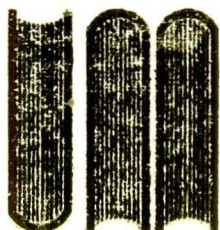


DICNE
\$4000=

8 JUN 19

UNIVERSIDAD DE MONTERREY

DIVISION DE CIENCIAS NATURALES
Y EXACTAS



UNIVERSIDAD
DE MONTERREY

Titulo:

DIAGNOSTICO ETIOLOGICO DE
LA INFLUENZA

REPORTE DEL PROGRAMA DE
EVALUACION FINAL
PRESENTADO POR

Autor:

MA. GUADALUPE DE LA ROSA MARTINEZ

EN OPCION AL TITULO DE
LICENCIADO EN QUIMICA CON
ESPECIALIDAD EN ANALISIS CLINICOS

Clasif:
040.54
R788d
1987
C.1

folio:
900797

Vo. Bo.

Ma. Lourdes Mty. M.

MONTERREY, N. L.

MAYO DE 1987

A Miguel Angel

A mis padres por toda su
dedicación, amor y confianza
za.

A mi abuelita Marcelina y
a mis tías, por su gran
cariño y apoyo.

Con todo mi amor y respeto.

Agradezco de todo corazón a cada uno de los maestros que me han dedicado parte de su tiempo y su interés sincero a lo largo de mis estudios. Y a todas las personas que de alguna forma colaboraron para la elaboración de este trabajo, en especial a:

Fam. Díaz Martínez,
Dr. Gerardo Velasco.

A mis asesoras:

QFB. Ma. Lourdes Mtz. M.
QFB. S. Teresa Jaramillo O.

Al Señor, mi Dios, por concederme tan maravillosa oportunidad.

I N D I C E

	pág
INTRODUCCION	1
MATERIALES Y METODOS	11
RESULTADOS	20
DISCUSION Y CONCLUSIONES	23
RESUMEN	27
BIBLIOGRAFIA	28

I N T R O D U C C I O N

La Influenza, comunmente conocida como "Gripe", es una de las enfermedades infecciosas de vías respiratorias más importante debido a la severidad y alta prevalencia con que se presenta (6, 15).

En 1892, Pfeiffer aisló el bacilo Haemophilus influenzae al que consideró como el agente etiológico de la enfermedad pero en 1933, Smith, Andrews y Laidlaw reportaron en Inglaterra, la presencia de un virus filtrable en secreciones nasofaríngeas obtenidas de pacientes sintomáticos, notando que los hurones y huevos embrionados eran susceptibles a estos virus. Años más adelante, reportes de aislamientos similares en varias partes del mundo establecieron a este virus como el agente etiológico de la Influenza, al cual se designó como tipo A. El segundo tipo serológico, el tipo B fue descrito en 1940 y el ter-

cero, tipo C en 1949 (7, 12, 14, 26, 27).

Estos tres tipos de virus de la Influenza constituyen la familia Orthomyxoviridae, cuyo nombre describe su afinidad por las mucinas, en especial las de glóbulos rojos. Los viriones consisten en partículas pleomórficas esféricas o filamentosas de 80 a 120 nm y se sabe que la forma depende de factores genéticos pero puede influir también el estado de la membrana de la célula huésped. El genoma está constituido por ocho segmentos diferentes de RNA de polaridad negativa, de tira única, con un peso molecular de $2-6 \times 10^6$ d. Cada uno de estos segmentos codifica por lo menos una proteína viral distinta: P₁, P₂, P₃, Nucleoproteína, Hemaglutinina, Neuraminidasa, Proteína M, y proteína NS. La nucleocápside, de simetría helicoidal y la proteína M, se encuentran rodeadas por una envoltura que contiene de un 20 a un 40 % de lípidos, la cual proviene de la membrana de la célula huésped. Sobre esta envoltura emergen unas estructuras llamadas espículas en un número de 700 a 900 dispuestas regularmente, cuya medida es de 80 a 100 Å (7, 15, 36).

Estas espículas son de dos tipos, y se diferencian tanto por su morfología como por sus funciones: La Hemaglutinina (HA) y la Neuraminidasa (NA) cuya proporción es de 5:1 respectivamente. La hemaglutinina tiene aspecto de bastoncillo, esta estructura confiere al virus poder hemaglutinante, ya que por acción de ésta se adsorbe a receptores presentes en la superficie de eritrocitos de algunos mamíferos y aves. La hemaglutinina está formada por subunidades; dos de HA₁ y dos de HA₂, unidas por puentes disulfuro, de las cuales una es variable y la otra esta-

ble. Este antígeno completo estimula la formación de anticuerpos que inhiben la hemaglutinación, pero sobre todo neutralizan el poder infeccioso. La neuraminidasa, tiene forma de hongo y posee actividad enzimática, actuando sobre los receptores situados en las células susceptibles y mediante la separación de ácido N- acetil- neuramínico capacita al virus para su liberación de la superficie de la célula. Por lo tanto los eritrocitos tratados con neuraminidasa del virus de la Influenza o con enzima destructora de receptores (RDE) de Vibrio cholerae no son aglutinables por virus homólogos; este antígeno también estimula la producción de anticuerpos (3, 7, 12, 14, 15, 16, 36).

Los virus son susceptibles a los solventes lípidos y al calor el cual inactiva primero la infectividad, posteriormente a la neuraminidasa y por último a la hemaglutinina (15).

En base a la composición de la ribonucleoproteína, los virus se clasifican en tres tipos inmunológicos distintos, el A, B y C; los cuales no tienen relación antigénica entre sí y por lo mismo no se produce respuesta inmune cruzada. El tipo A existe tanto para los animales como para el ser humano, causándoles enfermedad y se dividen en subtipos en base a la composición de su hemaglutinina y neuraminidasa. Los tipos B y C no presentan subtipos (7).

Todas las pandemias de Influenza se han debido al tipo A y en cada una de ellas el virus responsable ha sufrido una variación antigénica mayor; es decir la composición química de los antígenos de la hemaglutinina y/o neuraminidasa ha cambiado produciendo un nuevo subtipo, para el

cual no existen personas inmunes. La más importante de las pandemias ocurrió en 1918-1919 ya que hubo más de 20 millones de personas muertas debido a neumonía por Influenza del subtipo porcino ($H_{SW} N_1$) y a complicaciones bacterianas secundarias. Un rasgo característico de esta pandemia es que la mayoría de personas afectadas fueron adultos jóvenes entre 20 y 40 años de edad que por lo general son más resistentes que los niños y ancianos. En 1946-1947 apareció un nuevo subtipo ($H_1 N_1$); en 1957 el ($H_2 N_2$), responsable de otra pandemia no tan importante como la anterior; y en 1968 surgió un tercer subtipo ($H_3 N_2$). Además se han reportado reapariciones de Influenza porcina en 1976 y virus ($H_1 N_1$) en 1977. (7, 11).

Una posible explicación de estos cambios antigénicos es que debido a la forma del genoma viral, este grupo exhibe gran frecuencia de recombinación y reactivación múltiple, por lo que se ha considerado que el virus puede alojarse en algunos animales como el cerdo, sin causarle enfermedad y que en ellos ocurre recombinación, resultando nuevas cepas con características de los dos predecesores. Se ha observado que cada cepa presenta un antígeno mayor y varios antígenos menores, los cuales a su vez pueden constituir el antígeno mayor de otra cepa, por lo que al sufrir una infección por el virus de la Influenza se adquiere resistencia solo al virus específico u otros estrechamente relacionados; en algunas ocasiones puede presentarse reinfección , como los casos registrados tanto de cepas del subtipo A ($H_1 N_1$) como del subtipo A ($H_3 N_2$), en donde ésta es muy ligera o pasa inadvertida (3, 16, 26, 30, 36).

Además, los virus pueden presentar variaciones antigénicas

menores ya sea en la hemaglutinina y/o en la neuraminidasa como consecuencia de mutaciones de punto, originando variedades que son las responsables de las epidemias anuales. Anteriormente la periodicidad marcada de epidemias de Influenza tipo A cada 2 a 3 años, era un rasgo epidemiológico característico, sin embargo actualmente se presentan epidemias cada año durante el período invernal. En un estudio de control efectuado entre 1974 y 1985, se detectó que en estas epidemias anuales pueden circular si multáneamente los tipos A y B y los subtipos más recientes (H_1N_1) y (H_3N_2), pero siempre hay uno que es predominante (4).

La infección se adquiere por inhalación de aerosoles infectivos que provienen de personas enfermas o de portadores asintomáticos, los cuales se emiten al toser o estornudar. Al entrar a las vías respiratorias, la neuraminidasa del virus disminuye la viscosidad de la capa de moco, dejando al descubierto el epitelio ciliado y a la vez facilita la diseminación del líquido mucoso que contiene al virus. Esta secreción mucosa puede contener anticuerpos principalmente de la clase Ig A y algunas glucoproteínas inhibitoras. Si el virus logra superar esta barrera, se extiende en las membranas mucosas en donde se adsorbe a las células ciliadas de la tráquea (12, 16, 26, 31, 36).

La multiplicación se lleva a cabo mediante la penetración del virus a la célula huésped por acción de la hemaglutinina sobre los receptores específicos de la superficie celular, la envoltura de lípidos se fusiona con la membrana citoplasmática y se libera la nucleocápside de la cual se sintetiza el RNA en el núcleo con intervención de las RNA-polimerasas (P_1, P_2, P_3). La hemaglutinina y la neu-

raminidasa se sintetizan en el citoplasma y se incorporan al igual que la proteína M en la membrana citoplasmática de la célula infectada, liberándose el virus por gemación mediante la actividad de la neuraminidasa (7, 22).

La severidad del daño celular del epitelio está relacionada con la resistencia del huésped, por lo tanto los más susceptibles son aquellos que no han presentado infecciones anteriores con virus homólogos o estrechamente relacionados y su respuesta inmune local es baja. En niños recién nacidos la presencia de anticuerpos se debe a la transferencia pasiva de la madre durante la gestación y éstos duran solo el primer año de vida y luego desaparecen (8, 25, 26).

Entre los síntomas más característicos de la enfermedad se encuentra dolor de cabeza, mialgias generalizadas, conjuntivitis, tos, catarro y fiebre que puede durar hasta 3 días, ésta última se debe a pirógenos endógenos liberados de los fagocitos al interactuar con el virus durante la respuesta inmune. Por lo general, la enfermedad dura de 5 a 7 días, pero pueden ocurrir enfermedades leves y abortivas (12, 29, 31) .

En raras ocasiones puede presentarse también neumonía viral primaria la cual puede ser fatal en uno a dos días, debido a la necrosis del epitelio alveolar, bronquiolar y de la tráquea; en tanto que las complicaciones por neumonía bacteriana secundaria son más frecuentes y pueden ocasionar bronquitis, traqueobronquitis o crup. En pandemias anteriores se observó que las complicaciones bacterianas ocurridas se debieron en un 60 % a Staphylococcus aureus y en un 10 % a estreptococos beta-hemolíticos y a

Haemophilus influenzae . Las personas de más alto riesgo son aquellas que presentan enfermedades crónicas ya sea cardíacas, respiratorias, con diabetes y además las mujeres embarazadas. En personas normales la susceptibilidad es mayor en aquellas que se encuentran en edad escolar y en ancianos; por lo general los adultos jóvenes de 20 a 40 años son los menos susceptibles (2, 4, 13, 26, 31).

El diagnóstico de la enfermedad se establece por el aislamiento y la identificación de los virus de la Influenza, a partir de especímenes clínicos que consisten de exudado faríngeo o lavado nasal obtenidos durante los tres primeros días después de aparecer los síntomas e incluso de esputo y tejido pulmonar en caso de neumonía. (18, 35).

Por ser parásitos intracelulares, el método de aislamiento más utilizado es la inoculación de huevos embrionados de gallina de 9 a 10 días de desarrollo, por vía amniótica y alantoidea; los cuales son muy útiles para la producción de grandes cantidades de virus. La presencia del virus se comprueba por la técnica de Hemaglutinación con eritrocitos de pollo. La identificación posterior del tipo y subtipo se hace utilizando una serie de anticuerpos estandarizados en contra de la hemaglutinina, por medio de la técnica de Inhibición de la Hemaglutinación (I H A), ya que al formarse el complejo virus- anticuerpo, se neutraliza la capacidad hemaglutinante del virus. El diagnóstico se considera negativo si en un segundo pasaje no ocurre la hemaglutinación en la prueba; aunque se han reportado casos experimentales en que se ha recuperado el virus hasta el tercero o cuarto pasaje (2, 3, 14, 32,35).

Otros medios utilizados para el aislamiento del virus son

los cultivos de tejidos y células, principalmente las líneas de riñón de mono rhesus (RMK) y de riñón de perro Madin - Darby (MDCK), en las cuales puede presentarse un ligero efecto citopático no característico y la presencia del virus se detecta por la técnica de Hemadsorción y la identificación por Inhibición de la Hemaglutinación o por Inhibición de la Hemadsorción (6, 7, 8, 14, 15, 18, 20, 26).

Por otra parte, las técnicas de radioinmuno-ensayo (RIA) y ensayo-inmuno-enzimático (EIA), se sugieren como pruebas rápidas de diagnóstico viral en laboratorios de referencia por su alto grado de sensibilidad (28).

También puede demostrarse una infección reciente por pruebas serológicas empleando dos muestras de suero, una de la etapa aguda de la enfermedad y otra obtenida 10 a 15 días después, en la etapa de convalecencia. Un aumento en el título de anticuerpos al cuádruple indica una respuesta positiva. Las pruebas más utilizadas para este fin en orden decreciente de sensibilidad en base a un estudio comparativo son: ELISA, Neutralización, Fijación del complemento y la Inhibición de la Hemaglutinación (7, 12, 16, 26, 33).

Con el fin de prevenir futuras pandemias, algunos centros de estudios como el Centro Mundial de Influenza establecido en Londres por la Organización Mundial de la Salud, se han avocado a la producción de nuevas vacunas. Estas se producen en fluidos amniótico y alantoideo de huevos embrionados y cada año se seleccionan para prepararla las cepas más recientes del tipo A y B. Estas vacunas se recomiendan principalmente para personas de alto riesgo.

La vacuna de virus inactivados se administra por vía intramuscular y contiene subunidades purificadas del virus y se refuerza cada año. Esta logra un aumento en los anticuerpos séricos de la clase Ig G principalmente y en menor grado de los Ig A nasales. La vacuna de virus atenuados, ya sea por cepas adaptadas a bajas temperaturas o por serie de pasajes en huevos embrionados, se administran intranasalmente, produciendo mayor respuesta local de anticuerpos Ig A nasales y en menor grado Ig G séricos, dando así una reacción muy similar a la infección natural por lo que su efecto es más duradero y tiene mayor aceptación. Por otra parte, también se ha demostrado inmunidad mediada por células (CMI) en ratones y en voluntarios vacunados, ya que se producen células citotóxicas que destruyen a las células infectadas (9, 10, 17, 21, 22, 24, 26, 37, 38).

La quimioterapia antigripal es de carácter sintomático, aunque existen algunos antivirales que se emplean principalmente para prevenir la enfermedad. Entre éstos se encuentra el hidrocloreuro de amantadina, cuyo mecanismo de acción consiste en evitar la penetración del virus tipo A, a las células epiteliales. La desventaja de la amantadina es que puede producir algunos efectos colaterales como insomnio, dolor de cabeza y ansiedad (1, 3, 9, 16, 32, 34).

Otra medida de control que se debe considerar en casos de epidemia es evitar viajes y exposiciones en lugares muy concurridos y cerrados, ya que debido a la facilidad de la transmisión del virus puede ocurrir una rápida dispersión (4, 31).

En la ciudad de Monterrey, actualmente se notifican aproximadamente 500,000 casos anuales de enfermedades respiratorias agudas, de las cuales no se investiga el agente etiológico, debido a que la mayor parte de este tipo de enfermedades son causadas por agentes virales para cuyo diagnóstico se requiere de una tecnología especial, por lo que la investigación sobre estos virus se efectúa solamente en los laboratorios de referencia (6, 14).

En base a lo anterior, el objetivo del presente trabajo es aislar e identificar los virus de la Influenza de personas que presenten síntomas característicos, con el fin de contribuir en esta forma al diagnóstico etiológico y a la vigilancia epidemiológica de la enfermedad durante el período invernal de Enero a Abril de 1987.

M A T E R I A L E S Y M E T O D O S

Se examinaron un total de 195 especímenes faríngeos recolectados de personas de la ciudad de Monterrey que presentaban síntomas de enfermedad respiratoria aguda durante el período invernal de Enero a Abril de 1987, con el objeto de aislar e identificar los virus de la Influenza. Los especímenes se procesaron en el laboratorio de Microbiología de la División de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad de Monterrey.

Los exudados faríngeos se obtuvieron con hisopos estériles, los cuales se colocaron en un medio de transporte con antibióticos (R-1) y se almacenaron a 4°C por no más de una semana.

Para el aislamiento del virus, se inocularon embriones de pollo de un período de desarrollo de 9 a 10 días por vía

amniótica y alantoidea. La presencia del virus se detectó con la técnica de Hemaglutinación con eritrocitos de pollo al 0.5 % y la identificación posterior se realizó mediante la técnica de Inhibición de la Hemaglutinación. Se consideró una muestra negativa si en un segundo pasaje en huevo embrionado la prueba de Hemaglutinación resultó negativa (6, 14, 35).

I. PREPARACION DEL INOCULO.

1. Con jeringa estéril de 1.0 ml y aguja de 21 X 32 mezclar el caldo que contiene el espécimen, succionando y expulsando el material varias veces para homogenizar la suspensión.
2. Tomar un inóculo de 0.2 ml para cada embrión que se vaya a inocular.

II. AISLAMIENTO DEL VIRUS EN EMBRION DE POLLO.

1. Examinar la viabilidad del embrión utilizando un ovos copio, ésta se caracteriza por movimiento espontáneo y por la sombra de vasos sanguíneos corioalantoideos.
2. Marcar el límite de la cámara de aire.
3. Realizar una asepsia del cascarón sobre la cámara de aire con tintura de iodo y dejar actuar durante 1 min.
4. Hacer un orificio en el cascarón, sobre el centro de la

cámara de aire con un perforador de penetración ajus
tada.

5. Insertar la jeringa que contiene el inóculo en el ori
ficio y dirigir en dirección del ojo del embrión, man
teniendo el huevo transiluminado con el ovoscopio.
6. Penetrar la cavidad amniótica e inocular 0.1 ml. del
espécimen.
7. Remover la jeringa una distancia de 0.5 a 1.0 cm e i-
nocular 0.1 ml del espécimen en la cavidad alantoidea.
8. Sellar el orificio con parafina líquida o un adhesivo.
9. Incubar los huevos a 34°C con 40 - 70 % de humedad
durante 72 horas.
10. Refrigerar a 4°C durante una noche para dar muerte al
embrión y minimizar el sangrado durante la cosecha de
los líquidos.
11. Para cosechar los líquidos hacer una asepsia en el
cascarón sobre la cámara de aire con alcohol etílico
al 70 %, remover el cascarón y la membrana corioalan-
toidea con pinzas estériles.
12. Colectar el líquido alantoideo con una pipeta estéril
de 5 ml (rendimiento de 5 a 15 ml); colocarlo en un
tubo estéril y rotularlo adecuadamente.
13. Colectar el líquido amniótico con jeringa estéril de
5 ml y aguja de 21 X 32 en un tubo estéril y rotular-

lo adecuadamente.

14. Mantener los líquidos a 4°C.

III. DETECCION DEL VIRUS POR LA PRUEBA DE HEMAGLUTINACION.

1. Marcar dos hileras de una placa de microtitulación en " U " para cada antígeno, dos para cada uno de los virus utilizados como controles positivos y cuatro orificios para el control de eritrocitos de pollo.
2. Agregar 0.05 ml de PBS pH 7.2 (R-3), a los orificios para el control de eritrocitos y a los orificios del 1 al 12 de la hilera B hasta la H.
3. Agregar 0.1 ml de antígeno al primer orificio (hilera A) de cada una de las columnas de la placa.
4. Hacer diluciones seriadas usando dilutores de 0.0 5 ml.
5. Agregar 0.05 ml de la suspensión de eritrocitos de pollo al 0.5 % (R-4), a cada uno de los orificios.
6. Mezclar e incubar a temperatura ambiente por 45 a 60 minutos.
7. Leer la hemaglutinación cuando los eritrocitos de pollo en los orificios de control hayan formado botones compactos.

8. Después de leer los puntos finales, inclinar la placa de tal manera que las células no aglutinadas rueden y hagan un modelo en forma de lágrima.
9. Los especímenes negativos deben ser pasados en huevos embrionados una vez más. Los especímenes con título muy bajo deben ser pasados en huevos nuevos para incrementar el título.

NOTA: Una unidad hemaglutinante es la mínima cantidad (ma yor dilución) de la suspensión del virus que produce hemaglutinación completa.

IV. IDENTIFICACION DEL VIRUS POR LA TECNICA DE INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION.

A) Retrotitulación del antígeno.

1. Preparar diluciones de trabajo de cada antígeno que contengan 4 unidades hemaglutinantes por 0.025 ml.
2. En una placa de microtitulación en " U ", marcar dos hileras para cada antígeno y cuatro para el control de eritrocitos de pollo.
3. Agregar 0.05 ml de PBS, pH 7.2 (R-3), a los orificios de las hileras de la B a la H y a los orificios de los controles.
4. Agregar 0.1 ml del antígeno al primer orificio de ca da columna de la placa (hilera A).

5. Hacer diluciones seriadas de los orificios del A al H, usando dilutores de 0.05 ml.
6. Agregar 0.05 ml de la suspensión de eritrocitos de pollo al 0.5 % (R-4), a cada uno de los orificios.
7. Mezclar e incubar a temperatura ambiente por 45 a 60 minutos.
8. Leer la hemaglutinación cuando los eritrocitos en los orificios de control hayan formado botones compactos.
9. Después de leer los puntos finales inclinar la placa de tal manera que las células no aglutinadas rueden y hagan un modelo en forma de lágrima.

NOTA: Si la dilución probada es correcta, la aglutinación deberá ocurrir en los primeros cuatro orificios. Si se observan muchas o muy pocas unidades hemaglutinantes ajustar la dilución del antígeno con PBS, pH 7.2 (R-3). Repetir la retrotitulación.

B) Inhibición de la Hemaglutinación.

1. Agregar 0.025 ml de PBS, pH 7.2 (R-3), a cada orificio en las hileras de la A a la G omitiendo la H de placas de microtitulación en " V ".
2. Agregar 0.05 ml de un antisuero apropiado al primer orificio (hilera H) y diluir en forma seriada usando dilutores de 0.025 ml.
3. Agregar 0.025 ml del antígeno estandarizado (4 uni

dades hemaglutinantes) a cada dilución del suero.

4. Preparar un control para cada suero colocando 0.025 ml de antisuero en un orificio, mezclar.
5. Preparar cuatro orificios para el control de eritrocitos de pollo, agregando 0.05 ml de PBS, pH 7.2 (R-3), a cada orificio.
6. Incubar las placas a temperatura ambiente por 30 minutos.
7. Agregar 0.05 ml de la suspensión de eritrocitos de pollo al 0.5 % (R-4), a todos los orificios. Mezclar y sellar la placa.
8. Leer cuando los eritrocitos en los orificios de control hayan formado botones compactos.

INTERPRETACION: El título es la más alta dilución del virus que inhibe la aglutinación de los eritrocitos de pollo. Si ocurre aglutinación en los orificios de control de sueros, éstos deben ser absorbidos con glóbulos rojos para remover las aglutininas.

REACTIVOS.

(R-1) Medio de transporte.

Caldo de tripticaseína y soya	100.00 ml
Gelatina	0.50 g

Preparar el caldo con gelatina y esterilizar en

autoclave a 121°C durante 15 minutos. Agregar penicilina, estreptomycin y anfotericina para obtener una concentración final de 800 UI/ml, 400 microgramos/ml y 5 microgramos/ml respectivamente.

(R-2) Solución de Alsever.

Citrato de sodio	8.00 g
Glucosa	20.00 g
Ac. Cítrico	0.55 g
Cloruro de sodio	4.20 g

Disolver en agua destilada y aforar a un litro, esterilizar por filtración a través de una membrana Millipore de 0.22 micrómetros. Almacenar a 4°C.

(R-3) Buffer Salino de Fosfatos (PBS), pH 7.2

Fosfato disódico	1.096 g
Fosfato monosódico	0.315 g
Cloruro de sodio	8.500 g

Agregar agua destilada y aforar a un litro, ajustar el pH, esterilizar por filtración a través de una membrana Millipore de 0.22 micrómetros. Almacenar a 4°C.

(R-4) Suspensión de eritrocitos de pollo al 0.5 %.

Eritrocitos de pollo	0.5 ml
PBS, pH 7.2 (R-3)	99.5 ml

1. Sangrar un pollo con jeringa conteniendo una pequeña cantidad de Alsever (R-2).
2. Quitar la aguja de la jeringa e inmediatamente colocar la sangre en un matraz conteniendo suficiente solución de Alsever (R-2) de tal manera que la proporción sea de 1:4.
3. Mezclar y almacenar a 4°C.
4. Lavar tres veces los eritrocitos de pollo con PBS, pH 7.2 (R-3), centrifugando a 1500 rpm por 15 minutos.
5. Centrifugar para empaquetar los eritrocitos.
6. Agregar 5 ml del paquete de eritrocitos a 5 ml de PBS, pH 7.2 (R-3).
7. Hacer un hematocrito y anotar el porcentaje de eritrocitos.
8. Almacenar esta suspensión a 4°C.

R E S U L T A D O S

De los 195 especímenes clínicos analizados para el aislamiento e identificación de los virus de la Influenza, no se obtuvieron aislamientos.

En la tabla No. 1 se presenta la distribución de los especímenes clínicos recolectados en relación a los rangos de edad, tanto del sexo masculino como del femenino, de los cuales la mayor frecuencia correspondió a pacientes sintomáticos mayores de 50 años de edad.

La distribución de los especímenes clínicos en relación a la fecha de recolección se puede observar en la tabla No. 2, en donde se aprecia un número mayor de éstos en los últimos días del mes de Enero y en los primeros 15 días del mes de Marzo.

TABLA No. 1
DISTRIBUCION DEL NUMERO DE ESPECIMENES
CLINICOS EN RELACION A LA EDAD Y SEXO
DEL PACIENTE.

Edad (Años)	No. de especímenes recolectados	Sexo		Número de aislamientos
		F	M	
0 - 1	4	2	2	-
2 - 10	16	10	6	-
11 - 20	28	20	8	-
21 - 30	37	30	7	-
31 - 40	33	26	7	-
41 - 50	9	9	-	-
> 50	68	17	51	-
TOTAL	195	114	81	0

TABLA No. 2
 NUMERO DE ESPECIMENES CLINICOS
 EN RELACION A LA FECHA DE
 RECOLECCION.

Fecha de obtención		Número de especímenes clínicos.
ENERO	15 - 31	65
FEBRERO	1 - 15	35
	16 - 28	18
MARZO	1 - 15	42
	16 - 31	16
ABRIL	1 - 15	18
	16 - 24	1
T O T A L		195

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Debido a que la Influenza es una enfermedad de las vías respiratorias que puede llegar a originar grandes epidemias y complicaciones severas, es esencial el estudio del comportamiento de los virus con el objeto de aplicar todas las medidas posibles para su control.

En relación a los resultados obtenidos, se puede observar que la frecuencia de enfermedad debida a los virus de la Influenza varió respecto al estudio efectuado durante el período invernal de 1986, en el cual se aislaron 1 virus del tipo A y 7 del tipo B de un total de 100 especímenes analizados (35).

Probablemente la disminución de aislamientos se debió a que durante el período invernal bajo estudio, circularon virus antigénicamente relacionados con los anteriores, pa

ra los cuales la población general era inmune, de tal forma que solamente se presentaron infecciones muy leves o a sintomáticas (3, 16, 30, 36).

Además del factor antes mencionado, hay que considerar que el período de circulación de los virus de la Influenza pue de variar; por ejemplo, en la ciudad de Houston Texas, la mayor frecuencia de aislamientos se obtuvo en el período comprendido entre los meses de Noviembre y principios de Enero. Este mismo fenómeno podría haberse presentado en nuestro medio, lo cual concuerda con los resultados obteni dos (19, 23).

Otro factor muy importante que se requiere tomar en cuenta para la recuperación del virus, es la etapa de la enferme dad en la cual se obtienen los especímenes clínicos, ya que una vez desaparecidos los síntomas de la fase aguda disminuye considerablemente la probabilidad de aislamiento. En relación a lo anterior cabe mencionar que la mayoría de los especímenes clínicos obtenidos para este estudio se recolectaron de pacientes con un período de enfermedad de 5 a 7 días que acudieron a una clínica de bienes tar familiar. Debido a ésto se deben procesar aquellos especímenes que procedan de personas que presenten los síntomas definidos de la infección y que se encuentren dentro de los tres primeros días de evolución de la enfer medad, condiciones indispensables para poder tener éxito en el aislamiento. (5, 14, 16).

Por otra parte, el número de especímenes analizados no constituye una muestra representativa de la población afec tada con enfermedad respiratoria aguda, de tal manera que se recomienda incrementar el número de pacientes estudia-

dos y efectuar un muestreo aleatorio de los mismos para determinar la morbilidad de la Influenza (4).

Respecto a la técnica de aislamiento en embriones de pollo se puede mencionar que es sencilla de efectuar, económica y eficiente para los virus de Influenza tipos A y B. Sin embargo, es indispensable la refrigeración rápida de las muestras porque los virus son muy sensibles a los cambios de temperatura y se pierden con facilidad. Además para incrementar la frecuencia de aislamientos se recomienda que los antibióticos utilizados en el medio de transporte se renueven cada semana y se incluya un antimicótico para disminuir los organismos contaminantes (14, 35).

Es necesario enfatizar que para obtener resultados confiables en las técnicas de hemaglutinación e inhibición de la hemaglutinación se requiere un control de calidad muy estricto, que incluye el utilizar controles positivo y negativo, por medio de los cuales se pueda apreciar cualquier interferencia ya sea debida a los reactivos o al equipo utilizados. Por otro lado, tanto la técnica de hemaglutinación como la de inhibición de la hemaglutinación son fáciles de realizar e interpretar, además de ser confiables por su grado de sensibilidad y reproducibilidad (5, 14).

En conclusión, debido a la alta frecuencia y variabilidad en el patrón de las enfermedades respiratorias agudas y que además de los virus de la Influenza existen otros patógenos involucrados en este tipo de enfermedad como los rinovirus, adenovirus, virus de la parainfluenza y virus sincitial respiratorio entre otros, se recomienda continuar en el futuro con este tipo de investigaciones para poder establecer el agente etiológico y las característi-

cas epidemiológicas de la enfermedad y en esta forma contribuir con las instituciones de salud para aplicar las medidas de control necesarias para el beneficio de la comunidad.

R E S U M E N

Se analizaron 195 especímenes faríngeos de personas con síntomas de enfermedad respiratoria aguda, recolectados en medio de transporte con antibióticos, con el propósito de aislar virus de la Influenza mediante la inoculación de embriones de pollo de 9 a 10 días de desarrollo. La detección e identificación posterior se realizaron mediante las técnicas de Hemaglutinación e Inhibición de la Hemaglutinación respectivamente.

De los especímenes analizados no se obtuvo algún aislamiento de virus de la Influenza.

B I B L I O G R A F I A

1. Bailowitz, A. et al. 1985. Use of amantadine in the United States 1977-1982. J. Infect. Dis. 151: 372 - 373.
2. Burrows, W. 1974. Tratado de Microbiología. 3^a ed. Ed. Interamericana, México. pp 788 - 795.
3. Conacyt. 1980. La Gripe. Inf. Cient. Tec. 11:5-9
4. Couch, R. B. et al. 1986. Influenza: Its Control in Persons and Populations. J. Infect. Dis. 153: 431 - 439.
5. Cross, C. A. and E. J. Bell. 1974. Diagnostic methods in clinical virology. 2nd. ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford. pp 39 - 45.

6. Davidson, I. y J. B. Henry. 1978. Diagnóstico Clínico por el laboratorio. 6^a ed. Ed. Salvat, Barcelona. pp 1189, 1190, 1195.
7. Dulbecco, E. and H. S. Ginsber. 1980. Virology. Harper and Row, Philadelphia. pp 1120- 1138.
8. Edwards, M. et al. 1986. Human adenoid organ culture: A model to study the interaction of Influenza A with human nasopharyngeal mucosa. J. Infect. Dis. 153: 41 - 47.
9. Encyclopaedia Britannica. 1981. Influenza. Encyclopaedia Britannica Inc. Tomo V. p 353.
10. Encyclopaedia Britannica. 1981. Recent virus advances. Encyclopaedia Britannica Inc, USA. Tomo 11. p 834.
11. Encyclopaedia Britannica. 1981. Respiratory tract. Viral Diseases. Enciclopedia Britannica Inc., USA. Tomo 9. pp 548 - 549.
12. Fenner, F. J. y D. O. White. 1973. Virología médica. La prensa médica mexicana, México. pp 198- 211, 307- 317.
13. Frank, A.L. et al. 1985. Comparison of infection rates and severity of illness for Influenza A subtypes (H_1N_1) and (H_3N_2). J. Infect. Dis. 151: 73-79.
14. Frankel, S. R. and A. G. Sonnenwirth. 1970. Clini-

(cal Laboratory Methods and Diagnosis. 7th. ed. Mosby Company. pp 1608 - 1622.

15. Jackson Gee, G. and R. L. Muldoon. 1975. Viruses Causing Common Respiratory Infections in Man. The University of Chicago Press, Chicago. pp 199- 233.
16. Jawetz, E. y J. Melnik. 1983. Microbiología Médica. El manual moderno. 10a. ed. México. pp 432-439.
17. Johnson, P. R. et al. 1985. Comparison of long-term systemic and secretory response in children given live, attenuated, or inactivated Influenza A vaccine. J. Med. Virol. 17 : 325- 335.
18. Kimball, A. M. et al. 1983. Isolation of respiratory syncytial and Influenza viruses from the sputum of patients hospitalized with pneumonia. J. Infect. Dis. 147 : 181 - 184.
19. MMWR. 1987. Center for diseases control morbidity and mortality weekly report. 36 : 64-65
20. Moffet, M. L. 1975. Clinical Microbiology. J.B. Lippincott Company, USA. pp 154 - 159.
21. Morag, A. et al. 1983. Clinical and serological response in human following immunization with Gripax Influenza vaccine. J. Med. Virol. 11: 67 - 75
22. Norbert, J. R. et al. 1985. Expression of viral antigen after infection of human lymphocytes, monocytes

and macrophages with Influenza virus. J. Infect. Dis. 151: 308 - 313.

23. Acute respiratory disease . Update from Influenza re search center at Baylor College of medicine. USA. January 3, 1987. 12: 1
24. Pachuki, F. et al. 1985. Attitudes and behavior of health care personnel regarding the use and efficacy of Influenza vaccine. J. Infect. Dis. 151: 1170 - 1171.
25. Potter, C. W. et al. 1983. Interference following dual inoculation with Influenza A (H₃N₂) and (H₁N₁) viruses in ferrets and volunteers. J. Med. Virol. 11 : 77 - 86.
26. Rhodes, A. J. and C. E. Rooyen. 1962. Textbook of Virology. 4th ed. The Williams and Wikin Company, Baltimore. pp 42 - 49, 128- 134, 213 - 247.
27. Rivers, H. 1965. Enfermedades por virus y richett-sias. Ed. Interamericana, México. pp 516 - 543.
28. Sarkkienen, H. K. et al. 1981. Detection of Influen za A virus by Radio-immunoassay and Enzime-immunoassay from nasopharyngeal specimens. J. Med. Virol. 7: 213 - 222.
29. Smith, H et al. 1983. Studies on the pathogenicity of Influenza virus for ferrets as a model for Influen za in man. In: Human immunity to viruses. A. Ennis. Academic Press, New York. pp 133 - 135.

30. Sonoguchi, T. et al. 1986. Reinfection with Influenza A (H₂N₂, H₃N₂, H₁N₁) viruses in soldiers and students in Japan. J. Infect. Dis. 153: 33 - 40.
31. Taylor, B. et al. 1985. An epidemic of Influenza in the population of Niue. J. Med. Virol. 16: 133- 136.
32. Togo, Y. and E. A. McCracken. 1976. Chemoprophylaxis and therapy of respiratory viral infection. In: Antiviral with Clinical Potential. C. Merigan. The University of Chicago Press, Chicago. pp 109- 120.
33. Van Vons, L. P. et al. 1985. Serologic diagnosis of Influenza A/ UESS/ 77 (H₁N₁) Infections: Value of ELISA compared to other antibody techniques. J. Med. Virol. 16: 315 - 320.
34. Walker, J. S. and E. L. Stephen. 1973. Small- Particle aerosols of antiviral compounds in treatment of type A Influenza pneumonia in mice. In: Antiviral with Clinical Potential. C. Merigan. The University of Chicago Press, Chicago. pp 140- 144.
35. Wong Ruiz, M. S. 1986. Aislamiento e identificación de los virus de la Influenza. Reporte del programa de evaluación final. UDEM. pp 11 - 26.
36. Youmans, G. P.; P. Y. Paterson y H. M. Sommers. 1982. Infectología Clínica. 2^a ed. Ed. Interamericana, México. pp 397 - 412.
37. Zahradnik, J. M. et al. 1983. Immune response in serum and respiratory secretions following vaccination with a live cold-recombinant (C R 35) and inactiva-

ted A/ URSS / 77 (H₁N₁) Influenza virus vaccine.
J. Med. Virol. 11; 277 - 285.

38. Zakay-Rones, Z. et al. 1982. Cellular response in humans following vaccination with Gripax Influenza virus. J. Med. Virol. 10 : 75 - 80.

900797