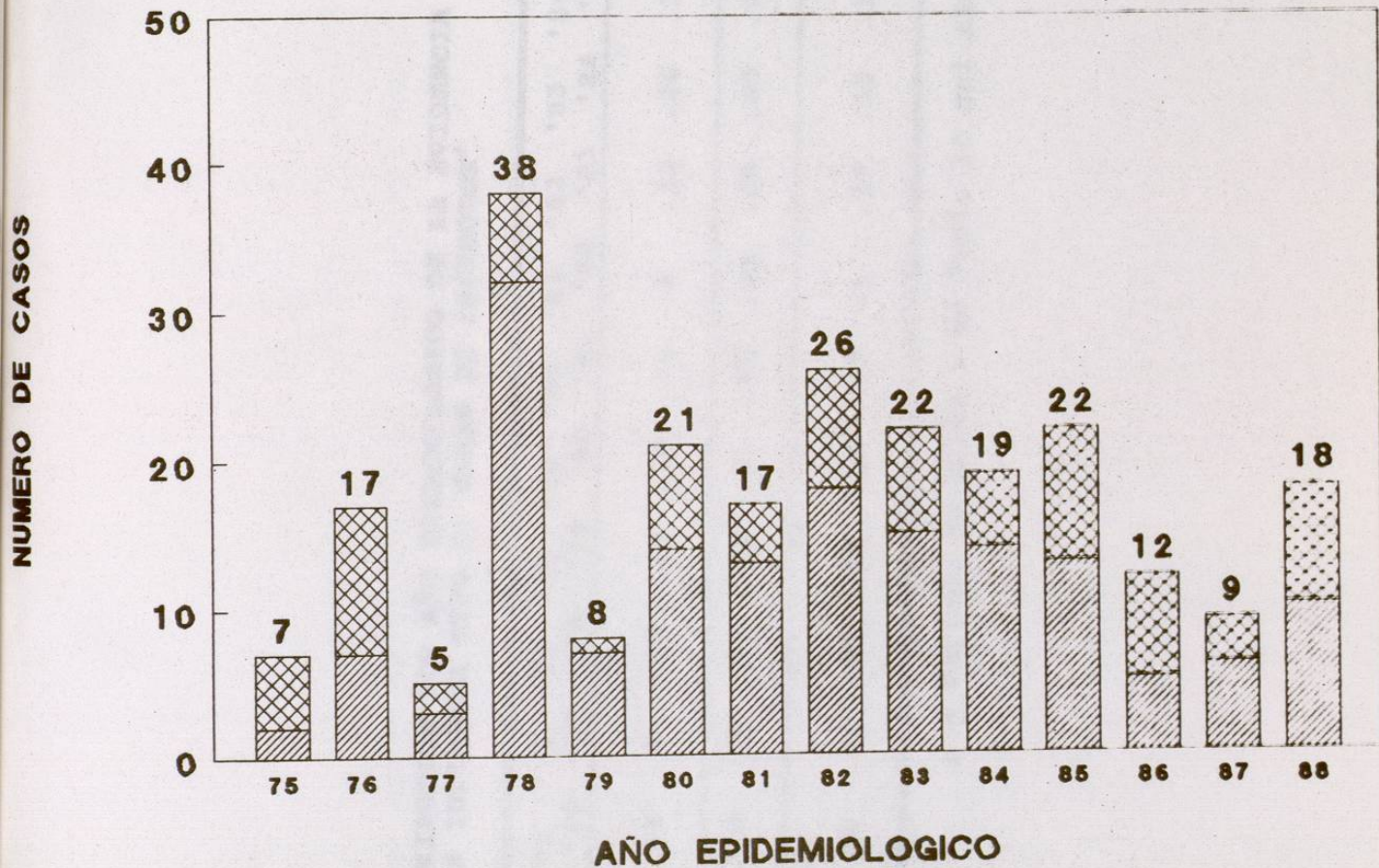


FIG. 11.- NÚMERO DE CASOS DE PRIMERA INFECCIÓN Y REINFECCIÓN DURANTE LOS AÑOS EPIDEMIOLÓGICOS DE 1975/76/ Y 1988/89 - ENTRE LOS NIÑOS PARTICIPANTES EN EL ESTUDIO DE FAMILIAS.

**TABLA 13.- DISTRIBUCION POR AÑO EPIDEMIOLOGICO DE LA EVIDENCIA SEROLOGICA DE INFECCION POR EL VIRUS INFLUENZA TIPO C: TASAS DE INFECCION<sup>a</sup>.**

Año	'75	'76	'77	'78	'79	'80	'81	'81	'82	'83	'84	'84	'85	'85	'86	'86	'87	'87	'88	'88	TASA
Epidemiológico <sup>b</sup>	'76	'77	'78	'79	'80	'81	'82	'83	'83	'84	'84	'85	'85	'86	'86	'87	'88	'88	'89	'89	MEDIA
Tasa																					
Primaria	.05	.2	.07	.43	.16	.26	.2	.32	.28	.38	.36	.15	.27	.34	.247						
De Infección																					
Tasa de	.26	.27	.03	.12	.01	.06	.04	.06	.05	.03	.07	.05	.02	.05	.08						
Reinfección																					
Tasa																					
Total de	.12	.24	.05	.31	.06	.13	.1	.15	.12	.11	.14	.07	.05	.1	.12						
Reinfección																					

a = Por 100 niños.      b = Período de Julio 1 to Junio 30 del siguiente año.

**TABLA 14.- INFECCIONES POR EL VIRUS INFLUENZA C POR EDADES: NUMERO DE INFECCIONES**

Edad	<1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	>16	TOTAL
Niños																			
Seronegativos Observados	156	145	114	75	44	28	22	11	4	2	1	1	1	1	1	1	1	2	607
Sero-conversiones	16	48	34	28	11	7	6	5	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	159
Niños																			
Seropositivos Observados	0	24	71	106	127	134	129	125	123	112	99	84	69	54	40	32	29	41	1399
Incrementos de Anticuerpos <sup>a</sup>	0	1	1	7	6	6	9	9	11	6	6	6	5	4	1	1	1	2	82

a = Aumento del cuádruplo o mayor en los títulos de anticuerpos pre-existentes microneutralización.

disminuyendo progresivamente de 6 hasta 1 caso por grupo etario en la adolescencia (14 - 16 años).

El número de años-niño en el grupo de seropositivos alcanzó el máximo en el grupo de 2 años disminuyendo paulatinamente hasta un mínimo de 30 en el grupo de 16 años. La tasa de la primo-infección mas baja es la del grupo menor de 1 año: 0.1, la tasa mas alta ocurrió a los 8 años: 1.00, en total había 4 niños bajo estudio en este grupo de edad; en cuanto a la reinfección, la tasa mínima ocurrió a los dos años: 0.01; la tasa maxima ocurrió a los 8 años: 0.09. La proporción de sero-negativos/seropositivos alcanza el nivel medio (50%) entre los 2 y 3 años (Fig. 13).

200 niños entraron en el estudio al momento de nacer y se tomó una muestra de suero del cordón umbilical, en todos los casos existían títulos de anticuerpos. En 109 de estos niños había también una o mas muestras de suero tomadas durante los primeros 12 meses de vida, estos 109 infantes continuaron siendo observados después de este período (Fig. 14, no se incluyen los niños que seroconvirtieron); En el grupo de neonatos, el nivel de anticuerpos al nacimiento es de  $5.7 \log_2$  y descendió  $1 \log_2$  cada 50 - 60 días aproximadamente, empezaron a verse niños sin anticuerpos a los 6 meses. Todos eran seronegativos a los 11 meses (títulos  $<1:2$  en la técnica de microneutralización).

Se determinó la persistencia de títulos de anticuerpos después de la seroconversión en 17 niños con muestras de suero disponibles por 10 años (Fig. 15, no se incluyen niños con evidencia serológica

### FIG 13 PORCENTAJE DE NIÑOS SEROPOSITIVOS

●—● % NIÑOS CON ANTICUERPOS

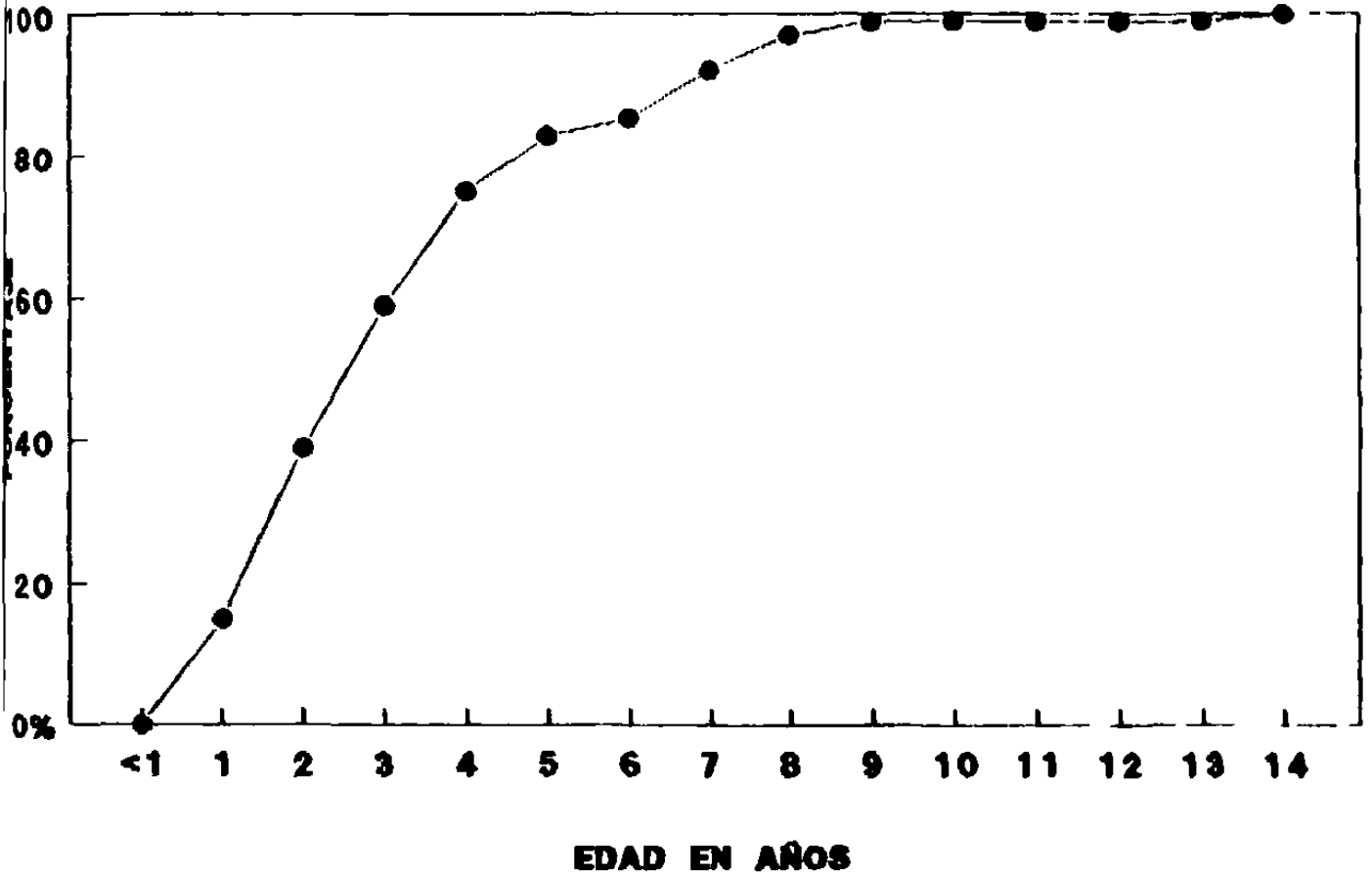


FIG. 13.- FRECUENCIA ACUMULADA DE PRIMOIINFECCIONES EN LOS NIÑOS PARTICIPANTES EN EL ESTUDIO DE FAMILIAS.

### FIG 14 PERSISTENCIA DE ANTICUERPOS MATERNOS EN 109 NIÑOS

■ TÍTULOS ME-  
DIOS GEOM

● % CON TÍ-  
TULOS <1:2

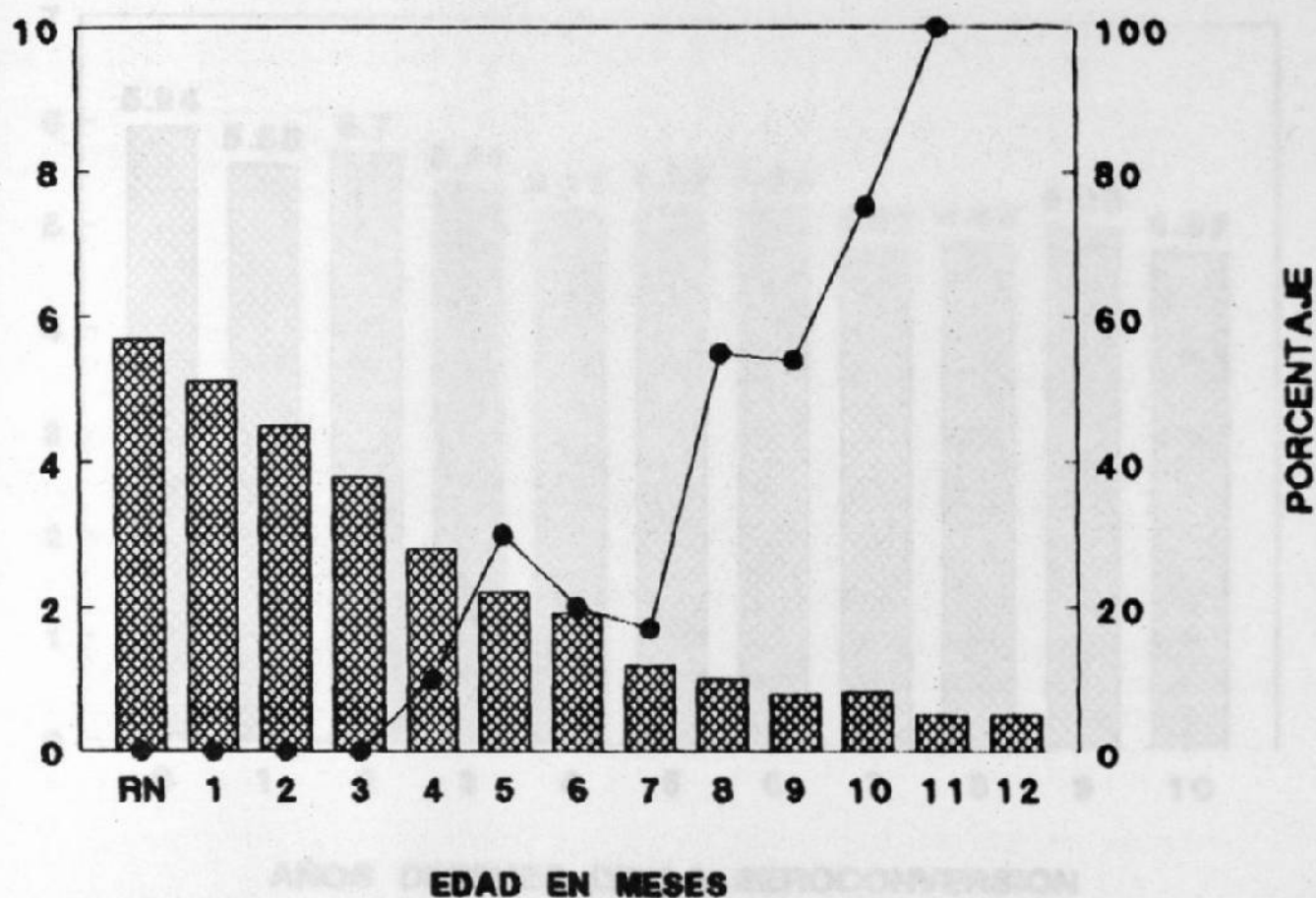


FIG. 14.- MEDICIÓN DE LA DESAPARICIÓN DE ANTICUERPOS MATERNOS DURANTE EL PRIMER AÑO DE VIDA. SE CALCULARON LOS TÍTULOS MEDIOS GEOMÉTRICOS DE 109 NIÑOS QUE ERAN SERONEGATIVOS A LOS 12 MESES DE EDAD (LOS TÍTULOS DE ANTICUERPOS EN LA TÉCNICA DE MICRONEUTRALIZACIÓN ERAN 1:2).

### FIG 15 PERSISTENCIA DE ANTICUERPOS DESPUES DE LA PRIMERA INFECCION

17 NIÑOS

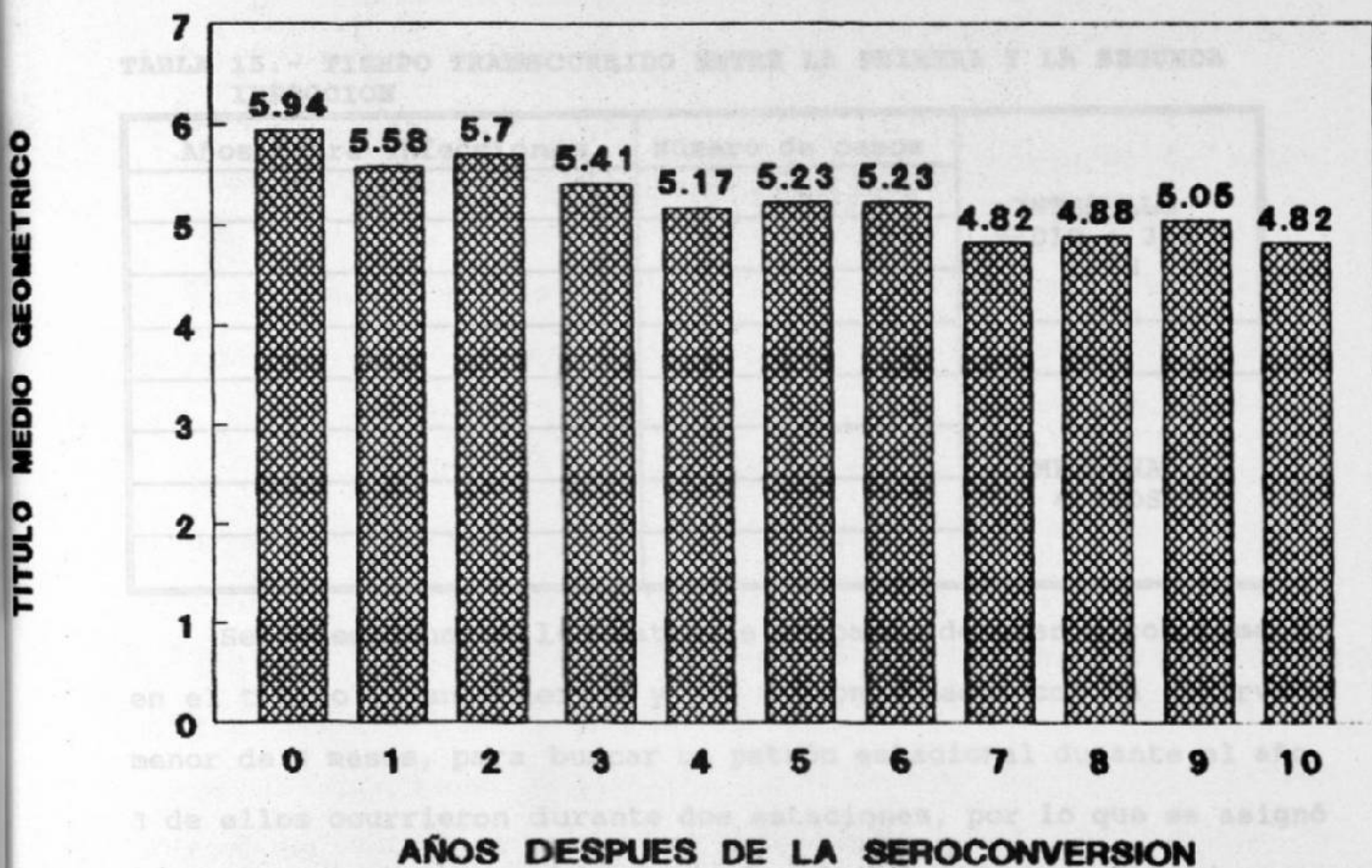


FIG. 15.- PERSISTENCIA DE ANTICUERPOS SÉRICOS EN 17 NIÑOS SEGUI-  
DOS POR 10 AÑOS DESPUÉS DE LA PRIMAINFECCIÓN.



de reinfección). La media geométrica de los títulos después de la infección fue de 5.94, ocurrió un descenso constante en los títulos, pero con una curva de pendiente muy poco inclinada, al final de los 10 años, la diferencia total fue de 1.12  $\log_2$ .

El tiempo transcurrido entre dos elevaciones de anticuerpos (tiempo de reinfección) fue de 1 - 8 años, con una media de 3.8, mediana de 4 (Tabla 15).

**TABLA 15.- TIEMPO TRANSCURRIDO ENTRE LA PRIMERA Y LA SEGUNDA INFECCION**

Años entre infecciones	Número de casos	
1	8	INTERVALO MEDIO = 3.8 AÑOS
2	9	
3	6	
4	6	
5	7	MEDIANA 4 AÑOS
6	7	
7	3	
8	3	

Se seleccionaron los datos de 25 pares de sueros con aumento en el título de anticuerpos y que fueron tomados con un intervalo menor de 3 meses, para buscar un patrón estacional durante el año, 3 de ellos ocurrieron durante dos estaciones, por lo que se asignó a cada una de las estaciones un valor de 0.5 por caso; hubo 4 casos en primavera, 4.5 en verano y 5 en invierno, pero 11.5 ocurrieron en otoño.

**TABLA 16.- OCURRENCIA ESTACIONAL: CASOS CON INTERVALO  $\leq 3$  MESES ENTRE LA PRIMERA Y LA SEGUNDA MUESTRA DE SUERO.**

	No. de Casos <sup>a</sup>	%
OTOÑO	11½	46
INVIERNO	5	20
PRIMAVERA	4	16
VERANO	4½	18
TOTAL	25	100

a = Casos que abarcaron dos temporadas se dividieron entre dos y se asignó una mitad a cada estación.

**ENFERMEDAD CLINICA.** La mayoría de las muestras de suero fueron tomadas a intervalos de 4 - 8 meses, período demasiado largo para establecer una asociación con entidades clínicas determinadas; no obstante, se compararon los números de niños que no tienen datos clínicos de enfermedad registrados durante el tiempo en que ocurrió el aumento en el título de anticuerpos con los que si hay datos de enfermedad durante tal período (Fig 16), 137 (85%) de los niños con seroconversión tuvieron datos clínicos de enfermedad: 1 a 10 episodios; en los niños con un incremento en el título de anticuerpos sobre un nivel previamente existente, 44 (53%) tuvieron datos de enfermedad registrada clínicamente. No se notó patrón alguno de enfermedad clínica entre los niños con aumento de anticuerpos comparados a los niños de edad similar con enfermedad no asociada con elevación de anticuerpos.

## FIG 16 VIRUS INFLUENZA TIPO C EVIDENCIA DE INFECCION Y ENFERMEDAD

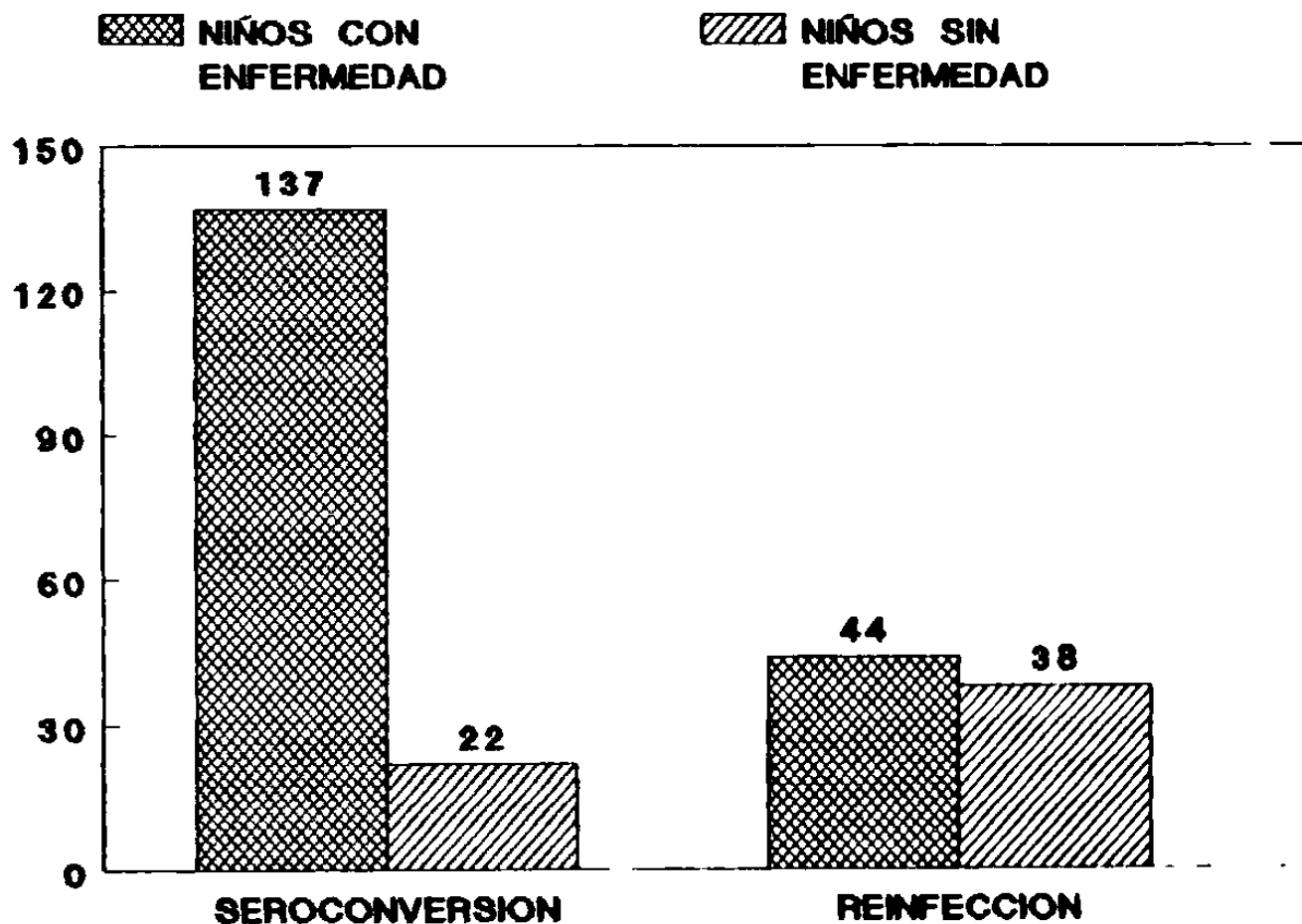


FIG. 16.- EVIDENCIA DE RELACIÓN ENTRE ENFERMEDAD E INFECCIÓN EN NIÑOS DEL ESTUDIO DE FAMILIAS; EL TIEMPO DE INTERVALO ENTRE LAS DOS MUESTRAS EN QUE HAY INCREMENTO EN LO TÍTULOS DE ANTICUERPOS ES DEMASIADO LARGO PARA ASOCIARLO CON CASOS ESPECÍFICOS DE ENFERMEDAD.

## DISCUSION

Los virus influenza tipo A y B causan brotes epidémicos cada año entre los meses de Noviembre a Marzo, afectando individuos de todas las edades; durante un episodio de influenza existe mayor riesgo de que ocurran complicaciones, principalmente neumonía, en las personas mayores de 65 años o los pacientes que padecen enfermedades debilitantes crónicas como neumopatías, nefropatías, cardiopatías, cáncer y diabetes. El virus tipo C poco se toma en cuenta como causa de enfermedad respiratoria aguda, y se asume que no causa infecciones con frecuencia. Este es el primer estudio epidemiológico en que se ha seguido longitudinalmente una población infantil mas de 3 años, para investigar la frecuencia con que ocurre esta infección en una población urbana.

### AISLAMIENTO DE VIRUS

Para el aislamiento del virus tipo C se ensayaron las condiciones de crecimiento en diversos cultivos celulares y se comparó la sensibilidad de estas células con el cultivo en embrión de pollo por medio de una titulación simultánea. La línea MDCK tiene una sensibilidad similar al cultivo primario de células de riñón de mono Rhesus (RhMK), pero la sensibilidad de ambas es menor que la del huevo embrionado por mas de  $2 \log_2$ . En cuanto a la línea HMV-II, la sensibilidad es similar a MDCK y RhMK, y menor que el huevo embrionado. Esto difiere de lo reportado por Nishimura<sup>(83)</sup> quien encontró una sensibilidad de las células HMV-II similar al huevo embrionado. Aunque en este estudio el sistema de cultivo mas sensible es el huevo embrionado, el cultivo en células HMV-II o

MDCK permite el manejo de un mayor número de especímenes.

Para el cultivo de virus tipo A y B rutinariamente se usan eritrocitos de cobayo, el virus tipo C no aglutina ni hemadsorbe eritrocitos de esta especie, y esta podría ser una causa de la baja frecuencia con que se aísla de personas enfermas, aun cuando la mayoría de las personas se infectan en algún momento de la niñez; en cambio el virus tipo C hemadsorbe eritrocitos de rata aunque no al mismo grado que los virus A y B. Se demostró por inmunofluorescencia que solo estaban infectadas 50% de las células (datos no mostrados), lo que indica que esta diferencia se debe a la propagación poco eficiente del virus en el cultivo celular y no a la incapacidad de la hemaglutinina viral de ligar eritrocitos.

La infecciosidad del virus se mantiene sin cambio a 4° C por 5 días, diluido en medio de caldo de infusión de ternera. Nuestros datos sugieren que la falta de aislamiento del virus no se debe a inactivación durante el transporte al laboratorio antes de la inoculación. En esta curva se observa un fenómeno poco usual, en el día cero hubo un título menor que en los días 1-5, esto se repitió con dos lotes diferentes del virus tipo C pero no sucedió en más de 10 titulaciones que fueron hechas durante las pruebas de microtitulación. Es posible que en estos dos lotes hubieran agregados de partículas virales que se dispersaron a las 24 horas de haber pasado la suspensión viral a la fase acuosa. En la curva de crecimiento viral se observaron títulos máximos de virus a los 6 días. En forma similar, en el reporte de Nerome, el período máximo de observación fue de 5 días.

## IDENTIFICACION DEL VIRUS

**1).- ENSAYO INMUNOENZIMATICO.-** Esta técnica se puede utilizar para identificar los antígenos virales en los especímenes; en la figura 6 se grafica la cantidad mínima de virus que puede ser detectada en este sistema:  $1 \times 10^{5.6} - 1 \times 10^{5.9}$  DIH<sub>50</sub>, que equivale a 0.25-0.5 UHA, lo que resulta ser una cantidad de partículas virales mas bien elevada; la especificidad es adecuada, pues permite diferenciar el tipo C de los tipos A y B. Esta técnica se puede usar antes del cultivo para el diagnóstico rápido del virus en secreciones nasofaríngeas en las fases iniciales de la infección, cuando existe mayor cantidad de descarga viral.

**2).- ESTERASA.-** La enzima destructora de receptores del virus tipo C no es una neuraminidasa como en los virus A y B, sino que es una acetilesterasa que actua sobre el enlace ester acetil-O-neuraminato<sup>(35)</sup>. Esta diferencia permite la identificación del virus usando p-nitrofenil-acetato (PNFA) 1mM como substrato; el límite de sensibilidad a pH 7.3 es comparable a la técnica ELISA:  $1 \times 10^{5.9} - 1 \times 10^{6.2}$  DIH<sub>50</sub> = 0.5-1 UHA. El rendimiento viral en cultivo celular usualmente es de 4-16 UHA, por lo que estas dos técnicas pueden confirmar la identidad del virus tipo C. Si la concentración de PNFA se aumenta hasta 8 mM, aumenta la lectura de DO de fondo sin aumentar la sensibilidad. La actividad de los virus A y B sobre PNFA es mínima, como cabe esperar en vista que la neuraminidasa de los virus A y B tiene actividad enzimática diferente.

Se buscó aislar el virus tipo C agregando un paso adicional de hemadsorción con eritrocitos de rata en los tubos con células MDCK que normalmente se procesan para aislar virus tipo A y B. este paso

adicional se llevó a cabo los días 10 y 14 post-inoculación; en el período de 2 años comprendido entre octubre de 1988 y octubre de 1990 se procesaron 5,281 especímenes provenientes de personas de todas las edades que participaron en el Programa de Vigilancia Comunitaria de Influenza en este tiempo ninguno de los virus influenza que fueron aislados pertenece al tipo C; se hizo un muestreo proporcional al número de muestras recibidas por semana, tomando en cuenta que durante el otoño e invierno se reciben mas especímenes. Como se vió anteriormente, la enfermedad puede ser leve o asintomática, por lo que es posible que la escasez de aislamientos se deba a esta razón.

Retrospectivamente se buscó el virus en 743 especímenes obtenidos 1-3 años antes de niños entre 1 y 3 años de edad, participantes en el mismo Programa de Vigilancia Comunitaria de Influenza. Se seleccionó este grupo de edad por tener mayores frecuencias de infección; las muestras tomadas en otoño se inocularon en células HMV-II y en huevos embrionados, las muestras tomadas en las otras épocas del año se inocularon solamente en células HMV-II.. 13 especímenes de hisopado faríngeo tomados de niños del Estudio de Familias durante el lapso en que tuvieron evidencia serológica de infección también fueron inoculados en huevo embrionado y en células HMV-II. No se aislaron virus tipo C de ninguno de los especímenes, en las células HMV-II se aislaron 2 cepas de parainfluenza tipo 1 y 4 de virus parainfluenza tipo 2 en Noviembre y Diciembre de 1989.

## ENCUESTA SEROLOGICA

Para hacer la encuesta serológica se estandarizaron y compararon las técnicas de Inhibición de la Hemaglutinación, ELISA y Microneutralización.

Lo publicado en la literatura<sup>(61,64)</sup> indica que no es necesario tratar el suero humano para destruir inhibidores no específicos, sin embargo se hicieron ensayos para determinar esto en vista de que ahora se conocen mejoras a los métodos para el tratamiento del suero que no se usaban anteriormente. En la estandarización de la técnica IH, se compararon 4 métodos de tratamiento de suero para remover inhibidores no-específicos: Enzima Destructora de Receptores (EDR), adsorción con Caolín,  $KIO_4$  y calor:  $56^\circ C$  por 30 minutos. Todos éstos métodos de tratamiento tienen en común modificar la fracción de carbohidrato de las beta globulinas normalmente presentes en el suero de las especies de vertebrados. Dichas proteínas se combinan con los receptores de las partículas virales, resultando un efecto de inhibición de la hemaglutinación indistinguible del mismo efecto inhibidor exhibido por los anticuerpos en el suero. La diferencia en los títulos del suero bajo los diferentes tratamientos es de 1 factor de dilución (1 tubo), lo que es atribuible a la variación en la dilución; la adsorción de los anticuerpos de un suero con proteína A de S. aureus removi6 la mayor parte de la actividad inhibidora de la hemaglutinación, habiendo un titulo residual de 1:4. Esto es compatible con el hecho de que  $IgG_3$ ,  $IgM$ ,  $IgA$ ,  $IgD$  e  $IgE$  no son ligadas por la proteína A. Estos datos concuerdan con la mayoría de los reportes publicados, que el suero humano carece de inhibidores



no-específicos para el virus tipo C<sup>(61,64,66)</sup>. Por otro lado, Nishimura y cols. reportan niños que tienen títulos de anticuerpos por la técnica IH pero no por RIP y concluyen que es posible que existan inhibidores inespecíficos del suero humano en títulos de hasta 1:16. En este estudio no hay evidencia que apoye este reporte pues no se encontraron casos en que la técnica IH fuera positiva y ELISA o Microneutralización fueran negativas, lo que sería de esperar en caso de que existieran inhibidores no específicos en el suero humano.

Respecto a la reproducibilidad de la técnica IH, las diferencias entre los títulos de dos alícuotas de suero en ningún caso fueron mayores de  $1 \log_2$ , lo que permite establecer que una diferencia de  $2 \log_2$  resulta de un incremento en el título de anticuerpos circulantes.

En la técnica de ELISA la varibilidad es mayor que en las técnicas de IH y Microneutralización, puesto que casi la mitad de los sueros divididos en alícuotas tuvieron una variación de  $2 \log_2$ , muy probablemente como resultado del uso de anticuerpos de cabra anti gamma-glubulina humana y conjugado de enzima con anticuerpos de cerdo anti-gamma glubulina de cabra, en este sistema se aumenta la sensibilidad para detectar anticuerpos pero al mismo tiempo aumentan las lecturas de fondo; bien podría usarse un solo reactivo: anticuerpos de cabra anti-gamma glubulina humanos conjugado con fosfatasa alcalina.

Para la técnica de microneutralización se usó una modificación del procedimiento publicado por Frank y cols.<sup>(104)</sup> para los virus Influenza tipo A y B en el que se mide el título de anticuerpos que

impide la replicación viral en las células MDCK, que luego producen cantidades suficientes de virus para aglutinar eritrocitos de pollo. Se comprobó que la tripsina mejora el rendimiento de infecciosidad viral, pues los lotes de virus usados como antígeno de prueba dan títulos mayores, lo que concuerda con las condiciones reportadas por Nerome<sup>(79)</sup> para el virus tipo C, que también requiere de la activación de la infecciosidad por el fraccionamiento de la proteína de la superficie HEF, como sucede en la HA de los virus A y B.

La lectura de la técnica de microneutralización es rápida porque se hace por hemaglutinación, se compararon eritrocitos de pollo y de rata para las lecturas y no se observó diferencia significativa en los títulos de infecciosidad ni en la temperatura de incubación. El método estandarizado en el presente trabajo permite que los laboratorios que ya usan la técnica de microneutralización como método serológico puedan ahora incluir al virus tipo C en sus estudios.

En cuanto a la reproducibilidad de la técnica, en ningún caso hubo diferencia mayor de  $2 \log_2$  entre los títulos, lo que permite considerar como incremento en el título de anticuerpos cualquier diferencia mayor del doble en la segunda muestra ( $S_2$ ) respecto a la primera ( $S_1$ ) con un índice de confiabilidad mayor de 0.95.

En la comparación de las tres técnicas, se ve que los títulos son mas altos por la técnica ELISA, lo que se debe a la mayor cantidad de marca ligada por el anticuerpo extra. La sensibilidad para detectar aumentos en el título de anticuerpos es similar. Se observaron 4 casos con incremento en el título de anticuerpos, y un

caso (niño No. 10) en que las muestras de suero disponibles fueron tomadas, la primera al momento de nacer y la segunda a los 22 meses de edad, la primera muestra corresponde a anticuerpos IgG maternos adquiridos por vía transplacentaria; estos anticuerpos desaparecen antes de los primeros 12 meses de edad, por lo que en este caso los anticuerpos en la segunda muestra son evidencia de infección natural. No hubo diferencia en los títulos detectados por ninguna de las tres técnicas, el índice de correlación es aceptable entre cualquiera de las tres técnicas, siendo mas elevado entre IH y Microneutralización, ( $r=0.88$ ,  $p<0.01$ ), el coeficiente de determinación entre estas dos técnicas es de 0.77, lo que indica una correlación fuertemente positiva.

La encuesta serológica comprende un período de 14 años en los que se siguió longitudinalmente una población infantil participante en el Estudio de Enfermedad Respiratoria Aguda en Familias. La mayoría de los niños entraron al estudio durante el primer año de vida, (media <1 año, mediana <1 año) lo que condiciona que pocos niños tuvieran anticuerpos adquiridos activamente al momento de ser reclutados en el estudio; la duración media de participación fue de 6.45 años, mediana de 6 años; el número total de niños/año, fue de 2006. Los niños se clasificaron en dos categorías: seronegativos (susceptibles) y seropositivos, según los títulos de anticuerpos en la primera muestra de suero. Los niños menores de un año con anticuerpos maternos, fueron incluidos en el grupo de seronegativos para propósito de este análisis, en total el número de años/número en esta categoría fue de 607; en 159 niños hubo episodios de seroconversión, demostrable por la aparición de anticuerpos, cuando

en la muestra anterior no existía título demostrable; en 4 casos evidentemente ocurrió seroconversión en bebés, tal como ocurrió en el infante No. 10 (Tabla 8), porque persistieron y se incrementaron los títulos observados durante los primeros 6 meses de vida, sin bajar como en el resto de los niños con anticuerpos pasivos.

La categoría de seropositivos se constituyó con el grupo de 73 niños que tenían anticuerpos al momento de entrar al estudio, y a ellos se agregaron los 159 niños que seroconvirtieron, en esta categoría el número de años/niño fue de 1399, en este grupo se observaron 82 casos en que hubo aumento en el título de anticuerpos sobre niveles existentes previamente, estos fueron considerados episodios de reinfección.

Los casos de seroconversión y los casos de reinfección fueron graficados juntos por edad y año en que ocurrieron, para integrar un perfil epidemiológico. En la distribución anual es importante notar que hubo casos de infección por el virus tipo C en cada año sin excepción, tanto primoinfecciones como reinfecciones; aparentemente no hay un patrón epidémico con fluctuaciones anuales, sino mas bien la infección parece ser endémica año con año entre los niños; el período de 1978-79, en que hubo 38 casos (tasa de infección 0.31) no puede ser considerado con certeza como un pico epidémico, en vista de que las muestras de suero fueron tomadas con una diferencia de entre 6 y 8 meses, en primavera y en otoño, lo que necesariamente implica que algunos casos pueden haber ocurrido en cualquiera de los períodos vecinos (1977-78 y 1979-80), que exhiben cifras de infección bajas, pero por otro lado en ese período de 1978-79 la tasa de infección fue la mas alta de todas,

lo que sugiere que pueden existir períodos epidémicos. En todo caso es obvio que la infección causada por este virus tiene un patrón endémico con algunas fluctuaciones y por otro lado podría darse un patrón de epidemias que se repiten en períodos mas o menos largos, sin que se pueda precisar por estos datos la duración de tales períodos inter-epidémicos. En vista de que en el virus tipo C no ocurren cambios antigénicos como es el caso de los tipos A y B, esta periodicidad dependería de que ocurran en la población fluctuaciones de parámetros tales como número de susceptibles (inmunidad comunitaria), existencia del virus en reservorios animales, o en última instancia podemos considerar que ocurriera una acumulación lenta de variantes dentro de cada una de las estirpes antigénicas que cocirculan según lo propuesto por Buonaugurio<sup>(91)</sup>.

La distribución de niños/año por edades no es normal, sino que es oblicua (esta corrida positivamente), es decir que las categorías de menor edad tienen mayores números de niños como resultado de una tendencia de los participantes a abandonar el estudio con el tiempo a pesar de que el reclutamiento continuó durante cada uno de los 14 años que duró este estudio. Aun con esto, es posible notar que la mayoría de las primoinfecciones (79%) ocurrieron en el período de <1 a 3 años de edad, y fueron progresivamente menos frecuentes hasta llegar a cero para la edad de 9 años y mayores. Estas cifras de infección tienen aun mayor grado de corrimiento que la distribución de años/niño total (seronegativos + seropositivos). Además la distribución de los casos de reinfección es mas constante en todos los grupos de edad

con la ausencia de niños sin anticuerpos conforme aumenta la edad. Por otro lado las tasas de reinfección son bajas en los grupos <1-2 años; esto es de esperarse debido a que el número de seronegativos es mayor que el de seropositivos en estos grupos de edad y tal proporción se invierte a los tres años. Consecuentemente aumentan las tasas de reinfección pero nunca alcanzan cifras mayores de 9%.

Nuestros datos son compatibles con el reporte de Homma<sup>(66)</sup> sobre el aumento en el número de seropositivos desde 1 año de edad, con aumento rápido hasta un rango de 80-90% a la edad de 7-10 años, manteniéndose esa cifra en todos los grupos etarios, hasta los 70 años.

Se intentó determinar la frecuencia estacional con los datos de 25 casos en los que las muestras con la evidencia de infección fueron tomadas con un intervalo menor de tres meses. Hubo mayor incidencia en otoño, pero también se vieron casos en invierno, primavera, y verano; los datos sobre la frecuencia estacional en la literatura son escasos y se limitan a reportes de 8 cepas<sup>(66)</sup> aisladas en Europa a razón de 1-2 por año en los meses de Diciembre, Febrero, Marzo y Abril y 14 cepas aisladas en Japón en todos los meses del año excepto Julio, Agosto y Septiembre.

Se observó el descenso gradual en los títulos de anticuerpos maternos en 109 niños que estuvieron en el estudio durante el primer año de vida. Los títulos medios geométricos por mes, declinan consecutivamente hasta desaparecer entre los 6 y 11 meses, lo que es comparable con el reporte de Homma<sup>(66)</sup>, en el que todos los bebés menores de 2 meses tenían anticuerpos en títulos (IH) 1:8 - 1:16; el porcentaje de bebés con anticuerpos llegó a cero a los 11

meses de edad. Estos datos indican que los infantes se vuelven susceptibles durante el primer año de vida; la menor tasa de infección en el grupo menor de un año, indica que la inmunidad adquirida pasivamente tiene un papel protector contra la infección. En el estudio de la guardería infantil en Yamagata<sup>(67)</sup> los infantes menores de tres meses no sufrieron enfermedad y los cultivos para el virus fueron negativos. Es posible que la infección ocurra en presencia de niveles bajos de anticuerpos circulantes, lo que explicaría los casos de niños con evidencia serológica de infección sin descenso de los títulos hasta cero; Un estudio prospectivo para identificar los datos clínicos asociados con la infección durante el primer año de vida ayudará a dilucidar esta cuestión.

También se graficaron los títulos medios geométricos de anticuerpos séricos en 17 niños que tenían disponibles muestras anuales por los 10 años siguientes a la infección primaria, estos niños fueron seleccionados entre los que no tuvieron reinfección, observándose un descenso gradual, pero después de 10 años los títulos solo disminuyeron 1  $\log_{10}$ ; el rango de edades cuando estos niños tuvieron la infección primaria fue de 4 meses a 7 años (media 2 años 4 meses, mediana: 2).

No pudieron obtenerse datos precisos sobre los síntomas y signos asociados con la infección puesto que los intervalos entre la dos muestras de suero son muy largos y en la mayor parte de los registros clínicos existían dos o mas episodios de enfermedad aguda del aparato respiratorio; solo se enumeraron los casos que durante el intervalo en que ocurrió el incremento del título de anticuerpos hubo algún episodio de enfermedad, y se comparo ésta cifra con los

casos en que no hubo registro de enfermedad en el tiempo en que ocurrió el aumento en el título de anticuerpos. Dado que el índice de casos con enfermedad es de 0.86 en la primoinfección, entonces la probabilidad de que ésta sea asintomática es  $\geq 0.14$ . En la reinfección, el índice es de 0.53 y la probabilidad de que estos episodios sean asintomáticos es  $\geq 0.47$ . En el brote epidémico de la guardería infantil en Yamagata, Japón<sup>(75)</sup>, se observó el mismo tipo de enfermedad febril (37-39° C) por 2 o 3 días, estornudos y flujo nasal por 2 - 8 semanas, nunca severa, con los mismos síntomas en la primoinfección o en las reinfecciones.

El virus de la influenza tipo C puede ser un patógeno importante de las vías respiratorias, dado que algunos casos de documentados de infección cursaron con un cuadro neumónico<sup>(56)</sup> y por lo tanto es necesario determinar cual es el porcentaje de infección que causa enfermedad grave y además determinar cual es el impacto global que tiene como enfermedad que aun siendo leve es causante de ausentismo escolar y del trabajo, resultando éste último una causa de pérdidas económicas importantes.

Puesto que solo se diagnostican los agentes etiológicos de las enfermedades respiratorias agudas en 50-70% de los casos, y aun quedan sin dilucidar cuales son los agentes causales cuando menos en 30% de los casos, es preciso modificar las técnicas de aislamiento para detectar el virus tipo C, usando eritrocitos de pollo en lugar de cobayo para la hemadsorción, e iniciando el uso de otras líneas celulares sensibles como HMV-II, con el doble propósito de averiguar que papel desempeña el virus tipo C epidemiológica y clínicamente, y esto permitirá continuar haciendo



estudios prospectivos en la población infantil para discernir la sintomatología asociada con la primoinfección, y en la población de adultos para determinar la frecuencia de reinfecciones y la sintomatología asociada con estas. En lo que respecta a las técnicas serológicas, es de hacerse notar que se estandarizó el procedimiento de microneutralización, que permite manejar grandes números de sueros y además se miden anticuerpos que bloquean la infecciosidad viral.

## CONCLUSIONES

En el presente estudio se estableció la metodología para utilizar las técnicas de ELISA y el ensayo de esterasa usando PNFA como substrato para la búsqueda del virus Influenza tipo C en la secreción respiratoria de las personas enfermas. Se sugieren modificaciones al sistema de cultivo de los virus Influenza y por último se propone continuar la vigilancia epidemiológica de los virus de Influenza incluyendo el tipo C.

Se acepta la hipótesis propuesta, esto es que la infección por el virus tipo C ocurre en todos los años del período estudiado de 1975 a 1978, en forma anual y se cumplen los objetivos de determinar las frecuencias de infección por año de calendario y por grupo de edad así como las tasas de infección.

También se determinó la frecuencia de reinfección por edades y la persistencia de anticuerpos maternos después del nacimiento y de anticuerpos originados por la primoinfección. Los datos derivados de los objetivos de este trabajo llenan un hueco en el conocimiento de los virus de Influenza tipo C, pues por primera vez pudo hacerse un estudio de seguimiento longitudinal en un grupo suficientemente grande de niños (311), que forman parte de una población urbana estudiada a largo plazo.

**BIBLIOGRAFIA**

- 1.- Taylor, R.M. 1949. Studies on survival of Influenza Virus Between Epidemics and Antigenic Variants of the Virus. *Am. J. Pub. Health.* 39:171-178.
- 2.- Taylor, R.M. 1951. A Further Note on 1233 ("Influenza C") Virus. *Arch. Gesamte Virusforsch.* 4:485-500.
- 3.- Francis, T., Quilligan, J.J., Minuse, E. 1950. Identification of Another Epidemic Respiratory Disease. *Science* 112 (2913):495-497.
- 4.- Minuse, E., Quilligan, J.J., Francis, T. 1954. Type C Influenza Virus I.-Studies of the Virus and its Distribution *J. Lab. & Clin. Med.* 43(1):31-34.
- 5.- Quilligan, J.J., Minuse, E., Francis, T. 1954. Type C Influenza Virus II.- Intranasal Inoculation of Human Individuals. *J. Lab. & Clin. Med.* 43(1):43-47.
- 6.- Andrewes, C.H., Bang, F., Burnet, F.M. 1955. A Short Description of the Myxovirus Group (Influenza and Related Viruses). *Virology* 1:176-184.
- 7.- Styk, B., 1963. Effect of some Inhibitor-Destroying Substances on the Non-specific Inhibitor of C Influenza Virus Present in Normal Rat Serum. *Acta. Virol.* 7:88-89.
- 8.- Andrewes, C.H., Worthington, G. 1959. Some New or Little-known Respiratory Viruses. *Bull WHO* 20:435-443.
- 9.- Hirst, G.K. 1950. The Relationship of the Receptors of a New Strain of Virus to Those of the Mumps-NDV-Influenza Group. *J. Exp. Med.* 91:177-184.
- 10.- White, J. 1953. The Position of Taylor's 1233 Strain of Virus in the Human Red Cell Receptor Gradient. *Brit. J. Exp. Pathol.* 34:668-673.
- 11.- Waterson, A.P. 1962. Two Kinds of Myxoviruses. *Nature* 193:1163-1164.
- 12.- Henle, W. 1964. Cellular Biology of Myxovirus Infections. *Ciba Symp.* 23
- 13.- Brown, F. 1987. The Classification and Nomenclature of Viruses: Summary of Results of Meetings of the International Committee on Taxonomy of Viruses in Edmonton, Canada. *Intervirology* 30:181-186.

- 14.- Waterson, A.P., Hurrell, J.M.W. Jensen. 1960. Fine Structure of Influenza A, B, and C Viruses. Arch. Gesamte Virusforsch. 12:487-495.
- 15.- Richtey, M.B., Palese, P., Kilbourne, E.D. 1976. RNAs of Influenza A, B and C Viruses. J. Virol. 18(2):738-744.
- 16.- Compans, R.W., Bishop, D.H.L., Meier-Ewert. 1977. Structural Components of Influenza C Virions. J. Virol. 21(2):658-665.
- 17.- Racaniello, V.R., Palese, P. 1979. Isolation of Influenza C Virus Recombinants. J. Virol. 12(3):1006-1014.
- 18.- Petri, T., Herrler, G., Compans, R.W., Meier-Ewert. 1980. Gene Products of Influenza C Virus. FEMS Microbiology Letters 2:43-47.
- 19.- Kendal, A.P. 1975. A Comparison of "Influenza C" With Prototype Myxoviruses: Receptor-Destroying Activity (Neuraminidase) and Structural Polypeptides. Virology 65:87-99.
- 20.- Cox, N.J., Kendal, A.P. 1976. Presence of a Segmented Single-Stranded RNA Genome in Influenza C Virus. Virology 74:239-241.
- 21.- Herrler, G., Compans, R.W. Meier-Ewert. 1979. A Precursor Glycoprotein in Influenza C Virus. Virology 92:49-56.
- 22.- Herrler, G., Nagele, A., Meier-Ewert, H., Bohm, A.S., Compans, R.W.. 1981. Isolation and Structural Analysis of Influenza C Virion Glycoproteins. Virology. 113:439-451.
- 23.- Meier-Ewert, H., Nagele, A., Herrler, G., Basak, S., Compans, R.W. 1981. Analysis of Influenza C Virus Structural Proteins and Identification of a Virion RNA Polymerase. In "Replication of Negative Strand Viruses" (D.H.L. Bishop and R.W. Compans, eds) Elsevier, N.Y.
- 24.- Chakraverty, P. 1974. The Detection and Multiplication of Influenza C Virus in Tissue Culture. J. Gen. Virol. 25:421-425.
- 25.- O'Callaghan, R.J., Loughlin, S.M., Labat, D.D., Howe, C. 1977. Properties of Influenza C Virus Grown in Cell Culture. J. Virol. 24:875-882.
- 26.- O'Callaghan, R.J., Labat, D.D. 1983. Evidence of a Soluble Substrate for the Receptor Destroying-Enzyme of Influenza C Virus. Inf. Immun. 39:305-310.

- 27.- Ohuchi, M., Ohuchi, R., Mifune, K. 1982. Demonstration of Hemolytic and Fusion Activities of Influenza C Virus. *J. Virol.* 4:1076-1079.
- 28.- Kitame, F., Sugawara, K., Ohwada, K., Homma, M. 1982. Proteolytic Activation of Hemolysis and Fusion by Influenza C Virus. *Arch. Virol.* 73:357-361.
- 29.- Sugawara, K., Ohuchi, M., Nakamura, K., Homma, M. 1981. Effects of Various Proteases on the Glycoprotein Composition and the Infectivity of Influenza C Virus. *Arch. Virol.* 68:147-151.
- 30.- Huang, R.T.C., Klenk, H.D., Rott, R. 1980. Fusion Between Cell Membrane and Liposomes Containing the Glycoproteins of Influenza Virus. *Virol.* 104:294-302.
- 31.- Pfeifer, J.B., Compans, R.W., 1984. Structure of the Influenza C Glycoprotein Gene as Determined from Cloned DNA. *Virus Research.* 1:281-296.
- 32.- Pfeifer, J.B., Compans, R.W. 1985. Structure and Variation of the Influenza C Glycoprotein. *Vaccine* 3:189-194.
- 33.- Herrler, G., Rott, R., Klenk, H.D. 1985. Neuraminic Acid is Involved in the Binding of Influenza C Virus to Erithrocytes. *Virol.* 141:144-147.
- 34.- Kitame, F., Nakamura, K., Saito, A., Sinohara, H., Homma, M. 1985. Isolation and Characterization of Influenza C Virus Inhibitor in Rat Serum. *Virus Res.* 3: 231-244.
- 35.- Kitame, F., Nakamura, K., Saito, A., Sinohara, H., Homma, M. 1985. Isolation and Characterization of Influenza C Virus Inhibitors in Rat Serum. *Vaccine* 3:211-214.
- 36.- Sugawara, K., Kitame, F., Homma, M., Nakamura, K. 1985. An Assay for the Receptor-Destroying Activity of Influenza C Virus. *Microbiol. Immunol.* 29:1207-1217.
- 37.- Herrler, G., Rott, R., Klenk, H.D., Müller, H.P., Shukla, A., Schauer, R. 1985. The Receptor Destroying Enzyme of Influenza C Virus is Neuraminase-O-acetylesterase. *EMBO Jrnl.* 4:1503-1506.
- 38.- Kitame, F., Nakamura, K., Saito, A., Suzuki, Y., Sinohara, H., Homma, M. 1986. Effects of  $\alpha$ -Macroglobulins and Murinoglobulins on the Hemagglutination by Influenza C Virus. *Biochem. Internat.* 12:649-652.

- 39.- Hongo, S, Sugawara, K., Homma, M., Nakamura, K. 1986. The Functions of Oligosaccharide Chains Associated with Influenza C Viral Glycoproteins. I.- The Formation of C Virus Particles in the Absence of Glycosilation. Arch. Virol. 89:171-187.
- 40.- Hongo, S, Sugawara, K., Homma, M., Nakamura, K. 1986. The Functions of Oligosaccharide Chains Associated with Influenza C Viral Glycoproteins. II.- The Role of Carbohydrates in the Antigenic Properties of Influenza C Viral Glycoproteins. Arch. Virol. 89:189-201.
- 41.- Rogers, G.N., Herrler, G., Paulson, J.C., Klenk, H.D. 1986. Influenza C Virus uses 9-O-acetyl-N-acetyl neuraminic acid as a High Affinity Receptor Determinant for Attachment to Cells. J. Biol. Chem. 261:5947-5951.
- 42.- Muchmore, E., Varki, A. 1987. Selective Inactivation of Influenza C Esterase: A Probe for Detecting 9-O-acetylated Sialic Acids. Science 23:1293-1294.
- 43.- Vlasak, R., Krystal, M., Nacht, M., Palese, P. 1987. The Influenza C Virus Glycoprotein (HE) Exhibits Receptor Binding (Hemagglutinin) and Receptor Destroying (Esterase) Activities. Virology 160:419:425.
- 44.- Herrler, G., Klenk, H.D. 1987. The Surface receptor is a Major Determinant of the Cell Tropism of Influenza C Virus. Virology 159:102-108.
- 45.- Herrler, G., Dürkop, I., Becht, H., Klenk, H.D. 1988. The Glycoprotein of Influenza C Virus is the Hemagglutinin, Esterase and Fusion Factor. J. Gen. Virol. 69:839-846.
- 46.- Nishimura, H., Sugawara, K., Kitame, F., Nakamura, K. 1988. Attachment of Influenza C Virus to Human Erythrocytes. J. Gen. Virol. 69:2545-2553.
- 47.- Luther, P., Cushley, W., Hölzer, C., Desselberger, U., Oxford, J.S. 1988. Acetylated Galactosamine is a Receptor for the Influenza C Virus Glycoprotein. Arch. Virol. 101:247-254.
- 48.- Sugawara, K., Kitame, F., Nishimura, H., Nakamura, K., 1988. Operational and Topological Analysis of Antigenic Sites on Influenza C Virus Glycoprotein and Their Dependence on Glycosilation. J. Gen. Virol. 69:537-547.
- 49.- Formanowski, F., Meier-Ewert, H. 1988. Isolation of Influenza C Virus Glycoprotein in a Soluble Form by Bromelain Digestion. Virus Res. 10:177-192.

- 50.- Schauer, R., Reuter, G., Stoll, S., Posadas del Río, F., Herrler, G., Klenk, H.D. 1988. Isolation and Characterization of Sialate 9(4)-O-acetylerase from Influenza C Virus. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler.* 369:1121-1130.
- 51.- Yamashita, M., Krystal, M., Palese, P. 1988. Evidence that the Matrix Protein of Influenza C Virus is Coded for By Spliced mRNA. *J. Gen Virol.* 62:3348-3355.
- 52.- Vlasak, R., Muster, T., Lauro, A.M., Powers, J.C., Palese, P. 1989. Influenza C Virus Esterase Analysis of Catalytic Site, Inhibition and Possible Function. *J. Virol.* 63:2056-2062.
- 53.- Hachinohe, S., Sugawara, K., Nishimura, H., Kitame, F., Nakamura, K. 1989. Effect of Anti-haemagglutinin-esterase Glycoprotein Monoclonal Antibodies on the Receptor-destroying Activity of Influenza C Virus. *J. Gen. Virol.* 70:1287-1292.
- 54.- Formanowski, F., Wharton, S.A., Calder, L.J., Hofbauer, C., Meier-Ewert H. 1990. Fusion Characteristics of Influenza C Viruses. *J. Gen. Virol.* 71:1181-1188.
- 55.- Wharton, S.A., Skehel, J.J. Wiley, D.C. 1986. Studies of Influenza Haemagglutinin-Mediated Fusion. *Virol.* 149:27-35.
- 56.- Gerber, P., Woolridge, R.L., Seal, J.R., Ziegler J.R. 1953. Epidemic Influenza B and C in Navy Recruits during Winter of 1951-52. *Proc. Soc. Exp. Biol.* 81:624-628.
- 57.- Andrews, B.F., McDonald, J.C, 1955. Influenza C Virus Infection in England. *Brit. Med. J.* 2:992-994.
- 58.- Grist, N.R. 1955. Influenza A and C in Glasgow, 1954. *Brit. Med J.* 2:994-995.
- 59.- De Meio, J.L., Woolridge, J.E., Whiteside, J.F. Seal, J.R. 1955. Epidemic Influenza B and C in Navy Recruits 1953 - 1954. II.- Antigenic Studies on Influenza Virus, Type C. *Proc. Soc. Exp. Biol.* 88:436-438.
- 60.- Farkas, E., Dömök, I., 1953. Isolation of Influenza C Virus in Hungary. *Acta Microbiol. Hung.* 1:85-87.
- 61.- Fraser, P.K., Hatch, L.A., Shell, G.N., Forster, J.M.R. 1959. Influenza C in a Naval Recruit Population. *Lancet* 1:1259-1260.
- 62.- Hornsleth A. 1967. Respiratory Virus Disease in Infancy and Childhood in Copenhagen 1963 - 1965. *Acta Path. et Microbiol. Scand.* 69:287-303.

- 63.- Jennings, R. 1968. Respiratory Viruses in Jamaica: A Virologic and Serologic Study 3.- Haemagglutination-inhibiting Antibodies to Type B and C Influenza Viruses in the Sera of Jamaicans. *Am. J. Epidemiol.* 87:440-446.
- 64.- Joosting, A.C.C., Head, B., Bynoe, M.L., Tyrrell, D.A.J. 1968. Production of Common Cold in Human Volunteers by Influenza C Virus. *Brit. Med. J.* 4:153-154.
- 65.- Dykes, A.C., Cherry, J.D., Nolan, J.E.. 1980. A Clinical, Epidemiologic, Serologic and Virologic Study of Influenza C Virus Infection. *Arch. Intern. Med.* 140:1295- 1298.
- 66.- O'Callaghan, R.J. Gohd, R.S., Labat, D.D. 1980. Human Antibody to Influenza C Virus: Its Age Related Distribution and Distinction from Receptors Analogs. *Inf. Immun.* 30:500-505.
- 67.- Troisi, C.L., Monto, A.S. 1981. Comparison of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Hemagglutination Inhibition in a Sero-epidemiological Study of Influenza Type C Infection. *J. Clin. Micro.* 14:516-521.
- 68.- Homma, M., Ohyama, S., Katagiri, S. 1982. Age Distribution of the Antibody to Type C Influenza Virus. *Microbiol. Immunol.* 26:639-642.
- 69.- Katagiri, S., Ohizumi, A., Homma, M. 1983. An Outbreak of Type C Influenza in a Children's Home. *J. Inf. Dis.* 148:51-55.
- 70.- Třimová, B., Scharfenorth, H., Adamczyk, G. 1983. Incidence of Influenza C Virus in Czechoslovakia and German Democratic Republic. *Acta Virol.* 27:502-510.
- 71.- Gerth, H.J., Bauer, K.H., Steinitz, H. 1975. Gibt es Hinweise auf eine Antigendrift bei Influenza C Viren? *Zbl.Bakt. Hyg* 231:47-56.
- 72.- El-Rai, F.M., Shaheen, Y.A., El-Diwani, K.M. Abdel-Al, M.H. 1977. The Incidence of Antibodies to Influenza C Virus in Egyptian sera. *J. Egypt. Public Health Assn.* 52:6-11.
- 73.- Chakraverty, P., Adhami, Z., Wise, R., Mattehws, R.S. 1984. Influenza C Virus in the United Kingdom. *J. Infect.* 8:177-179.
- 74.- Pead, P.F., Saeed, . A.A., Pomeroy, M. 1985. Influenza C Virus in the United Kingdom. *J. Infect.* 10:78-79.



- 75.- Buonaugurio, D.A., Nakada, S., Fitch, W.M., Palese, P. 1986. Epidemiology of Influenza C Virus in Man: Multiple Evolutionary Lineages and Low Rate of Change. *Virology* 153:12-21.
- 76.- Nishimura, H., Sugawara, K., Kitame, F., Nakamura, K., Sasaki, H. 1987. Prevalence of the Antibody to Influenza C Virus in Northern Luzon Highland Village, Philippines. *Microbiol. Immunol.* 31:1137-1143.
- 77.- Katagiri, S., Ohizumi, A., Ohyama, S., Homma, M. 1987. Follow-up Study of Type C Influenza Outbreak in a Children's Home. *Microbiol. Immunol.* 31:337-343.
- 78.- Mogabgab, W.J. 1962. Influenza C Virus in Monkey Kidney Tissue Cultures. *J. Bact.* 83:209-210.
- 79.- Takemoto, K.K., Lynt, R.K., Rowe, W.P., Huebner, R.J., Bell, J.A., Mellin, G.W., Davis, D.J. 1955. Primary Isolation of Influenza A B and C Viruses in Monkey Kidney Tissue Cultures. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 89:308-311.
- 80.- Austin, M.A.D., Monto, A.S., Maassab, H.F. 1978. Growth Characteristics of Influenza Virus Type C in Avian Hosts. *Arch. Virol.* 58:349-353.
- 81.- Nerome, K., Ishida, M. 1978. The Multiplication of an Influenza C Virus in an Established Line of Canine Kidney (MDCK) Cells. *J. Gen. Virol.* 39:179-181.
- 82.- Petri, T., Meier-Ewert, H., Compans, R.W., 1979. Replication and Plaque Assay of Influenza C Virus in Chicken Kidney Cells. *FEMS Microbiol Lett.* 5:227-230.
- 83.- Camillieri, J.J., Maassab, H.F., 1988. Characteristics of a Persistent Infection in Madin-Darby Kidney Cells with Influenza C Virus. *Intervirology.* 29:176-184.
- 84.- Goshima, F.Y., Maeno, K. 1989. Persistent Infection of MDCK Cells by Influenza C Virus: Initiation and Characterization. *J. Gen. Virol.* 70:3481-3485.
- 85.- Nishimura, H., Sugawara, K., Kitame, F., Nakamura, K., Katsushima, N., Moriuchi, H., Numazaki, Y., 1989. A Human Melanoma Cell Line Highly Susceptible to Influenza C Virus. *J. Gen. Virol.* 70:1653-1661.
- 86.- Moriuchi, H., Oshima, T., Nishimura, H., Nakamura, K., Katsushima, N., Numazaki, Y. 1990. Human Malignant Melanoma Cell Line (HMV-II) for Isolation of Influenza C and Parainfluenza Viruses. *J. Clin. Micro.* 28:1147-1150.

- 87.- Helenius, A.J, Kartenbeck, J., Simmons, K., Fries, E. 1980. On the Entry of Semliki Forest Virus into BHK-21 Cells. *J. Cell Biol.* 84:404-420.
- 88.- Maeda, T., Ohnishi, S. 1980. Activation of Influenza Virus by Acidic Media Causes Haemolysis and Fusion of Erythrocytes. *FEBS Lett.* 122:283-287.
- 89.- Zhdanov, V.M. 1959. Results of Further Research on Influenza in the USSR with special Reference to the 1957 Pandemic. *Bull. WHO.* 20:261-296..
- 90.- Chakraverty, P., Antigenic Relationship Between Influenza C Viruses. *Arch. Virol.* 58:341-348.
- 91.- Buonaugurio, D.A., Nakada, S., Desselberger, U., Krystal, M., Palese, P. 1985. Noncumulative Sequence Changes in the Hemagglutinin Genes of Influenza C Virus Isolates. *Virology* 146:221-232.
- 92.- Sugawara, K., Nakamura, K., Homma, M. 1983. Analysis of Structural Polypeptides of Seven Different Isolates of Influenza C Virus. *J. Gen. Virol.* 64:579-587.
- 93.- Meier-Ewert, H., Petri, T., Bishop, D.L., 1981. Oligonucleotide Fingerprint Analysis of Influenza C Virion RNA Recovered from Five Different Isolates. *Arch. Virol*67:141-147.
- 94.- Sugawara, K., Nishimura, H., Kitame, F., Nakamura, K. 1986. Antigenic Variation Among Human Strains of Influenza C Virus Detected with Monoclonal Antibodies to gp88 Glycoprotein. *Virus. Res.* 6:27-32.
- 95.- Kawamura, H., Tashiro, M., Kitame, F., Homma, M., Nakamura, K. 1986. Genetic Variation Among Human Strains of Influenza C Virus Isolated in Japan. *Virus Res.* 4:275-278.
- 96.- Yamashita, M., Krystal, M., Fitch, W.M., Palese, P. 1988. Influenza B Virus Evolution: Co-circulating Lineages and Comparison of Evolutionary Pattern with those of Influenza A and C Viruses. *Virol.*163:112-122.
- 97.- Wagaman, P., Spence, H.A., O'Callaghan R.J., 1989. Detection of Influenza C Viruses by Using In-Situ Esterase Assay. *J. Clin. Micro.* 27:832-836.
- 98.- Yuangi, G., Fengen, J., Ping, W., Min, W., Jiming, Z. 1983. Isolation of Influenza C Virus from Pigs and Experimental Infection of Pigs with Influenza C Virus. *J. Gen. Virol.* 64:177-182.

- 99.- Ohwada, K., Kitame, F., Sugawara, K., Nishimura, H., Homma, M., Nakamura, K. 1987. Distribution of the Antibody to Influenza C Virus in Dogs and Pigs in Yamagata Prefecture, Japan. *Microbiol. Immunol.* 31:1173-1180.
- 100.-Ohwada, K., Kitame, F., Homma, M. 1986. Experimental Infections of Dogs with Type C Influenza Virus. *Microbiol. Immunol.* 30:451-460.
- 101.-Inoue, H., Horio, S., Ichinose, M., Ida, S., Hida, W., Takashima, T., Ohwada, K., Homma, M. 1986. Changes in Bronchial Reactivity to Acetylcholine with Type C Influenza Virus Infection in Dogs. *Am. Rev. Resp. Dis.* 133:367-371.
- 102.-Takiguchi, K., Tachiro, M., Nakamura, K. 1990. Influenza C Virus Infection in Rats. *Microbiol. Immunol.* 34:35-44.
- 103.-Veit, M., Herrler, G., Schmidt, M.F.G., Rott, R., Klenk, H.D. 1990. The Hemagglutinating Proteins of Influenza B and C Virus are Acylated with Different Fatty Acids. *Virology* 177:807-811.
- 104.-Adachi, K., Kitame, F., Sugawara, K., Nishimura H., Nakamura, K. 1989. Antigenic and Genetic Characterization of Three Influenza C Strains Isolated in the Kinki District of Japan in 1982 - 1983. *Virology* 172:125-133.
- 105.-Leiter, J.M.E., Agrawal, S., Palese, P., Zamecnik, P.C., 1990. Inhibition of Influenza Virus Replication by Phosphorothioate Oligodeoxynucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:3430-3434.
- 106.-Frank, A.L, Puck, J. Hughes, B.J, Cate, T.R. 1980. Micro-neutralization Test for Influenza A and B and Parainfluenza 1 and 2 Viruses That uses Continuous Cell Lines and Fresh Serum Enhancement *J. Clin. Micro.* 12:426-432.
- 107.-Baxter, B.D., Couch, R.B., Greenberg, S.B. 1977. Maintenance of Viability and Comparison of Identification Methods for Influenza and Other Respiratory Viruses of Humans. *J. Clin. Micro.* 6:19-22.
- 108.-Homma, M. 1986. Epidemiological Characteristics of Type C Influenza. In *Options for The Control of Influenza*, Kendal, A.P. y Patriarca, P. Eds. pp 125-138.
- 109.-Petri, T., Meier-Ewert, H., Crumpton, W.M. and Dimmock, N.J. 1979. RNA's of Influenza Virus Strains. *Arch. Virol* 61:239-243.

- 110.-Dowdle, W.A., Kendal, A.P., and Noble, G.P. Influenza Viruses. En Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections. Eds: Lennette, E.H. y Schmidt, N.J. American Public Health Association. 1979



