



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

C U A U T I T L A N

AISLAMIENTO DEL VIRUS DE LA INFLUENZA
PERIODO COMPRENDIDO ENTRE JUNIO DE 1984
Y JULIO DE 1985

FALLA DE ORIGEN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A

MARIA LILIA RIVERO HERNANDEZ

CUAUTITLAN IZCALLI, ESTADO DE MEXICO, 1989.



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

TITULO y OBJETIVOS	1
INTRODUCCION	2 - 12
MATERIAL y METODOS	13 - 35
RESULTADOS	36 - 51
DISCUSION DE RESULTADOS	52 - 56
CONCLUSIONES	57
RESUMEN	58
BIBLIOGRAFIA	59 - 63

ASLAMIENTO DEL VIRUS DE LA INFLUENZA

PERIODO COMPRENDIDO ENTRE JUNIO DE 1984 Y JULIO DE 1985

OBJETIVOS:

- 1.- Llevar a cabo el aislamiento del virus de la influenza en las muestras estudiadas en el laboratorio de Virus Respiratorios del I.S. E.7. (Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales).
- 2.- Detectar un posible brote de influenza y el tipo de virus que lo cause, utilizando la técnica de Inhibición de la Hemaglutinación

INTRODUCCION:

Dentro de la familia *Orthomyxoviridae* se encuentra el virus de la influenza.

La influenza es una enfermedad aguda del aparato respiratorio que se presenta frecuentemente en forma epidémica, es causada por el virus de la influenza. Clínicamente se caracteriza por un comienzo brusco con escalofrío, cefalea, mialgias generalizadas, adinamia y fiebre. Es común que se presenten complicaciones bacterianas con *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* o *Streptococcus beta haemolyticus*.

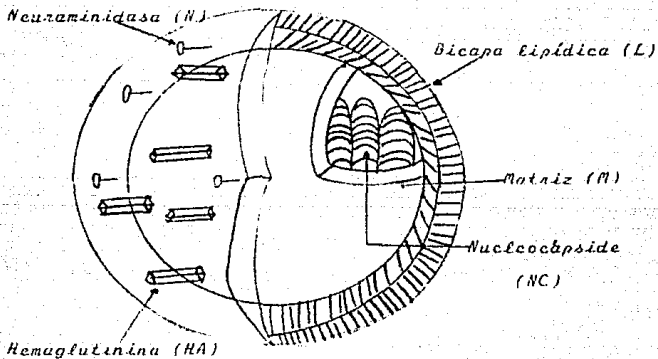
La recuperación de la influenza no complicada es de 2 a 7 días, aunque la convalecencia puede ser prolongada. (Wong Chia 1975; S. Benenson 1983; R. Cate 1987).

El virus de la influenza consiste en partículas pleomorfas aproximadamente esféricas, la figura #1 muestra un corte esquemático del modelo del virus de la influenza; la cubierta del virus posee una bicapa lipídica, en su superficie se encuentran dos tipos de proyecciones radiales correspondientes uno a la hemaglutinina (HA) y otro a la neuraminidasa (N) respectivamente, en la

cubierta interna del virus están contenidos otro número de componentes virales, estos son el genoma RNA, la - nucleoproteína (NP) y la proteína de la matriz b - membrana (M). (L. Mandel, G. Douglas y E. Bennett 1975; Stuart-Harris 1976; Fenner W. 1984).

Corte esquemático del modelo del virus de la influenza

Fig. # 1



La hemagglutinina (HA) es un antígeno en forma de bastón o varilla que se encuentra sobre la cubierta del virus es responsable de la adhesión de la partícula viral hacia sitios receptores sobre las células del huésped también presenta una afinidad hacia sitios receptores sobre la superficie de eritrocitos de muchos mamíferos y de varias especies de aves. (Maramonosch-Kuntak 1971).

La hemagglutinina presenta dos moléculas diferentes las cuales pueden ser designadas como HA₁ y HA₂. Es el antígeno específico mayor de la cubierta viral y es capaz de sufrir considerable variación antigénica. Figura #2.

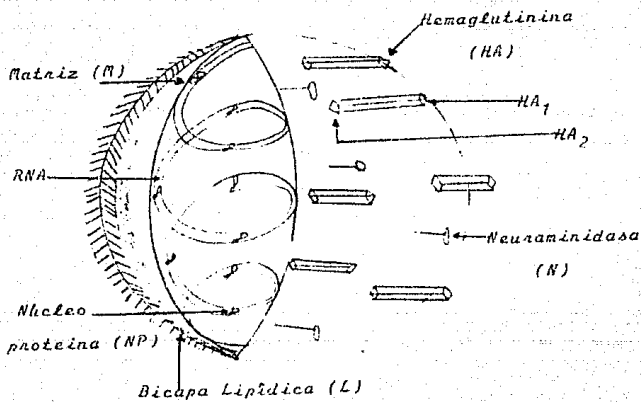
El otro antígeno es la enzima neuraminidasa (N) la cual presenta una estructura oblonga con una proyección terminal (forma de hongo) no se relaciona antigénicamente con la hemagglutinina, se encuentra sobre la superficie del virus, es responsable de la actividad destructora del receptor del virus, esta actividad resulta en el clución de éste con las células del huésped o de los eritrocitos, a este antígeno se le nombra también como enzima destructora del receptor o enzima sialidasa.

(Dunnows 1981; Holzman 1988).

Componentes de la nucleocapside (NC)

RNA y la nucleo-proteina (NP)

Fig. # 2



La proteína de la membrana o matriz (M). Aparece como un antígeno interno específico del virus, es antigénicamente estable, la proteína M es común para todas las cepas de influenza A, pero diferente para las del tipo B y C, esta proteína estabiliza la partícula del virus, rodea a la núcleo-proteína y forma la parte interna de la cubierta viral, su abundancia en la partícula viral fue lo que sirvió para designarla como proteína M indicando que es la membrana mayor o la proteína de la matriz. (A. P. Kendal 1987).

Núcleo-proteína (NP). Partícula del virus muy asociada con el genoma RNA formando un complejo proteína RNA conocido con el nombre de núcleo capsida (NC) ésta es de forma helicoidal y se encuentra enrollada dentro de la envoltura de la lipoproteína, figura # 2. La núcleo-proteína se designa también como antígeno "S" (soluble), es antigénicamente estable y provee las bases para la clasificación del virus de la influenza en tipos A, B y C. (Merchant Packer 1988).

Los tres tipos de influenza que son el A, B y C varían grandemente en su significado epidemiológico los más importantes son el A y el B. (Farreras -

Rozman 1972; Stuart-Harris 1975; Makoto Y. Park K. -
M. Fitch 1987).

El material genético del virus de la influenza es -
una línea única de moléculas de RNA la cual presenta -
forma segmentada en el virus, se han identificado 8 -
segmentos de una sola cadena de RNA en el vírico.
(Palmer 1975; B. Szybaes y N. Acha 1986).

Uno de los rasgos más notables y que más gravemente -
inciden en la epidemiología de la influenza humana son -
los cambios en la composición antigénica del virus y la -
aparición de nuevos subtipos o variantes dentro de los -
mismos, basados en las diferencias antigénicas de la -
hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (N).

La hemaglutinina (antígeno específico mayor) puede -
tener cambios mayores "antigenic-Shift" y cambios meno-
res "antigenic-Drift", durante el "antigenic-Shift" la -
composición de la hemaglutinina cambia radicalmente y
cuando ocurre un "antigenic-Drift" solo sufren una -
modificación menor los polipeptidos de la HA. La deriva
antigénica se ha observado en los tipos de virus A y B
pero los del tipo B no tienen cambios mayores "antigenic
Shift".

Quando ocurren cambios menores en los virus, los anticuerpos en la población no son muy eficaces para proporcionar inmunidad y se presentan pocos brotes de la enfermedad, pero cuando ocurren cambios mayores los anticuerpos protecciones que ya están en la población no proporcionan inmunidad y el virus es capaz de difundirse sin restricciones en la población culminando con una pandemia de influenza.

Puesto que el virus de la influenza posee la propiedad singular de experimentar cambios graduales en su composición antigénica, esto da lugar a oleadas pandémicas. (Smith and Ritchie 1980; M. Jensen y N Wright 1987).

La influenza aparece en epidemias periódicas, se presenta bruscamente y se propaga con rapidez, con frecuencia invade el mundo entero. Además tiene ondas sucesivas de infección cuya máxima frecuencia es durante épocas de invierno.

Quando sucede una pandemia debido al desplazamiento antigénico mayor, la cepa anterior de la influenza parece ser desplazada o se ha vuelto muy escasa.

Todas las pandemias conocidas fueron ocasionadas

por cepas de influenza "A", las cuales se registraron en 1889, en la de 1918-1919, más de 20 millones de personas murieron. Las pandemias más recientes ocurrieron de 1957 a 1958 debido a la influenza A(H₂N₂); en 1968 fu'e ocasionada por la influenza del tipo A(H₃N₂) en 1976 surgió un nuevo tipo de influenza en Nueva Jersey, que asemeja a la influenza de cerdo (H_{sw}N₂) pero fué poca su diseminación. (P. Kendal 1987; M. Jensen y D.N. Wright 1987).

La influenza "B" no tiende a diseminarse tan rápidamente entre las comunidades como la influenza "A". Su periodo interepidémico es de 3 a 6 años.

La periodicidad epidémica parece depender de la acumulación en la población de individuos susceptibles y la desaparición de éstos por muerte, pero la influenza pandémica parece resultar de cambios antigénicos "antigenic-shift" en los virus, de magnitud suficiente para que exista poca inmunidad cruzada eficaz entre los tipos antigénicos nuevos y viejos.

Para nombrar las cepas de los virus que causan influenza, primero se indica el tipo de virus que la

causa A, B ó C después el huésped, esto es indicado sólo en las cepas provenientes de hospederos no humanos seguido de la localización del aislamiento inicial y la designación antigénica de la hemaglutinina y la neuraminidasa, por ejemplo A/England/333/80 (H₁N₁) A/cendo/New Jersey/8/76 (H₁N₁). (Higuera- Wong Chia 1978; Fierca Joshua 1986).

Los materiales para el aislamiento viral deben ser obtenidos lo más pronto posible al inicio de la enfermedad, el virus es fácilmente aislado durante los primeros 3 días

Los especímenes que se utilizan para dicho propósito pueden ser: lavados de garganta (gargarismos), lavados nasales, hisopos nasales y exudados faríngeos.

Experimentalmente se han empleado para la propagación del virus de la influenza embriones de pollo (E.P.) cultivos celulares (C.C.) huones y ratones. (S. Benson 1983).

Los virus recientemente aislados algunas veces inician la infección con un número mínimo de partículas víricas, se multiplican y alcanzan títulos elevados en la cavidad amniótica y alantoidea del embrión de pollo

pueden adaptarse a las dos vías después de algunos pasajes, los E.P. han demostrado ser el huésped más sensible y adecuado para la propagación de este virus.

Los especímenes para el aislamiento viral deben permanecer almacenados en frío siempre y ser inoculados lo más pronto posible, si la inoculación no puede hacerse dentro de las 48 hrs. después de la colección deben ser sellados y almacenados en hielo seco o bajo refrigeración a menos 70°C.

Las muestras son tratadas con antibióticos antes de ser inoculados en los medios de propagación. Para obtener un número máximo de aislamientos estos son inoculados en huevos embrionados de 9 a 11 días de edad por vía alantoica y amniótica simultáneamente, los embriones de pollo son incubados a 33°C durante 48 a 72 hrs. y ambos fluidos son examinados. La identificación del virus se logra por métodos serológicos, el más importante es la Inhibición de la Hemaglutinación (IHA) Lennette y Schmidt 1979; WHO 1981).

El diagnóstico puede llevarse a cabo también usando muestras de suero obtenidas en la fase aguda y convalescente de la enfermedad; por medio de inmunofluorescencia

cia puede mostrarse el antígeno específico en las células de las vías respiratorias en las secreciones nasales y faríngeas. (Dubelco 1985; S. Benenson 1983; R. Pyhala, L. Pyhala, M. Valle and K. Aho 1987).

El diagnóstico certero de la influenza sólo puede darse por el laboratorio usando especímenes de los pacientes, ya que es muy frecuente que esta enfermedad se confunda con otras enfermedades respiratorias.

La susceptibilidad de la influenza es universal, es una de las enfermedades pandémicas clásicas que tienen mayores complicaciones para la salud pública, se considera la más importante enfermedad viral del tracto respiratorio, la presentación de la influenza resulta en una morbilidad alta; la letalidad de la influenza es debido principalmente a las complicaciones por infecciones bacterianas.

La vigilancia de brotes de la influenza es más extensa que para cualquier otra enfermedad respiratoria ya que se propaga rápidamente dando origen a pandemias (S. Benenson 1983; N. Acha 1984; Schanfer 1987; R. Cole 1987).

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL BIOLÓGICO:

Antígenos de influenza

- *A/Bangkok/1/79 (H₃N₂)*
- *A/Victoria/3/75 (H₃N₂)*
- *A/Pondicherry/1/73 (H₃N₂)*
- *A/England/333/80 (H₁N₁)*
- *A/New Jersey/8/76 (H₃N₂)*
- *B/Singapore/222/79*
- *Sueros de referencia positivos hacia influenza*
- *Suero control negativo para influenza.*
- *Sueros anti-Newcastle*
- *Huevos embrionados de pollo de 9 a 11 días de edad.*

• *Proporcionados por el C.D.C. en Atlanta*

•• *Proporcionados por la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.*

••• *Donados por los laboratorios PFIZER*

ESPECIMENES:

145 Muestras de exudados faringeos
y garganizmos de personas con
síntomas compatibles con la influenza

EQUIPO:

Refrigerador Reuco
Refrigerador (IEM)
Centrífuga refrigerada (International
Equipment Company)
Centrífuga (International Equipment
Company)
Mezclador Vortex (Lab. Line Instru-
ment INC.)
Estufa a 33°C (Precision Scientific)
Placas de microtitulación en "U"
(Cooke Engineering Co.)
Micropipetas y Microdiluidores
Jeringas de 1 ml. y de 10 ml.
Agujas del número 22 X 32 mm.
Ovoscopio
Material de vidrio usual

REACTIVOS:

1.- Solución amortiguadora de fosfatos p.H. = 7.2

Fosfato dibásico (Na_2HPO_4)	1.15 g.
Fosfato monobásico (Na_2HPO_4)	0.2 g.
Cloruro de sodio (NaCl)	8.0 g.
Agua destilada	1000.0 ml.

2.- Solución Alsever's

Dextrosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)	20.5 g
Citrato de sodio ($\text{Na}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$)	8.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	4.2 g.
Acido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$)	0.55 g.
Agua destilada	1000.0 ml.

3.- Cloruro de sodio al 0.85 %

Cloruro de sodio

(NaCl) 0.85 g.

Agua destilada 1000.0 ml.

4.- Glóbulos rojos de pollo al 1 %

Paquete de glóbulos rojos 1.0 ml.

Buffer de fosfato salino 99.0 ml.

5.- Reactivos para el tratamiento de sueros

Periyodato de potasio

(KIO_4) 0.125 ml.

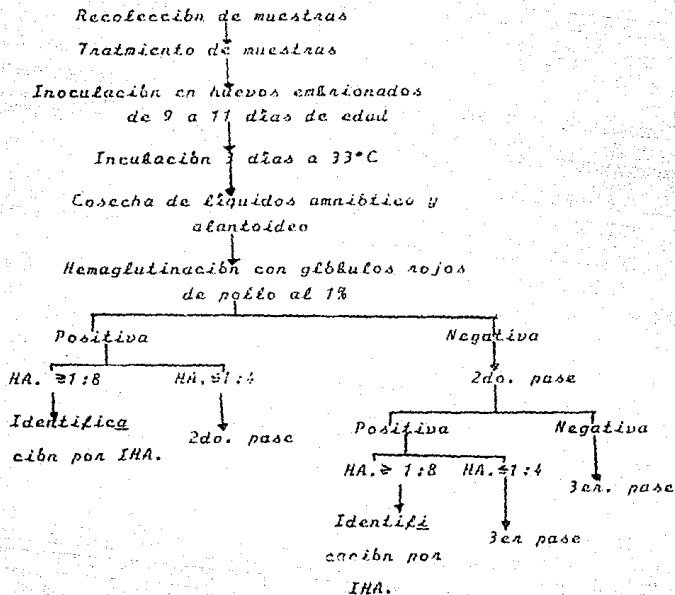
Glicerol

($C_3H_8O_3$) 0.5 ml.

Solucion salina al 0.85% 49.5 ml.

Agua destilada 50.0 ml.

ESQUEMA DE TRABAJO



HA. = Hemaglutinación

IHA. = Inhibición de la hemaglutinación

RECOLECCION DE MUESTRAS

Para el aislamiento del virus de la influenza fueron estudiadas 145 muestras de personas de diferentes sexos y edades, las cuales presentaron sintomas compatibles con la influenza, éstas fueron tomadas dentro de los tres primeros días de las manifestaciones clínicas.

Las tomas de muestra fueron realizadas de dos maneras

A.- Por medio de lavados de garganta

B.- Por medio de exudados faríngeos

A.- En los lavados de garganta se les indicó a los -
pacientes que con el líquido contenido en el frasco -
(solución salina estéril al 0.85%) hicieran gargarismos
manteniendo el líquido en la garganta el mayor tiempo
posible y depositaran nuevamente el líquido en el frasco
estéril, ésta muestra es indicada principalmente en los
pacientes adultos.

B.- La toma de exudado faríngeo fue realizada con un
hisopo, el cual se sumergió después de haber tomado el
exudado en un tubo que contenía 2 ml. de solución salina
estéril al 0.85% , descartando la parte distal del hiso-
po que fue contaminado con la mano.

Si el espécimen va a ser inoculado en el sistema -
hospedero, embriones de pollo (E.P.) en pocas horas -
este debe ser almacenado a 4°C, sin embargo si va a ser
almacenado por largo tiempo para su posterior inoculación
las muestras deben ser congeladas a menos 70°C. (Bullock
Craig and Forrester 1984).

TRATAMIENTO DE MUESTRAS

- 1.- Mezclar los exudados faringeos y/o gargarismos en -
el mezclador Vortex por unos segundos.
- 2.- Centrifugar a 2,500 rpm/15 min a 4°C.
- 3.- Depositar el sobrenadante en un tubo que contiene 0.5
ml. de antibiotico de penicilina 100,000 U.I./ml. y
800 mg. de sulfato de estreptomocina/ml. agregar un
volumen igual de caldo de soya Lipticasa, dejar 30-
min. a temperatura ambiente.
- 4.- Realizar un cultivo bacteriano de las muestras ante-
riores en gelosa sangre.
- 5.- Colocar las muestras ya tratadas en refrigeracion a -
4°C b a menos 70°C.

Si el cultivo bacteriano fue positivo en una o varias
muestras se tratan nuevamente y se realiza nuevamente el

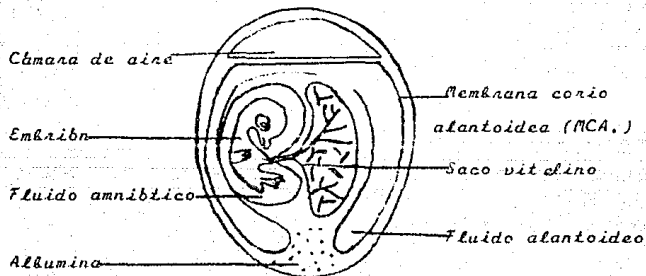
cultivo bacteriano. Las muestras que resultaron positivas al crecimiento de bacterias no son utilizadas para la inoculación en (E.P.) hasta comprobar la ausencia de estas.

INOCULACION DE MUESTRAS EN HUEVOS EMBRIONADOS

En el aislamiento del virus de la influenza se utilizan embriones de pollo (E.P.) de 9 a días de edad. Figura 3.

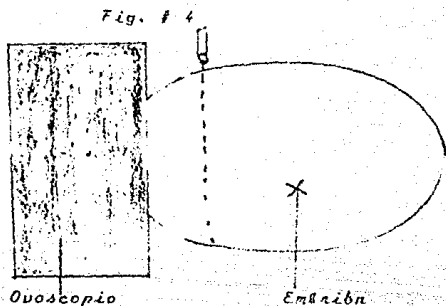
Embrión de pollo en desarrollo

Fig. # 3



Para llevar a cabo la inoculación de especímenes -
fue utilizado el ovoscopio, por medio del cual se localiz
ab la cámara de aire o saco de aire y el embrión Figura
4.

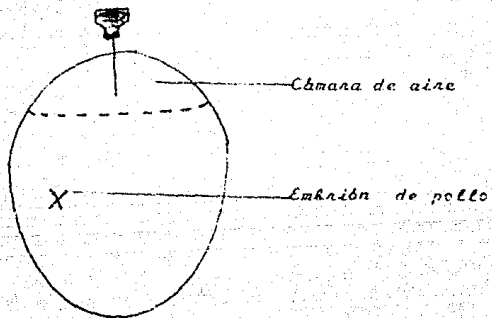
Localización de la cámara de aire y el
embrión



Posteriormente se limpia el cascaron con alcohol al 70% y se perfora en el centro de la cámara de aire. Figura 5.

Perforación del huevo embrionado
en la cámara de aire

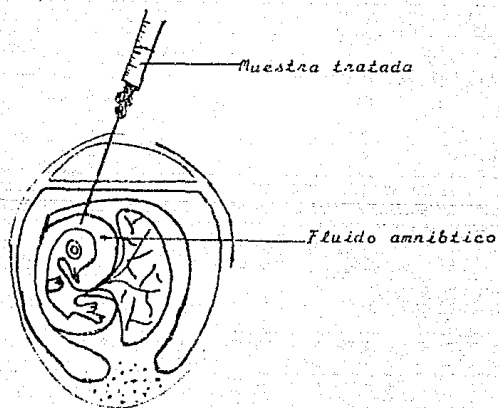
Fig. # 5



Las muestras ya tratadas fuerbn depositadas con ja -
ringas de insulina y agujas del número 22 X 32 mm. en -
la cavidad amnibtica y alantoidea simultaneamente 0.1 ml
en cada cavidad Figuras 6 y 7.

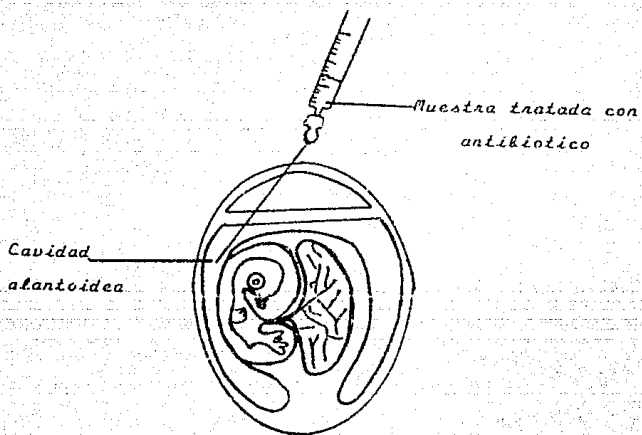
*Inoculaci6n en la cavidad amnibtica de las
muestras ya tratadas*

Fig. # 6



Inculación en la cavidad alantoidea

Fig. # 7



Para llevar a cabo la inoculación de las muestras -
fueron utilizados dos huevos embrionados por cada -
muestra, inoculándose dos huevos más con PDS estéril
p.H. = 7.2 los cuales sirvieron como controles, posterior-
mente fueron sellados los huevos con barniz de uñas.

Los embriones de pollo inoculados permanecieron en -
una atmósfera húmeda a 33°C durante 48 a 72 Hrs., trans-
currido este tiempo se dejaron una noche a 4°C antes de
realizar la cosecha de los líquidos alantoideo y -
amniótico, a unas 3 ó 4 horas antes en congelación.

COSECHA DE LIQUIDOS

- 1.- Desinfectar el cacarón en una área estéril con -
alcohol al 70 %.
- 2.- Abrir el huevo embrionado por la cámara de aire -
asepticamente, remover la membrana corio-alantoidea
y localizar las cavidades amniótica y alantoidea.
- 3.- Colectar los líquidos amniótico y alantoideo por -
separado con ayuda de una jeringa de 10 ml. y aguja
de 22 x 22 mm.
- 4.- Depositar los líquidos en tubos estériles en un baño
de hielo hasta que finalice la cosecha de los mismos.

- 5.- Centrifugar los líquidos que estén turbios a 2,500 rpm/10 min. a 4 C y depositarlos en tubos estériles.
- 6.- Realizar el cultivo bacteriano a todos los líquidos cosechados incluso a los controles.
- 7.- Almacenar los líquidos a 4 C o a menos 70 C hasta el momento de realizar las pruebas de Hemaglutinación (HA) e Inhibición de la Hemaglutinación (IHA).
- 8.- Si el cultivo bacteriano fue positivo los líquidos son desechados; inoculándose la muestra original nuevamente en E.P. y se trabaja únicamente para las pruebas de HA e IHA los líquidos con ausencia de crecimiento bacteriano.
- 9.- Si la prueba de hemaglutinación da resultados negativos se realiza un segundo y tercer pase ciego a los líquidos cosechados para dar como negativo este espécimen.

PRUEBA DE HEMAGLUTINACION (HA)

P Para la detección de las hemaglutininas en los líquidos cosechados se utilizarán microplacas tipo "U", microdiluidores y suspensión de eritrocitos de pollo al 1 % en PBS p.H. = 7.2 .

En la toma de muestra a gallinas jóvenes se uso como anticoagulante solución de Helsever, una parte de esta - con nueve partes de sangre.

PROCEDIMIENTO

- 1.- Lavar los glóbulos rojos 3 veces con PBS p.H. = 7.2
- 2.- Hacer una dilución de 1:10 del paquete celular con la solución de buffer de fosfato salino.
- 3.- Colocar en una microplaca tipo "U", Figura 8, del del pozo 2 al 10 y los dos pozos de la hilera 11 (los cuales servirán como controles) una gota de PBS (0.025 ml.) con una pipeta gotero.
- 4.- Colocar en los pozos # 1 0.05 ml. de los líquidos cosechados, realizar la titulación de los líquidos por duplicado.
- 5.- Hacer diluciones de los líquidos hasta el pozo 10 con un microdiluidor precalibrado de 0.025 ml.

- 6.- Colocar una gota 0.025 ml. de la suspensión de glóbulos rojos al 1 % a todos los pozos incluyendo a los controles.
- 7.- Agitar las microplacas, cubrirías y dejarlas en reposo a temperatura ambiente.
- 8.- Leer la prueba cuando los eritrocitos de los pozos control formen un botón compacto negativo generalmente loma cerca de 30 minutos. Figura 8.

Se considera que la última dilución en la cual se observa hemaglutinación completa contiene una unidad hemaglutinante del virus en un volumen de 0.025 ml. La lectura debe de hacerse inmediatamente ya que los virus pueden eluirse de los eritrocitos y cambiar la imagen.

PLACA DE MICROTITULACION
 PARA LA DETECCION DE
 HEMAGLUTININAS EN LOS
 FLUIDOS DE HUEVOS
 EMBRIONADOS

FIG. # 8

	00	00	00	00	●●	Control de eritrocitos
1:512	●●	00	00	00	00	
1:256	●●	00	00	00	00	
1:128	●●	00	00	00	00	
1:64	●●	00	00	00	00	
1:32	●●	00	00	00	00	
1:16	00	00	00	00	00	
1:8	00	00	00	00	00	
1:4	00	00	00	00	00	
1:2	00	00	00	00	00	
	00	00	00	00	00	

0 = Hemaglutinación

● = no hemaglutinación

Líquido amniótico

El título de H.A. es igual 1:16 del líquido amniótico

La figura # 8 indica que el título del líquido amniótico es de 1:16, presentando éste una Unidad Hemaglutinante (1 U.H.A.).

Para comprobar la exactitud de los líquidos positivos y la preparación del mismo conteniendo 4 U.H.A. en 0.025 ml. los líquidos deben ser titulados nuevamente (retrotitulación) antes de realizar la prueba de Inhibición de la Hemaglutinación (HI).

Al mismo tiempo se realiza la HA de los virus de control (enviados de Atlanta) con los cuales se los desca-
caracterizar.

RETROTITULACION

- 1.- Colocar en una microplaca tipo "U" 0.025 ml. de PBS p.H. = 7.2 de los pozos #1 al #5 y a dos pozos control de eritrocitos, Figura 9.
- 2.- Adicionar 0.025 ml. de los líquidos positivos con 4 U.H.A. al pozo #1 (la titulación se realiza por duplicado)
- 3.- Realizar diluciones dobles con un microdiluidor de 0.025 ml. hasta el pozo #5
- 4.- Agregar 0.025 ml. de glóbulos rojos de pollo al 1% a todos los pozos incluso a los controles.

5.- Agitar unos segundos y dejar reposar a temperatura ambiente de 30 a 45 min.

6.- Leer la prueba cuando los cristecitos de los pozos control formen un boton compacto negativo, generalmente toma cerca de 30 min. Figura 9

Si el antígeno de prueba y los líquidos cosechados han sido preparados correctamente contendrán 4 U.H.A. - en 0.025 ml. por tanto las primeras tres hileras de los pozos mostrarán aglutinación completa y la cuarta y quinta hilera tendrán aglutinación parcial o ninguna.

PLACA DE RETROTI TULACION

FIG. 2 2

	0 0	0 0	0 0	0 0	● ●	Control de eritrocitos
	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	
	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	
Dilucion 5	● ●	0 0	0 0	0 0	0 0	
Dilucion 4	● ●	0 0	0 0	0 0	0 0	
Dilucion 3	● ●	0 0	0 0	0 0	0 0	1 U.H.A.
Dilucion 2	● ●	0 0	0 0	0 0	0 0	2 U.H.A.
Dilucion 1	● ●	0 0	0 0	0 0	0 0	4 U.H.A.

↙
Líquido positivo

Dilucion 1 = 0.025 ml. del líquido positivo diluido

1:2 conteniendo 4 UHA

Dilucion 2 = 0.025 ml. del líquido positivo diluido

1:4 conteniendo 2 UHA.

Dilucion 3 = 0.025 ml. del líquido positivo diluido

1:8 conteniendo 1 UHA.

● = Hemaglutinación

○ = no Hemaglutinación

INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION

Para cada aislamiento que se va a caracterizar se utilizan microplacas tipo "U", aquí se van acomodando el número de antígenos seleccionados (líquidos con HA positiva), al mismo tiempo se marca una microplaca la cual va a servir como control; en ésta se usan el antígeno con el antisuero homólogo de referencia previamente seleccionado. Figuras 10 y 11.

Antes de utilizar el antisuero éste debe ser tratado con peryodato de potasio o con su enzima destructura del receptor, con el fin de destruir los inhibidores inespecíficos que puedan dar lugar a una reacción falsa (ver apéndice de reactivos).

PROCEDIMIENTO

- 1.- Colocar 0.025 ml. (una gota) de PBS p.H. = 7.2 de los pozos #2 al #10 y una gota a los pozos #11 que servirán como controles de eritrocitos.
- 2.- Colocar 0.05 ml. del antisuero de referencia tratado previamente.
- 3.- Realizar diluciones dobles seriadas de los sueros hasta el pozo # 10 con un microdiluidor de 0.025ml.

hasta este momento todos los pasos anteriores se -
siguen para las dos placas.

4.- En la placa de prueba adicionar una gota 0.025 ml.
de la dilucion del aislamiento conteniendo 4 UHA en
0.025 ml. a todos los pozos de la serie de dilucio-
nes del suero, en la placa control se siguen los -
mismos pasos pero en lugar de adicionar el líquido
del aislamiento se adiciona el antígeno homólogo de
referencia conteniendo también 4 UHA en 0.025 ml.

5.- Cubrir las placas e incubar durante 30 min. a temp.
ambiente hasta que los eritrocitos de los pozos de
control formen un botón compacto

Para identificar y caracterizar las cepas, éstas -
se deben de comparar con los títulos de los antígenos
y antisueros de referencia con el aislamiento.

Un aislamiento que reaccione con un antisuero de re-
ferencia a un título igual al de aquel que reaccione con
el virus homólogo se considera intimamente relacionado
con este virus.

La inhibición de la hemaglutinación se muestra en -
las placas 10 y 11.

PLACA DE CONTROL

Antígeno y antisuero
de referencia
A/England/333/80

FIG. # 10

0 0 0 0 0 0
0 0 0 0 0 0
0 0 0 0 0 0
0 0 0 0 0 0
● ● 0 0 0 0
● ● 0 0 0 0
● ● 0 0 0 0
● ● 0 0 0 0
● ● 0 0 0 0
● ● 0 0 0 0
● ● 0 0 0 0
● ● 0 0 0 0

1:2560
1:1280
1:640
1:320
1:160
1:80
1:40
1:20
1:10

PLACA DE PRUEBA

Antisuero de referencia
A/England/333/80 con los
líquidos #56 y # 82

FIG. # 11

0 0 0 0 0 0
0 0 0 0 0 0
0 0 0 0 0 0
0 0 0 0 0 0
0 0 ● ● 0 0
0 0 ● ● 0 0
0 0 ● ● 0 0
● ● ● ● 0 0
● ● ● ● 0 0
● ● ● ● 0 0
● ● ● ● 0 0

56 #82

En las placas #10 y # 11 se observa que el líquido #82 se relaciona con el virus de la influenza A/England 333/80 ya que presentan títulos semejantes.

RESULTADOS

Se trabajaron 145 muestras para aislar el virus de la influenza; las cuales correspondieron a la Ciudad de México y a diversos lugares de la República Mexicana.

Al realizar la prueba de HA e IHA 5 muestras resultaron positivas hacia dichas reacciones con el virus de la influenza; 3 de estas correspondieron a la Ciudad de México una a la Ciudad de Acapulco Gro. y otra a la Ciudad de Monterrey N.L., pero únicamente de 4 de ellas pudimos determinar el tipo de virus presente.

La muestra # 1223 procedente de Acapulco Gro. y la muestra # 1276 de Monterrey N.L. dieron resultados positivos en el tercer pase por embrión de pollo. Se llevo a cabo la prueba de inhibición de hemaglutinación para la identificación del virus de la influenza.

Los resultados obtenidos son mostrados en el cuadro número uno, los especímenes se trabajaron con los sueros recibidos de Atlanta en el año de 1985. Para el tipo de influenza A y B.

CUADRO # I
REACCION DE HEMAGLUTINACION

Pase No.	Título de la muestra #1223	Título de la muestra #1276
	Acapulco	Monterrey
1	Neg.	Neg.
2	Neg	Neg
3	1:32	1:32

Para conocer a que tipo de virus pertenecian se realizó primero la IHA del antígeno con su antisuero homólogo de referencia con los cuales se les desea caracterizar los resultados son mostrados en el cuadro # II

CUADRO # II
REACCION DE IHA DE LOS ANTIGENOS Y ANTISUEROS
HOMOLOGOS DE REFERENCIA RECIBIDOS EN EL AÑO DE 1985

CEPA	TITULO
Antígeno y antisuero A/Bangkok/1/79	1:1280
Antígeno y antisuero A/England/333/80	1: 640
Antígeno y antisuero B/Singapore/222/79	1:1280

Posteriormente se realizo la IHA de los aislamientos con los antisueros de referencia, esto fue para conocer a que virus pertenecian, puesto que los titulos deben de corresponder con los aislamientos que encontramos, los datos obtenidos se presentan en el cuadro III

CUADRO # III

REACCION DE IHA DE LAS MUESTRAS CUYA HA FUE POSITIVA CON EL GRUPO DE SUEROS RECIBIDOS EN 1985

Antisuero de pollo	Titulo de la muestra # 1223 Acapulco	Titulo de la muestra #1276 Monterrey
A/Bangkok/11/79	1:20	1:20
A/England/333/80	1:160	1:40
B/Singapore/222/79	1:20	1:10

Los datos mostraron que la IHA con el suero anti A/England/333/80 es la más alta; sin embargo los resultados no son claros puesto que dieron reacciones cruzadas con los tres antisueros utilizados.

Posteriormente se trabajo con los antisueños y los -
antigenos que conservabamos de los años anteriores, los
resultados obtenidos se muestran en el cuadro IV.

CUADRO # IV

REACCION DE IHA DE LOS ANTIGENOS Y ANTISUEROS
HOMOLOGOS DE REFERENCIA DE LOS AÑOS ANTERIORES

CCPA	TITULO
Antigeno y antisuero A/Victoria/3/75	1:1280
Antigeno y antisuero A/Pont Chalmers/1/73	1:320
Antigeno y antisuero A/New Jersey/8/76	1:640

Se caracterizo ahora los aislamientos realizados con -
con los antisueños de los años anteriores, los resulta
dos obtenidos se muestran en el cuadro V.

CUADRO # V

REACCION DE IHA PARA EL VIRUS DE LA INFLUENZA
CON EL GRUPO DE AUEROS DE LOS AÑOS ANTERIORES

Antisueno de pollo	Titulo de la muestra # 1223 Acapulco	Titulo de la muestra # 1276 Monterrey
A/Victoria/3/75	1:20	1:20
A/Pont Chalmers/1/73	1:10	-
A/New Jersey/8/76	1:40	1:40

Con los resultados obtenidos de IHA de los cuadros # III y # V, no se logro esclarecer a que tipo de virus de la influenza pertenecian ya que estos aislamientos no correspondieron a ningun titulo igual al de los antígenos y antisueños homólogos de referencia con que se contaba en el laboratorio, estos dos cuadros se resumen como sigue: ver cuadro VI.

CUADRO # VI
 REACCION DE IHA PARA EL VIRUS DE LA INFLUENZA
 DE LAS MUESTRAS DE ACAPULCO Y DE MONTEREY

ANTIGENOS DE REFERENCIA	Titulo con la muestra 1223 Acapulco	Titulo con la muestra 1276 Monterrey
A/Englund/333/80 (H ₁ N ₁)	1:160	1:40
A/Bangkok/1179 (H ₃ N ₂)	1:20	1:20
B/Singapore/222/79	1:20	1:10
A/Victoria/3/75 (H ₃ N ₂)	1:20	1:20
A/Port Chalmers (H3N2)	1:10	-
A/New Jersey/8/76 (H ₃ N ₂)	1:40	1:40

Puesto que en las pruebas de inhibición de hema -
 glutinación los especímenes aislados no correspondieron -
 a ninguno de los grupos de sueros con que contamos -
 pensamos en la necesidad de que estas muestras se -
 estudiaran con sueros más específicos. por tal motivo -
 los virus aislados se enviaron al C.D.C. en Atlanta. Los
 resultados que recibimos de ellos se muestran en el cua -
 dro VII

CUADRO VII

PRUEBA DE IRA DE LAS MUESTRAS AISLADAS CON DIFERENTES ANTISUEROS ENVIADOS POR LOS LABORATORIOS DEL C.D.C. EN ATLANTA

Antisuero de pollo	Titulo con la muestra 1223 Acapulco	Titulo con la muestra 1276 Monterrey
A/PR/8/34 (H_1N_1)	1:10	1:10
A/FM/1/74 (H_1N_1)	1:10	1:10
A/Jap/305/57 (H_2N_2)	1:10	1:10
A/Aich-L/2/68 (H_3N_2)	<u>1:1280</u>	<u>1:1280</u>
A/New Jersey/8/76 (H_1N_1)	1:10	1:10
A/Victoria/3/75 (H_3N_2)	1:20	1:20
A/Texas/1/77 eq. (H_3N_2)	1:10	ND
A/Bangkok/1/77 (H_3N_2)	1:10	ND
B/Lee/40	ND	1:10
B/Hong Kong/5/72	1:10	1:10
B/Singapore/222/79	ND	1:10

NOTA: ND significa que esta prueba no se realizó
eq. indica que el primer aislamiento de este virus fue de origen equino.

En el cuadro VII se mostro que los virus aislados en el I.S.E.7, se relacionaron con el tipo A/Aichi/2/68.

Los tres aislamientos posteriores correspondieron a la Ciudad de México de las muestras # 1310, #1437 y # 1438, las cuales dieron la prueba de H₁ positiva desde los primeros pases por embrión de pollo, aunque los títulos fueron muy bajos, aumentando lentamente en los pases sucesivos, el cuadro VIII muestra dichos resultados.

CUADRO # VIII
REACCION DE HEMAGLUTINACION PARA LOS AISLAMIENTOS
PROCEDENTES DE LA CIUDAD DE MEXICO

Pase No.	Título de la muestra # 1310	Título de la muestra # 1437	Título de la muestra #1438
1	1:1	1:2	1:2
2	1:2	1:8	1:8
3	1:4	1:32	1:32
4	1:8		
5	1:32		

Se realizó la reacción para la caracterización de los de los aislamientos con los antisueños recibidos en el año de 1985, los resultados se muestran en el cuadro IX.

CUADRO # IX

REACCION DE IHA PARA EL VIRUS DE LA INFLUENZA CON LAS MUESTRAS DE LA CIUDAD DE MEXICO

Antisueno	Título de	Título de	Título de
	la muestra # 1310	la muestra # 1437	la muestra # 1438
A/Bangkok/1/79	1:160	1:160	1:160
A/England/333/80	1:160	1:160	1:160
B/Singapore/222/79	1:160	1:160	1:160

Los resultados se compararon con la reacción de los antígenos con sus antisueños homologos, mostrados en el cuadro II. Dicha comparación no permitió la identificación de los virus aislados, ya que se presentaron reacciones cruzadas con los antisueños utilizados; las posibles causas pudieron ser:

a). - En comunicaciones de Atlanta en 1984. Mencionan que ocasionalmente pueden encontrarse virus similares a

a los de la influenza "Influenza like" poco comunes - que no dan reacciones de IHA claras con los sueros proporcionados por ellos.

b).- Fenner White en 1984. Sugiere la utilizaci3n de eritrocitos de cokayo para la pruebas de HA e IHA ya que se obtinen mejores resultados.

c).- En los sueros se encuentran inhibidores inespecíficos de la hemaglutinaci3n por lo que debe tratar de eliminarse estos con la Enzima Destructora del receptor (RDE) b con el peryodato de potasio (en comunicaciones de Atlanta) se nos sugiri3 el uso de peryodato de potasio.

Se ensayo la HA e IHA con los gl3bulos rojos de cokayo, tambien se utilizo gl3bulos rojos de humano tipo "O" positivo, pero los resultados fueron semejantes. Al realizar el tratamiento de los sueros una parte con RDE y otra con peryodato de potasio se encontro que dichos antisueros no funcionaban adecuadamente puesto que presentaron reacciones cruzadas con los diversos antígenos

De Atlanta se nos comunico que todos los aislamientos que no puedan identificarse con los antisueros que se reciben de alla deben de ser enviados inmediatamente a-

a alguno de los dos centros internacionales de referencia, ya que ellos cuentan con reactivos que dan mayor especificidad, con estos se puede encontrar la diferencia de los tipos de influenza con mayor exactitud, por tal motivo se remitieron las muestras para que fueran estudiadas allá.

Los resultados que se enviaron de Atlanta son mostrados en el cuadro X.

CUADRO # X

REACCION DE IHA PARA EL VIRUS DE LA INFLUENZA H₃N₂ (C.D.C. ATLANTA)

Ags. de referencia	Suero de huones					
	A/Bangkok 1/79	A/Bangkok 2/79	A/Philippines 2/82	A/Taiwan 16/83	A/Caen 1/84	A/Mississippi ppr/1/
A/Bangkok/1/79	1:1280	1:160	1:320	1:640	1:80	1:640
A/Bangkok/2/79	1:320	1:2560	1:160	1:80	1:160	1:640
A/Philippines/2/82	1:160	1:80	<u>1:320</u>	1:80	1:160	1:320
A/Taiwan/16/83	1:320	1:40	1:80	1:640	1:40	1:160
A/Caen/1/84	1:40	1:80	1:160	1:160	1:1280	1:160
A/Mississippi/1/85	1:160	1:160	1:640	1:320	1:640	1:1280
Muestras						
1437	1:40	1:40	<u>1:320</u>	1:80	1:320	1:320
1438	1:80	1:40	<u>1:320</u>	1:80	1:160	1:640

En el cuadro X se pudo observar que los aislamientos logrados en el laboratorio del I.S.E.7., correspondieron al virus A/Philippines/2/82 (H₃N₂). De la muestra # 1310 se nos informó que no se pudo recuperar el virus en Atlanta, cabe recordar que nos fue difícil aumentar el título de esta muestra en el laboratorio.

Cuando se trabajaron las muestras para encontrar el virus de la influenza resultaron dos muestras más con una hemaglutinación positiva; pero al realizar la caracterización viral para dicho virus los resultados fueron negativos, estos datos se muestran en el cuadro XI.

CUADRO # XI
REACCION DE LA REMAGLUTINACION

Pase No.	Título de la muestra # 1346	Título de la muestra # 1352
1	Dudoso	Neg.
2	1:8	1:32
3	1:32	1:64

Hasta el momento de realizar la prueba de hemaglutinación no sabíamos que se trataba de otro tipo de virus por tanto se trabajó como si fuera influenza es decir, los líquidos cosechados con hemaglutinación positiva fueron confrontados con los antisueños de referencia enviados al laboratorio en el año de 1985, los resultados se muestran en el cuadro XII.

CUADRO # XII

IHA CON SIEROS ANTI-INFLUENZA

Antisueños	Título de la muestra # 1348	Título de la muestra # 1352
A/England/333/80	Neg.	Neg.
A/Bangkok/1/79	Neg.	Neg.
B/Singapore/222/79	Neg.	Neg.

La prueba de IHA nos mostro que los aislamientos realizados no correspondian a el virus de la influenza ya que en el cuadro XII se observo una reaccion negativa hacia este virus. La HA puede ser positiva debido a varios factores como son:

- a).- La presencia de hemaglutininas bacterianas
- b).- Cuando se encuentran presentes virus hemaglutinantes como el de Newcastle

Se realizaron a dichas muestras cultivos bacterianos para buscar algun posible contaminante presente en los líquidos pero no se encontraron bacterias. Por tanto se inicio la busqueda del virus de Newcastle, para dicho proposito se realizaron pruebas de IHA con sueros anti Newcastle los cuales fueron proporcionados por la Escuela Nacional de Ciencias Biologicas E.N.C.B. los antisueros proporcionados estaban rotulados como suero anti Newcastle # 136 y suero anti Newcastle # 162. El cuadro XIII muestra los resultados obtenidos de la reaccion de IHA con los antisueros de Newcastle.

CUADRO # XIII

REACCION DE LA IHA PARA EL VIRUS DE NEWCASTLE

<i>Antisueros</i>	<i>Título de la muestra # 1348</i>	<i>Título de la muestra # 1352</i>
<i>Newcastle # 136</i>	<i>1:640</i>	<i>1:320</i>
<i>Newcastle # 162</i>	<i>1:320</i>	<i>1:640</i>

Con los resultados anteriores nos dimos cuenta que los líquidos cosechados presentaban el virus de Newcastle en esos lotes de embriones de pollo.

DISCUSION DE RESULTADOS

A pesar de que el aislamiento del virus de la influenza en embrión de pollo y su identificación por medio de la reacción de Inhibición de la Hemaglutinación son procesos relativamente fáciles de llevar a cabo en el laboratorio, deseamos llamar la atención sobre algunos problemas que en ocasiones pueden presentarse como es el hecho de que en los últimos años la situación epidemiológica de la influenza se ha visto complicada por la aparición de cepas inesperadas pertenecientes a subtipos ya desaparecidos de la circulación. Estos hechos hacen que el problema de la aparición o reaparición de los nuevos virus de la influenza se coloque en un primer plano. (Pérez y colaboradores 1980).

En nuestros estudios se encontraron siete muestras que dieron reacción positiva hacia la Hemaglutinación una procedente de la Ciudad de Monterrey N.L., otra de la Ciudad de Acapulco Gro. y cinco de la Ciudad de México. La prueba de Inhibición de la Hemaglutinación mostró que 4 correspondieron a el tipo de influenza H_3N_2 , de la muestra # 7370 de la Ciudad de México

presento diversos problemas en el laboratorio, no se logra conocer a que tipo de virus de la influenza pertenecian dos muestras fueron neutralizadas por el anti Newcastle.

Las muestras procedentes de las Ciudades de Acapulco y Monterrey presentaron reacciones cruzadas en la prueba de IHA con los antisueños de influenza A y B, utilizando los anti sueños con que se contaba en el laboratorio del I.S.E.T. no fue posible determinar a que tipo de virus de su influenza pertenecian, estas muestras se enviaron a el C.D.C. en Atlanta. En el cuadro VII se muestra que nuestros aislamientos se encuentran relacionados con el virus A/Aichi/2/68 H₃N₂ dicho virus no se encuentra circulando actualmente en el mundo.

Las tres muestras procedentes de la Ciudad de México dieron reacción positiva hacia la hemaglutinación presentandose reacciones cruzadas al mismo título cuando se realizo la prueba de IHA con los anti sueños de influenza A y B.

Stewart-Harris 1976 y Fenner White 1984 mencionan que existen varios problemas relacionados con las cepas

que circulan actualmente en el mundo; tratamos de encontrar las causas de los problemas que se presentaban por lo tanto se utilizaron globulos rojos de diferentes animales, tratandose tambien de aumentar el titulo del virus por pases sucesivos en embrión de pollo, se realizo la inhibición de la hemaglutinación de las muestras con sueros anti Newcastle; al tratar los sueros con la RDE una parte y otra con peryodato de potasio se encontro que dichos antisueros no funcionaban adecuadamente ya que presentaban reacciones cruzadas a titulos semejantes con los diferentes antigenos por lo anteriormente mencionado las muestras se enviaron a Atlanta de ahí se nos informo que dos de nuestros aislamientos se relacionaban con el tipo A/Philippines/2/82 H₃N₂, de una de las muestras no se logro recuperar el virus, con esta muestra se habian presentado desde el principio algunas dificultades en el laboratorio del I.S.E.T. como fueron, el problema de aumentar y mantener el titulo; como lo muestra el cuadro VIII en nuestro caso se requirieron hasta cinco pases para la obtención de titulos adecuados de HA, ya que por ejemplo el dia que se cosechaban los líquidos se tenia un

título de 1:8 y al siguiente día cuando se trataba de -
caracterizar a el virus, éste había disminuido a un -
título de 1:2 a pesar de que se tenía almacenado en -
refrigeración

Las dos muestras que pertenecieron a el virus A/Phi-
lipinos/2/82 H₃N₂ y que presentamos en el cuadro X - -
están relacionadas con los otros virus del tipo A como
el Mississippi y el Caen a un título igual o mayor que
con su antígeno y su antisuero homólogo, esto se debe
a que existe un factor de memoria que ha sido llamado -
"pecado original antigénico" indicándonos que los - -
animales o personas cuando tienen sucesivas exposiciones
con los virus de la gripe la respuesta de los anticuer-
pos va dirigida principalmente a los antígenos de la -
cepa única con la que fue inicialmente infectado aun
cuando desarrollan también anticuerpos al paso del tiem-
po contra el nuevo virus que ha sido infectado, y con -
un mayor número de exposiciones.

Las pruebas de HA e IHA deben de realizarse a tempe-
ratura ambiente y debido a que en el verano en el labo-
ratorio aumenta la temperatura nos vimos en la necesi-
dad de enfriar las placas de microtitulación e incluso

algunas veces mantenerlas en refrigeración antes de realizar la prueba de caracterización viral, esto fue con el fin de evitar problemas de la elución de la partícula viral con los glóbulos rojos.

Dos muestras cuya HA fue positiva, al llevar a cabo la IHA con sueros anti-influenza dieron resultados negativos frente a este virus, esto nos sugirió la posibilidad de que las hemaglutininas presentes en el líquido fueran de origen bacteriano ó de algunos virus como lo son: parainfluenza, parotiditis y el virus de Newcastle. (Palmer, Dowdle y Schild 1975; J.T. Siehinga and G.F. de Boer 1988)., realizamos cultivos bacterianos en medios enriquecidos pero no se encontraron bacterias presentes en los líquidos, procedimos a la identificación de los aislamientos realizando pruebas de IHA con sueros anti Newcastle, en el cuadro XIII se mostró la presencia de este virus en los embriones de pollo, por lo que fueron desechados y se busco otro proveedor.

Los embriones de pollo fueron proporcionados ahora por los laboratorios PFIZER.

CONCLUSIONES

- 1.- Se logro aislar e identificar el virus de la influenza de cuatro muestras.
- 2.- Dos virus pertenecieron al tipo A/Aichi/2/68 (H_3N_2) uno procedente Monterrey N.L. y otro de Acapulco Gro., de la Ciudad de México - se aislaron dos virus del tipo A/Philippines-12/82 (H_3N_2).
- 3.- Se presentaron cepas inesperadas que se - consideraban desaparecidas de la circulación.
- 4.- En el periodo de junio de 1984 a julio de - 1985 la influenza no presento un caracter - epidemico.
- 5.- La técnica para el aislamiento viral en - (E.P.), así como su identificación por la - IHA son procesos relativamente fáciles de - llevar a cabo.

RESUMEN

En el I.S.E.T. se realizó el estudio de 145 muestras para aislar el virus de la influenza procedentes de diversos lugares de la República Mexicana y de la Ciudad de México

Las muestras fueron inoculadas en embriones de pollo de 9 a 11 días de edad, la técnica utilizada para la identificación viral fue la Inhibición de la Hemaglutinación (IHA)

Siete muestras resultaron positivas al llevar a cabo la reacción de HA, una procedente de Monterrey N.L., otra de Acapulco Gro., ambas relacionadas con la cepa A/Aichi/2/68 (H_3N_2), el cual es un virus que se consideraba desaparecido de la circulación. Tres aislamientos procedentes de la Ciudad de México, dos de ellos fueron A/Philippines/2/82 (H_3N_2) de uno de los aislamientos no se logró esclarecer a que tipo de virus pertenecía.

Las dos muestras restantes con reacción de HA positiva resultaron negativas al llevar a cabo la prueba de IHA con sueros anti-influenza, estas fueron identificadas como virus de Newcastle.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Acha, N.P. y Szyfres, B. (1986). Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes de hombres y a los animales. 2a. Edición. Organización Panamericana de la Salud. 488-494.
- 2.- Ballew, H.C., Craig, L.H. and Forrester, F.F. (1984). Laboratory Methods for Diagnosing Respiratory Virus Infections U.S. Department of Health and Human Services. 33-45; 53-59.
- 3.- Benenson, S.A. (1983). El control de la enfermedad transmisibles en el hombre. 13a. Edición. Organización Panamericana de la Salud. 232-236.
- 4.- Bunnows, W. (1987) Tratado de Microbiología Vigésima edición, Ed. Interamericana 786-795.
- 5.- Cate, R.T. (1987). Clinical Manifestations and Consequences of Influenza. The American Journal of Medicine. 82 (6A) 15-18.
- 6.- Davis, D.B., Dulbecco, R., Eisen, N.H., y Ginsbergs S.H. (1985). Tratado de Microbiología 3a. Edición Salvat Editores. 912-928.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 7.- De Jong, J.C., De Ronde-Verloop, F.M., Veenedaaf-Van Henk, T.M., Weijers, T.F., Bijlsma, K. & Osterhaus, A.D.M.E. (1988). Antigenic Heterogeneity within Influenza A(H₃N₂) virus strains. *Bulletin of the World Health Organization*, 66 (1): 47-55.
- 8.- Farreras, V.P. y Rozman, C. (1972). *Medicina Interna*, tomo 11 Marín. S.A. 860-872.
- 9.- Fenner, F. y White, O.D. (1984). *Virología Médica* 2a. Edición. La Prensa Médica Mexicana. 239-269; 350-360.
- 10.- Fierce Joshua. (1986). *International Textbook of Medicine*. 2a. Edition. W.B. Saunders Company - Chapter 63: 507-514.
- 11.- Harmon, W.N., (1985). *Department of Health and Human Services Center for Disease Control Atlanta*. (comunicaciones).
- 12.- Holtzman, E. and Nookoff, B.A. (1988). *Virus Estructura y Dinámica Celular* 3a. Edición Ed. Interamericana. 315-322.
- 13.- Jensen, H.M. and Wright, A.N. (1987). *Introducción a la Microbiología Médica* Ed. Prentice Hall Hispanoamericana S.A. Capítulo 36.

- 14.- Kendal, P.A. (1984). *Reactivos de la Organizaci6n Mundial para la Salud para la identificaci6n del Virus de La Influenza 1984-1985*. Department of Health and Human Services, C.D.C. Atlanta.
- 15.- Kendal, P.A. (1987). *Epidemiologic Implications of Changes in the Influenza Virus Genome*. The American Journal of Medicine. 82 (6A); 4-14.
- 16.- Lennette, H.E. and Schmidt, J. (1975). *Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamidial Infections*. 5a. Edition. American Public Health Association 585-606.
- 17.- Mandell L.G., Douglas, G.R. and Bennett, E.J. (1975). *Principles and Practice of Infections Disease*. Volumen 2 Ed. Wiley Medical Publication 1135-1162.
- 18.- Muramoresch-Kursluk. (1977). *Comparative Virology*, Academic Press 407-416.
- 19.- Merchant, J.A. y Packer, R.A. (1980). *Bacteriologia y Virologia Veterinaria*. 3a. Ed. Espanola. Ed. Acribia. Capitulo 49.
- 20.- Mohs, E. (1985). *Infecciones respiratorias agudas en ninos. Posibles medidas de control*. Bulletin -

Of Sanitary panamericana 98 (2); 113-121.

- 21.- Palmer, F.D., Doulla, R.W., Coleman, T.M. & Schild C.G. (1975). *Advanced Laboratory Techniques for - Influenza Diagnosing*. U.S. Department of Health - Education and Welfare. 1-61.
- 22.- Pérez, B.M.P., López, G.C., Llacer, A., Najera, E. y Najera, R. (1980). *La circulación del virus de - la influenza y su repercusión en los niveles de - anticuerpos en el hombre*. *Bol. Of. Sanit. Panam.* 89 (2); 113-121.
- 23.- Pyhala, C. R., Pyhala, L., Valle, M. and Aho, K. - (1987). *Egg-grown and tissue-culture grown variants of influenza A(H₃N₂) virus with special attention to their use as antigen in seroepidemiology.* - *Epidemiol. Infect.* 99 (3); 745-753.
- 24.- Schanflner, W. (1987). *Influenza from the Public Health Perspective*. *The American Journal of Medicine*. 82 (6A); 61-63.
- 25.- Stuart-Harris & Schild, C.G., (1976). *The virus - and the disease*. Edward Arnold Publishers. 23-24; 97-108; 112-126; 208-211.
- 26.- Swain and Dodds. (1976). *Clinical Virology.* - -

- Edimburgo and London. 92-94; 149-155.
- 27.- WHO Memorandum. (1980). A revision of system of nomenclature for influenza virus. Bulletin of Health Organization. 58 (4); 585-591.
- 28.- WHO (1984). Properties of recent Influenza Virus - Strains Collaborating Center for Influenza C.D.C. Atlanta. (comunicaciones).
- 29.- Wong, Ch.C., Higuera, B.T. (1977). Nomenclatura actual de los virus de la influenza. Rev. Med. Hosp. Genl. 40 (4); 277-281.
- 30.- Wong, Ch. C. (1975). Influenza en Control de Enfermedades Transmisibles 2a. Edición Secretaría de Salud y Asistencia. 204-213.
- 31.- Yamashita Makoto, Kasai, H. (1988). Influenza B Virus Evolutionary Patterns with those of Influenza A and C Viruses. Virology. 163 (1); 112-122.