

DCNE
\$1,500

3 SET. 1986

FECHA DE DEVOLUCION

El último sello marca la fecha tope para ser devuelto este libro.

El lector pagará ~~\$500~~ pesos por cada día que ~~pase una~~ semana después del vencimiento.

15 MAR. 1987 ²
7 MAYO 1987 ²

clasific.

040.54

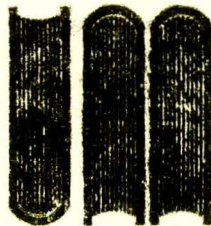
w928a

1986

C.I

UNIVERSIDAD DE MONTERREY

DIVISION DE CIENCIAS NATURALES
Y EXACTAS



UNIVERSIDAD
DE MONTERREY

Título

AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE
LOS VIRUS DE LA INFLUENZA

REPORTE DEL PROGRAMA DE
EVALUACION FINAL
PRESENTADO POR

Auto
MARIA SOLEDAD WONG RUIZ

Folio
900643

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

Vo Bo.
Ma. Lourdes Mtz. M.

MONTERREY, N. L.,

MAYO DE 1986

Si sabes poner
a Dios en todo lo que
haces, lo encontraras
también en todo lo
que pasa.

Vladimir Ghika.

A DIOS NUESTRO SEÑOR.

A mi Madre muy especialmente,
a quien admiro como Madre, Esposa
y gran Amiga. Gracias por darme
lo mejor de Ti, te Adoro.

A mi Padre, por ser un hombre
que siempre ofrece lo mejor de El,
a quien admiro y respeto.

A mis Abuelitos:
Sra. Soledad Gutiérrez
Sr. Martín Tabares G.
Por su amor, cariño y cuidados.

A mis Hermanos: Marte, Daniella, Erika y Ciro.
Por quererme.

A mis Tíos. Por su cariño y apoyo.

A mi Asesora:
Srita. Q.F.B. Ma. de Lourdes Martínez Macouzet.
Por todo su apoyo y dedicación para la
elaboración de este trabajo. Por su cariño,
comprensión y paciencia a lo largo de toda
mi carrera. Te quiero.

Al Dr. Gerardo Velazco, quien me brindó
su ayuda desinteresada en todo momento.

Con cariño, respeto y admiración a mis Maestras:

Srita. Q.F.B. Maricela Ramírez B.

Srita. Q.F.B. S.Teresa Jaramillo O.

Srita. Q.F.B. Laura E. García T.

A Juan J., por su ayuda.

A mis Maestros, Compañeros y Amigos.

Y en general, a todas aquellas
personas que colaboraron de
alguna u otra manera en la
elaboración de este trabajo.

INDICE

	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 es una de las enfermedades respiratorias que aún no ha sido controlada y que presenta un alto índice de contagiosidad. Se sabe desde hace muchos años que es una enfermedad cuyos agentes etiológicos son los diferentes tipos del virus de la Influenza.

El término Influenza fue introducido en Italia a principios del siglo XV para describir una epidemia que se atribuyó a la influencia de las estrellas. Este término fue adoptado por los Ingleses en el siglo XVIII y durante este mismo período los Franceses nombraron a la enfermedad como "la gripe".

Durante la pandemia de 1889, Pfeiffer aisló el bacilo conocido como Haemophilus influenzae, al cual consideró como el agente etiológico de la enfermedad. Sin embargo, no fue hasta 1918 cuando la mayoría de los investigadores concluyeron que la infección no era causada por una bacteria sino por un virus. En 1933, Smith, Andrews y Laidlow, aislaron el virus de la Influenza tipo A inoculando hurones por vía nasal con filtrados de secreciones de nasofaringe obtenidos de personas durante la etapa aguda de la enfermedad. Sus observaciones fueron confirmadas por Francis, quien aisló el virus empleando hurones y lo transfirió a ratones, observando que les producía neumonía. En 1940, Francis y Magill aislaron un grupo antigénicamente distinto al anterior al que designaron como virus de la Influenza B. Francis en 1949, aisló otro virus que presentaba características antigénicas distintas, al cual denominó virus de la Influenza C (1).

Hirst, McClellan y Hare descubrieron que los eritrocitos de pollo eran aglutinados por los virus de la Influenza y que esta acción aglutinante podía ser inhibida específicamente por los anticuerpos de sueros inmunes. Estos descubrimientos establecieron la base para el desarrollo de los métodos de identificación de los virus (2).

Los virus de la influenza pertenecen a la familia Orthomyxoviridae, tienen forma esférica, en ocasiones filamentosa, se caracterizan por poseer un genoma RNA de ocho segmentos de tira única, con un peso molecular de $2-4 \times 10^6$ Daltons. Cada uno de estos segmentos codifica una proteína viral distinta: P1, P2, P3, Nucleoproteína, Hemaglutini-

nina, Neuraminidasa, Proteína M y Proteína NS. La nucleocápside y la proteína de la matriz se encuentran rodeadas de una envoltura constituida de lípidos. De la capa de lípidos se proyectan las glicoproteínas de la superficie viral que consisten de trímeros y tetrámeros de hemaglutinina y neuraminidasa respectivamente. La hemaglutinina es un antígeno que estimula la producción de anticuerpos, los cuales inhiben la hemaglutinación de eritrocitos de pollo y además neutralizan el poder infeccioso. La neuraminidasa es una enzima que presenta una actividad similar a la de Vibrio cholerae denominada enzima destructora de receptores, que desintegra los agregados producidos por la hemaglutinina al reaccionar con el ácido neuramínico, separándolo del resto de los receptores con los que la hemaglutinina se había combinado (1,3,4,5,6).

Uno de los aspectos más intrigantes en cuanto a la replicación del virus de la Influenza es la manera en la que el virus adquiere su genoma completo. Se sabe que la transcripción de los diferentes segmentos de RNA se inicia independientemente. Por otra parte, la síntesis del RNA viral es regulada durante la infección y puede involucrar una transcripción selectiva de su plantilla, ya que ésta controla la producción de los ácidos ribonucleicos mensajeros (7).

La replicación del virus se inicia cuando el virión se une a los receptores del ácido N-acetil neuramínico de la membrana de la célula huésped mediante la molécula de la hemaglutinina. Se ha demostrado que penetra por fusión y el virión es transportado hacia el citoplasma dentro de una vesícula pinocítica, los lisosomas se unen a esta

vesícula formándose así el fagolisosoma lo cual conduce a la reducción del pH, permitiendo de esta forma la liberación de la nucleocápside. Por un mecanismo desconocido el RNA viral es transportado al núcleo, en donde la polimerasa viral transcribe filamentos positivos del RNA mensajero (mRNA) y filamentos negativos del RNA viral. Después de la síntesis del RNA y de las proteínas virales las nucleocápsides son ensambladas en el citoplasma. La envoltura y las glicoproteínas superficiales se obtienen por un proceso de gemación en la membrana plasmática de la célula huésped. Se cree que la neuraminidasa, remueve los residuos del ácido N-acetil neuramínico del virión completo, para evitar que se aglomeren unos con otros favoreciendo así la liberación de los virus (1,8).

Los virus de la influenza sufren dos tipos de variaciones en sus antígenos de superficie (Hemaglutinina y Neuraminidasa). El primer tipo se denomina cambio antigénico menor (drift) y consiste en una serie de alteraciones menores dentro de un grupo de cepas similares; este tipo de cambio antigénico es el responsable de las epidemias. El segundo tipo de cambio antigénico es el mayor (shift) e implica la sustitución de la hemaglutinina, de la neuraminidasa o de ambas espículas. Debido a que el virus de la Influenza tipo A es el único que ha sufrido este tipo de cambio antigénico es el responsable de las grandes pandemias. En el virus de la Influenza B solo se han detectado cambios antigénicos menores y los virus de la Influenza C han sido aislados ocasionalmente (9).

Los factores necesarios para causar una epidemia o pandemia no han sido bien definidos, pero el más significativo parece ser una población susceptible al virus circulante. La magnitud de una epidemia puede ser directamente proporcional al grado de cambio antigénico del virus (2).

Cada 10 a 20 años ha aparecido en la naturaleza una nueva cepa pandémica del virus de Influenza A, la cual presenta una hemaglutinina serológicamente distinta al subtipo anterior. Debido a que el genoma viral está constituido por ocho segmentos individuales, se ha propuesto que estas cepas se originan por la recombinación de una cepa humana prevalente con otro virus de Influenza A de origen animal.

Si este concepto es correcto, se puede suponer que muchos de los segmentos del RNA de la nueva cepa exhiben una homología de casi un 100% en la secuencia de bases en relación al segmento correspondiente del subtipo humano anterior (10).

Actualmente, por medio de anticuerpos monoclonales se han podido analizar los cambios antigénicos menores (drift) que ocurren en las diferentes cepas de los virus de la Influenza. De esta forma se han estudiado y seleccionado las variantes con un potencial epidemiológico significativo de los virus H3N2 que circularon en Japón y el sureste de Asia desde 1968 hasta 1982 (11).

Entre las pandemias más importantes de este siglo se consideran las siguientes: la que ocurrió durante el período de 1918 a 1919, la cual

ocasionó más de 20 millones de muertes en la población de 30 a 40 años; la del período entre 1957 a 1958 que fue producida por la cepa Asiática y la que se registró de 1968 a 1969 que se atribuye a la cepa Hong Kong. En estas dos últimas, la mayoría de las muertes se presentaron entre los niños y los ancianos (3,12).

La infección se adquiere por vía aérea al inhalar el virus, el cual se disemina a la orofaringe y a las vías respiratorias superiores. El período promedio de incubación es de dos días (varía entre 1 y 4 días) presentándose los síntomas clínicos de la infección: aparición súbita de fiebre, malestar, mialgias, dolor de cabeza, tos, faringitis y escalofríos. La fiebre es característica de la influenza presentándose temperaturas tan altas como de 41°C. La enfermedad persiste por dos a cinco días y desaparece sin dejar secuelas (3).

Cuando un huésped entra en contacto con los virus y éstos no son neutralizados por los anticuerpos de la clase IgA ocurre la replicación y la diseminación viral. Por lo tanto, el curso de la enfermedad depende tanto de la cepa del virus como de los factores del huésped incluyendo la respuesta inmune local (IgA), la sérica (IgG) y los efectos debidos a la respuesta inmune mediada por células. Como prueba de esto último se ha demostrado la inducción de células efectoras y citotóxicas y la actividad de células matadoras naturales, la cual es máxima dos días después de la infección; su toxicidad está directamente relacionada con la producción de interferón y con la recuperación del paciente (1,2,13,14).

Las complicaciones más graves que se pueden presentar durante la infección pueden ser producidas por el propio virus y son bronquiolititis, crup, neumonitis, encefalitis y síndrome de Reye. Además pueden ocurrir infecciones bacterianas secundarias como neumonía, bronconeumonía, otitis media, sinusitis, miocarditis y miositis. Este tipo de infecciones se presentan con mayor frecuencia en pacientes con enfermedades pulmonares persistentes y en individuos débiles; entre los agentes etiológicos más comunes se encuentran: Staphylococcus aureus, Haemophilus influenzae y Streptococcus pneumoniae (15,16,17).

El diagnóstico de una enfermedad viral respiratoria puede establecerse considerando los síntomas, la edad del paciente, la época del año y la población involucrada. Sin embargo, para un diagnóstico específico se requiere del aislamiento del virus o la demostración de un aumento en el título de anticuerpos séricos (15,16).

Debido a que los virus son parásitos intracelulares obligados, el cultivo de éstos requiere de huéspedes vivos. Para esto se pueden emplear diversas especies de animales de laboratorio (ratones, ratas y cobayos), embriones de pollo, cultivos de tejido diferenciales o de células. Los embriones de pollo han sido utilizados como huéspedes sensibles para el cultivo de los virus de la Influenza. Las principales ventajas que ofrece el uso de huevos embrionados en comparación con animales de laboratorio y otros medios de cultivo es que son estériles, no desarrollan funciones inmunológicas, no son caros y son fáciles de conseguir en cualquier parte del mundo. Además en los hue-

vos embrionados se producen grandes cantidades del virus en comparación con las obtenidas en los cultivos de células.

Los especímenes clínicos más comunmente empleados para el aislamiento del virus y su identificación consisten en lavados o raspados faríngeos, correspondientes a la fase aguda de la enfermedad. Como medio de transporte se puede usar caldo de tripticaseína y soya conteniendo gelatina al 0.5%, y ciertos antibióticos como la penicilina y la estreptomicina, los cuales disminuyen la contaminación bacteriana.

El espécimen clínico se inocula en las cavidades amniótica y alantoidea de huevos embrionados de un período de desarrollo de 9 a 10 días, una vez inoculados se incuban por tres días a 34°C y se analizan los líquidos correspondientes por medio de la prueba de la hemaglutinación. El resultado se considera negativo si después de dos pasajes no se detecta hemaglutinación (2,16,18).

La identificación del virus se lleva a cabo por medio de la técnica de inhibición de la hemaglutinación. En esta prueba los virus aglutinan a los eritrocitos de pollo, pero la reacción es inhibida por sueros inmunes (sueros de referencia) que contienen anticuerpos antivirales que evitan la aglutinación, quedando de esta manera libres los eritrocitos.

El diagnóstico serológico se establece al demostrar un aumento en el título de anticuerpos de por lo menos cuatro veces, una vez que se

comparan los sueros sanguíneos obtenidos al inicio y durante la convalecencia de la enfermedad. Entre los métodos más utilizados se encuentran la reacción de fijación del complemento con un antígeno soluble o la inhibición de la hemaglutinación, seleccionando como antígenos las cepas virales prevalentes. En el caso de obtener una sola muestra, se considera el diagnóstico positivo si se registra un título de 1:64 en adultos y de 1:3 en niños menores de cinco años (15).

Debido a la excesiva frecuencia y severidad de la influenza se han recomendado varias estrategias para lograr el control de la enfermedad. Entre éstas se encuentran el uso de vacunas que pueden estar constituidas por virus completos inactivados con formalina o por virus divididos. La selección de los subtipos virales que constituyen una vacuna se basa en los datos epidemiológicos y de laboratorio más recientes, por ejemplo: la IPAC (Immunization Practices Advisory Committee) anticipó que la vacuna para el período invernal de 1984-1985 debería contener los virus A/Filipinas/2/82 (H3N2), A/Chile/1/83 (H1N1) y B/URSS/100/83, que fueron las cepas prevalentes (19).

El uso de la vacuna se recomienda para personas de todas las edades con enfermedades cardiopulmonares y otros desórdenes crónicos y para el personal médico que esté en contacto con personas de alto riesgo. El programa de inmunización consiste en aplicar una dosis primaria y una anual como refuerzo. Una de las principales precauciones que se deben tener es el no administrar la vacuna a personas sensibles al

huevo ya que se prepara en embriones de pollo. Las reacciones pueden ser locales y/o sistémicas, varían con la edad, preparación y dosis. Los efectos colaterales son raros e incluyen fiebre y mialgias, se presentan en menos del 5% de los vacunados y aparecen de seis horas a dos días después de la administración (1,3).

En base a lo anterior, el objetivo del presente trabajo es llevar a cabo el Aislamiento e Identificación de los Virus de la Influenza, que circularon durante la temporada invernal, con el fin de contribuir a la vigilancia epidemiológica de este tipo de enfermedades respiratorias.

MATERIALES Y METODOS

El Aislamiento e Identificación de los Virus de la Influenza se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología de la División de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad de Monterrey.

Se analizaron 100 muestras clínicas obtenidas de pacientes que presentaron síntomas de enfermedad respiratoria, durante el período de Enero a Abril de 1986.

Los especímenes clínicos consistieron en exudados faríngeos obtenidos con hisopo estéril. El medio de transporte empleado fue un caldo de tripticaseína y soya con gelatina al 0.5%. A este medio se le

agregaron los antibióticos estreptomina y penicilina en una concentración de 400mg/ml y 800 U/ml respectivamente. Los especímenes clínicos fueron almacenados a 4°C por no más de una semana. Posteriormente se llevó a cabo el cultivo del virus. (20) .

METODOS:

I. AISLAMIENTO DEL VIRUS EN EMBRIONES DE POLLO

1. Examinar los huevos embrionados de un período de 9 a 10 días con un ovoscopio para localizar la cámara de aire y verificar la viabilidad del embrión.
2. Realizar una asepsia en la cámara de aire con tintura de iodo y dejar reaccionar por espacio de un minuto.
3. Con un perforador hacer un orificio en el cascarón sobre el centro de la cámara de aire.
4. Mantener el huevo en el ovoscopio, con una jeringa de 1 ml y aguja de 21 X 32, insertar la aguja a través del orificio en el cascarón hacia el embrión.
5. Con un movimiento leve penetrar la cavidad amniótica e inocular 0.1 ml del espécimen clínico.

6. Sacar la jeringa 0.5-1 cm e inocular 0.1 ml del espécimen clínico en la cavidad alantoidea.
7. Sellar el orificio con un adhesivo.
8. Incubar los huevos a 34°C durante 72 horas.
9. Refrigerar a 4°C durante la noche para dar muerte al embrión y minimizar el sangrado durante la cosecha de los líquidos.
10. Hacer una asepsia con alcohol etílico y remover el cascarón y la membrana corioalantoidea con pinzas estériles.
11. Colectar el líquido alantoideo con una pipeta estéril de 5 ml (el rendimiento es de 5-15 ml), colocarlo en un tubo estéril y rotularlo adecuadamente.
12. Colectar el líquido amniótico con jeringa de un ml y aguja de 21 X 32 estériles y rotularlo adecuadamente.
13. Mantener los líquidos a 4°C .

II. IDENTIFICACION DEL VIRUS

A. Prueba de la Hemaglutinación (HA)

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-2) a los orificios para el control de eritrocitos y a los orificios del 2 al 12.
3. Agregar 0.1 ml del antígeno al primer orificio de cada una de las hileras de la placa (orificio 1).
4. Hacer diluciones seriadas usando dilutores de 0.05 ml.
5. Agregar 0.05 ml de la suspensión de eritrocitos de pollo al 0.5% (R-3) a cada uno de los orificios.
6. Mezclar e incubar a temperatura ambiente por 45 a 60 minutos aproximadamente.
7. Leer la HA cuando los eritrocitos de pollo en los orificios 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 nuevos 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 (mayor dilución) de la suspensión del virus que produce aglutinación completa.

B. Inhibición de la Hemaglutinación (IHA)

a) Retrotitulación del Antígeno.

1. Preparar diluciones de trabajo de cada antígeno que contengan cuatro 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-2) a los orificios del B al H de cada hilera marcada para el antígeno y a los orificios de los controles.
4. Agregar 0.1 ml del antígeno al primer orificio de cada hilera de la placa. (orificio 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-3) a cada uno de los orificios.
7. Mezclar e incubar a temperatura ambiente durante 45 a 60 minutos.
8. Leer la hemaglutinación cuando los eritrocitos en los orificios 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 muy pocas o muchas unidades aglutinantes ajustar la dilución del antígeno con PBS, pH 7.2 (R-2). Repetir la retrotitulación.

b) Inhibición de la Hemaglutinación

1. Agregar 0.025 ml de PBS, pH 7.2 (R-2) 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 (cuatro unidades hemaglutinantes) a cada dilución de 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-2) 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-3) a todos los orificios. Mezclar y sellar la placa.
8. Leer cuando los eritrocitos en los orificios 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 del control de sueros, éstos deben ser absorbidos con glóbulos rojos para remover las aglutininas.

REACTIVOS:

(R-1) Solución de Alsever, pH 6.1:

Citrato de Sodio	8.00 g
Glucosa	20.00 g
Acido Cítrico	0.55 g
Cloruro de Sodio	4.20 g

Disolver en agua destilada y aforar a 1 L, esterilizar por filtración a través de una membrana Millipore de 0.22 micrómetros. Almacenar a 4°C.

(R-2) Buffer Salino de Fosfatos, pH 7.2 (PBS) :

Fosfato disódico	1.096 g
Fosfato monosódico	0.315 g
Cloruro de Sodio	8.500 g
Agua destilada	1.000 L

Agregar agua destilada hasta un volumen final de 1 L, esterilizar por filtración a través de una membrana Millipore de 0.22 micrómetros. Almacenar a 4°C.

(R-3) Suspensión de Eritrocitos de pollo, 0.5%:

Eritrocitos de Pollo	0.5 ml
PBS pH 7.2	99.5 ml

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

RESULTADOS

Se obtuvieron un total de ocho aislamientos de los 100 especímenes clínicos analizados, los cuales correspondieron uno al subtipo viral A/Filipinas/2/82 (H3N2) y siete al subtipo B/URSS/100/83.

La mayor frecuencia se observó en los rangos de edad comprendidos entre los 11 y 30 años de edad como se muestra en la tabla No.1.

En la tabla No.2 se presenta la distribución de los especímenes clínicos en relación a la fecha de recolección. Como se puede observar la mayor frecuencia de aislamiento ocurrió durante los primeros 15 días del mes de Marzo.

TABLA No.1 TIPOS DE VIRUS AISLADOS DE LOS ESPECIMENES CLINICOS ANALIZADOS.

EDAD (AÑOS)	No. DE ESPECIMENES OBTENIDOS	SEXO		No. DE AISLAMIENTOS	TIPOS DE VIRUS AISLADOS	
		F	M		A/Filipinas/2/82 (H3N2)	B/URSS/100/83
1-10	4	2	2	-	-	-
11-20	41	31	10	3	-	3
21-30	31	17	14	3	1	2
31-40	14	11	3	2	-	2
41-50	7	5	2	-	-	-
> 50	3	3	-	-	-	-
TOTALES	100	69	31	8	1	7

TABLA No.2 DISTRIBUCION DE LOS ESPECIMENES
CLINICOS EN RELACION A LA FECHA DE OBTENCION

FECHA DE OBTENCION DE LOS ESPECIMENES	No. DE ESPECIMENES OBTENIDOS	No. DE AISLAMIENTOS VIRALES
ENERO 15 - 31	14	2
FEBRERO 1 - 15	14	-
FEBRERO 16 - 28	14	-
MARZO 1 - 15	38	6
MARZO 16 - 31	12	-
ABRIL 1 - 15	8	-

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Debido a que la influenza es una enfermedad que puede llegar a causar epidemias e inclusive grandes pandemias en una población; es recomendable llevar a cabo una vigilancia epidemiológica anual para determinar los subtipos virales que circulan durante el período invernal, con el propósito de establecer una serie de estrategias que puedan contribuir al control de la enfermedad.

Para realizar este proyecto los especímenes clínicos se recolectaron durante los meses de Enero a Abril, período que coincide con la mayor frecuencia de aislamientos del virus de la Influenza (21).

En nuestro caso, el mayor número de aislamientos ocurrió durante los primeros quince días del mes de Marzo de 1986.

La contaminación bacteriana de los líquidos alantoideo y amniótico conduce a resultados falsos positivos en la reacción de hemaglutinación; por lo cual es esencial la adición de antibióticos al medio de transporte. En este caso la frecuencia de contaminación fue muy baja, de tal forma que se puede considerar que la detección de los virus fue eficiente.

En base a lo reportado en la literatura, se sabe que la óptima detección de los virus de la Influenza tipos A y B se lleva a cabo utilizando cultivos primarios de tejidos de riñón de perro de la línea celular continua MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) y que los huevos embrionados de gallina son una alternativa solamente para los virus tipo A. Los 100 especímenes faríngeos se inocularon en embriones de pollo debido a la falta de disponibilidad de cultivos de células, por lo tanto se esperaba aislar únicamente los virus tipo A. Sin embargo al analizar los resultados se puede observar que el mayor número de aislamientos correspondió al subtipo viral B/URSS/100/83 probablemente porque fue la cepa que circuló con mayor frecuencia durante este período invernal y debido a que los huevos embrionados utilizados pudieron actuar como huéspedes sensibles (22).

La detección e identificación de agentes virales directamente en los especímenes clínicos ha surgido como un método alternativo para el

diagnóstico de enfermedades de etiología viral. Entre estos métodos se encuentran los ensayos inmunoenzimáticos, sin embargo la eficiencia reportada para el caso de los virus de la Influenza tipo A ha sido de 53%; por lo tanto mientras no se incremente la sensibilidad, el aislamiento de los virus continuará siendo el método de elección para establecer el diagnóstico de la Influenza. Por otra parte, la IHA es una técnica sensible, reproducible, de fácil interpretación y adaptable a cualquier laboratorio de diagnóstico (23).

Tomando en cuenta los resultados obtenidos, es importante mencionar que este tipo de estudio se puede llevar a cabo en las condiciones operativas de nuestro medio, sin embargo se debe enfatizar que la recolección y condiciones de almacenamiento de los especímenes clínicos, así como la fidelidad de los métodos y el establecimiento de un sistema de control de calidad, son los factores indispensables para obtener resultados confiables. Además, recomendamos para trabajos futuros que se incremente el número de especímenes clínicos, con el objeto de conocer la morbilidad de la Influenza en la población bajo estudio.

Respecto a la epidemiología de la Influenza se ha propuesto que ocurren epidemias con un intervalo de 2 a 3 años, sin embargo el programa de vigilancia realizado en la ciudad de Houston, Texas, durante 11 años, ha revelado que se presentan epidemias cada año de tal forma que quizá ésta sea la característica epidemiológica actual de la enfermedad respiratoria. Debido a esto y a la excesiva magnitud de la

frecuencia y severidad de la Influenza es de vital importancia llevar a cabo el Aislamiento e Identificación de los Virus de la Influenza que circulan cada invierno para contribuir a su control en beneficio de nuestra comunidad.

RESUMEN

Se recolectaron 100 especímenes faríngeos de personas que presentaron síntomas de enfermedad respiratoria con el objeto de Aislar e Identificar los Virus de la Influenza. Los especímenes se inocularon en embriones de pollo de un período de desarrollo de 9 a 10 días y los virus se detectaron e identificaron por medio de los métodos de la Hemaglutinación e Inhibición de la Hemaglutinación.

Se obtuvieron un total de ocho aislamientos correspondiendo uno al subtipo viral A/Filipinas/2/82(H3N2) y siete al subtipo B/URSS/100/83.

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

1. Couch, B. R. 1985. Influenza and the Influenza Virus.
Curso de Vigilancia Epidemiológica de Virus Respiratorios.
U.A.N.L.
2. Joklik, W. K. et al. 1980. Zinsser Microbiology.
17th ed. Appleton - Century - Crofts, USA.
3. Pons, G. V. y R. Dolin. 1980. Influenza.
Tribuna Médica. XXXVIII: 1 - 7.
4. Conacyt. 1980. La Gripe. Inf. Cient. Tec. 11: 5 - 9.

5. Laver, G. W. et al 1981. Antigenicity of Influenza Virus Hemagglutinin Following Chemical Modification. *Virology*. 111: 538 - 548.
6. Ruigrok, W. R. et al. 1984. Characterization of Three Highly Purified Influenza Virus Strains by Electron Microscopy. *J. Gen. Virol.* 65: 799 - 802.
7. Smith, L. G. and A. J. Hay. 1982. Replication of the Influenza Virus Genome. *Virology* 118: 96 - 108.
8. Huang, C. T. et al. 1981. Influenza Viruses Cause Hemolysis and Fusion of Cells. *Virology* 110: 243 - 247.
9. Kaplan, M. M. and R. G. Webster. 1977. The Epidemiology of Influenza. *Sci. Amer.* 237: 88 - 106.
10. Scholtissek, C. et al. 1978. On the Origin of the Human Influenza Virus Subtypes H2N2. *Virology* 87: 13 - 20.
11. Yamazi, Y. et al. 1983. Analysis by Monoclonal Antibodies of H3N2 Subtype Influenza A Viruses in Japan and South-east Asia Prior to 1983. *J. Infect. Dis.* 148: 1126.
12. Wright, L. 1977. Sweating out the Swine Flu Scare. *New Times* __: 28 - 38.

13. Nahor, S. O. and Z. Z. Roncs. 1985. Local and Peripheral Cell - Mediated Immune Response to Influenza Virus in Mice. *J. Med. Virol.* 15: 81 - 91.
14. Justewicz, M. D. et al. 1984. Blocking of Influenza Virus - Induced Cell - Mediated Cytotoxicity by Hemagglutinin - Specific Monoclonal Antibody. *J. Infect. Dis.* 150: 348 - 357.
15. Pumarola, A. 1983. Gripe. *Tratado de Medicina Práctica* 27: 1588 - 1594.
16. Stringfellow, A. D. (ed) . 1982. *Virology*. Upjohn, USA.
17. Huxham, J. 1981. The Effects of Influenza on Host Defenses. *J. Infect. Dis.* 144: 248 - 291.
18. Jawetz, E. y otros. 1983. *Microbiología Médica*. 10a. ed. El Manual Moderno, S. A. de C. V., México.
19. 1984. Campaña de Inmunización Contra la Influenza en 1984 - 1985. *Am. Pharm.* 24: 15 - 16.
20. Department of Health, Education, and Welfare Public Health Service. C D C. 1975. IHA. *Advanced Laboratory Techniques for Influenza Diagnosis*, USA.

21. Couch, B. R. et al. 1986. Influenza: Its Control in Persons and Populations. J. Infect. Dis. 153: 431 - 439.

22. Couch, B. R. et al. 1979. Comparison of Different Tissue Cultures for Isolation and Quantitation of Influenza and Parainfluenza Viruses. J. Clin. Microbiol. 10: 32 - 36.

23. Harmon, W. M. and K. M. Pawlik. 1982. Enzyme Immunoassay for Direct Detection of Influenza Type A and Adenovirus Antigens in Clinical Specimens. J. Clin. Microbiol. 15: 5 - 11.

900643